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

**Determinação da isotretinoína em medicamentos por
cromatografia líquida de alta eficiência e caracterização por
análise térmica e difração à laser**

Carla Aiolfi Guimarães

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:
Profa. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2007

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

**Determinação da isotretinoína em medicamentos por
cromatografia líquida de alta eficiência e caracterização por
análise térmica e difração à laser**

Carla Aiolfi Guimarães

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2007

19040

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013309

Ficha Catalográfica

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

Guimarães, Carla Aiolfi
G963d   Determinação da isotretinoína em medicamentos por cromatografia
líquida de alta eficiência e caracterização por análise térmica e
difração à laser / Carla Aiolfi Guimarães. -- São Paulo, 2007.
114p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Santoro, Maria Inês Rocha Miritello

1. Droga : Controle de qualidade : Indústria farmacêutica
2. Cromatografia líquida de alta eficiência : Análise I. T. II.
Santoro, Maria Inês Rocha Miritello, orientador.

615.40685   CDD

Carla Aiolfi Guimarães

**Determinação da isotretinoína em medicamentos por
cromatografia líquida de alta eficiência e caracterização por
análise térmica e difração à laser**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro
orientadora/presidente

Prof. Dr. Ivo Lebrun

Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos

São Paulo, dezembro de 2007.

06 dez. 2007

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve e a vida é muito para ser insignificante. Eu faço e abuso da felicidade e não desisto dos meus sonhos. O mundo está nas mãos daqueles que tem coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos.”

Charles Chaplin

À Deus

"Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos" (Pv 16.3).

Em especial aos meus pais, Antonio Carlos e Vilma, a quem devo minha vida e formação, meu reconhecimento e gratidão pela paciência, compreensão, pelo amor que sempre me dedicaram e pelo apoio constante nesta jornada. Ao meu irmão Arthur pelo incentivo e amizade, a minha avó Hermínia pela sabedoria e experiência. Meu amor e reconhecimento eterno.

Ao meu noivo Farid pela compreensão, apoio, incentivo, confiança e colaboração durante a realização deste trabalho.

“Merci d'être cette personne si spéciale. Je t'aime mon Chéri! Et t'aimerai! toute ma Vie.”

À querida amiga Joyce, pela sólida amizade construída ao longo do trabalho, obrigada pelo incentivo, apoio, carinho, companheirismo, pela paciência e pelas palavras de incentivo, quando tudo parecia muito difícil e também pela ajuda incondicional. Muito obrigada por dividir as angústias e as alegrias.

À professora Maria Inês Rocha Miritello Santoro,
pela oportunidade e orientação, possibilitando o
cumprimento de mais um grande passo em minha
vida.

Aos professores colaboradores, professor Jivaldo do Rosário Matos e professora Lucildes Pita Mercuri, agradeço por acreditarem no desenvolvimento deste trabalho, pela atenção, confiança, paciência, incentivo e inestimável apoio. Ao Drº Ivo Lebrun pela valiosa contribuição.

AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que colaboraram para que este trabalho se tornasse realidade, e por isto, o meu eterno agradecimento.

À coordenadoria do curso de pós-graduação em fármacos e medicamentos da faculdade de ciências farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos Professores e colegas do laboratório de controle de qualidade físico-químico. Em especial à Ingrid e Mariana, pela amizade, ajuda e apoio em todos os momentos.

Ao Professor Jivaldo do Rosário Matos pela disposição do laboratório ao Renato e colegas do LATIG (IQ).

Ao Instituto Butantan, laboratório de bioquímica e biofísica e ao Dr. Ivo Lebrun, pela compreensão, confiança e colaboração no empréstimo do cromatógrafo, para o desenvolvimento da metodologia, o qual foi essencial no desenvolvimento deste trabalho. A Aline pela valiosa ajuda.

À Dra. Fernanda Portaro, pelo apoio, colaboração, sugestões e amizade, obrigada pelo carinho e atenção.

À professora Maria Vitória Lopes Barda Bentley, pela disposição de equipamento de microscopia, a FAPESP projeto número 04/09465-7, e a Fábria pelo auxílio na análise microscópica.

À professora Lucildes Pita Mercuri pela disposição da central analítica da Universidade Federal de São Paulo, pelo uso do cromatógrafo líquido e à Paula pelo apoio técnico.

Ao André Borges Braz, e ao Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na análise e na interpretação do tamanho de partícula.

À Iria R. da Silva, pelo apoio, amizade, e colaboração durante todo o período do mestrado, obrigada pela atenção e carinho com que você sempre me recebeu e por toda sua ajuda.

À Regina M. Rojas pela colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

À Dra. Vera Ponçano, pelo incentivo, amizade, apoio.

À Bete e ao Jorge pelo auxílio durante esses anos que estive no mestrado.

À Leila Aparecida Bonadio da biblioteca do Conjunto das Químicas, pela conferência da bibliografia utilizada no trabalho.

Ao meu tio Sidnei pela paciência e colaboração por todas as vezes que me ajudou com problemas em meu computador.

Aos meus amigos pela compreensão e torcida durante minha ausência social e afetiva no período do mestrado. Em especial à Thaís e Roberta pelo carinho e incentivo e por simplesmente me escutar.

A todos aqueles que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS.....i

LISTA DE TABELAS.....iv

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....v

1. INTRODUÇÃO.....01

2. OBJETIVOS.....05

2.1. Objetivo geral.....05

2.2. Objetivos específicos.....05

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Isotretinoína.....06

3.1.1. Histórico.....06

3.1.2. Uso terapêutico.....09

3.1.3. Mecanismo de ação.....11

3.1.4. Posologia/ Farmacocinética.....14

3.1.5. Efeitos adversos.....15

3.1.6. Química.....16

3.1.7. Estabilidade.....17

3.2. Conceitos e definições.....19

3.2.1. Medicamento inovador.....19

3.2.2. Medicamento genérico.....	20
3.2.3. Medicamento similar.....	21
3.2.4. Equivalentes farmacêuticos.....	22
3.2.5. Bioequivalência.....	22
3.2.6. Biodisponibilidade.....	23
3.2.7. Dissolução.....	25
3.2.8. Tamanho de partícula.....	26
3.3. Métodos analíticos : aspectos gerais.....	27
3.3.1. Análise do tamanho de partícula.....	27
3.3.1.1. Espalhamento de luz laser de baixo ângulo (difração à laser).....	29
3.3.1.2. Microscopia.....	30
3.3.2. Análise térmica.....	32
3.3.2.1. Termogravimetria e termogravimetria derivada –TG/DTG.....	34
3.3.2.2. Calorimetria exploratória diferencial – DSC.....	36
3.3.2.3. Aplicações dos métodos termoanalíticos no estudo da cinética de degradação térmica.....	37
3.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	39
3.3.4. Metodologia analítica para determinação da isotretinoína.....	42

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material.....	45
4.1.1. Amostras.....	45
4.1.2. Padrão.....	48
4.1.3. Reagentes e solventes.....	48
4.1.4. Vidrarias e acessórios.....	49

4.1.5. Equipamentos.....	49
4.2. Métodos.....	50
4.2.1. Determinação do tamanho de partículas.....	50
4.2.1.1. Difração à Laser.....	50
4.2.1.2. Microscopia.....	52
4.2.2. Análise térmica.....	53
4.2.2.1. Termogravimetria e termogravimetria derivada	53
4.2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial.....	54
4.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	55
4.2.3.1. Desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos....	55
4.2.3.2. Preparo da fase móvel.....	56
4.2.3.3. Validação da metodologia analítica para análise das amostras comerciais.....	56
4.2.3.3.1. Preparação da solução padrão.....	56
4.2.3.3.2. Construção da curva de calibração.....	57
4.2.3.3.3. Linearidade.....	57
4.2.3.3.4. Preparação das amostras.....	58
4.2.3.3.5. Teste de repetibilidade – Precisão.....	59
4.2.3.3.6. Teste de recuperação – Exatidão.....	60
4.2.3.3.7. Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) – Sensibilidade.....	62

5. RESULTADOS

5.1. Tamanho de partícula.....	64
5.2. Análise térmica.....	68

5.2.1. Estudo termoanalítico.....	68
5.2.2. Cinética de degradação térmica.....	74
5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	84
5.3.1. Curva de calibração.....	86
5.3.2. Linearidade.....	87
5.3.3. Teste de repetibilidade – Precisão.....	88
5.3.4. Teste de recuperação – Exatidão.....	89
5.3.5. Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) – Sensibilidade.....	90
 6. DISCUSSÃO.....	 91
 7. CONCLUSÕES.....	 104
 8. BIBLIOGRAFIA.....	 107

ANEXOS

RESUMO

A isotretinoína (ácido-13-cis-retinóico) é uma substância derivada da vitamina A. É indicada no tratamento de formas graves de acne nódulo císticas e resistentes a terapias anteriores. É uma substância termo e fotossensível, que requer cuidados especiais na formulação, produção e acondicionamento. Como atualmente existem várias preparações comerciais contendo essa substância, é importante que se estudem e validem métodos analíticos para sua determinação quantitativa, que possam ser aplicados no controle de qualidade destas formulações. O objetivo da pesquisa foi, portanto, a caracterização e a determinação quantitativa da isotretinoína, e avaliação do comportamento desta substância em três formulações farmacêuticas comercializadas no Brasil. Esta análise comparativa foi realizada através das técnicas de difração à laser, microscopia de luz polarizada, termogravimetria, e calorimetria exploratória diferencial, para caracterizar, respectivamente, a distribuição do tamanho de partícula e comportamento térmico. Não foi encontrada diferença entre o comportamento térmico das três amostras, mas na medida do tamanho de partícula, houve uma grande variação entre duas das três amostras. O tamanho de partícula é um fator conhecido que altera a absorção de moléculas no trato-gastrointestinal, podendo haver conseqüências na segurança e eficácia do produto. Foi desenvolvida e validada uma metodologia, para determinação quantitativa da isotretinoína nessas três amostras estudadas, um método de cromatografia líquida de alta eficiência, rápido e simples, empregando detector no UV. Duas das amostras ultrapassaram o limite de isotretinoína de 90 – 110% especificado pela Farmacopéia Americana. A apresentação, controle de qualidade e a caracterização de formulações farmacêuticas são importantes para

assegurar a qualidade do produto final. Embora a cromatografia, análise térmica e determinação do tamanho de partícula sejam utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, o tamanho de partícula ainda não é uma especificação definida pelas farmacopéias. Isso mostra a importância de futuras pesquisas, determinando o efeito dessas variações encontradas, possibilitando o estudo comparativo, entre a qualidade de produtos contendo isotretinoína em pacientes através de testes de bioequivalência.

Palavras chaves: isotretinoína – medicamentos - cromatografia líquida de alta eficiência – análise térmica- difração à laser.

Determination of isotretinoin in pharmaceuticals products by high performance liquid chromatography and characterization by thermal analysis and laser diffraction

ABSTRACT

Isotretinoin (13-cis retinoic acid), a vitamin A derivative is indicated for the treatment of several forms of acne, cystic nodules resistant to other therapies and also acts as an inhibitor of proliferation neoplastic cells. It is a thermolabile substance, light and air sensitive and these physicochemical properties impose special cares in the formulation, development and packaging to avoid the isotretinoin degradation. Currently some preparations available on the stores contain this substance and it is important to study and validate quantitative methods to determine the quality control of these formulations. The purposes of research were to characterize, to determine quantitatively the isotretinoin and check the behavior of this substance in three pharmaceutical formulations available on the Brazilian stores. This comparative analysis was performed by laser diffraction/polarized light microscopy, thermogravimetry and differential scanning calorimetry techniques in order to characterize, respectively, the particle size distribution and the thermal behavior. The thermal stability was found to be none a variable parameter, the isotretinoin average particle size was significantly different in 2/3 formulations. Interestingly, the particle size is a factor known to affect the absorption of the molecules from the gastrointestinal tract and, therefore, may have consequences for the safety and the efficiency of the product. Its was also developed and validated one analytical method for quantitative determination of isotretinoin in these three samples. A simple and rapid method using an isocratic high performance liquid chromatography and UV

detection was developed. The average isotretinoin content of two ranged outside the 90 - 110% date showed into United States Pharmacopeia specifications. Eventually, the design, the quality control and the characterization of the pharmaceutical formulations are important to ensure the quality of the final product. Although the chromatography, thermal and particle size analysis were currently used in the pharmaceutical industry, the particle size is not a specification stated in the pharmacopeias and should be considered with more interest. It would seem important; therefore, that future research determines the full effect of particle size variation and a comparative study with pharmaceutical quality of isotretinoin products on patient exposure to isotretinoin by comparative bioequivalence testes.

Keywords: Isotretinoin – pharmaceuticals - high performance liquid chromatography - thermal analysis - laser diffraction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química dos retinóides empregados como agentes terapêuticos.....	08
Figura 2.	Estrutura química da isotretinoína.....	16
Figura 3.	Sobreposição das curvas da distribuição estatística das amostras: A, B e C.....	65
Figura 4.	Média da distribuição das partículas pelo volume (μm) em três diferentes amostras testadas.....	66
Figura 5.	Partículas de isotretinoína na amostra A; amostra B e na amostra C. Visualização utilizando microscopia de luz polarizada.....	67
Figura 6.	Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/mim e sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) da isotretinoína padrão.....	68
Figura 7.	Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/mim e sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) do óleo de soja.....	69
Figura 8.	Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/mim e sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) da amostra A.....	70
Figura 9.	Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/mim e sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) da amostra B.....	71
Figura 10.	Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/mim e sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) da amostra C.....	71
Figura 11.	Sobreposição das curvas TG das três amostras de isotretinoína A, B e C, obtidas a 10°C/mim e sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min).....	72
Figure 12.	Sobreposição das curvas DTG das três amostras de isotretinoína A, B e C, obtidas a 10°C/mim e sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min).....	73

Figure 13.	Sobreposição das curvas DSC das três amostras de isotretinoína A, B e C, obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL/min).....	73
Figura 14.	Curvas TG do padrão de isotretinoína em atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min) e razões de aquecimento de 2,5; 5; 10; 15; 20°C/min.....	75
Figura 15.	Curvas do logaritmo da razão de aquecimento em função da temperatura ($\log A \times 1/T$).....	76
Figura 16.	Gráfico da função $G(x)$ pelo inverso da temperatura para a isotretinoína padrão.....	77
Figura 17.	Curvas TG da amostra A em atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min) e razão de aquecimento de 2,5; 5; 10; 15; 20°C/min.....	78
Figura 18.	Curvas do logaritmo da razão de aquecimento em função da temperatura ($\log A \times 1/T$).....	79
Figura 19.	Gráfico da função $G(x)$ pelo inverso da temperatura para a amostra A.....	80
Figura 20.	Curvas TG da amostra B em atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min) e razão de aquecimento de 2,5; 10; 15; 20°C/min.....	81
Figura 21.	Curvas do logaritmo da razão de aquecimento em função da temperatura ($\log A \times 1/T$).....	82
Figura 22.	Gráfico da função $G(x)$ pelo inverso da temperatura para a amostra B.....	83
Figura 23.	Perfil cromatográfico da isotretinoína, padrão de referência.....	84
Figura 24.	Perfil cromatográfico da amostra A.....	85
Figura 25.	Perfil cromatográfico da amostra B.....	85

Figura 26.	Perfil cromatográfico da amostra C	85
Figura 27.	Curva de calibração do padrão de isotretinoína (intervalo de concentração de 5,0 a 30,0 µg/mL) Obtida por CLAE.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação dos retinóides.....	44
Tabela 2.	Peso médio das cápsulas de isotretinoína das amostras comerciais.....	59
Tabela 3.	Esquema para obtenção das soluções para o teste de recuperação.....	61
Tabela 4.	Distribuição do tamanho de partícula (μm).....	66
Tabela 5.	Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da isotretinoína por CLAE empregando o método cromatográfico proposto.....	87
Tabela 6.	Parâmetros estatísticos relativos à curva de calibração da isotretinoína.....	88
Tabela 7.	Dados estatísticos obtidos nas análises das amostras empregando o método cromatográfico proposto.....	88
Tabela 8.	Recuperação da solução padrão adicionada às amostras analisadas empregando o método cromatográfico proposto.....	89
Tabela 9.	Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e de quantificação pelo método cromatográfico proposto para cápsulas de isotretinoína.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%R = Percentual de recuperação

Δm = Variação de massa

ACN = Acetonitrila

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

$C_{20}H_{28}O_2$ = Isotretinoína

CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência

DSC = Calorimetria exploratória diferencial

DTG = Termogravimetria derivada

Grau p.a. = para análise

ICH = International Conference on Harmonisation

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

N_2 = Nitrogênio

pH = Potencial hidrogeniônico

Ph.Eur = European Pharmacopoeia

pKa = Logaritmo da constante de dissociação

r = Coeficiente de correlação linear

RSD = Desvio padrão relativo

SVS = Secretaria de Vigilância Sanitária

TFA = Ácido trifluoracético

TG = Termogravimetria

THF = Tetraidrofurano

Tr = Tempo de retenção

USP = United States Pharmacopeia

UV = Ultravioleta

VIS = Visível

λ = Comprimento de onda

I. INTRODUÇÃO

A isotretinoína ou ácido 13-cis-retinóico, é um isômero sintético do ácido trans-retinóico, também conhecido como tretinoína. Este composto atua na pele inibindo a diferenciação sebácea no interior da glândula sebácea. A isotretinoína é de grande utilidade no tratamento da acne nódulo-cística (LEITE e LEITE, 2005).

No Brasil, o seu uso está limitado ao tratamento dermatológico de *acne vulgaris*. Entretanto, em outros países, principalmente nos EUA, o uso estende-se ao tratamento de lesões neoplásicas, como câncer de células basais, câncer de células escamosas e linfoma de células T (WYATT et al. 2001).

Muitos dos efeitos adversos da isotretinoína são graves e, por isso, sua indicação no tratamento de acne e se restringe ao fracasso prévio com as terapias convencionais. A teratogenicidade é o mais grave dos efeitos tóxicos, é acentuado quando o fármaco é administrado em mulheres no primeiro trimestre de gestação. Por outro lado, problemas simples, como a irritação cutânea, também fazem parte dos efeitos adversos ocasionados pela isotretinoína. Além destes, estão descritos na literatura outros efeitos associados ao uso oral deste fármaco, como a depressão nervosa, aumento dos ácidos graxos livres no sangue e complicações pulmonares (ALMEIDA et al., 1998).

A isotretinoína sistêmica é comercializada como medicamento de marca registrada, similar e genérico, sob a forma farmacêutica de cápsulas de gelatina mole nas concentrações, de 10 e 20 mg. A isotretinoína tópica pode ser encontrada sob forma de gel ou de creme. A forma de administração por via oral encontra-se sob a regulamentação da Portaria 344 MS n.6/99, na qual consta a lista de substâncias sujeitas ao controle especial e venda sob retenção de receita. Os medicamentos de uso tópico são vendidos mediante prescrição médica, mas sem retenção de receita.

O mercado saturado de produtos torna a concorrência acirrada, dessa forma, o fator preço influencia substancialmente a seleção do produto no processo de aquisição de medicamentos. Atualmente, as especialidades farmacêuticas que contém o mesmo princípio ativo, na mesma dosagem e forma farmacêutica são comercializadas no Brasil como similares intercambiáveis, supondo-se que os mesmos apresentem a mesma eficácia e segurança quando administrados ao paciente (STORPIRTIS e CONSIGLIERI, 1995). Entretanto, para apresentar o mesmo desempenho no organismo esses produtos devem cumprir os seguintes requisitos: serem elaborados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação; estarem adequadamente rotulados; serem equivalentes farmacêuticos e bioequivalentes. Por isso a necessidade de estudos comparativos entre os medicamentos disponíveis no mercado.

O curto prazo de validade apresentado pela isotretinoína depende aparentemente das condições de temperatura e armazenamento. Estudos sobre a estabilidade da isotretinoína, determinada por meio de métodos como a microcalorimetria, espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cristalografia, revelam a ocorrência de modificações químicas nas características do produto, em razão da exposição ao oxigênio atmosférico, luz, umidade e altas temperaturas (TAN, et al., 1992; TAN et al., 1993, BERBENNI et al., 2001).

Considerando a viabilidade de execução e obtenção de resultados satisfatórios, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa é o método de escolha para a análise de retinóides, por ser um método rápido, não destrutivo, sensível e possuir boa resolução, usado na separação de isômeros e metabólitos dentro de uma larga escala de polaridade (WYSS, 1990).

Vários estudos para quantificação e de estabilidade da isotretinoína são realizados em plasma e fluidos biológicos, mas poucos são feitos em formulações farmacêuticas contendo esse fármaco isolado ou em associações, devido à sensibilidade ao calor, luz e à oxidação dos retinóides, sua determinação quantitativa em formas farmacêuticas é particularmente importante para o controle de qualidade do produto final e para os ensaios indicativos de estabilidade (GATTI et al., 2001)

Por ser um composto instável que requer cuidados especiais, a isotretinoína, desperta o interesse no estudo de várias formas farmacêuticas visando sua identificação e quantificação em produtos farmacêuticos. O tamanho de partícula que pode variar de produto para produto, não é um parâmetro definido pelas farmacopéias. Assim sendo, é grande a importância da realização de pesquisas para determinação da variação do tamanho de partícula de fármacos em medicamentos visando posterior realização de testes de bioequivalência.

No presente trabalho são propostos métodos para a análise e avaliação de formulações farmacêuticas contendo isotretinoína, comercializadas no mercado nacional.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O trabalho teve como objetivo a caracterização da isotretinoína, e avaliação das formulações farmacêuticas comercializadas no Brasil, aplicando métodos analíticos como; cromatografia líquida de alta eficiência, termogravimetria, calorimetria exploratória diferencial, difração a laser e a microscopia eletrônica de luz polarizada.

2.2. Objetivos específicos

- ✚ Determinação do tamanho de partícula nas formulações;
- ✚ Estudo do comportamento térmico da isotretinoína;
- ✚ Estudo do comportamento térmico das formulações;
- ✚ Estudos preliminares sobre a cinética de degradação térmica;
- ✚ Desenvolvimento de método analítico para separação e quantificação da isotretinoína nas formulações selecionadas.

III. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Isotretinoína

3.1.1. Histórico

Retinóides é uma classe de fármacos que se tornou indispensável aos dermatologistas da atualidade. Começou com a descoberta de Stepp, em 1909, indicando que o extrato lipossolúvel da gema de ovo era essencial para o crescimento de ratos e camundongos. A mesma substância foi também encontrada por McCollum e Davis, em 1913, na gordura animal e no óleo de fígado de bacalhau. Em 1920, Drumond denominou-a vitamina A. Karrer caracterizou sua estrutura química, em 1931, e Isler, finalmente, conseguiu sintetizá-la, em 1947. O ácido all-trans retinóico (tretinoína) foi descoberto por Arens e Van Dorp. A caracterização do ácido all-trans retinóico foi realizada por Zile em 1967. Bollag descobriu a isotretinoína, em 1971 (PAWSON, 1982; BOLLAG e GEIGER, 1983).

A isotretinoína (ácido-13-cis-retinóico) é uma substância derivada da vitamina A. É o estereoisômero sintético do ácido all-trans retinóico (tretinoína). É uma substância termo e fotossensível, que requer cuidados especiais na formulação, produção e acondicionamento (DINIZ et al., 2002).

As recomendações para a nomenclatura das vitaminas, incluindo retinol, retinal e ácido retinóico, foram publicadas, pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) em 1960 e posteriormente revisadas em 1965. O conhecimento da estrutura molecular da vitamina A foi o marco inicial para a procura por derivados químicos e sintéticos com atividade biológica do retinol. Sporn e colaboradores introduziram o termo retinóide em 1976 para abranger todos os análogos estruturais naturais, bem como os sintéticos da vitamina A (SPORN, et al. 1976).

Retinóide é um termo empregado para designar uma classe de compostos cuja estrutura química consiste em quatro grupos isoprenóides unidos de modo cabeça-cauda. O esqueleto dos retinóides naturais é constituído por um anel não aromático de seis átomos de carbono com uma cadeia lateral poliprenóide que é, com poucas exceções, terminada com um grupo funcional constituído de carbono e oxigênio (Figura 1). O metabolismo e o catabolismo dos retinóides provocam o rearranjo destas três partes estruturais do esqueleto dos retinóides justificando a existência de vários análogos com efeitos biológicos potencialmente diversos (GUNDERSEN, et al., 2001).

Vitamina A (retinol)

Ácido all-trans-retinóico (tretinoína)

Ácido 13-cis-retinóico (isotretinoína)

Figura 1. Estrutura química dos retinóides empregados como agentes terapêuticos.

A isotretinoína é considerada o único retinóide natural (primeira geração de retinóides) que apresenta aplicação clínica através da terapia sistêmica para tratamento de acne (ALLEN et al, 1989).

Quimicamente, a síntese da isotretinoína decorre de uma reação de condensação de produtos olefínicos. A condensação pode levar à mistura de estereoisômeros com predominância da forma isomérica 11,13-di-cis, porém, também, com produção de isômeros trans. A forma isomérica 13-cis é sinteticamente obtida por técnicas diferentes que incluem a condensação com adição de um metal de transição como catalisador, preferencialmente, o paládio, e isomerização regiosseletiva por substituição na dupla ligação 11-cis, separando-se os isômeros por cristalização. Outro método empregado na conversão do produto 11,13-di-cis em 13-cis consiste no emprego da irradiação de luz natural à temperatura ambiente, na presença de foto ativador. Nessas

condições reacionais, o produto desejado surge no reator na forma de um precipitado (BOSHETTI et al., 1996).

Em 1999, o laboratório MAG (Milão, Itália) patenteou o processo de síntese e separação da isotretinoína sem o uso de metais de transição em uma das etapas do processo. A síntese é realizada a partir do vinil-beta-ionol preparado da ionona e haleto de vinil magnésio, dando origem a um produto com alta pureza e estabilidade. O uso de metais de transição, como o ródio e o paládio, para promover a isomerização do ácido 11,13-di-cis retinóico, não somente apresenta custo elevado, como, também, dificulta a separação do ácido 13-cis-retinóico. (DINIZ, 2003). A isotretinoína ainda não é produzida no Brasil; assim, os laboratórios dependem da importação da matéria-prima.

3.1.2. Uso terapêutico

A isotretinoína está indicada no tratamento da acne vulgar – nas formas nódulo-cística e recalcitrante, em especial com tendência à cicatriz. Indicações menos formais incluem acne ainda que discreta e que esteja afetando psicologicamente o paciente, acne com edema facial sólido, doenças foliculares como foliculite por gram-negativo, foliculite eosinofílica associada ao HIV, rosácea nas formas papulopustulosas e granulomatosas, foliculite dissecante do couro cabeludo. Tem ótima ação também nas doenças de queratinização, em especial Darier, bem como em outras doenças. Em geral, apresenta uma toxicidade bem maior, sobretudo óssea, com o uso continuado

e/ou principalmente com altas doses quando comparada a acitretina (AZULAY, 1999).

Apesar de possuir vários dos efeitos farmacológicos da vitamina A, a aplicação terapêutica do ácido all-trans-retinóico por via oral é bastante limitada, também, devido aos intensos efeitos colaterais de hipervitaminose, que ocorrem mesmo em concentrações terapêuticas. O uso oral de tretinoína é restrito aos casos de leucemia promielocítica aguda (APL) e em pacientes refratários ou intolerantes aos regimes citológicos de quimioterapia, e apenas como fármaco de segunda escolha (WARREL, et al. 1991).

A regulamentação específica dos retinóides foi iniciada com a Portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária, em 1993, que estabelecia o esquema de venda controlada de isotretinoína. Em 1996, após a entrada no mercado do etretinato e da acitretina, acrescentou-se a Portaria 132 de 10/9/96, que passou a regular as três formas – isotretinoína, etretinato e acitretina. Por esta portaria, a prescrição e a dispensação das formas sistêmicas ficou restrita a médicos e a farmácias especialmente credenciadas. Ficou também proibida a manipulação e foram colocadas algumas restrições na manipulação de formas tópicas. A Portaria, no entanto não incorporou plenamente todas as recomendações do parecer, tais como a contra-indicação no período da gravidez. Foi acrescentado o sistema de receituário e consentimento, após informação obrigatória, e prestação de contas sobre o uso do produto, e restrita a importação previamente autorizada pela SVS.

Essa Portaria foi substituída em 7/3/97 pela Portaria nº 97, que modificou os prazos que antecedem a gravidez e descentralizou a aprovação do credenciamento das farmácias para as vigilâncias Estaduais (ANVISA).

A forma de administração por via oral encontra-se sob a regulamentação da Portaria 344 MS n.6/99, na qual consta a lista de substâncias sujeitas ao controle especial e venda sob retenção de receita. Os medicamentos de uso tópico são vendidos mediante prescrição médica, mas sem retenção de receita.

A isotretinoína sistêmica é comercializada no Brasil como medicamento de marca registrada, genérico e similar, sob a forma farmacêutica de cápsulas de gelatina mole nas concentrações 10 e 20 mg.

3.1.3. Mecanismo de ação

Sabe-se que a vitamina A e seus derivados encontram-se presentes na célula sebácea e que possuem capacidade de inibir os principais mecanismos de formação da acne: a hiperqueratinização do infundíbulo sebáceo e a hiperprodução de gordura.

A acne é uma dermatose freqüente na sua forma simples, que acomete 80% dos adolescentes e adultos jovens. As formas graves de acne são denominadas nódulo cístico crônica, considerada uma verdadeira doença que modifica a imagem corporal e é de difícil tratamento, extremamente séria quanto às conseqüências psicossociais. Estes tipos de acnes acometem mais

frequentemente o sexo masculino e, até o momento, são desprovidos de um tratamento eficaz (CUNLIFFE e COTTERILL, 1975).

A acne é uma doença comum, provocada pela obstrução dos folículos pilossebáceos que são localizados na camada intermediária da pele, a derme. Os folículos contêm glândulas sebáceas que produzem sebum. Em condições normais, os ácidos graxos são eliminados através dos poros e se espalham na epiderme, mas nas pessoas predispostas a acne, ocorre um espessamento da pele que bloqueia a saída do sebum. O acúmulo de secreção pode atrair bactérias, principalmente a *Propionibacterium acnes*, gerando, assim um processo inflamatório. Os folículos pilossebáceos estão distribuídos no corpo todo, com exceção das palmas das mãos e plantas dos pés, no entanto, em algumas áreas as glândulas sebáceas são maiores, como face, peito e costas. Por isso, tais regiões são preferidas dos populares 'cravos' e 'espinhas'. O fator genético é o principal causador, pela tendência à produção hormonal andrógena excessiva. E esses androgênicos regulam a atividade das glândulas sebáceas. A eclosão dos hormônios durante a puberdade explica a predominância da acne na fase juvenil, porém a enfermidade pode se estender até a vida adulta provocando sérios problemas emocionais (CUNLIFFE e COTTERILL, 1975).

A acne é um distúrbio causado pelo funcionamento inadequado das glândulas sebáceas. O número, o tamanho e a reatividade dessas glândulas são definidos geneticamente. As glândulas sebáceas são os órgãos-alvo para os hormônios androgênicos. Elas se desenvolvem na puberdade e secretam grandes quantidades de gordura (AZULAY, 1999).

A isotretinoína demonstra grande eficiência terapêutica relacionada à indução e controle da diferenciação epitelial, nos tecidos secretores de muco ou queratinizantes, à produção de prostaglandinas E_2 , de colágeno, de precursores da queratina como os tonofilamentos e tonofibrilas, e ao controle da proliferação de *Propionibacterium acnes*. Uma vez que o desenvolvimento das glândulas sebáceas e a exarcebação de sua atividade secretora são fatores essenciais para a ocorrência de lesão inflamatória associada à acne, o bloqueio na produção de sebo, provocado pela isotretinoína, constitui o fator determinante de sua atividade farmacológica no tratamento desta afecção (DINIZ, 2003).

A isotretinoína é eficaz no tratamento da acne por ser sebostático e causar atrofia da glândula sebácea. Age também modificando a composição lipídica do sebo (menor conversão de triglicerídeos em ácidos graxos), inibindo a ação de receptores andrógenos (menor conversão em diidrotestosterona), diminuindo a adesividade dos queratinócitos da ceratose óstiofolicular e inibindo a quimiotaxia de neutrófilos (AZULAY, 1999).

3.1.4. Posologia / Farmacocinética

A sua dose inicial recomendada é de 0,5–1 mg/kg de peso corporal, administrado diariamente, em duas doses divididas; a dose máxima recomendada é de 2 mg/kg de peso corporal diariamente, devendo ser administrada com alimento (STIRLING et al., 2003).

Com a administração oral, as concentrações de isotretinoína no sangue aparecem após um intervalo de tempo inicial de até 2 horas. O perfil de concentração-tempo típico, após uma dose oral única, mostra picos duplos e triplos pronunciados. Isotretinoína é extensivamente (99,9%) ligada à proteína plasmática, quase exclusivamente à albumina. O principal metabólito no sangue após administração oral é a 4-oxo-isotretinoína (ácido 4-oxo-13-cis-retinóico). O fármaco também sofre isomerização *in vivo* em tretinoína, sendo que esta reação é catalizada pela luz (STIRLING et al., 2003).

A absorção oral de isotretinoína é potencializada em até 60% quando administrada nas refeições. Aproximadamente 50-70% de uma dose oral é excretada, não modificada, nas fezes dentro de 72 horas de administração da droga. Isotretinoína não modificada não parece ser eliminada na urina em qualquer quantidade significativa, embora seu metabólito 4-oxo-isotretinoína tenha sido encontrado em quantidades mensuráveis (STIRLING et al., 2003).

Através de oxidação ocorre a metabolização da isotretinoína e de seus isômeros em respectivamente 4-oxo-isotretinoína, 4-oxo-9-ácido-cis retinóico e 4-oxo-ácido retinóico, que também se interconvertem. Durante o tratamento com isotretinoína, a 4-oxo-isotretinoína é encontrada numa concentração 5 a 6 vezes maior do que isotretinoína e os dois são os únicos verdadeiramente seboestáticos. A excreção é essencialmente feita através da bile e da urina (AZULAY, 1999).

3.1.5. Efeitos adversos

Apesar de ser grande aliada no tratamento da acne-nódulo-cística grave, a isotretinoína, quando administrada por via oral, requer grandes cuidados, pois apresenta inúmeros efeitos adversos que vão desde a irritação cutânea até complicações sistêmicas mais graves como a esofagite aguda, pequenas úlceras, edema, complicações gastrointestinais, desconforto muscular, elevação do nível de triglicerídeos, e ainda existem relatos de casos de pacientes que desenvolveram depressão durante o tratamento com isotretinoína. O maior fator de preocupação destes efeitos tóxicos é a teratogenicidade, que atinge vários órgãos do feto, desde o sistema nervoso central até disformia facial, podendo chegar a casos de morte fetal. Outro fator de grande preocupação é o aumento nos níveis de ácidos graxos e triglicerídeos ocasionando a hipertrigliceridemia, que atinge até 25% dos pacientes tratados (ALMEIDA et al., 1998).

Os efeitos colaterais são numerosos e, essencialmente, dose-dependente, à exceção da teratogenicidade que é, indiscutivelmente, o motivo mais preocupante do ponto de vista médico. É certo que 100% dos pacientes apresentarão algum tipo de efeito colateral que pode ser clínico e/ou laboratorial e que, excepcionalmente, são potencialmente fatais ou seriamente preocupantes. Considerando as indicações clínicas e o tempo de uso, poderíamos dizer que um tratamento de acne com isotretinoína é bastante seguro, pois, espera-se a reversão de todos os efeitos colaterais após o término do tratamento (AZULAY,1999).

Dessa forma, o uso da isotretinoína deve ser monitorado para que o sucesso do tratamento possa compensar o risco do paciente que se expõe. Deve-se estar vigilante quanto à manipulação indiscriminada dos retinóides, principalmente a isotretinoína, visto que essa classe de fármacos, sob determinadas condições de manipulação e armazenamento, origina produtos de biotransformação (isômero trans, derivados 4-oxo, entre outros) com caráter tóxico às vezes mais pronunciado do que o do fármaco de origem, podendo assim, ser prejudicial aos pacientes (ALMEIDA, 1998).

3.1.6. Química

A estrutura química da isotretinoína corresponde a:

Figura 2. Estrutura química da isotretinoína.

A isotretinoína, ácido dimetil-3,7-(trimetil-2,6,6-cicloexeno-1-il-1)-9-nonatetraenóico 2,4,6,8 (Figura 2). Apresenta peso molecular de 300,44 g/mol e fórmula molecular ($C_{20}H_{28}O_2$), um pó cristalino amarelo-alaranjado, praticamente insolúvel em água, solúvel em cloreto de metileno e pouco solúvel em álcool, é sensível ao ar, calor e luz, especialmente em solução (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2003).

3.1.7. Estabilidade

Devido à presença de duplas ligações conjugadas, a isotretinoína é sensível à degradação, como oxidação e isomerização, particularmente, na presença de luz e oxigênio. A oxidação é rápida e vários produtos podem surgir; o mais comum é a 4-oxi-isotretinoína. A isotretinoína é uma substância instável, que requer cuidados especiais de formulação, produção e acondicionamento. Por esse motivo, não deve ser manipulada em farmácias magistrais, por não conseguirem reproduzir as condições adequadas e ideais para o preparo de fórmulas contendo esse princípio ativo (DINIZ et al., 2002).

A isotretinoína é uma molécula muito lipofílica, quase insolúvel em água e parcialmente solúvel em óleo. É instável ao calor, luz e ar. Essas propriedades físico-químicas impõem limites consideráveis nas opções de formulação, por exemplo, como a degradação da isotretinoína na forma sólida na presença de ar, que é um processo catalítico e rápido. Desta maneira uma formulação contendo isotretinoína em pó simplesmente não apresenta

estabilidade satisfatória. A suspensão da isotretinoína em óleo é mais estável (TAYLOR e KEENAN, 2006).

A biodisponibilidade é melhorada por um microambiente lipofílico, fornecido pela suspensão oleosa, e também pela diminuição do tamanho da partícula do ingrediente ativo. A suspensão oleosa também minimiza a degradação química, como as preparações lipídicas, especialmente aquelas com baixa quantidade de peróxidos, aumentando também a estabilidade. A composição e a taxa de dissolução das cápsulas podem influenciar também a biodisponibilidade (IOELE et al., 2005).

A decomposição da isotretinoína na presença de ar atmosférico resulta em grande número de subprodutos, originados principalmente da quebra oxidativa do sistema conjugado de dupla ligação. O estágio de degradação depende da pressão parcial do oxigênio, sendo acelerado com a presença de luz e altas temperaturas, e ocorre sem nenhuma seletividade por uma dupla ligação em particular. O aparecimento de componentes amorfos está diretamente relacionado à existência de um processo oxidativo que muda a estrutura molecular, induzindo a perda parcial do empacotamento cristalino (MALPEZZI et al., 1998).

3.2. Conceitos e definições

3.2.1. Medicamento inovador

Medicamentos de referência são, normalmente, medicamentos inovadores, sendo o produto que primeiro recebeu a autorização para comercialização e patente do fármaco, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovados cientificamente, com base em documentação para o uso dessa nova substância (STORPIRTS, 1995).

O medicamento inovador apresenta em sua composição ao menos um fármaco ativo que tenha sido objeto de patente, mesmo já extinta, por parte da empresa responsável pelo seu desenvolvimento e introdução no mercado no país de origem, e disponível no mercado nacional. Em geral medicamento inovador é considerado medicamento de referência (ANVISA).

A ANVISA considera como referência o medicamento inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no país, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registrado.

3.2.2. Medicamento genérico

Os medicamentos genéricos são produtos semelhantes aos medicamentos de referência em quantidade de princípio ativo, concentração, forma farmacêutica, modo de administração e qualidade. Assim devem agir no organismo exatamente da mesma forma que o medicamento referência. São produzidos após expiração ou renúncia da patente e após comprovação de sua segurança e eficácia, através de testes obrigatórios. São comprovadamente tão eficazes e seguros quanto os de marca e, em média, menos onerosos. O conceito principal de um produto genérico é possuir qualidade comparável ao produto inovador e ser amplamente estudado no processo de primeiro registro. Fica assim garantida a sua intercambialidade, ou seja, produtos que podem ser substituídos durante o tratamento sem causar nenhum mal ao usuário (RODRIGUES, 1999).

Para medicamento genérico, o fabricante deve investir no desenvolvimento farmacotécnico de um produto que cumpra com as mesmas especificações *in vitro*, em relação ao medicamento de referência. Entretanto, aceita-se que a formulação e o processo de fabricação não sejam idênticos, o que geralmente ocorre devido aos diferentes equipamentos e fornecedores de matérias-primas empregados por distintos fabricantes, desde que essas diferenças não comprometam a bioequivalência entre os produtos (DIGHE, 1999).

Nesse contexto é fundamental ressaltar que diferenças em relação a características físicas e físico-químicas do fármaco e demais componentes da formulação, bem como no processo de fabricação, podem gerar diferenças na biodisponibilidade que, no caso do genérico, podem comprometer a bioequivalência. Entretanto, tal fator pode ser evitado realizando-se o desenvolvimento farmacotécnico do produto de forma adequada (STORPIRTIS et al., 1999).

Assim sendo, merecem atenção especial as formas farmacêuticas em que o fármaco está presente na forma sólida, cuja dissolução pode ser afetada significativamente pelas características inerentes ao próprio fármaco, bem como pela presença de excipientes que favorecem ou dificultam a dissolução, além das técnicas de fabricação empregadas. Portanto, formas farmacêuticas sólidas de uso oral, de liberação imediata ou modificada, são aquelas que, potencialmente, podem apresentar problemas em relação à biodisponibilidade e à bioequivalência (STORPIRTIS et al., 2004).

3.2.3. Medicamento similar

Medicamento similar é aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, e que é equivalente ao medicamento registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do

produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca (ANVISA).

3.2.4. Equivalentes farmacêuticos

Equivalentes farmacêuticos são especialidades que contém o mesmo princípio ativo (mesmo sal ou éster), na mesma dosagem e forma farmacêutica podendo diferir quanto aos excipientes e técnica de fabricação. Cumprem com os requisitos de identidade, pureza, teor, tempo de desintegração e dissolução (RODRIGUES, 1999). Dois medicamentos são considerados terapeuticamente equivalentes se após a administração na mesma dose molar, seus efeitos em relação à eficácia e segurança são essencialmente os mesmos, o que se avalia por meio de estudos de bioequivalência apropriados, ensaios farmacodinâmicos, ensaios clínicos ou estudos *in vitro*.

3.2.5. Bioequivalência

Medicamentos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos que, ao serem administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação à biodisponibilidade.

A bioequivalência entre diferentes fármacos está baseada na seguinte premissa, que é fundamental: quando dois medicamentos equivalentes em velocidade e em quantidade de absorção são disponíveis na circulação assume-se que são terapeuticamente equivalentes. Assim, o propósito básico dos ensaios de bioequivalência é a identificação de uma alternativa terapêutica que pretende a intercambialidade (ANVISA).

No atual momento, o Ministério da Saúde não dispõe de mecanismos eficientes para garantir a qualidade dos produtos farmacêuticos, não assegurando, principalmente, à bioequivalência dos produtos considerados similares. Fatores ligados às propriedades físico-químicas dos fármacos e excipientes, além das técnicas de manufatura, principalmente no caso de sólidos de uso oral, podem acarretar modificações significativas na dissolução dos princípios ativos, comprometendo a biodisponibilidade (PITTA, 2004).

3.2.6. Biodisponibilidade

O parâmetro utilizado para comparação dos medicamentos está relacionado à absorção. No caso da isotretinoína sob a forma farmacêutica de cápsulas, após a ingestão, a gelatina é digerida e o fármaco, menos compactado do que em comprimido é liberado, se dispersa com facilidade e apresenta boa biodisponibilidade (TAYLOR e KEENAN, 2006), consequentemente exercendo a ação farmacológica desejada.

Biodisponibilidade indica a velocidade e a extensão pela qual um fármaco é absorvido, a partir de um produto farmacêutico e torna-se disponível no local de ação. Esses parâmetros farmacocinéticos são obtidos através da coleta e quantificação do princípio ativo do medicamento em amostras sangüíneas e em intervalos pré-determinados (PITTA, 2004).

A biodisponibilidade tem sido, nos últimos anos, associada à qualidade dos medicamentos por correlacionar a quantidade de princípio ativo absorvido e a velocidade pela qual ocorre o processo, tomando-se por base a forma farmacêutica (PITTA, 2004).

A ANVISA, o órgão que regulamenta e controla a liberação dos medicamentos no Brasil, não indica um método estatístico específico para ser utilizado nos estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Tendo em vista que existem vários métodos estatísticos possíveis, PITTA (2004) demonstrou que os métodos podem gerar conclusões diferentes, ou seja, em determinados casos, se obtém um resultado não bioequivalente com um determinado modelo estatístico e bioequivalente utilizando um outro modelo.

3.2.7. Dissolução

O papel do processo de dissolução na eficácia de uma forma farmacêutica sólida tem sido objetivo de muitas pesquisas desde a década de 60, quando tiveram início as investigações sistemáticas em relação às influências quantitativas da dissolução na biodisponibilidade dos medicamentos (RODRIGUES, 1999).

Considerando que o fármaco para ser absorvido deve estar dissolvido, as formas sólidas são potencialmente candidatas a apresentarem problemas de biodisponibilidade. A etapa de dissolução pode limitar a absorção para fármacos de ação sistêmica administrados por via oral, sendo a absorção um pré-requisito para atividade terapêutica (RODRIGUES, 1999).

Estas deduções surgiram em consequência de uma série de observações da ausência ou diminuição da atividade terapêutica de produtos considerados similares. Nestes casos, as diferenças dos efeitos são relacionadas a fatores que possam alterar o perfil de dissolução do fármaco, tais como: a) solubilidade; b) natureza química (sal, éster, ácido, etc.); c) solvatos, hidratos e anidros; d) polimorfismo; e) estado físico (cristalino ou amorfo); f) variação do tamanho de partícula; g) quiralidade; h) tipo e quantidade dos excipientes e ativo utilizados (RODRIGUES, 1999).

3.2.8. Tamanho de partícula

A influência do tamanho de partícula em relação à velocidade de dissolução é indiscutível. Noyes e Whitney, em 1991 afirmaram que a velocidade de dissolução de um sólido era indiretamente proporcional à área superficial exposta ao líquido solvente. Logo, essa propriedade pode influenciar na desintegração de comprimidos, a velocidade de dissolução *in vivo* e, conseqüentemente, a absorção do princípio ativo (CARAMELLA, 1991).

Fármacos com absorção exclusivamente no estômago ou nas porções superiores do intestino, podem apresentar uma melhora na absorção através da redução do tamanho de partícula. Entretanto, nos casos em que o sítio de absorção encontra-se nas regiões inferiores do intestino, a influência do tamanho de partícula é menor devido ao intervalo de tempo maior existente para que ocorra a dissolução do princípio ativo (RODRIGUES, 1999).

É importante ressaltar que a diminuição do tamanho de partícula nem sempre assegura absorção melhor e mais rápida. Produtos muito solúveis podem apresentar os mesmos níveis plasmáticos, independente do tamanho da partícula (RODRIGUES, 1999).

Fármacos com diferentes tamanhos de partículas, ou seja, áreas superficiais variadas diferirão quanto ao perfil de dissolução para uma mesma massa. Um fármaco dissolverá mais rápido quanto maior for a sua área superficial, ou seja, quanto menor for o tamanho de suas partículas. Por essa

razão muitos fármacos se encontram micronizados de forma a facilitar a dissolução e consequentemente, a absorção. Entretanto, existem alguns casos em que a diminuição do tamanho das partículas não apresenta vantagens para a absorção. Nos casos em que há degradação do fármaco nos líquidos gástricos, a redução do tamanho das partículas é contra indicada. Outros fatores que também exercem influência na área de superfície são as formas da partícula e sua densidade (MARCOLONGO, 2003).

A medida do tamanho de partícula em materiais farmacêuticos é importante porque influencia propriedades físicas, e determina a habilidade do pó em fluir, misturar, granular e dissolver (NARAYAN e HANCOCK, 2005).

3.3. Métodos Analíticos: aspectos gerais

3.3.1. Análise do tamanho de partícula

A existência e a determinação da quantidade exata do fármaco nas formulações farmacêuticas garantem ao paciente a segurança da ação terapêutica desejada. Estudos estão sendo realizados comparando a qualidade dos produtos genéricos com a dos produtos inovadores. Tem sido observada uma deficiência considerável em muitos ingredientes ativos nas amostras de medicamentos genéricos. Assim sendo, para suspensões de moléculas lipofílicas, como é o caso da isotretinoína, não somente a quantidade de princípio ativo é importante em cada cápsula, mas também o tamanho da partícula da isotretinoína, que tem relação com a absorção no trato

gastrointestinal (TAYLOR e KEENAN, 2006). As partículas menores são absorvidas mais rapidamente e mais completamente, fator esse que pode afetar profundamente, tanto a eficácia, quanto os efeitos adversos da medicação.

O conhecimento do tamanho e da distribuição da partícula é um pré-requisito fundamental para muitas operações de produção e processamento envolvendo sistemas de materiais particulados. A distribuição do tamanho de partícula influi de maneira significativa em várias etapas de produção (transporte, compactação, sinterização etc.) e na micro estrutura do material, afetando a resistência mecânica, a densidade e as propriedades térmicas e elétricas dos produtos acabados. Portanto a sua determinação é uma etapa crítica em todos os processos que de alguma maneira envolvam materiais na forma de pós. Caso realizado incorretamente, pode gerar perdas econômicas decorrentes de produtos de baixa qualidade (PAPINI, 2003).

Com o crescente aumento das aplicações de materiais particulados, diversas técnicas de caracterização física têm sido desenvolvidas. Especificamente para tamanho de partícula, é grande a variedade de técnicas disponíveis (PAPINI, 2003).

3.3.1.1. Espalhamento de luz laser de baixo ângulo (Difração à laser)

Faz parte de um conjunto de técnicas onde as partículas são dispersas num fluido em movimento. As partículas de pó causam descontinuidades no fluxo do fluido, que são detectadas por uma luz incidente e correlacionadas com o tamanho de partícula. A luz incidente sofre uma interação segundo quatro diferentes fenômenos (difração, refração, reflexão e absorção), formando um invólucro tridimensional de luz. O formato e o tamanho deste invólucro são afetados pelo índice de refração relativo da partícula no meio dispersante, pelo comprimento de onda da luz e pelo tamanho e formato da partícula (PAPINI, 2003). Detectores estrategicamente posicionados medem a intensidade e o ângulo da luz espalhada. O sinal dos detectores é então convertido para a distribuição de tamanho de partícula através de algoritmos matemáticos (ALLEN, 1997).

O conceito fundamental desta técnica é a teoria de espalhamento Mie que apresenta uma solução matemática para o espalhamento de luz incidente sobre partículas esféricas. Deve ser usada uma baixa concentração da amostra para evitar o espalhamento múltiplo do laser (GUARDANI et al., 2002).

Nas análises de tamanho de partícula a dispersão é muito importante para que agregados ou aglomerados fracos não sejam interpretados como partículas individuais. Além disso, pós bem dispersos tendem a apresentar uma maior estabilidade, o que melhora a reprodutibilidade da análise (PAPINI, 2003).

Para evitar a aglomeração destas partículas é necessário que existam no sistema forças de repulsão que superem as forças de atração. Estas forças de repulsão podem ser criadas, basicamente, por meio do desenvolvimento de cargas elétricas nas partículas – devido à interação entre sua superfície e o meio líquido, formando a dupla camada elétrica (estabilização eletrostática) – e/ou pela absorção superficial de polímeros de cadeias longas que impedem mecanicamente a aproximação das partículas (estabilização estérica) (PAPINI, 2003).

TAYLOR e KEENAN (2006) empregaram a difração a laser para determinar o tamanho de partícula em 14 amostras comerciais contendo isotretinoína e verificaram uma considerável variação entre as amostras.

3.3.1.2. Microscopia

A microscopia é a única técnica de medida direta. Por esta razão é freqüentemente utilizada como método padrão. É possível a realização de medidas relativas não só quanto ao tamanho, mas também à forma das partículas, fornecendo uma quantidade maior de informações do que as outras técnicas convencionais. Para a observação ao microscópio, as partículas são depositadas sobre uma lâmina (PAPINI, 2003).

As imagens projetadas nos microscópios são bidimensionais e dependem da orientação das partículas. Partículas em uma orientação estável tendem a apresentar sua área máxima, fazendo com que as medidas realizadas por microscopia tenham valores maiores do que aqueles apresentados por outros métodos, ou seja, as menores dimensões das partículas são desprezadas. Uma única partícula irregular tem um grande número de dimensões lineares e, por isso, se um dimensionamento for realizado aleatoriamente, esta medida dependerá da orientação da partícula na lâmina do microscópio. As medidas que são dependentes da orientação são chamadas de diâmetros estatísticos, aceitos apenas quando o número de determinações pode representar uma distribuição e quando a orientação é aleatória, isto é, a distribuição de diâmetros medidos em uma direção deve apresentar a mesma distribuição de tamanho quando medida em outra direção (ALLEN, 1997).

Como as partículas são em grande número e medidas individualmente, esta técnica requer a análise de um número de partículas estatisticamente significativo, o que tem demandado a utilização de programas automáticos de análise de imagens (realizados com auxílio de microcomputadores). Este processo inclui várias etapas (1) formação da imagem, (2) aquisição e digitalização da imagem, (3) pré-processamento e realce, (4) segmentação, (5) pós-processamento, (6) realização das medidas (formato, tamanho, contagem ou outro parâmetro selecionado) e (7) processamento, análise e apresentação dos dados (PAPINI, 2003).

Na formação da imagem podem ser usados microscópios ópticos (luz refletida ou transmitida) ou eletrônicos (varredura ou transmissão) (ALLEN, 1997).

3.3.2. Análise térmica

A análise térmica é definida como um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida como função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura (GIOLITO e IONASHIRO, 1988). A termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG), a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) são as técnicas termoanalíticas mais difundidas e empregadas para o desenvolvimento de diferentes estudos e aplicações a grande variedade de matérias (OZAWA, 2000).

O caráter multidisciplinar dessas técnicas tem despertado o interesse dos pesquisadores das mais diversas áreas da ciência aplicada. No campo das ciências farmacêuticas, as técnicas termoanalíticas vem sendo utilizadas nos últimos 30 anos e o crescente interesse é evidenciado pela publicação do livro "*Pharmaceutical Thermal Analysis*" em 1989 (FORD e TIMMINS, 1989).

A termogravimetria é um método analítico, quantitativo e comparativo capaz de produzir resultados rápidos e reprodutíveis. Pode ser usado no controle de qualidade de medicamentos melhorando o produto final a partir da determinação da estabilidade térmica, por métodos cinéticos isotérmicos e não isotérmicos. Estes métodos são mais fáceis de serem empregados para determinações quantitativas (FORD e TIMMINS, 1989).

O estudo da estabilidade é um dos principais fatores que devem ser avaliados no desenvolvimento das formulações farmacêuticas. Estes estudos são realizados rotineiramente pela indústria farmacêutica, porém, requerem longos períodos de armazenamento das amostras, sob condições controladas de temperatura e umidade. As técnicas termoanalíticas apresentam inúmeras vantagens nos estudos de interação entre princípio ativo e excipientes, estudo cinético de degradação e estabilidade de formas farmacêuticas entre outras aplicações. Embora não substituam os estudos convencionais, as técnicas termoanalíticas mostram-se extremamente úteis em estudos de estabilidade, possibilitando a escolha das formulações mais estáveis com extrema rapidez, fator desejável especialmente para indústria farmacêutica (BAZZO e SILVA, 2005).

TAN et al. (1992) examinaram a estabilidade da tretinoína e da isotretinoína por técnicas de microcalorimetria e CLAE. BERBENNI et al. (2001) empregaram técnicas de análise térmica (Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC, Termogravimetria – TG, Termogravimetria acoplada a infravermelho com Transformada de Fourier – TG/FTIR), espectroscopia (FTIR com refletância difusa, UV-visível), espectrometria de massas e difratometria de raio X, para a determinação da estabilidade térmica e a caracterização físico-química de tretinoína e isotretinoína. Através da avaliação por DSC, foi demonstrado que a isotretinoína funde a 180°C, enquanto que a tretinoína funde em temperatura menor, conforme o pico no sentido endotérmico a 150°C, podendo apresentar transição de forma monocíclico-tricíclico.

A aplicação de métodos térmicos de análise, em especial o DSC e a TG, tem sido de fundamental importância no estudo de caracterização, desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos (BUCKTON et al., 1991).

3.3.2.1. Termogravimetria e termogravimetria derivada – TG/DTG

Técnica na qual a massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. O registro é a curva TG ou termogravimétrica; o peso deve ser colocado em ordenadas, com valores decrescentes de cima para baixo e o tempo (t) ou a temperatura (T) em abscissas, com valores crescentes da direita para a esquerda (GIOLITO e IONASHIRO, 1988).

Os experimentos para se avaliar as variações na massa de um material em função da temperatura são executados através de uma termobalança, que deve permitir o trabalho sob variadas condições experimentais. As curvas geradas possibilitam obter informações quanto à estabilidade térmica da amostra, à composição e à estabilidade dos compostos intermediários e produto final.

Na DTG, a derivada da curva de variação de massa em função do tempo, dm/dt , é dada em função do tempo (t) ou temperatura (T). Em outros casos, a derivada da variação de massa com relação à temperatura, dm/dt , é registrada como função do tempo ou da temperatura. Nestes casos, a curva resultante é a derivada primeira da curva TG, em que uma série de picos é obtida em função das etapas de decomposição térmica. Um patamar horizontal na curva TG correspondente, também, a um patamar horizontal na curva DTG uma vez que $dm/dt = 0$. Um ponto de máximo na curva DTG é obtido quando a curva TG apresenta um ponto de inflexão em que a massa está sendo perdida mais rapidamente. A curva DTG, geralmente, apresenta as informações de forma visualmente mais acessível (maior resolução), além de permitir, a partir da altura do pico, a qualquer temperatura, obter a razão de Δm naquela temperatura, como também, permitir a pronta determinação da $T_{\text{máx}}$ (onde Δm ocorre mais rapidamente).

3.3.2.2. Calorimetria exploratória diferencial – DSC

DSC é a técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura (GIOLITO & IONASHIRO, 1988). De acordo com o método de medição utilizado, há duas modalidades: o DSC com compensação de potência e o DSC com fluxo de calor.

No DSC com compensação de potência, a amostra e referência são aquecidas em compartimentos distintos, tornando possível manter a amostra e a referência em condições isotérmicas. Neste caso, se a amostra sofre alterações de temperatura devido a um evento endotérmico ou exotérmico em função do aquecimento ou resfriamento, ocorre uma modificação na potência de entrada do forno correspondente, de modo a se anular esta diferença (WENDLANDT, 1985). No DSC com fluxo de calor, a amostra e a referência são colocadas em cápsulas idênticas, localizadas sobre um disco termoelétrico de constantan (liga metálica constituída de cobre e níquel), e aquecidos por uma única fonte de calor.

Assim, o calor é transferido através do disco para a amostra e a referência, onde o fluxo de calor diferencial entre os dois é controlado por termopares conectados abaixo das cápsulas. Dessa forma, a diferença no fluxo de calor da amostra e da referência é diretamente proporcional à diferença de potência das junções dos termopares (WENDLANDT, 1985).

3.3.2.3. Aplicações dos métodos termoanalíticos no estudo da cinética de degradação térmica

O fato que a temperatura é alterada na análise térmica significa que considerações especiais deverão ser dadas aos fatores termodinâmicos e cinéticos. Fatores termodinâmicos relacionam-se com condições de equilíbrio a qualquer temperatura. Nos cinéticos, a ênfase é sobre a velocidade da reação (SILVA, 1998).

Experimentos com perda de massa correspondem a processos que são heterogêneos por definição e que se mostram complicados pelos passos químicos e físicos considerados na fase condensada. Os processos de degradação, geralmente, consistem de inúmeros passos cada um com seu particular conjunto de parâmetros cinéticos, devendo-se assumir que valores idênticos ou médios são suficientes para bem representar o processo como um todo.

O fato de que a temperatura é alterada na análise térmica significa que considerações especiais deverão ser dadas aos fatores termodinâmicos e cinéticos. Fatores termodinâmicos relacionam-se com condições de equilíbrio a qualquer temperatura. Nos cinéticos, a ênfase é sobre a velocidade de reação (SILVA, 1998).

Quando se trata especificamente de fatores cinéticos, admite-se que o processo normal de acompanhamento de uma reação é executar o experimento em uma série de temperaturas. Isto representa o método isotérmico e na decomposição no estado sólido a reação é dada pelo gráfico da fração decomposta α contra o tempo t , mantendo-se a temperatura constante e repetindo para o experimento com diferentes temperaturas. Pode-se assim elucidar-se o mecanismo de reação a ser identificado, a velocidade específica e a constante de reação $K(T)$ a ser determinada para cada temperatura. Com o gráfico do $\log K(T) \times K(T)$, onde T é a temperatura, em graus Kelvin, do experimento isotérmico correspondente, os termos de Arrhenius, os termos pré-exponenciais A e a energia de ativação E , poderão ser estabelecidos.

De acordo com OZAWA (1965), vários tipos de materiais têm sido estudados por TG, registrando-se variações na massa de amostras aquecidas a uma razão de aquecimento constante. Os inúmeros métodos propostos para a obtenção de parâmetros cinéticos de dados de TG, embora complicados, poderão ser classificados em duas classes, sendo que em ambas as velocidades de decomposição deverão ter a seguinte forma:

$$-dW / dt = A \exp (-\Delta E/RT) W^n$$

Onde W é a fração de massa residual da amostra; T é a temperatura absoluta; R é a constante dos gases; t é o tempo e A , ΔE e n , o fator pré-exponencial, a energia de ativação e a ordem da reação, respectivamente.

Assim, os gráficos de $\log \beta$ (razão de aquecimento) pela temperatura absoluta recíproca para um dado valor de fração de massa poderão originar uma linha reta, de cuja inclinação tira-se a energia de ativação. Em outras palavras, se as curvas TG são dadas com um gráfico de fração de massa por temperatura absoluta recíproca para várias razões de aquecimento, as curvas poderão ser sobrepostas. A linha lateral é proporcional ao logaritmo da razão de aquecimento da curva característica. Através de sobreposições são obtidas as curvas TG principais, as quais representam uma curva padrão mais apurada que aquelas individuais. Este procedimento torna possível a comparação mútua dos dados termogravimétricos a diferentes razões de aquecimento (SILVA1998).

3.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Esta fundamentada na separação diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicabilidade. A CLAE surgiu na década de 60 com base nas teorias instrumentais desenvolvidas originalmente para a cromatografia gasosa (CASS e DEGANI, 2001).

A separação de compostos por CLAE envolve interação entre soluto, fase estacionária e fase móvel, as quais podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou forças de Van der Waals, entre outras. Os métodos de separação podem então ser classificados de acordo com a natureza destas interações. São eles: cromatografia líquida em fase reversa, em fase normal, por pareamento de íon, por troca iônica e por exclusão. A escolha do modo mais adequado vai depender da natureza, massa molecular, polaridade e caráter iônico do soluto (CASS e DEGANI, 2001).

A sílica-gel é a matéria-prima mais importante das fases estacionárias usadas na CLAE. É um material versátil, podendo ter sua superfície alterada por derivação química dos grupos silanóis, possibilitando o surgimento das fases ligadas polares (ciano, diol e amino, etc.) ou apolares (butila, octila ou C₈, octadecila ou C₁₈, etc.). Tradicionalmente as fases ligadas não polares são conhecidas por fases reversas. A cromatografia de fase reversa é o modo mais empregado e envolve a separação de compostos com base na sua hidrofobicidade, por meio do uso de uma fase estacionária não polar e de uma fase móvel polar. Assim a diminuição da polaridade da fase móvel é acompanhada da diminuição da retenção do soluto (WESTON e BROWN, 1997).

A separação de compostos iônicos tende a ser mais complexa do que a de moléculas neutras. A maior parte das substâncias farmacêuticas e cosméticas contém funções ionizáveis como ácidos carboxílicos e amino grupos. A separação de compostos ionizáveis pode ser conseguida por

supressão iônica (uso de tampão na fase móvel e controle de pH a fim de deslocar o equilíbrio da dissociação da espécie para a forma não dissociada ou mais hidrofóbica, aumentando assim a retenção nas colunas de fase reversa), por pareamento iônico ou usando colunas de troca iônica (CASS e DEGANI, 2001).

Enquanto na cromatografia em fase normal a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, no modo reverso a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária. A cromatografia por fase reversa é mais usada na CLAE, uma vez que permite a separação de uma variedade de solutos e uso de fases móveis aquosas.

O princípio da retenção em fase reversa é a hidrofobicidade. A separação em fase reversa se deve principalmente a interação entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária, isto é, a repulsão desta parte do soluto pela fase aquosa (CASS e DEGANI, 2001).

As normas de boa prática de fabricação vigentes exigem que os métodos de testes, utilizados para assegurar as conformidades dos produtos farmacêuticos em relação às especificações estabelecidas, devem atender padrões adequados de exatidão e reprodutibilidade.

A validação de um método analítico é definida como sendo um processo através do qual, estudos de laboratórios são utilizados para garantir que o método em questão atenda às exigências desejadas (BRITTAİN, 1998).

De acordo com a Farmacopéia Americana, os parâmetros de desempenho analítico a serem avaliados são: precisão, exatidão, seletividade, linearidade e variação, resistência e robustez.

3.3.4. Metodologia analítica para determinação da isotretinoína

A cromatografia sempre representou a técnica analítica preferida para a análise dos retinóides e a CLAE tornou-se, o método analítico predominante para a separação e quantificação dos retinóides, tanto em amostras biológicas, quanto em formas farmacêuticas. Ao todo, há um vasto número de retinóides naturais e sintéticos com diferentes polaridades e o desenvolvimento de um método analítico que possa separar todos os retinóides em somente uma análise cromatográfica tem demonstrado ser uma tarefa muito difícil. Deste modo, as condições cromatográficas são muitas vezes elaboradas para cada aplicação analítica pretendida (GUNDERSEN et al., 2001).

Devido à fotolabilidade, à sensibilidade ao calor e à oxidação dos retinóides, sua determinação quantitativa em formas farmacêuticas é importante para o controle de qualidade do produto final e para ensaios indicativos de estabilidade (GATTI et al., 2000).

Foram descritos inúmeros métodos cromatográficos para determinação e quantificação de isotretinoína. O método analítico atual descrito pela Farmacopéia Americana (USP, 2007) é a CLAE fase-normal para análise da isotretinoína em produtos farmacêuticos.

Dentre todas as técnicas cromatográficas descritas na literatura, considerando a viabilidade de execução e obtenção de resultados satisfatórios, a técnica de CLAE em fase reversa tem sido o método de escolha para a análise dos retinóides, apresentando melhor desempenho que CLAE em fase normal (GUNDERSEN et al., 2001). Várias condições cromatográficas foram testadas para a determinação simultânea dos compostos retinóides, utilizando diferentes solventes em diferentes porcentagens, em condições isocráticas ou em gradiente de eluição, assim como em fase normal e em fase reversa (Tabela 1).

Tabela 1. Metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação dos retinóides.

Matriz	Coluna	Fase móvel	Detector (nm)	Referência
Creme e gel	Phenomenex Nucleosil® 5 µm C18 100 A, 250x4.6 mm	TFA 0,01%/ ACN (15:85)	UV 342 nm	TASHTOUSH, et al., 2007
Cápsula	Nucleosil® 100-3 C18 HD, 150x4.6 mm	Metanol/água/ácido acético 100% (80:19,5:0,5)	UV 355 nm	TAYLOR e KEENAN, 2006
Cápsula	Phenomenex Prodigy® 5 ODS ₃ 250x3,2 mm	ACN/etanol/ácido acético glacial 1% (68:8:24)	Fluorescência λ _{em} = 520 nm com λ _{ex} = 350 nm	GATTI, et al., 2000
Forma farmacêutica	Phenomenex Luna® 3 µm C18 180x 4,6 mm	1- metanol/10 mM acetato de amônio (75:25)	UV (λ=350nm)	GATTI, et al., 2001
	Phenomenex Prodigy® 5 ODS ₃ , 250x3,2 mm	2-metanol/THF (84:16) 3-ACN/etanol/THF (73:25:2)	Fluorescência λ _{em} = 520 nm com λ _{ex} = 350 nm	
Plasma	Zorbax® 5 µm ODS 25 cmx4,6 mm	ACN 0,5%/ácido acético (85:15)	UV 365 nm	GADDE e BURTON, 1992
Cápsula	Lichrospher® 100 RP-18 5 µm	ACN/acetate de amônio 1% (90:10)	UV 340 nm e 500nm	CAVIGLIOLI, et al., 2000
Plasma	Lichrospher® SI60 250 x 4 mm	Hexano/diclorometano/dioxano com 1% de ácido acético (78:18:4)	UV 360 nm	LEFEBVRE et al. 1995
Plasma	Inertsil Sílica® 100-5 4,6mmx25cm	1 n-hexano/2-propanol/ácido acético glacial (1000:4,3:0,675) 2 n-hexano/2-propanol/ácido acético glacial (1000:17,5:0,675)	UV 350 nm	MIYAGI, et al., 2001
Plasma	Nova Pak® C18	1-metanol/ACN/THF 5% (65:35) 2-ácido acético aquoso 2%	UV 350 nm	DISDIER, et al. 1996
Cremses, géis e cápsulas	Spherisorb ODS® 2 250x4,6mm	Metanol/ACN/ácido acético glacial 0,05% (42,5:32,5:25)	UV 360 nm	SIMMONS et al. 1997.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Amostras

Todas as amostras, inclusive o produto de referência, empregados neste trabalho foram adquiridas em farmácias e drogarias na região da grande São Paulo.

✦ **Produto de referência** (amostra “A”)

Embalagem: cartucho de papelão lacrado, contendo três *blisters*, com 10 cápsulas em cada. As cápsulas estão totalmente embaladas em *blister* de alumínio, opaco, evitando contato direto com a luz.

Forma farmacêutica e apresentação: cápsulas de gelatina mole contendo 20 mg de isotretinoína por cápsula.

Composição: ingrediente ativo: 13-cis-retinóico (isotretinoína). Excipientes: óleo de soja, cera amarela, óleo de soja hidrogenado e óleos vegetais parcialmente hidrogenados.

Materiais e métodos

Cuidados de armazenamento: as cápsulas devem ser armazenadas em temperatura ambiente (abaixo de 30°C).

Lote analisado - B4126; Validade: 24 meses – 11/2008.

✦ **Produto similar** (Amostra “B”)

Embalagem: cartucho de papelão lacrado, contendo três *blisters*, com 10 cápsulas em cada. As cápsulas estão embaladas em *blíster* de alumínio e plástico. Assim sendo, as cápsulas ficam em contato direto com a luz quando retiradas da caixa.

Forma farmacêutica e apresentação: cápsulas de gelatina mole contendo 20 mg de isotretinoína por cápsula.

Composição: ingrediente ativo: 13-cis-retinóico (isotretinoína). Excipientes: Gelatina, glicerina, FD&C Red no.1, dióxido de titânio, metilparabeno, propilparabeno, água purificada, óleo de soja hidrogenado, cera branca, edetato dissódico, butilidroxinisol, óleo de soja.

Cuidados de armazenamento: as cápsulas devem ser armazenadas em temperatura abaixo de 25°C e protegidas da luz.

Lote analisado - lote 1623440; Validade: 24 meses – 02/2008.

✦ **Produto genérico (Amostra “C”)**

Embalagem: cartucho de papelão lacrado, contendo três *blisters*, com 10 cápsulas em cada. As cápsulas estão embaladas em *blíster* de alumínio e plástico. Assim sendo, as cápsulas ficam em contato direto com a luz quando retiradas da caixa.

Forma farmacêutica e apresentação: cápsulas de gelatina mole contendo 20 mg de isotretinoína.

Composição: ingrediente ativo: 13-cis-retinóico (isotretinoína). Excipientes: Gelatina, glicerina, FD&C Red no.1, dióxido de titânio, metilparabeno, propilparabeno, água purificada, óleo de soja hidrogenado, cera branca, edetato dissódico, butilidroxinisol, óleo de soja.

Cuidados de armazenamento: as cápsulas devem ser armazenadas em temperatura abaixo de 25°C e protegidas da luz.

Lote analisado - lote 1638539; Validade: 24 meses – 04/2008.

4.1.2. Padrão

Padrão USP de referência - isotretinoína cat. 1353500, grau de pureza de 99,1% (United States Pharmacopeia). Sob a forma de pó cristalino amarelo alaranjado. Absorção máxima UV 355 nm. Protegido da luz, em atmosfera inerte em refrigerador (+2 °C a +8 °C). Validade, 30 de Dezembro de 2007.

4.1.3. Reagentes e solventes

- ✦ Acetona grau p.a. (Caal®);
- ✦ Acetonitrila grau cromatográfico (Merck®);
- ✦ Ácido trifluoroacético grau cromatográfico (TFA) (Merck®);
- ✦ Tetraidrofurano grau p.a. (THF) (Merck®);
- ✦ Água destilada;
- ✦ Água obtida pelo sistema Milli Q® (Millipore®);
- ✦ Óleo de soja, grau farmacêutico, 100% de pureza (Blanver®).

4.1.4. Vidrarias e acessórios

- ✦ Cadinho de alumínio para análise térmica;
- ✦ Cadinho de platina para análise térmica;
- ✦ Coluna cromatográfica LiChrospher® 100 RP-18 (125 x 4mm, 5µm), (Merck®);
- ✦ Seringa de vidro 100 µL (Hamilton®);
- ✦ Sistema de filtração a vácuo para fase móvel;
- ✦ Unidade filtrante HV em PE com membrana Durapore 0,45µm 13mm, não estéril (Millipore®);
- ✦ Membrana filtrante HV Millex 0,45µm 47mm (Millipore®);
- ✦ Pipeta automática (Eppendorf®);
- ✦ Balões volumétricos âmbar;
- ✦ Vidraria âmbar.

4.1.5. Equipamentos

- ✦ Aparelho de ultra-som (Unique®) - modelo USC 1450;
- ✦ Aparelho medidor de pH DM 21 (Digimed®) – modelo TE 901;
- ✦ Balança analítica AG 200 (Gehaka®);
- ✦ Balança analítica (Ohaus®);
- ✦ Balança analítica (Mettler-Toledo®);
- ✦ Célula calorimétrica DSC (Shimadzu®) - modelo DSC-50; com *software Thermal Analysis Workstation, TA-60WS*;

Materiais e métodos

- ✦ Termobalança (Shimadzu®) - modelo TGA-50; com com *software Thermal Analysis Workstation*, TA-60WS;
- ✦ Cromatógrafo HP® série 1100 dotado de duas bombas um detector UV-VIS e Fluorescência e forno aquecedor de colunas;
- ✦ Cromatógrafo Argilent® - modelo 1100, constituído de bomba quaternária, injetor automático, degaseificador, detector UV-VIS. Equipamento calibrado e qualificado – validade 07 de novembro de 2007.
- ✦ Malvern®, modelo - Mastersizer S long bed Ver. 2.19;
- ✦ Microscopia de Luz Polarizada (Carl Zeiss®, Germany) e *software* analisador de Imagem (Zeiss®),

4.2. Métodos

4.2.1. Determinação do tamanho de partículas

4.2.1.1. Difração à laser

A análise de determinação do tamanho de partícula foi efetuada em equipamento da marca Malvern®, modelo Mastersizer S long bed Ver. 2.19, que permite realizar medidas de tamanho de partícula no intervalo de 0,05 μm a 3,5 mm. O equipamento conta com uma série de acessórios, possibilitando a análise de materiais particulados de natureza diversa, seja mediante dispersão em meio líquido ou em ar. Os acessórios são escolhidos em função das

Materiais e métodos

---

características da amostra a ser analisada e das condições de execução do ensaio.

A verificação do sistema é efetuada pelo menos uma vez ao ano com base em um retículo de referência de difração certificado, de validade indefinida, constituído por discos circulares de cromo depositados sobre um substrato de vidro. Este retículo também conta com certificado de análise segundo método de referência para verificação de calibração de instrumentos de determinação de tamanho de partículas por laser, efetuado pelo fabricante.

Condições experimentais:

- ✦ Meio de dispersão: Acetona;
- ✦ Rotação da bomba: 70%;
- ✦ Tipo de acessório: MS-1; small volume sample dispersion unit;
- ✦ Intervalo de medida (lente): 0,05 a 900 μm (lente 300 RF);
- ✦ Índice de refração considerado: Presentation = 3QHD (1.7290, 0.1000, 1.3300);
- ✦ Número de medidas por determinação: 1.000 ("measure sweeps");
- ✦ Número de determinações consideradas: 10;
- ✦ Tipo de distribuição: Material polidisperso;
- ✦ Temperatura: Ambiente (+/- 22°C).

Preparação da amostra:

O conteúdo de uma cápsula foi disperso em acetona, a adição da amostra foi efetuada até obter-se uma concentração de partícula (concentração óptica) entre 5 e 25 %. A determinação da distribuição do tamanho de partícula foi realizada em três séries de dez determinações. Cada conjunto de determinações compreende a execução automática de 10 determinações de mil campos (totalizando, portanto, 10.000 medidas, de modo a garantir a representatividade da análise).

4.2.1.2. Microscopia

A visualização do tamanho de partícula foi realizada por Microscopia de Luz Polarizada (ZEISS) e Software analisador de Imagem (ZEISS). Uma gota de cada amostra foi depositada sobre uma lâmina.

4.2.2. Análise térmica

4.2.2.1. Termogravimetria e termogravimetria derivada

As curvas TG/DTG foram obtidas a partir da termobalanças modelo TGA-50 (Shimadzu®). Essa termobalança detecta variações de massa da ordem de 1 µg e sua capacidade máxima é da ordem de 200 mg. O forno opera a temperatura ambiente até cerca de 1000°C. Os experimentos foram executados empregando cadinho de platina, atmosferas dinâmicas de ar comprimido (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min (temperatura ambiente a 800°C). A massa da amostra foi em torno de 5,0 mg. Todas as curvas TG/DTG foram corrigidas com subtração da linha base (curva TG obtida nas mesmas condições analíticas e utilizando o cadinho vazio). Periodicamente as condições da instrumentação são verificadas empregando amostra padrão de oxalato de cálcio monohidratado ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), pois apresenta três perdas de massa bem definidas e características.

Para a avaliação dos parâmetros cinéticos, utilizou-se o mesmo sistema, obtendo-se curvas TG/DTG nas razões de aquecimento de 2,5; 5,0; 10; 15; 20°C/min, atmosfera dinâmica de ar e massa de amostra de $\pm 5,0$ mg em cadinho de platina. Para o tratamento dos dados, empregou-se o *software* de cinética instalado no sistema.

4.2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial

As curvas DSC foram obtidas a partir da célula DSC-50 da Shimadzu®. Usou-se cápsula de alumínio parcialmente fechada, razão de aquecimento de 10°C/min, atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min), massa de amostra entre 1 – 2 mg, no intervalo de 25 – 500°C.

O equipamento foi calibrado usando-se para tal os metais *índio* e *zinco*, de pureza 99,99%, com pontos de fusão, respectivamente, em 156.6°C e 419,5°C, calculando-se o fator de correção conforme especificação do fabricante. O fluxo de calor foi ajustado conforme a entalpia de fusão do elemento do *índio* metálico (28.45 J/g).

As curvas em branco para os ensaios foram obtidas nas mesmas condições e utilizando cadinhos vazios, em ambos os sensores (amostra e referência).

4.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

4.2.3.1. Desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos

Com base em dados fornecidos pela literatura, foram efetuadas várias tentativas de separação e análise quantitativa da isotretinoína. Para estabelecer a fase móvel ou sistema eluente ideal, várias combinações de solventes foram empregadas em diferentes proporções. As vazões experimentais foram aquelas compatíveis com a coluna cromatográfica. O comprimento de onda empregado foi aquele descrito pela literatura (TASHTOUSH et al., 2007). Após estudos sistemáticos, para padronização do método proposto foram fixados os seguintes parâmetros cromatográficos:

1. Coluna cromatográfica: LiChrospher® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm),
2. Vazão: 1,0 mL/min;
3. Temperatura: temperatura do local de trabalho 24°C ± 1°C;
4. Volume de injeção: 20 µL;
5. Deteção: UV 342 nm
6. Fase móvel: ácido trifluoroacético 0,01% (TFA):acetonitrila (15:85, v/v%).

4.2.3.2. Preparo da fase móvel

A fase móvel foi preparada em balão volumétrico, por diluição de 0,5 mL de TFA em 500 mL de água purificada MilliQ®, à temperatura ambiente. A proporção de solvente orgânico foi adicionada posteriormente. O volume final foi filtrado a vácuo em membrana filtrante de 0,45 µm. Procedeu-se a degaseificação do sistema em aparelho de ultra-som por 15 min.

4.2.3.3. Validação da metodologia analítica para análise das amostras comerciais

A validação da metodologia analítica foi baseada nas recomendações da International Conference on Harmonisation (ICH), European Pharmacopoeia (Ph.Eur.) e United States Pharmacopeia (USP).

4.2.3.3.1. Preparação da solução padrão

Foram pesados analiticamente 50,0 mg do padrão de isotretinoína e transferidos para balão volumétrico de 200 mL, dissolvendo-se e completando o volume com acetonitrila. Obteve-se solução com concentração final de 250,0 µg de isotretinoína/mL.

4.2.3.3.2. Construção da curva de calibração

Alíquotas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mL da solução padrão (250 µg/mL) foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume com acetonitrila, obtendo-se soluções com concentrações finais de 5,0; 10,0; 15,0; 20; 25; 30 µg de isotretinoína/mL.

Todas as soluções padrão foram filtradas em unidades filtrantes e posteriormente injetada no cromatógrafo no volume de 20 µL.

A curva de calibração foi construída com valores da concentração versus a área do pico obtida, com os seis níveis de concentração obtidos a partir da diluição da solução padrão. A equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.3.3.3. Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde a sua capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma variação conhecida. Recomenda-se para o estabelecimento da linearidade no mínimo cinco concentrações, que devem variar de 80% a 120% da concentração a ser analisada na determinação do teor e de 70% a 130% na análise da uniformidade de conteúdo (USP, 2007).

A linearidade foi avaliada através da proporcionalidade das respostas entre a média das áreas dos picos obtidos e as concentrações do padrão empregado para a curva de calibração.

4.2.3.3.4. Preparação das amostras

Para cada amostra comercial de 20 mg de isotretinoína por cápsula foram pesados 20 cápsulas, individualmente, e determinado o peso médio (Tabela 2).

O conteúdo da cápsula foi removido diretamente com o uso de solvente e agitação. A cápsula foi aberta com o uso de bisturi e colocada em recipiente de vidro contendo 10 mL de THF, para que a concentração de isotretinoína atingisse 2,0 mg/mL. Foi transferido uma alíquota de 1,0 mL da solução para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com acetonitrila, obtendo-se uma solução de concentração igual a 0,2 mg/mL. Após a solubilização, outra alíquota de 1,0 mL foi retirada e transferida para outro balão volumétrico de 10 mL, o volume do balão foi completado com acetonitrila, obtendo-se uma solução de concentração final de 20,0 µg de isotretinoína/mL, esse processo foi realizado para as três amostras (A, B e C).

Tabela 2. Peso médio das cápsulas de isotretinoína das amostras comerciais.

Amostra	Peso médio (mg)	DPR (%)	Quantidade de fármaco declarada (mg)	Quantidade excipiente (mg)
A	302,20	0,45%	20	282,2
B	308,08	0,93%	20	288,08
C	298,94	1,40%	20	278,94

* Média de 20 cápsulas para cada amostra.

DPR (%) desvio padrão relativo em relação a média.

4.2.3.3.5. Teste de repetibilidade – Precisão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio (USP, 2007). Recomenda-se que a precisão seja estimada empregando-se no mínimo, nove determinações de três concentrações, uma baixa, uma média e uma alta, em triplicata de cada determinação ou, um mínimo de seis determinações da concentração esperada (USP, 2007).

Tal parâmetro foi determinado através da análise repetitiva (dez determinações) da amostra, na concentração de 20 µg/mL. As amostras foram preparadas conforme procedimento descrito 4.2.3.3.4.

4.2.3.3.6. Teste de recuperação - Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito com referência. A exatidão é calculada como a porcentagem de recuperação através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame adicionada a um meio de composição definida (USP, 2007).

Para a realização do ensaio, avaliou-se a concentração de isotretinoína resultante após a adição de quantidades crescentes de padrão às soluções das amostras. A porcentagem recuperada foi determinada comparando-se os valores obtidos na análise das soluções amostra, antes e após a adição de concentração conhecida de padrão. A recuperação do método foi avaliada para todas as amostras comerciais.

Preparou-se solução padrão de isotretinoína e amostras (200 µg/mL). Foram transferidas alíquotas da solução padrão e da amostra para um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com acetonitrila (em triplicata), obtendo-se as seguintes concentrações, conforme o esquema ilustrado na *Tabela 3*.

Materiais e métodos

O percentual de recuperação (%R) foi calculado através da seguinte equação:

$$R \% = \frac{Ca - Cna}{Cp} \times 100$$

Onde:

R% = Porcentagem do padrão recuperada;

Ca = Concentração de fármaco encontrado na amostra adicionada no padrão;

Cna = Concentração de fármaco encontrada na amostra não adicionada de padrão;

Cp = Concentração teórica de padrão.

Tabela 3. Esquema para obtenção das soluções para o teste de recuperação.

Quantidade de isotretinoína (µg)			
Balão volumétrico	Solução padrão	Solução amostra	Quantidade teórica
Padrão	20,0	-----	20,0
Amostra	-----	20,0	20,0
1	5,0	20,0	25,0
2	10,0	20,0	30,0
3	15,0	20,0	35,0

4.2.3.3.7. Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) - Sensibilidade

O limite de detecção é a concentração mais baixa da substância em exame que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade. O limite de detecção pode ser determinado por vários métodos. O método de escolha é baseado no desvio padrão e na inclinação da curva de calibração e é expresso como:

$$\text{Limite de detecção} = \frac{\sigma}{b} \times 3,3$$

Onde:

σ = desvio padrão médio da resposta

b = inclinação da curva de calibração

O limite de quantificação é a concentração mais baixa da substância em exame presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitável. Em alguns casos o LQ é definido como a menor concentração apresentada na curva padrão. Pode ser determinada a partir do desvio padrão médio e da inclinação da curva de calibração. Sendo expresso como:

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{\sigma}{b} \times 10$$

Onde:

σ = desvio padrão médio da resposta

b = inclinação da curva de calibração

O valor de b pode ser estimado a partir da curva de calibração da substância em questão, enquanto que a estimativa do valor do σ pode ser obtido por vários caminhos, como, por exemplo, baseado no desvio padrão do branco, ou na curva de calibração.

V. RESULTADOS

5.1. Tamanho de partícula

Seguem os resultados da determinação do tamanho de partícula das três formulações comerciais A, B e C.

O gráfico representa a distribuição estatística do volume em porcentagem pelo diâmetro da partícula (μm), exibindo uma sobreposição das curvas das amostras A, B e C, pelo método de difração à laser (Figura 3).

A técnica empregada gera um resultado de distribuição do tamanho de partícula a partir da conversão dos dados de espalhamento da luz laser. Este procedimento considera unicamente o fenômeno físico de espalhamento da luz e não necessita de qualquer amostra de referência para obtenção de resultados da mesma forma a análise independe do número de partículas.

Resultados

Figura 3. Sobreposição das curvas da distribuição estatística das amostras, A, B e C – distribuição acumulada abaixo (%) x diâmetro de partículas (μm).

A Tabela 4 e a Figura 4 mostram os resultados estatísticos obtidos por difração à laser das três amostras. O histograma mostra o diâmetro médio das partículas onde o produto A aparece três vezes menor do que o produto B e o produto C.

Tabela 4. Distribuição do tamanho de partícula (μm).

Amostra	D [v, 0.1]	D [v, 0.5]	D [v, 0.9]	D [4,3]
A	2,94	10,04	22,74	11,66
B	7,82	29,27	55,30	30,80
C	8,26	25,57	64,93	33,37

D [4,3] = Média da distribuição do tamanho de partículas*

D [v, 0.9] = diâmetro (μm) no qual 90% das partículas passam*

D [v, 0.5] = diâmetro (μm) no qual 50% das partículas passam*

D [v, 0.1] = diâmetro (μm) no qual 10% das partículas passam*

*tamanho medido por volume (μm).

Figura 4. Média da distribuição das partículas pelo volume (μm) em três diferentes amostras testadas.

Resultados

A observação visual das amostras foi caracterizada também por microscopia (Figura 5) a fim de observar a aspereza e as diferenças na morfologia das partículas, sendo também evidenciado visualmente pela microscopia a variação do tamanho de partícula das amostras. Observa-se que as partículas da amostra A estão em menor tamanho quando comparadas com as amostras B e C.

Figura 5. Partículas de isotretinoína na amostra A (A); amostra B (B) e na amostra C (C). Visualização efetuada à temperatura de 25°C, utilizando microscopia de luz polarizada com objetiva de 20X.

5.2. Análise térmica

5.2.1. Estudo termoanalítico

As curvas TG/DTG e DSC (Figura 6) obtidas sob atmosfera dinâmica de ar e N₂, evidenciaram que a espécie é termicamente estável até ~ 110°C. As curvas TG/DTG mostram dois eventos principais de perda de massa característico da decomposição térmica da isotretinoína (padrão, sob a forma de pó). A curva DSC evidenciou um evento endotérmico com temperatura de pico em 181°C característico da fusão dessa molécula.

Figura 6. Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min) da isotretinoína padrão.

Resultados

As curvas TG/DTG e DSC sob a atmosfera dinâmica de ar e N_2 , evidenciaram o comportamento térmico do óleo de soja e que esse excipiente das formulações é termicamente estável até $\sim 200^\circ\text{C}$ (Figura 7).

Figura 7. Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ e sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50\text{ mL}/\text{min}$) do óleo de soja.

Resultados

As curvas TG/DTG e DSC das amostras comerciais A, B e C (sob a forma farmacêutica de cápsulas de suspensão oleosa), obtidas em ar e N₂, as três mostram-se similares entre si em relação ao comportamento térmico. O processo de decomposição acompanha o perfil mostrado pelo óleo de soja. As três amostras são termicamente estáveis até ~ 180°C (Figuras 8,9 e 10).

Figura 8. Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min) da amostra A.

Resultados

Figura 9. Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min) da amostra B.

Figura 10. Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min) da amostra C.

Resultados

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam a comparação entre o comportamento térmico das amostras A, B e C, através da sobreposição das curvas TG/DTG e DSC, mostrando assim a similaridade no comportamento térmico das amostras.

Figura 11. Sobreposição das curvas TG das três amostras de isotretinoína, A, B e C, obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min).

Resultados

Figura 12. Sobreposição das curvas DTG das três amostras de isotretinoína, A, B e C, obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min).

Figura 13. Sobreposição das curvas DSC das três amostras de isotretinoína, A, B e C, obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min).

5.2.2. Cinética de degradação térmica

Um programa específico e disponível no *software* do sistema de análise térmica da marca Shimadzu® que permite investigar a cinética de degradação térmica foi aplicado ao padrão, e as amostras A e B, para a obtenção de parâmetros cinéticos. Usou-se o modelo de OZAWA (1965) para o tratamento dos dados termogravimétricos, os quais foram obtidos a partir do aquecimento das amostras até 600°C em razão de aquecimento (2,5; 5; 10; 15; 20°C/min), sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min).

A *Figura 14* apresenta as curvas TG do padrão de isotretinoína (sob forma de pó), para as diferentes razões de aquecimento, relacionando os valores percentuais de perdas de massa com aqueles de energia cinética envolvida na etapa de decomposição da amostra. Para a aplicação do método de OZAWA (1965), recomenda-se considerar apenas os processos de decomposição térmica que ocorrem em uma única etapa e bem definida. Desse modo, para o tratamento cinético considerou-se a etapa de perda de massa entre 26 e 300°C e percentagens de massa de 96,28 a 66,49%. Os valores de energia cinética do processo mostram-se da ordem de 89 a 78 KJ/mol.

Resultados

Figura 14. Curvas TG do padrão de isotretinoína em atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min) e razões de aquecimento de 2,5; 5; 10; 15; 20°C/min.

A Figura 15 mostra as curvas para a determinação da energia de ativação do padrão de isotretinoína que relacionam o logaritmo da razão de aquecimento ao inverso da temperatura. Isso possibilita a obtenção das conversões para os fenômenos de decomposição da amostra.

Resultados

Figura 15. Curvas do logaritmo da razão de aquecimento em função da temperatura ($\log A \times 1/T$) para a amostra de padrão de isotretinoína.

A relação entre a massa residual da amostra pelo tempo reduzido é mostrada na *Figura 16*. No caso, a ordem de reação proposta para o entendimento dos fenômenos relacionados com o processo de decomposição térmica sugere um processo de degradação de ordem 2,0 para o padrão de isotretinoína, uma vez que nessa situação os valores experimentais apresentaram melhor correlação com a curva teórica. A energia cinética média envolvida foi de 83 KJ/mol e um fator de frequência $1,195 \times 10^8$ min.

Resultados

Figura 16. Gráfico da função $G(x)$ pelo inverso da temperatura para a isotretinoína padrão.

A Figura 17 apresenta as curvas TG da amostra A, para as diferentes razões de aquecimento, relacionando os valores percentuais de perdas de massa com aqueles de energia cinética envolvida na etapa de decomposição da amostra. Para a aplicação do método de OZAWA (1965). Para o tratamento cinético considerou-se a etapa de perda de massa entre 26 e 400°C e percentagens de massa de 98,88 a 89,89%. Os valores de energia cinética do processo mostraram-se da ordem de 64 a 57 KJ/mol.

Figura 17. Curvas TG da amostra A em atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min) e razão de aquecimento de 2,5; 5; 10; 15; 20°C/min.

A Figura 18 mostra as curvas para a determinação da energia de ativação da amostra A que relacionam o logaritmo da razão de aquecimento ao inverso da temperatura. Isso possibilita a obtenção das conversões para os fenômenos de decomposição da amostra.

Resultados

Figura 18. Curvas do logaritmo da razão de aquecimento em função da temperatura ($\log A \times 1/T$) para a amostra A.

A ordem de reação proposta para os fenômenos de decomposição térmica parece estar de acordo com um processo de degradação de ordem 2,1 para a amostra A, como pode ser observado na *Figura 19*. A energia cinética média envolvida foi de 61 KJ/mol e um fator de frequência de $2,342 \times 10^4$ min.

Resultados

Figura 19. Gráfico da função $G(x)$ pelo inverso da temperatura para a amostra A.

A Figura 20 apresenta as curvas TG da amostra B, para as diferentes razões de aquecimento, relacionando os valores percentuais de perdas de massa com aqueles de energia cinética envolvida na etapa de decomposição da amostra. Para a aplicação do método de OZAWA (1965). Para o tratamento cinético considerou-se a etapa de perda de massa entre 26 e 400°C e percentagens de massa de 98,04 a 82,39%. Os valores de energia cinética do processo mostraram-se da ordem de 56 a 65 KJ/mol.

Resultados

Figura 20. Curvas TG da amostra B em atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min) e razão de aquecimento de 2,5; 10; 15; 20°C/min.

A Figura 21 mostra as curvas para a determinação da energia de ativação da amostra B que relacionam o logaritmo da razão de aquecimento ao inverso da temperatura. Isso possibilita a obtenção das conversões para os fenômenos de decomposição da amostra.

Resultados

Figura 21. Curvas do logaritmo da razão de aquecimento em função da temperatura ($\log A \times 1/T$) para amostra B.

A ordem de reação proposta para os fenômenos de decomposição térmica parece estar de acordo com um processo de degradação de ordem 0,2 para a amostra B, a energia cinética média envolvida foi de 59 KJ/mol e um fator de frequência de $1,581 \times 10^4$ min. como pode ser observado na *Figura 22* que apresenta o gráfico de $G(x)$ pelo inverso da temperatura.

Resultados

Figura 22. Gráfico da função $G(x)$ pelo inverso da temperatura para a amostra B.

Devido à similaridade apresentada entre as amostras B e C nos resultados de análise térmica e por serem produzidas pelo mesmo fabricante, não foi realizado o estudo de cinética de degradação térmica para amostra C.

Resultados

5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

As figuras a seguir (Figuras 23-26) mostram o perfil cromatográfico da isotretinoína, padrão de referência e amostras, no sistema mencionado, segundo as condições experimentais estabelecidas no item 4.2.3.1.

Figura 23. Perfil cromatográfico da isotretinoína, padrão de referência (20 $\mu\text{g/mL}$). Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18, fase móvel TFA 0,01%/acetonitrila (15:85 v/v), vazão 1 mL/min; volume injetado 20 μL , detecção a 342 nm; temperatura ambiente.

Resultados

Figura 24. Perfil cromatográfico da amostra A (20 µg/mL). Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18, fase móvel TFA 0,01%/acetonitrila (15:85 v/v), vazão 1 mL/min; volume injetado 20 µL, detecção a 342 nm; temperatura ambiente.

Figura 25. Perfil cromatográfico da amostra B (20 µg/mL). Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18, fase móvel TFA 0,01%/acetonitrila (15:85 v/v), vazão 1 mL/min; volume injetado 20 µL, detecção a 342 nm; temperatura ambiente.

Figura 26. Perfil cromatográfico da amostra C (20 µg/mL). Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18, fase móvel TFA 0,01%/acetonitrila (15:85 v/v), vazão 1 mL/min; volume injetado 20 µL, detecção a 342 nm; temperatura ambiente.

5.3.1. Curva de calibração

Visando o emprego da CLAE, foi determinada a melhor concentração da isotretinoína, para obtenção da curva de calibração (Figura 18). As concentrações estabelecidas foram: 5,0; 10,0; 15,0; 20; 25; 30 µg de isotretinoína/mL. Os dados estatísticos obtidos na determinação das curvas de calibração estão apresentados na Tabela 5.

Figura 18. Curva de calibração do padrão isotretinoína (intervalo de concentração de 5,0 a 30,0 µg/mL) Obtida por CLAE, fase móvel: no comprimento de onda de 342 nm, fase móvel TFA 0,01%/acetonitrila (15:85 v/v), vazão 1 mL/min; volume injetado 20 µL, detecção a 342 nm; temperatura ambiente.

Resultados

Tabela 5. Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da isotretinoína por CLAE empregando o método cromatográfico proposto.

Concentração de leitura µg/mL	Área* (mAU)	% RSD Área	Tr	% RSD Tr
5,0	3307,209	0,16%	3,937333	0,50%
10,0	6621,951	3,09%	3,917667	0,06%
15,0	10558,8	1,21%	3,879	0,38%
20,0	13910,53	1,61%	3,864	0,14%
25,0	17872,7	0,42%	3,838667	0,41%
30,0	21351,97	1,28%	3,832333	0,29%

* Média de três determinações para cada concentração.

% RSD – desvio padrão relativo obtido para a média de três determinações.

tr – tempo de retenção

5.3.2. Linearidade

A faixa linear de determinação que obedece a lei de Beer é dependente do composto analisado e do tipo de detector utilizado.

A linearidade foi determinada pelos coeficientes de correlação (r), obtido pela curva de calibração, conforme *Tabela 6*. O método desenvolvido para quantificação da isotretinoína mostrou-se linear na faixa de concentração de 5,0 a 30 µg de isotretinoína/mL.

Resultados

Tabela 6. Parâmetros estatísticos relativos à curva de calibração da isotretinoína.

Parâmetro	Valor
Inclinação (b)	- 328,09
Intercepto (a)	138,86
Coefficiente de correlação linear (r)	0,997
Regressão linear	$Y = a + bx$

5.3.3. Teste de repetibilidade – Precisão

A *Tabela 7* apresenta os dados estatísticos obtidos nas análises das amostras, que confirmam a precisão do método cromatográfico proposto. Os teores percentuais de isotretinoína encontrado nas amostras comerciais pelo método cromatográfico também pode ser observado na *Tabela 7*.

Tabela 7. Dados estatísticos obtidos nas análises das amostras empregando o método cromatográfico proposto.

Amostra	Concentração teórica de isotretinoína (µg/mL)	Valor encontrado (µg/mL)	Teor (%)	RSD ^(a) (%)	Intervalo de confiança ^(b)
A	20,0	21,0	105,0	0,43	105,0 ± 0,05
B	20,0	25,7	128,5	0,70	128,5 ± 0,08
C	20,0	23,1	115,5	0,30	115,5 ± 0,04

^(A) Média de 10 determinações.

^(B) Grau = 95%

Resultados

5.3.4. Teste de recuperação – Exatidão

A recuperação do método foi avaliada para as três amostras sob a forma farmacêutica de cápsulas, no comprimento de onda de 342 nm. As mesmas amostras utilizadas para o teste de precisão, foram empregadas para a realização do teste de recuperação. Os resultados obtidos estão representados na *Tabela 8*.

Tabela 8. Recuperação da solução padrão adicionada às amostras analisadas empregando o método cromatográfico proposto.

Amostra	Concentração final (µg/mL)	Quantidade encontrada * (µg/mL)	Resultado (%)	Média (%)
A	25,0	26,0	100,0	101,2
	30,0	31,3	103,0	
	35,0	36,1	100,6	
B	25,0	30,6	98,0	99,4
	30,0	35,8	101,0	
	35,0	40,6	99,3	
C	25,0	28,2	102,0	99,3
	30,0	32,9	98,0	
	35,0	37,8	98,0	

* Média de 3 determinações

5.3.5. Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) – Sensibilidade

Os valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico proposto e validado para cápsulas de isotretinoína estão representados na *Tabela 9*.

Tabela 9. Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico proposto para cápsulas de isotretinoína.

Parâmetro	Isotretinoína
Limite de detecção (µg/mL)	0,34
Limite de quantificação (µg/mL)	1,0

VI. DISCUSSÃO

Por ser um composto instável que requer cuidados especiais, a isotretinoína, desperta o interesse em estudos visando sua identificação e quantificação em produtos farmacêuticos. O tamanho de partícula que pode variar de produto para produto, não é um parâmetro definido pelas farmacopéias. Assim sendo, é grande a importância da realização de pesquisas para determinação da variação do tamanho de partícula em medicamentos visando a realização de testes de bioequivalência.

O objetivo principal dessa pesquisa foi a caracterização da isotretinoína e a avaliação do comportamento desse composto nas formulações farmacêuticas. Para isso foram utilizados três produtos comercializados hoje no mercado brasileiro, que foram no trabalho codificados como amostras A, B e C.

O trabalho experimental foi iniciado pela caracterização da isotretinoína na substância de referência e nas amostras, mediante o emprego da difração à laser, microscopia eletrônica, e análise térmica.

Todos os produtos estavam na forma de cápsulas gelatinosas em suspensão oleosa, protegidos da luz e do ar em suas embalagens originais. A isotretinoína é uma molécula muito lipofílica. Devido suas propriedades físico-químicas, impõe limites nas opções de formulações, por isso uma formulação contendo isotretinoína em pó, simplesmente não apresenta estabilidade satisfatória, sendo mais estável em soluções oleosas (TAYLOR e KEENAN, 2006). Por este motivo todas as formulações são apresentadas como suspensões em óleo.

Geralmente moléculas lipofílicas em formulação com tamanho de partículas menor, são absorvidas mais rápidas e completamente pelo trato-gastrointestinal, comparada com a mesma molécula formulada com tamanho de partículas maior. O tamanho de partículas menor pode resultar em um aumento das concentrações plasmáticas (CHAUMEIL, 1998). Desde que, moléculas com tamanho de partículas maior podem não ser absorvidas completamente e serem liberadas em um período mais longo. Conforme descrito na literatura, fármacos com diferentes tamanhos de partícula diferem quanto ao perfil de dissolução (MARCOLONGO, 2003) e fármacos com absorção no estômago, podem ter uma melhora na absorção através da redução do tamanho de partículas (RODRIGUES, 1999).

A composição e a taxa de dissolução da cápsula também podem influenciar a biodisponibilidade do fármaco. A biodisponibilidade é melhorada por suspensão em óleo e pela diminuição do tamanho de partícula do princípio ativo. Não somente é importante a quantidade de isotretinoína em cada cápsula, mas também o tamanho das partículas do fármaco uma vez que existe influência direta do tamanho em que as partículas se encontram com a absorção no trato gastrointestinal.

Certamente a isotretinoína com tamanho menor de partículas será absorvida mais completamente e mais rapidamente, resultando em concentrações mais elevadas no plasma. Já as partículas maiores são absorvidas e liberadas em um período de tempo maior (TAYLOR e KEENAN, 2006, CHAUMEIL, 1998).

A absorção do princípio ativo é um fator que pode afetar profundamente, tanto a eficiência da terapêutica, como acentuar os efeitos adversos do medicamento.

O estudo baseado na caracterização do tamanho de partícula mostrou diferenças entre as três amostras estudadas (Figuras 3 e 4 e Tabela 4). A média da distribuição do tamanho de partículas medida pelo seu volume foi muito similar nas amostras B e C (30,80 e 33,37, respectivamente), mas diferiram da amostra A (11,66). As partículas nas amostras B e C são aproximadamente três vezes maior que na amostra A. Além disso, as observações microscópicas confirmaram a variação considerável do tamanho

de partículas obtidas mostrando que as partículas da amostra A estão mais uniformes e em tamanho menor quando comparadas as amostras B e C (Figura 5).

Essa variação no tamanho de partícula pode ter uma consequência terapêutica para o paciente. Por exemplo, o paciente tratado com “a mesma dose” de um produto com tamanho de partícula menor apresentará concentração plasmática mais elevada de isotretinoína e de seus metabólitos, assim sendo, será exposto a uma forma mais intensiva dos efeitos terapêuticos e dos efeitos adversos. Inversamente um paciente tratado com uma formulação com “a mesma dose” de isotretinoína com tamanho de partícula maior, terá uma menor exposição a isotretinoína e seus metabólitos consequentemente menor efeito terapêutico e menor efeito adverso.

A maior consequência surge quando o paciente muda de formulação de um espectro de tamanho de partícula para outro, durante o tratamento, influenciando assim na segurança e eficácia do tratamento. Esta questão é particularmente importante, uma vez que o médico pode não estar consciente desta propriedade.

A análise de tamanho da partícula mostrou similaridade apenas entre as amostras B e C, porém, o comportamento térmico foi similar entre as três amostras analisadas (Figuras 11 e 12). A única diferença foi observada na curva DSC da amostra A que apresentou uma exoterma com maior intensidade (Figura 13). Quando comparada ao padrão de referência, a estabilidade

térmica foi aumentada, comprovando a maior estabilidade da isotretinoína na suspensão oleosa. O padrão de referência da isotretinoína é termicamente estável até ~ 110°C (Figura 6) sofrendo decomposição entre ~110°C até 380°C; com perda de massa aproximadamente de 80%. Entre 380°C e 600°C, a variação de massa foi de 19,6%. A somatória das variações de massa indicou perda de massa total. A curva DSC (Figura 6) mostra um evento endotérmico com temperatura de pico em 181°C, característico da fusão da isotretinoína. Porém, simultaneamente à fusão, ocorre a perda de massa, indicando que o material sofre decomposição térmica ou volatilização parcial assim que funde. A rápida e acentuada perda de massa mostrou a baixa estabilidade térmica do material no estado de fusão. A curva DSC evidenciou que o processo de decomposição térmica é exotérmico.

Todas as amostras da isotretinoína analisadas (amostras A, B e C), são termicamente estáveis até ~ 180°C (Figuras 8 a 10), porém a decomposição térmica do material na formulação ocorre numa faixa de temperatura menor quando comparada ao padrão. Por outro lado, se a comparação for feita com o comportamento térmico do óleo de soja (Figura 7), excipiente das formulações, o processo de decomposição das amostras acompanha o perfil mostrado pelo do óleo. Isso fica mais evidente comparando-se as curvas DSC das três amostras, que apresentam eventos exotérmicos muito similares.

A aplicação de métodos cinéticos baseados em TG vem sendo amplamente relatada na literatura com o intuito de elucidar mecanismos de reação no estado sólido, tais como, decomposição térmica, oxidação, redução, cristalização, polimerização e desidratação de materiais (GIRON, 1990). A análise cinética por TG consiste na utilização de relações que fornecem informações sobre o mecanismo do processo. Com o intuito de determinar os parâmetros cinéticos e verificar os fatores que podem influenciar no perfil das curvas termogravimétricas, foi proposto o estudo com a isotretinoína. A obtenção desses dados torna-se fundamental para a padronização do método e a realização de um estudo preciso sobre o processo de decomposição térmica, principalmente para substâncias sólidas, uma vez que essas quando aquecidas, acarretam no aumento dos movimentos moleculares, atômicos ou iônicos, podendo levar a mudanças na estrutura cristalina, conduzir à sintetização, à fusão ou à sublimação.

A partir do estudo preliminar da cinética de degradação térmica das amostras para a obtenção dos parâmetros cinéticos, foram desenvolvidos os cálculos de acordo com a metodologia proposta por OZAWA (1965). Percebe-se que a ordem de reação proposta para o entendimento dos fenômenos relacionados ao processo de decomposição térmica corresponde a um fenômeno de ordem 2,0, no caso do padrão de isotretinoína, uma vez que os valores experimentais apresentaram uma melhor correlação com a curva teórica. A energia cinética média envolvida foi de 84 KJ/mol e um fator de frequência $1,195 \times 10^8 \text{ min}$ (Figuras 14 a 16). Para a amostra A, entretanto, a ordem de reação proposta para o entendimento dos fenômenos de

decomposição térmica parece estar de acordo com um processo de degradação da ordem 2,1. As energias cinéticas médias envolvidas foram de 61 KJ/mol e um fator de frequência de $2,342 \times 10^4$ min (Figuras 17 a 19). Para a amostra B, uma reação de ordem 0,2 foi proposta, com energia cinética média de 59 KJ/mol e fator de frequência de $1,581 \times 10^4$ min (Figuras 20 a 22). Indicando que não existem diferenças térmicas entre a amostra A e B, pois o valor da energia cinética não obteve uma variação significativa, entretanto a isotretinoína na forma pó apresentou uma energia cinética maior que nas formulações. Considerando que nas amostras A e B o fármaco encontra-se solubilizado na matriz oleosa, esse fato é consistente com o menor valor de energia de ativação obtido para as formulações, onde a isotretinoína já esta dissolvida.

Vários estudos de quantificação e de estabilidade da isotretinoína são realizados em plasma e fluidos biológicos, mas poucos são feitos em formulações farmacêuticas. No entanto, sua determinação quantitativa em formas farmacêuticas é particularmente importante para o controle de qualidade do produto final (GATTI et al., 2001)

Atualmente, a CLAE é uma das técnicas mais utilizadas na quantificação de fármacos. A maioria das farmacopéias preconiza a utilização desta técnica em função de inúmeras vantagens que apresenta com relação à precisão, exatidão, rapidez, seletividade e capacidade de automação. Entretanto, esta técnica apresenta um alto custo e depende de treinamento constante de uma equipe especializada para sua utilização.

A isotretinoína é um composto ionizável, com valor de pK_a de 4,67. Assim sendo, a retenção desse composto por CLAE com fase reversa vai depender principalmente do grau de ionização e consequentemente do pH da fase móvel. Vários fatores podem influenciar na otimização de um método cromatográfico para a análise de compostos ionizáveis. Além disso, dentre os mais críticos está a composição e o pH da fase móvel, e a composição química da fase estacionária.

TASHTOUSH et al. (2007) padronizaram uma metodologia simples e rápida para a separação e quantificação de tretinoína e isotretinoína em formulações dermatológicas, sendo realizada em menos de 15 min, usando a metodologia CLAE fase-reversa, sob as seguintes condições: ácido trifluoroacético 0,01% (TFA): acetonitrila (15:85, v/v%), e detecção no UV em 342 nm. A validação experimental confirmou a precisão e a recuperação da metodologia, que se revelou como boa opção para quantificar e separar a isotretinoína e tretinoína em cremes e géis.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi proposta para quantificação da isotretinoína nas amostras A, B e C. Foram testadas diversas condições cromatográficas, mas, o método escolhido foi o proposto por TASHTOUSH et al. (2007). O método além de simples e rápido, mostrou-se eficaz na quantificação e separação da isotretinoína em formulações farmacêuticas, cápsulas de gelatina mole. Obteve-se o mesmo tempo de retenção (3,8 min), tanto para o padrão quanto para as amostras (Figuras 23 a 26).

A coluna empregada neste estudo foi a coluna LiChrospher® RP-18. São colunas convencionais constituídas de octadecilsilano como fase ligada à fase estacionária. O grande problema é que esse tipo de coluna é restrita para o uso em pH na faixa de 2 a 7, visto que o pH no limite ou fora desta faixa diminui o tempo de vida útil da coluna, com alto risco de causar corrosão no suporte, quebra da fase ligada ou até dissolução da sílica. Por este motivo, é importante manter o pH da fase móvel.

O maior problema encontrado foi quanto à extração quantitativa da isotretinoína do óleo de soja, excipiente nas formulações, já que a injeção direta da amostra no cromatógrafo com o óleo de soja danifica a coluna cromatográfica. Foram testados diferentes solventes e condições para se obter a extração eficiente e quantitativa das amostras. O solvente escolhido foi o THF. Com este solvente, efetuou-se a extração da isotretinoína do óleo de soja. A partir da solução obtida com THF foram feitas outras diluições com a fase móvel, para se obterem soluções com as concentrações desejadas.

De maneira a garantir que o método forneça informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação de procedimentos analíticos, foram avaliados nesse trabalho, cinco parâmetros de validação para o método cromatográfico proposto: linearidade, precisão, exatidão e os limites de detecção e quantificação.

Porém, validar um método analítico não implica que ele seja isento de erros e que possa ser usado indiscriminadamente, o processo permite a obtenção de informações estatísticas confiáveis, confirmando que o referido método está adequado para o uso proposto.

Para a validação do método empregado neste estudo foram consideradas as diretrizes descritas nos compêndios da International Conference on Harmonisation (ICH), European Pharmacopoeia (Ph.Eur) e United States Pharmacopeia (USP).

O método proposto mostrou-se apropriado para quantificação da isotretinoína em cápsulas. Obtiveram-se resultados adequados em relação aos parâmetros de validação.

A linearidade de um método analítico demonstra a capacidade do método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma variação conhecida. Pode ser determinada por meio da análise de regressão linear simples, a qual vai determinar se há relação linear entre a resposta instrumental e a concentração conhecida da substância presente na amostra. A linearidade do método foi determinada através da curva de calibração, na qual foi verificada a proporcionalidade entre as diferentes concentrações do padrão e a área.

Com os parâmetros de análise estabelecidos, foi construída uma curva de calibração num intervalo de 5,0 – 30,0 µg/mL (Figura 27 e Tabela 5). A curva de calibração obtida foi analisada pelo método dos mínimos quadrados. Obteve-se uma boa linearidade com média do coeficiente de correlação de 0,997, conforme *Tabela 6*, indicando que o coeficiente de linearidade está adequado (0,99 a 1,0).

A precisão de um método analítico está relacionada com o grau de concordância entre os valores experimentais obtidos, quando o procedimento é aplicado repetidamente a uma mesma amostra homogênea, preparada, independentemente em idênticas condições experimentais.

Segundo o ICH (2006), a precisão pode ser determinada em três diferentes níveis: em nível de reprodutibilidade, repetibilidade e precisão intermediária. A precisão em nível de reprodutibilidade corresponde ao grau de concordância entre os valores experimentais obtidos, quando o método é aplicado por diferentes analistas, equipamentos e laboratórios. A precisão em nível de repetibilidade corresponde ao grau de concordância entre os valores experimentais obtidos, quando o método é aplicado pelo mesmo analista, no mesmo dia, no mesmo laboratório. E a precisão intermediária corresponde ao grau de concordância entre os valores obtidos quando o método é aplicado pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, porém em diferentes dias. Quanto mais próximos entre si estiverem os valores obtidos, maior será a precisão do método.

A precisão do método está relacionada ao desvio padrão relativo (RSD). Os limites sugeridos na literatura para o RSD na determinação de substâncias por métodos como CLAE, variam. Para alguns autores este deve ser menor do que 1% ou não deve exceder 2%. Neste trabalho, a precisão do método CLAE foi determinada pelo nível de repetibilidade.

A porcentagem do RSD foi calculada para cada amostra através da média de dez determinações. A média da % RSD obtida para as três amostras foi de 0,43, 0,70 e 0,30% para as amostras A, B e C, respectivamente, de acordo com os resultados expressos na *Tabela 7*. O método proposto foi preciso, indicando boa reprodutibilidade e concordância entre os resultados obtidos.

A *Tabela 7* apresenta os resultados obtidos na determinação do teor das amostras A, B e C. O teor dos fármacos variou: 105,0% para amostra A, 128,5% para a amostra B e 115,5% para a amostra C. Segundo os resultados referentes ao teor de isotretinoína, obtidos a partir da análise cromatográfica, somente a amostra A se encontra em conformidade com o preconizado em compêndio oficial, cuja, especificação é de 90 a 110 % do valor rotulado de isotretinoína (USP, 2007).

A exatidão de um método analítico expressa a concordância dos valores experimentais obtidos com um valor teórico ou tido como verdadeiro. Neste trabalho, a exatidão do método CLAE foi determinada a partir da recuperação de uma quantidade conhecida do padrão adicionada na amostra, calculando-se em seguida o percentual de recuperação. A *Tabela 8* mostra a porcentagem de recuperação das amostras. As médias das porcentagens de recuperação obtidas foram de 101,2, 99,4 e 99,3%, para as amostras A, B e C, respectivamente. Considera-se que quanto mais a medida se aproxima do valor verdadeiro mais exato é o método. Um método pode ser considerado exato quando o intervalo dos resultados obtidos apresenta variação de $\pm 2,0\%$ do valor nominal (BRITTAİN, 1998).

O LQ de um método analítico reflete a mais baixa concentração da substância em exame presente na amostra, que pode ser exata e precisamente medida, nas condições pré-estabelecidas. O LD é a concentração mais baixa da substância em exame que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade. A *Tabela 9* apresenta os resultados de LQ e LD, para o método cromatográfico proposto na determinação da isotretinoína onde LQ é igual a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e LD é igual a 0,34 $\mu\text{g/mL}$.

VII. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais empregadas para realizar o presente trabalho e com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- ✚ O tamanho de partícula e a presença dos excipientes são dois parâmetros importantes para assegurar o controle de qualidade final e características do fármaco no produto a ser disponibilizado para consumo.
- ✚ O tamanho de partícula é um fator conhecido, por influenciar na absorção a partir do trato-gastrointestinal, sendo assim, um fator importante que pode ocasionar conseqüências na segurança e eficácia dos medicamentos. Porém, o tamanho de partícula não é uma especificação definida nas farmacopéias. Esse parâmetro pode variar de produto para produto, como foi verificado no presente estudo. Houve uma variação significativa, do tamanho de partícula entre, as amostras A, B e C estudadas nesta pesquisa.

-
- ✦ A utilização segura da isotretinoína, particularmente com relação a teratogenicidade, continua sendo um fator de preocupação. Existem informações, que não se pode presumir, quanto ao tamanho de partícula. Assim sendo são de grande importância futuras pesquisas determinando o completo efeito dessa variação em pacientes expostos ao tratamento com isotretinoína, fazendo-se um comparativo com testes de bioequivalência.

  - ✦ O emprego do óleo de soja como excipiente conduz a um aumento na estabilidade térmica da isotretinoína nas formulações. As três amostras apresentaram similaridade no comportamento térmico. Porém a energia cinética é maior no padrão isotretinoína na forma de pó, do que nas amostras que corresponde a uma suspensão oleosa do produto em óleo de soja.

  - ✦ O método cromatográfico desenvolvido mostrou-se apropriado para quantificação *in vitro* da isotretinoína em cápsulas de gelatina mole. Obtiveram-se resultados adequados para os parâmetros de validação: linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção.

- ✦ No teor médio de fármacos somente a amostra A estava em conformidade com o preconizado em compêndio oficial. Fica evidenciada a necessidade da realização de estudos adicionais de quantificação, estabilidade, envolvendo a isotretinoína em suas várias formas farmacêuticas e cosméticas, desenvolvendo-se novas metodologias analíticas. Importante também será a validação de métodos analíticos indicativos da estabilidade para a identificação e quantificação dos compostos de degradação da isotretinoína gerados nas formulações farmacêuticas.

- ✦ A variação entre os resultados obtidos para as três amostras, mostra a necessidade de estudos subseqüentes de liberação do fármaco através de sua forma farmacêutica, e de estudos *in vivo*. É importante o estudo da avaliação das conseqüências dessa variação entre os medicamentos contendo isotretinoína, com objetivo de demonstrar a bioequivalência e biodisponibilidade das formulações farmacêuticas disponíveis no mercado, traçando-se um parâmetro a partir do produto de marca registrada.

VIII BIBLIOGRAFIA*

ALLEN, J.G.; BLOXHAM, D.P. The pharmacology and pharmacokinetics of retinoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.40, n.1, p.1-27, 1989.

ALLEN, T. **Particle size measurement**: powder sampling and particle size measurement. 5.ed. London, New York: Chapman & Hall, 1997. v.1, (Powder technology series).

ALMEIDA, A.D.T.; SANTOS, F.L.F.; SANTANA, D.P. Isotretinoína e seus efeitos clínicos tóxicos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.34, n.2, p.41-46, 1998.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/controlados/parecer_retinoides.doc.
 Acesso em: mar. 2005

AZULAY, R.D.; AZULAY, D.R. **Dermatologia**. 2.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 516p.

BAZZO, G.C.; SILVA, M.A.S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória deiferencial (DSC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.3, p.315-322, 2005.

BEMPONG, D.K.; HONINGBERG, I.L.; MELTZER, N.M. Separation of 13-cis and all-trans retinoic acid and their photodegradation products using capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography (MECK). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.11, n.9, p.829-833, 1993.

BERBENNI, V.; MARINI, A.; CARDINI, A. Thermoanalytical and spectroscopic characteriation of solid-state retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v.221, n.1/2, p.123-141, 2001.

* A bibliografia está de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BOLLAG, W.; GEIGER, J.M. The development of retinoids in dermatology. In: CUNLIFFE, W.J.; MILLER, A.J., eds. **Retinoid therapy**: a review of clinical and laboratory research: proceedings of an International Conference held in London, 16-18 May 1983. Lancaster: MTP Press, 1984. p.1-7.

BOSCHETTI, C.; PELLEGATTA, C.; MAGNONE, R. **On the isotretinoin manufactured by laboratory MAG**. Milano: Laboratorio MAG, 1996. 3p. [Relatório].

BRITTAİN, G.H. Validação de métodos não cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n.3, p.4-9, 1998.

BUCKTON, G.; RUSSELL, S.J.; BEEZER, A.E. Pharmaceutical calorimetry: a selective review. **Thermochimica Acta**, v.193, p.195-214, 1991.

CARAMELLA, C. Utilizzazione dei parametri granulometrici nella progettazione di forme farmaceutiche. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v.130, n.2, p.43-51, 1991.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFScar, 2001. 77p. [Apontamentos].

CAVIGLIOLI, G.; PARODI, B.; POSOCCO, V.; CAFAGGI, S.; BIGNARDI, G. Stability study of hard gelatin capsules containing retinoic acid. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.26, n.9, p.995-1001, 2000.

CHADWICK, R.R.; HSIEH, J.C. Separation of cis and trans double-bond isomers using capillary zone electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v.63, n.20, p.2377-2380, 1991.

CHAUMEIL, J.C. Micronization: a method of improving the bioavailability of poorly soluble drugs. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v.20, p.211-215, 1998.

CUNLIFFE, W.J.; COTTERILL, J.A. **The acnes**: clinical features, pathogenesis and treatment. London, Philadelphia: W.B. Saunders, 1975. 306p. (Major problems in dermatology, v.6).

DIGHE, S.V. A review of the safety of generic drugs. **Transplantation Proceedings**, v.31, suppl.3A, p.235-245, 1999.

DINIZ, D.G.A. **Determinação por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) da isotretinoína e seus produtos de degradação em formas farmaceuticas sólidas submetidas a testes de estabilidade**. Goiás, 2003. p.1-124. Dissertação de Mestrado -124 - Universidade Federal de Goiás.

DINIZ, D.G.A.; LIMA, E.M.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Isotretinoína: perfis farmacológicos, farmacocinético e analítico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, p.415-430, 2002.

DISDIER, B.; BUN, H.; CATALIN, J.; DURAND, A. Simultaneous determination of all-trans-, 13-cis-, 9-cis-retinoic acid and their 4-oxo-metabolites in plasma by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications**, v.683, n.2, p.143-154, 1996.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 4.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2003. p.1087-1088.

FLORENTIN, E.; ATHIAS, A.; LAGROST L. Modulation of the activity of the human cholesteryl ester transfer protein by carboxylated derivatives. **European Journal of Biochemistry**, v.240, p.699-706, 1996.

FORD, J.L.; TIMMINS, P. Thermal analysis in the characterization of pharmaceutical solids. In: FORD, J.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical thermal analysis: techniques and applications**. Chichester: E. Horwood: New York: Halsted Press, 1989. p.137-149. (Ellis Horwood books in biological sciences, Series in pharmaceutical technology).

GADDE, R.R.; BURTON, F.W. Simple reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for 13-cis-retinoic acid in serum. **Journal of Chromatography**, v.593, p.41-46, 1992.

GATTI, R.; GIOIA, M.G.; CAVRINI, V. Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, n.1, p.147-159, 2000.

GATTI, R.; GIOIA, M.G.; DI PIETRA, A.M.; CINI, M. Determination of retinoids in galenicals by column liquid chromatography with fluorescence and diode-array detection. **Journal of Chromatography, A**, v.905, n.1/2, p.345-350, 2001.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica – Parte II. **Cerâmica**, v.34, p.163-171, 1988.

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

GIRON, D.J. Thermal analysis in pharmaceutical routine analysis. **Acta Pharmaceutica Jugoslavica**, v.40, p.95-157, 1990.

GUARDANI, R.; NASCIMENTO, C.A.O.; ONIMAW, R.S. Use of neural networks in the analysis of particle size distribution by laser diffraction: testes with different particle systems. **Powder Technology**, v.126, p.42-50, 2002.

GUNDERSEN, T.E.; LUNDANES, E.; BLOMHOFF, R. Qualitative and quantitative liquid chromatography determination of natural retinoids in biological sample. **Journal of Chromatography, A**, v.935, n.1/2, p.13-45, 2001.

GUNDERSEN, T.E.; LUNDANES, E.; BLOMHOFF, R. Quantitative high-performance liquid chromatographic determination of retinoids in human serum using on-line solid-phase extraction and column switching: determination of 9-cis-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, all-trans-retinoic acid, 4-oxo-all-trans-retinoic acid and 4-oxo-13-cis-retinoic acid. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.691, n.1, p.43-58, 1997.

GUIDANCE for Industry: Q2B Validation of analytical procedures: methodology. In: U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance Documents. Center for Drug Evaluation and Research. **International Conference on Harmonization-Quality**. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Acesso em: 25 mar. 2006.

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.

KASSAB, N.M. **Validação de métodos analíticos para determinação de antibióticos quinolônicos em preparações farmacêuticas**. São Paulo, 2004. 171p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

LEFEBVRE, P.; AGADIR, A.; CORNIC, M.; GOURMEL, B.; HUE, B.; DREUX, C.; DEGOS, L.; CHOMIENNE, C. Simultaneous determination of all trans and 13-cis retinoic acids and their 4-oxi-metabolites by absorption liquid chromatography after solid phase extraction. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications**, v.66, n.1, p.55-61, 1995.

LEHMAN, P.A.; FRANZ, T.J. A sensitive high-pressure liquid chromatography/particle beam/ mass spectrometry assay for the determination of all-trans-retinoic and 13-cis-retinoic acid in human plasma. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n.3, p.287-290, 1996.

LEITE Jr., A.C.; LEITE, A.C. Benefícios da isotretinoína no tratamento da acne nódulo cística em pacientes hiperandrogênicas devido à síndrome dos ovários policísticos. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v.33, n.5, p.211-218, 2005.

MA, Y.; WU, Z.; FURR, H.C.; LAMMI-KEEFE C.; CRAFT, N.E. Fast minimicroassay of serum retinol (Vitamin A) by capillary zone electrophoresis with laser-excited fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v.616, p.31-37, 1993.

MALPEZZI, L.; BOSCHETTI, C.; FUGANTI, C.; GRASSELLI, P.; MAGNONE, G.A.; PELLEGGATTA, C. Stability of 13-cis-retinoic acid x-ray diffraction study. **Pharmaceutical Industry**, v.60, n.11, p.983-985, 1998.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos**: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. São Paulo, 2003. 117p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MARTÍN, I.D.; VILADROSA J.L. Liberación factores fisicoquímicos. In: BERROZPE, J.D.; LANAÓ, J.M.; DELFINA, J.M.P. **Biofarmacia y farmacocinética**. Madrid: Editorial Sintesis, 2000. v.2, cap.13, p.276-292.

MIYAGI, M.; YOKOYAMA, H.; SHIRAISHI, H.; MATSUMOTO, M.; ISHII, H. Simultaneous quantification of retinol, retinal, and retinoic acid isomers by right-performance liquid chromatography with a simple gradation. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.757, n.2, p.365-368, 2001.

NARAYAN, P., HANCOCK, B.C. The influence of particle size on the surface roughness of pharmaceutical excipient compacts. **Materials Science & Engineering, A: Structural Materials: Properties, Microstructure and Processing**, v.407, n.1/2, p.226-233, 2005.

OZAWA, T. A new method of analyzing thermogravimetric data. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.38, p.1881-1888, 1965.

OZAWA, T. Thermal analysis-review and prospect. **Thermochimica Acta**, v.355, p.35-42, 2000.

PAPINI, C.J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula**. São Paulo, 2003. 129p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares.

PAWSON, B.A. History of retinoids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.6, n.4, suppl., pt.2, p.577-582, 1982.

PITTA, L.R. **Estudos dos métodos estatísticos na análise da biodisponibilidade relativa/bioequivalência para registro de medicamentos no Brasil**. São Paulo, 2004. 98p. Dissertação de Mestrado - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz.

RANALDER, U.B.; LAUSECKER, B.B.; HUSELTON, C. Micro liquid chromatography-mass spectrometry with direct liquid introduction used for separation and quantitation of all-trans- and 13-cis-retinoic acids and their 4-oxo metabolites in human plasma. **Journal of Chromatography** v.617, p.129-135, 1993.

ROCHE Químicos e farmacuticos SA. Monografia medicamento Roacutan® Disponível em: http://www.roche.com.br/Products/roacutan_PT.htm.: Acesso em: mar. 2005

RODRIGUES, D. **Estudo comparativo de cápsulas de omeprazol do mercado nacional**: avaliação biofarmacotécnica. São Paulo, 1999. 105p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SANTORO, M.I.R.M. **Introdução ao controle de qualidade de medicamentos**. São Paulo: Atheneu, 1988. 121p.

SANTORO, M.I.R.M.; PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; KEDDOR-HACKMANN, E.R.R.M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v.36, n.1, p.97-110, 2000.

SICHINA, W.J. Characterization of pharmaceuticals using thermal analysis. **American Laboratory**, v.33, n.1, p.16, 18-20, 22-25, 2001.

SILVA, M.A.S. **Contribuição ao estudo do comportamento térmico de filmes farmacêuticos de revestimento**. São Paulo, 1998. 119p. Tese de Doutorado – Faculdade de ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SIMMONS, B.R.; CHUKWUMERIJE, O.; STEWART, J.T. Supercritical fluid extraction of 13-cis retinoic acid and its photoisomers from selected pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.16, p.395-403, 1997.

SKOOG, D.A. **Fundamentals of analytical chemistry**. 6.ed. Forth Worth: Fort Worth Saunders College, 1992. 892p. (Saunders Golden Sunburst series).

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York, Chichester: John Wiley, 1997. 765p.

SPORN, M.B.; DUNLOP, N.M.; NEWTON, D.L.; SMITH, J.M. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Federation Proceedings**, v.35, n.6, p.1332–1338, 1976.

STIRLING, S.; SPIRITO, M.D.; DIMARCO, M.; MORELLI, G.; TANGUAY, M.; WADA, Y.C. Estudo comparativo de biodisponibilidade relativa entre duas formulações comerciais distintas de isotretinoína sistêmica existentes no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina**, v.60, n.1/2, p.61-64, 2003.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.31, n.2, p.63-70, 1995.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F.S.; VILANOVA, C.M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v.16, n.9/10, p.51-56, 2004.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.35, n.1, p.1-16, 1999.

TAN, X.; MELTZER, N.; LINDENBAUM, S. Determination to the kinetics of degradation to 13-cis-retinoic acid and all-trans retinoic acid in solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.11, n.9, p.817-822, 1993.

TAN, X.; MELTZER, N.; LINDENBAUM, S. Solid-state stability studies of 13-cis retinoic acid and all trans retinoic acid using microcalorimetry and HPLC analysis. **Pharmaceutical Research**, v.9, n.9, p.1203-1208, 1992.

TASHTOUSH, M.B.; JACOBSON, E.L.; JACOBSON, M.K. A rapid HPLC method for simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, p.859-864, 2007.

TAYLOR, P.W.; KEENAN, M.H.J. Pharmaceutical quality of generic isotretinoína products, compared with Roaccutane. **Current Medical Research and Opinion**, v.22, n.3, p.603-615, 2006.

UNITED States Pharmacopeia. 30.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007. pag 2428-2429.

WARREL, R.P.; FRANKELL, W.H.; MILLER Jr., W.H.; SCHEINBERG, D.A.; ITRI, L.M.; HITTELMAN, W.N.; VYAS, R.; ANFREEF, M.; TAFURI, A.; JAKUBOWSKI, J.; GABRILOVE, J.; GORDON, M.; DMITROVSKY, E. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin(all-trans-retinoic acid). **New England Journal of Medicine**, v.324, n.20, p.1385-1393, 1991.

WENDLANDT, W.W.M.; ELVING, P.J., eds. **Thermal analysis**. 3.ed. New York: Wiley, 1985. 815p.

WESTON, A.; BROWN, P.R., eds. **HPLC and CE: principles and practice**. San Diego: Academic Press, 1997. 280p.

WYATT, E.L.; SUTTER, H.S.; DRAKE, L.A. Dermatological pharmacology In: GOODMAN, L.S.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw Hill, 2001. p.1795-1818.

WYSS, R. Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications**, v.671, n.1/2, p.381-425, 1995.

WYSS, R. Chromatography of retinoids. **Journal of Chromatography**, v.531, p.481-508, 1990.

WYSS, R.; BUCHELI, F. Quantitative analysis of retinoids in biological fluids by high-performance liquid chromatography using column switching. III. Determination of the arotinoid sumarotene and its Z-isomer in human and animal plasma. **Journal of Chromatography**, v.576, n.1, p.111-120, 1992.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Senhor(a) Presidente da Banca

Antes do início da apresentação do(a) candidato(a) transmitir as seguintes instruções aos demais membros da Comissão Julgadora e ao candidato:

DEFESA DE MESTRADO/DOUTORADO

Instruções

1. O aluno disporá de 30 minutos para fazer sua apresentação do trabalho.
2. A arguição será realizada em sessão pública, que não deverá exceder o prazo de três horas, para o caso de mestrado, e de cinco horas, para o caso do doutorado.
  - 2.1 Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. O relatório deve ser assinado por todos os examinadores e o resultado deve ser preenchido como aprovado ou reprovado. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
  - 3.1 Se algum membro optar pela reprovação, a Comissão Julgadora emitirá (obrigatoriamente) um parecer no campo indicado. Havendo necessidade, o verso do formulário também poderá ser utilizado.
4. O intervalo, quando necessário, deve se restringir a atividades não relativas à defesa. Deve ser breve e sua duração não será computada no tempo total da arguição.
5. Cabe ao presidente da sessão de defesa zelar para que a mesma ocorra dentro das normas legais e do decoro acadêmico.
6. Após a realização da defesa, as duas vias do relatório devem ser encaminhadas para a homologação pela Comissão de Pós-Graduação.
  - 6.1 Não é permitida a cópia da ata antes da homologação pela CPG.

São Paulo, 21 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Lembrete: Segue em anexo os certificados de participação e duas vias da ata de defesa (relatório de defesa). Constatando alguma incorreção nos documentos, favor comunicar imediatamente a Secretaria de Pós-Graduação, para as devidas correções.

ANEXO A – INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DA BANCA JULGADORA

ANEXO B – RESUMOS PUBLICADOS

RESUMOS EM ANAIS DE EVENTOS

1) QUENCA-GUILLEN, J.S. ; GUIMARÃES, C. A. ; Kedor-Hackmann, E. R. ; SANTORO, M.I.R. científico "O Brasil está na moda. A utilização de princípios ativos oriundos de Plantas da Flora Brasileira em Cosméticos". Resumo foi apresentado no 20º Congresso Brasileiro de Cosmetologia e publicado na Revista Cosmetics and Toiletries, Brasil, Vol. 18. Nº. 2, I, Mar/Abr 2006. ISSN 0103-4030.

2) GRACA, I.; GUIMARÃES, C. A.; MATOS, J. R, "Estudo do comportamento térmico do resinato de diclofenaco". Resumo foi apresentado durante o V congresso brasileiro de análise térmica e calorimetria, e publicado no livro de resumos do congresso V CBRATEC, Poços de Caldas, MG, Brasil, 02 a 05 abril, 2006.

3) QUENCA-GUILLEN, J.S. ; GUIMARÃES, C. A. ; SANTORO, M.I.R. ; MATOS, J. R. ; Kedor-Hackmann, E. R., "Avaliação Termoanalítica do ascorbato de monometilsilanotriol em formulações cosméticas, utilizando a calorimetria exploratória diferencial(DSC) e termogravimetria(TG). Resumo foi apresentado no 21º congresso Brasileiro de Cosmetologia e publicado na Revista Cosmetics and Toiletries Brasil, Mai/JUN 2007. Vol 19. Nº 3 19º ano ISSN 0103-4030.

4) GUIMARÃES, C. A., QUENCA-GUILLEN, J. S., MENAA, F., MATOS, J. R., MERCURI, L. P., BRAZ, A. B., Rossetti F. C., SINGH, A. K., KEDOR-HACKMANN E. R. M., Santoro M. I. R. M. Characterization of commercial isotretinoin products by laser diffraction and thermal behavior analysis. 2007, São Paulo. Resumo disponível em CD_ROOM
<http://www.metrologiaquimica.org.br/ivmetrochem/scientific/>, 2007.

5) QUENCA-GUILLEN J S.; GUIMARÃES, C. A.; GARCÍA P. L.; Silva, P. I. J.; ALMEIDA M. M.; SANTORO, M. I. R. M.; MATOS J. .D. R.; MERCURI L. P.; SANTOS, P. F., KEDOR-HACKMANN, E. R. M. "Validação de metodologia analítica para a determinação do ascorbato de monometilsilanotriol em formulações cosméticas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa com pareamento inônico". Resumo enviado para o Congresso Latino-Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos-18 Colaminq, disponível em CD-ROOM Guatemala, 21 a 24 de outubro 2007, trabalho apresentado em conferência,

20º

Congresso Brasileiro de Cosmetologia

Cosmetologia: Integrando Ciência e Qualidade

18 a 20 de abril de 2006

Transamérica Expo Center - São Paulo, SP

Certificamos que **Carla Aiolfi Guimarães**

participou do 20º Congresso Brasileiro de Cosmetologia realizado em São Paulo - SP no período de 18 a 20 de abril de 2006, na qualidade de

Co-Autora do Trabalho Técnico Científico: "O Brasil está na moda. A utilização de princípios ativos oriundos de plantas da flora brasileira em cosméticos."

São Paulo, 20 de abril de 2006

Realização

abc

Associação Brasileira de Cosmetologia
www.abc-cosmetologia.org.br

Janete Nunes

Janete Nunes
Presidente da ABC

Angie C. Lizaraga

Angie C. Lizaraga
Coordenador Geral do Congresso

Albino K. Kurebayashi

Albino K. Kurebayashi
Coordenador da Comissão Científica

V CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA
POÇOS DE CALDAS - MG - BRASIL 2006

Certificado

Certifico que **INGRID GRAÇA** apresentou o trabalho intitulado "**ESTUDO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO DO RESINATO DE DICLOFENACO**" de autoria de **Carla Aiofi Guimarães; Ingrid Graça; Jivaldo do Rosário Matos**, na modalidade **PÔSTER**, durante o V Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, realizado no período de 02 a 05 de Abril de 2006.

Poços de Caldas, abril de 2006

_____
Antonio Gouveia de Souza
Presidente da ABRATEC

210

Congresso Brasileiro de Cosmetologia

Cosmetologia: Integrando Ciência e Arte a Novos Mercados

15 a 17 de maio de 2007

Transamérica Expo Center - São Paulo - SP - Brasil

**Certificamos que Carla A. Guimarães
participou do 21º Congresso Brasileiro de Cosmetologia,
realizado em São Paulo - SP no período de 15 a 17 de maio de 2007,
na qualidade de**

**Co-autora do Pôster: "Avaliação Termoanalítica do Ascorbato de
Monometilsilanotriol em Formulações Cosméticas, Utilizando a
Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) E Termogravimetria
(TG)"**

Realização

abc

associação brasileira de cosmetologia
www.abc-cosmetologia.org.br

São Paulo, 17 de maio de 2007.

Jadir Nunes

Jadir Nunes
Presidente da ABC

Alberto K. Kurebayashi

Alberto K. Kurebayashi
Coordenador Geral do Congresso

Adeline K. Nakano

Adeline K. Nakano
Coordenador Científico

IV METROCHEM

IV International Congress on Chemical
Measurements, Traceability and Quality
Assurance

July 16th - 20th 2007

CERTIFICAMOS QUE

CARLA AIOLFI GUIMARÃES

PARTICIPOU DO IV CONGRESSO INTERNACIONAL
SOBRE MEDIÇÕES QUÍMICAS, RASTREABILIDADE E
GARANTIA DA QUALIDADE

Characterization of commercial Isotretinoin products by laser diffraction
and thermal behavior analysis.

Ilva Kulselman

President of the International Scientific Committee - IV Metrochem
Scientific Director - National Physical Laboratory of Brazil
Vice Chair - CITAC

SÃO PAULO, 20 DE JULHO DE 2007

Vera Maria Lopes Poçano

President of the Organizing Committee - IV Metrochem
Coordinator - International Affairs - IPT
Coordinator - Brazilian Network on Chemical Measurements
Chair - CITAC

Vahan Agopyan

President of the National Scientific Committee - IV Metrochem
Director President - IPT
Professor-Escala Honária - São Paulo University
Superior Council Member - FAPESP

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DO ASCORBATO DE MONOMETILSILANOTRIOL EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS EMPREGANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EM FASE REVERSA COM PAREAMENTO IÔNICO

Joyce S. Quenca-Guillen¹ (PG); Carla A. Guimarães¹ (PG); Pedro López García¹ (PG); Pedro Ismael da Silva Junior² (PQ); Mariana Mandelli de Almeida¹ (PG); Maria Inês R. M. Santoro¹ (PQ); Jivaldo D. R. Matos³; Lucildes P. Mercuri⁴; Paula Ferreira dos Santos⁴; Érika Rosa Maria K. Hackmann¹ (PQ)

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP; ²Instituto Butantan ; ³ Instituto de Química-USP; ⁴Unifesp-Campus Diadema

O Ascorbato de Monometilsilanotriol (AMS) apresenta às propriedades cosméticas do ácido ascórbico. Além de ser um antioxidante e despigmentante, o AMS apresenta silício em sua estrutura, assim sua presença em formulações tópicas tem como objetivo repor o silício endógeno, proporcionando a regeneração do tecido. A cromatografia pode ser conceituada como um método físico-químico de separação, sendo que os métodos cromatográficos são utilizados para identificação e quantificação de ingredientes. A presente investigação tem como objetivo, a validação de metodologia analítica para determinação do ascorbato de monometilsilanotriol isolado e em formulações cosméticas. Não há na literatura, até o presente momento relato de método analítico para determinação do AMS em cremes, dada a relevância desse trabalho. Foram desenvolvidas três formulações contendo 10% de AMS, sendo dois cremes não iônicos e um gel. Os materiais utilizados foram: padrão de ascorbato de monometilsilanotriol cedido pela Polytechno Indústrias Químicas; brometo de tetrabutilamônio; metanol grau cromatográfico e água Milli-Q plus. O cromatógrafo utilizado foi Shimadzu® LC-10 AD VC com detector UV-VIS e a coluna Synergi-Hydro® RP C18. No desenvolvimento do método foram testadas diferentes fases móveis com e sem a adição do pareador iônico. A fase móvel selecionada para validação do método analítico para determinação do AMS foi: metanol : água (70:30 v/v); brometo de tetrabutilamônio 30 mM; pH= 5,9, vazão de 1mL/min, detecção UV a 254 nm; apresentando resultados confiáveis. O método validado pode ser usado na análise de formulações tópicas na forma de creme.

Fig 1. Perfil cromatográfico do AMS

Fig 2. Perfil cromatográfico do creme contendo AMS

Bibliografia:

SNYDER, L.R.; KIRLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development. 2ed. New York: Wiley Interscience, 1997. 765p.

Objetivo

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação do ascorbato de monometilsilanotriol em formulações cosméticas empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Introdução

A aplicação tópica do ácido ascórbico nas suas diferentes formas disponíveis no mercado tem despertado grande interesse pela comunidade científica, uma vez que seus efeitos na hidratação cutânea, atenuação de manchas e ação antioxidante, têm sido cada vez mais observados por profissionais da área cosmética e dermatológica e pelos próprios usuários (MAIA CAMPOS et-al, 2001).

Dentre as principais ações do ácido ascórbico estão: neutralizar ânions superóxido (O_2^-) e oxigênios reativos. Funciona também como um antioxidante de quebra de cadeia, pois após a transferência de um único elétron, o radical livre ascorbato tem potencial pró-oxidante relativamente baixo. O ácido ascórbico destaca-se por ser reafirmante participando como co-fator na hidroxilação da hidroxiprolina, importante aminoácido do tecido conjuntivo e das fibras colágenas, assim, contribui de forma significativa para a formação de novas fibras colágenas, melhorando a elasticidade e firmeza cutânea, maior alvo do envelhecimento (SANCHES et-al., 1997).

Sendo o uso do ácido ascórbico em formulações cosméticas inviável devido à baixa estabilidade do ativo em solução aquosa, pois esse sofre oxidação em formulações como: géis, emulsões O/A; cientistas têm buscado desenvolver derivados do ácido ascórbico com ação similar, mas que apresentem estabilidade química superior e com permeação percutânea equivalente (MAIA CAMPOS et-al., 2000).

Para viabilizar sua utilização, vários derivados do ácido ascórbico foram desenvolvidos, dentre esses se destaca o ascorbato de monometilsilanotriol (AMS), cuja estrutura química está demonstrada na Figura 1. De acordo com dados da literatura, o ascorbato de monometilsilanotriol apresenta às propriedades cosméticas do ácido ascórbico. Além de ser um antioxidante e despigmentante, o ascorbato de monometilsilanotriol apresenta silício em sua estrutura, assim sua presença em formulações tópicas tem como objetivo repor o silício endógeno, proporcionando a regeneração do tecido.

Figura 1. Estrutura Química do ascorbato de monometilsilanotriol

A cromatografia pode ser conceituada como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados em duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra um fluido insolúvel na fase estacionária, que percorre a primeira. A fase estacionária, ou adsorvente, tem tomado várias formas no decorrer do tempo, incluindo papel, camada delgada de sólidos sobre placa de vidro, líquidos imobilizados, géis e partículas sólidas empacotadas em colunas. O componente que flui, ou fase móvel, é um líquido ou um gás (WESTON; BROWN, 1997; CIOLA, 1998).

Na cromatografia de pareamento iônico o pH da fase móvel é ajustado de modo a “encorajar” a ionização da amostra. A retenção é alcançada pela introdução de um reagente de pareamento iônico no eluente, uma molécula orgânica dotada de carga positiva (separação de ácidos) ou de carga negativa (separação de bases). A amostra interage com o contra-íon do pareador e o par iônico formado terá maior afinidade pela coluna de fase reversa em função da hidrofobicidade da cadeia carbônica do reagente pareador (SNYDER et al., 1997).

Alguns mecanismos são postulados na tentativa de explicar a forma como ocorre a interação entre pareador, analito e fase estacionária. Além de outros mais complexos (formação de micelas, complexação), os mecanismos fundamentais envolveriam a interação do pareador com o analito ionizado já na fase móvel e a posterior partição do par não carregado com a fase estacionária e/ou então a interação do pareador com a fase estacionária, expondo sua carga para a superfície e a posterior interação do analito de carga oposta que passa pela coluna, o que se assemelharia com o mecanismo da cromatografia de troca iônica (SNYDER et al., 1997).

Na cromatografia do pareamento iônico, a retenção e separação são influenciadas pelo pH e concentração do tampão, tamanho e concentração do reagente de pareamento, tipo e concentração do reagente de pareamento, tipo e concentração do solvente orgânico e fase estacionária utilizada (SNYDER et al., 1997).

Sendo assim, o presente trabalho se propõe a: desenvolver e validar uma metodologia analítica por CLAE para determinação do ascorbato de metilsilanotriol em formulações cosméticas.

Materiais e Métodos

Materiais

Matérias-primas

As matérias-primas que se seguem foram empregadas na preparação das formulações cosméticas: água destilada; monoestearato de Sorbitan Etoxilado 20 OE (Sorbix® 60); álcool ceto-estearílico (álcool C1618S®); ascorbato de monometilsilanotriol solução aquosa a 1%-(ascorbosilane C®); butilhidroxitolueno – BHT; glicerina (glicerina bi-distilada®); derivado alcoxilado de glucose (glucam E-20®); Ginkgo biloba (Ginkgo Biloba extrato vegetal tipo hidroglicólico®); Ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) dissódico (Versene Na₂);hidraction NMF®; PEG-23 sheato (lipex® emulshea); PEG 7 sheabutterate (lipex® shea PEG 7); shea butter oleyl Esters (Lipex® Shea WL); Shea Butter Cetyl Esters (Lipex® Shea W); hidroxipropilmetilcelulose (methocel 40-101®);óleo de Macadamia ternifolia -uso tópico cosmético; mistura de fenoxietanol e parabenos (phenoben®); óleo de oliva (Polygreen® Oliva OL); propilenoglicol e proteína de trigo hidrolisada(pró-trigo) foram cedidos pela Polytechno Indústrias Químicas Ltda - Brasil. O C13-14 isoparafina e laureth-7(sepigel®305) foi comprado da Seppic – França. O Polidimetilsiloxano (silicone DC 245) foi comprado pela Dow Corning Brasil-Brasil.

Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes empregados nesse trabalho foram: brometo de tetrabutilamônio (Sigma Aldrich); metanol grau cromatográfico (Merck) e água purificada Milli-Q Plus (Millipore).

Equipamentos e acessórios

1. Os equipamentos e acessórios utilizados nesse estudo foram: centrífuga Excelsa® Modelo 206 MP; centrífuga eppendorf refrigerada modelo: 5804 R; cromatógrafo líquido Shimadzu® LC-10 AD VC com detector UV-VIS, sistema controlador SLC-10A VP, injeção automática e sistema degaseificador DGU-14A, acoplado ao software Class VP®; cromatógrafo líquido Shimadzu® LC-10 AD VP com detector UV-VIS, sistema controlador, SPD-10A VP, injeção manual, acoplado ao software Class VP®; coluna Synergi-Hydro® RP Phenomenex 150 X 4,6 mm, partícula de 5µ, 80 Å de poro, C18; estufa Biolabor® com fotoperíodo mod.131FC; estufa Nova Ética®; potenciômetro DIGIMED® DM 21 e viscosímetro Brookfield® modelo RVT.

Métodos

Preparo das formulações

Foram desenvolvidas 3 formulações cosméticas contendo 10% de monometilsilanotriol ascorbato, sendo 1 gel-creme e 2 emulsões contendo extratos vegetais. O gel-creme foi obtido por pesagem dos componentes e obtido a temperatura ambiente. As formulações na forma de emulsão foram obtidas por pesagem dos componentes e posterior aquecimento a 75° C, das fases aquosas e oleosas, separadamente. A fase aquosa foi vertida sobre a oleosa (método de emulsificação por inversão de fases) e as emulsões foram agitadas até o resfriamento. A composição das formulações está descrita nas tabelas abaixo.

Princípio ativo	Concentração	Função
Sepigel 305 ®	2,5%	Agente espessante
Propilenoglicol	2,0%	Umectante
GlucamE ® 20 ®	2,0%	Umectante
Phenoben ®	0,5%	Conservante
Silicone ®	5%	Emoliente
DC 245		
Versene Na ₂ ®	0,1%	Agente
		quelante
BHT ®	0,1%	Antioxidante
Ascorbosilane C ®	10%	
Água destilada Q.S.P 100	77,8%	Veículo

Tabela 1. Descrição farmacotécnica da formulação do gel creme (F1)

Princípio ativo	Concentração	Função
Fase Aquosa		
Hidracion NMF ®	1%	Umectante/hidratante
Pró-trigo	2,0%	Umectante/hidratante
GlucamE ® 20	2,0%	Umectante
Methocel40-101 ®	1%	Espessante fase aquosa
Glicerina bi destilada	q.s.p para solubilizar methocel	Umectante
Versene Na ₂ ®	0,1%	Agente quelante
Água destilada q.s.p 100	77,7%	Veículo
Fase Oleosa		
Álcool C1618S ®	2,5%	Espessante Fase oleosa
BHT	0,1%	Antioxidante
Lipex ® Shea PEG 7	1%	Co-emulsionante
Lipex ® Emulshea	4,1%	Tensoativo não iônico
Lipex ® Shea WL	2%	Emoliente
Lipex ® Shea W	2%	Doador de viscosidade

Fase Fria		
Extrato Glicólico Ginkgo biloba	2%	Princípio ativo
Phenoben	0,5%	Conservante
Silicone DC 245	2%	Emoliente

Tabela 2. Descrição farmacotécnica da emulsão contendo *Ginkgo biloba* associado à AMS.

Princípio ativo	Concentração	Função
Fase Aquosa		
Hidracion NMF ®	1%	Umectante/hidratante
Pró-trigo	2,0%	Umectante/hidratante
GlucamE ® 20	3,0%	Umectante
Methocel40-101 ®	1%	Espessante fase aquosa
Glicerina bi destilada	q.s.p para solubilizar methocel	Umectante
Versene Na ₂ ®	0,1%	Agente quelante
Sorbiex 60 (Tween 60)	3,5%	Tensoativo hidrófilo - não iônico
Água destilada q.s.p 100	72,8%	Veículo
Fase Oleosa		
Álcool C1618S ®	4%	Espessante Fase oleosa
BHT	0,1%	Antioxi-dante
Lipex ® Shea PEG 7	2%	Co-emulsionante
Polygreen ® Oliva OL	3%	Emoliente

Óleo de macadâmia	2%	Emoliente
Lipex®Shea W	3%	Doador de viscosidade
Fase Fria		
Phenoben	0,5%	Conservante
Silicone DC 245	2%	Emoliente

Tabela 3. Descrição farmacotécnica da emulsão contendo Óleo de Macadâmia associado à AMS.

Estudo de estabilidade das formulações

Após o preparo das formulações, foram realizados testes preliminares de estabilidade por centrifugação de 5 gramas de cada formulação a 3000 rpm por 30 minutos.

A estabilidade acelerada das formulações foi investigada a 5+/- 1° C, 25+/-1° C, 40+/-1° C e fotoestabilidade a 25+/-1° C durante 90 dias de acordo com o Guia de estabilidade de produtos cosméticos da Anvisa. Foram avaliados caracteres organolépticos, pH e viscosidade das formulações nos tempos: T0, T1, T7; T15, T30 e T90 dias após o preparo das formulações.

Preparo das soluções padrão

Para obtenção da curva de calibração do ascorbato de monometilsilanotriol foram injetadas no sistema cromatográfico quantidades crescentes de solução padrão de AMS, a fim de obter massas de 25; 50; 100; 200; 400 µg.

Preparo das soluções das amostras

Foram preparadas 6 replicatas de solução amostra para cada formulação cosmética obtida. Cada replicata foi injetada 3 vezes.

Desenvolvimento do método

No desenvolvimento do método foram testadas diferentes fases móveis com e sem a adição do pareador iônico. A fase móvel selecionada para validação do método analítico para determinação do AMS foi: metanol: água (70:30 v/v); brometo de tetrabutilamônio 30 mM; pH= 5,9; vazão de 1mL/min, detecção UV a 254 nm e temperatura ambiente (25 °C).

Validação do método

A validação do método foi conduzida experimentalmente de acordo com as recomendações da ICH (International Conference on Harmonization), instrumento Q2(R1) – Validation of analytical procedures: text and methodology (novembro, 2005) e da USP 30.

Preparo da fase móvel

As fases móveis testadas foram preparadas diariamente em balão volumétrico por dissolução do aditivo brometo de tetrabutylamônio (TBA) em água purificada Milli Q®. A proporção de solvente orgânico foi mensurada e adicionada posteriormente. O volume final foi filtrado a vácuo em membrana filtrante de 0,45 µm. Procedeu-se a desgaseificação do sistema em aparelho de ultra-som por 15 minutos.

Linearidade

Foi determinada pela curva padrão, que foi obtida empregando-se 5 níveis de massa: (25; 50; 100; 200; 400 µg). As soluções foram preparadas em triplicata e a linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados.

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação do cromatograma obtido na análise da solução placebo a concentração equivalente da solução amostra.

Precisão

Foram preparadas 6 replicatas de solução amostra para cada formulação cosmética obtida, de acordo com o item (preparo das soluções das amostras). O teor de AMS foi calculado em função da equação da curva de calibração.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação foram determinados com base, no desvio padrão da resposta instrumental (desvio padrão residual da linha de regressão) e sua relação com a inclinação da reta na curva padrão constituída a baixas concentrações.

Estabilidade da solução padrão

A amostra padrão de ascorbato de monometilsilanotriol foi congelada e, ao sofrer descongelamento foi analisada 24, 48 e 72 horas após atingir temperatura ambiente.

Resultados e Discussões

Estudo de estabilidade das formulações

Os resultados dos testes preliminares de estabilidade por centrifugação mostraram-se satisfatórios, visto que não houve separação de fases em nenhuma das formulações estudadas.

Em relação aos testes de estabilidade acelerada, as formulações mantiveram-se estáveis durante o período de avaliação de 90 dias, não apresentando separação de fases, alteração nos caracteres organolépticos e nem alterações significativas referentes a mensurações de pH e viscosidade.

Validação do Método

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um método de análise para determinação do AMS em formulações cosméticas por CLAE.

Não há na literatura até o presente momento, relato de método analítico para determinação do ascorbato de monometilsilanotriol em formulações cosméticas.

Pelo fato de o ácido ascórbico apresentar valor de PKA 4,2 e ser a molécula ativa do AMS, há interação de atração por cargas opostas com o reagente de pareamento iônico (brometo de tetrabutilamônio), o qual está em solução que apresenta pH 5,9.

Linearidade

Com os parâmetros estabelecidos, foi construída uma curva de calibração para AMS. A curva de calibração (Figura 2) obtida foi analisada pelo método dos mínimos quadrados, observando-se que cada uma das retas passa muito próximo da origem, uma vez que o valor da intersecção da reta (a), analisado pelo teste t, é insignificante, indicando que o método empregado não está sujeito a erros determinados (BARROS et al., 2003). Obteve-se uma boa linearidade, com média de coeficiente de correlação de 0,9995. A Figura 3 mostra um pico do AMS solução padrão.

Figura 2. Curva de calibração do AMS.

Figura 3. Perfil cromatográfico do ascorbato de monoemtilsilanotriol matéria-prima. Condições cromatográficas: coluna Synergi-Hydro® RP Phenomenex® 150 X 4,6 mm, partícula de 5µ, 80 Å de poro, C18, fase móvel: TBA 30mM + água:Metanol (70:30 v/v) (pH = 5,9), vazão 1 mL/min, detecção UV a 254 nm; temperatura ambiente (25° C).

Seletividade

Não foi detectado nenhum pico que interferisse na determinação.

Precisão

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos na determinação do teor de AMS nas formulações cosméticas obtidas. O % DPR foi calculado para cada amostra, empregando-se 10 preparações independentes. A média do %RSD obtido para as três amostras foi de 0,84%, indicando uma boa repetibilidade do método e uma concordância entre os resultados obtidos.

AMOSTRA	Valores Rotulados(%)	Valores Encontrados (%)	Teor Percentual ^(a)
			(DPR)
F1	10	9,94	99,49 (0,84%)
F2	10	10,04	100,41 (0,82%)
F3	10	9,01	90,11(0,86%)

(a) medida de 6 determinações

Tabela 4. Resultados das análises nas amostras F1, F2 e F3 aplicando o método cromatográfico e o tratamento estatístico dos dados obtidos.

Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram respectivamente: 8,423 µg/mL e 28,078 µg/mL

Estabilidade da solução padrão

De acordo com a avaliação, a solução padrão se mantém estável até 48 horas. Após esse período, o uso da solução não é recomendado. A Figura 4 mostra a avaliação da estabilidade da solução padrão submetida a congelamento e avaliada após o descongelamento. Sendo que a avaliação foi realizada logo após o descongelamento; 24 horas após e 48 horas após o descongelamento.

Figura 4. Gráfico da avaliação da estabilidade da solução padrão de AMS após sofrer descongelamento.

Conclusão

A metodologia desenvolvida para determinação do AMS demonstrou boa linearidade; precisão, limites de detecção e quantificação, podendo ser usada na análise de formulações cosméticas.

Bibliografia

1. Barros Neto, B; Scarminio, I.S; Bruns, R.E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 2º ed., Campinas, SP:Editora da Unicamp, 2003.p.64-70.

2. Brasil.Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: Ministério da Saúde, 2004 a.47p. (Séries Temáticas)
3. International Conference on Harmonization-ICH. instrumento–Validation of analytical procedures:text and methodology Q2(R1), novembro, 2005. Disponível em:
<http://www.ich.org>. Acesso em 10/02/2007.
2. 4. Maia Campos, P.M.B.G and Silva, G.M. Ascorbic acid and its derivatives in cosmetic formulations. *Cosmetics & Toiletries*. 115, 59-62 (2000).
5. Maia Campos, P.M.B.G and Silva, G.M. Influence of a formulation`s pH on cutaneous absorption of ascorbic acid. *Cosmetics & Toiletries*.116, 73-75 (2001).
6. Sanches,J.Z; Oliveira, L.S.Efeito do ácido ascórbico nas células epiteliais. Pouso Alegre, 1997.
7. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J .; Glajch, J.L. Practical HPLC method development, 2ed. New York: Wiley Interscience, 1997.765p.
8. United States Pharmacopeia.30 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.
9. Weston, A.; Brown, P.R. HPLC and CG:principles and practice. San Diego: Academic Press, 1997.280p.

ANEXO C – TRABALHOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO

OS TRABALHOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO FORAM:

- 1) O Brasil está na moda. A utilização de princípios ativos oriundos de plantas da flora brasileira em cosméticos. publicado na íntegra na Revista Cosmetics and Toiletries, Brasil, Julho/agosto Vol 20. Nº 4, 2007.
- 2) Comparative characterization of isotretinoin products available on the market by laser diffraction and thermal behavior analysis. Journal of thermal analysis and calorimetry, 2008.
- 3) Characterization and analysis of monomethylsilanetriol ascorbate in cosmetic formulations. International Journal of Cosmetic Science, 2008.

O Brasil está na Moda

**Joyce Santos Quenca-Guillen, Carla Aiolfi Guimarães,
Maria Inês Rocha Miritelto Santoro, Erika Rosa Kedor-Hackmann**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo SP, Brasil

Este trabalho visa estimular estudos etnobotânicos, conscientizar sobre a necessidade do controle de qualidade de matérias-primas naturais e avaliar os apelos dos ingredientes naturais frente à literatura científica.

Los objetivos de este trabajo son: estimular los estudios etnobotánicos, estar enterado de que es muy importante realizar el control de calidad de los ingredientes activos y evaluar si el claim de los ingredientes naturales es soportado por literatura científica.

The aims of this work are: stimulate ethnobotanical studies, to make aware that is very important to perform quality control assays of active and to evaluate if marketing claims for the natural ingredients is supported by scientific literature.

De acordo com a resolução da Anvisa Nº 79, de 28 de agosto de 2000, cosméticos, produtos de higiene e perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.

Segundo dados da Abihpec (Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos), o setor de beleza é o que mais cresce no país e a indústria brasileira de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos apresentou crescimento médio de cerca de 8,2% nos últimos 5 anos.

Vários fatores têm contribuído para este excelente crescimento, entre os quais a participação crescente das mulheres no mercado de trabalho; a utilização de tecnologia de ponta e o conseqüente aumento da produtividade, favorecendo os preços praticados pelo setor; o lançamento constante de novos produtos, atendendo cada vez mais as necessidades do mercado; aumento da expectativa de vida, o que traz a necessidade de conservar a impressão de juventude.

Da Natureza

Após anos de desmatamento em nome do progresso, os países desenvolvidos ou em desenvolvimento despertam suas atenções para a preservação da natureza. Com as diversas campanhas promovidas em todo o mundo por organizações não-governamentais, a ecologia vem aos poucos conquistando os consumidores, cada vez mais envolvidos com a consciência ambiental. Atualmente, com a natureza mais distante e devastada, observa-se a preocupação da população em contribuir para a prevenção da fauna, da flora e da biodiversidade mundial.

Além de promover o desenvolvimento sustentável tão apregoado, algumas indústrias químicas e de cosméticos apostam em ingredientes naturais para beneficiar o consumidor final em sua qualidade de vida.

Em virtude dessa relação beleza versus meio ambiente, a Abihpec e a Cetesb (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, do Estado de São Paulo) assinaram um protocolo em 2005 em busca a melhoria da qualidade ambiental. O acordo consiste no desenvolvimento conjunto de programas, projetos e atividades capazes de incentivar o aprimoramento de medidas para melhorar a qualidade ambiental relacionada ao setor de higiene pes-

soal, perfumaria e cosméticos. O documento prevê a adoção de práticas como as de produção mais limpa e prevenção da poluição.

Biodiversidade Brasileira

A questão de que "o Brasil realmente está na moda" é evidenciada por feiras como a Cosmoprof-Bologna, realizada em abril de 2005. Mais de 30 empresas brasileiras estavam presentes, representando US\$ 29,9 milhões em negócios.

Os consumidores estão mais adeptos da consciência ambiental e por essa razão são atraídos pela utilização sustentável de recursos naturais. A exigência pelo uso desses recursos vem principalmente dos países desenvolvidos como a Alemanha, Japão e Estados Unidos chegando, aos poucos, ao Brasil. Os ingredientes da flora brasileira representam a mais nova aposta das indústrias de higiene e beleza para os mercados nacional e principalmente internacional.

Considerando as plantas superiores, temos atualmente cerca de 250.000 espécies em todo o mundo; aproximadamente 55.000 delas localizam-se no Brasil, país com a maior diversidade do planeta. Dessas espécies, apenas 2% são conhecidas, restam 98% para avaliação e pesquisa. Seis são os biomas existentes em terras brasileiras: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa.

A conservação da biodiversidade tem sua importância confirmada por seus desdobramentos econômicos, sociais e ambientais. Essa importância é revelada na agregação de valor a produtos e processos, na criação de novas oportunidades de empregos e de mercados, principalmente para países que possuem essa consciência. Seu potencial e impacto econômico não podem ser negligenciados

pelos diversos atores que participam do processo de conservação e uso sustentável, como setores governamentais, comunidades técnico-científicas, empresas, populações tradicionais, populações indígenas, além de toda a sociedade usuária e beneficiária da diversidade biológica.

A etnobotânica caracteriza-se pelo estudo do conhecimento e das conceituações desenvolvidas por qualquer sociedade sobre o mundo vegetal. O presente estudo engloba a maneira como um grupo social classifica as plantas e qual o uso que dá para elas.

A partir de estudos etnobotânicos, novas plantas e novas atribuições à sua utilização foram descobertas.

Em um estudo realizado na Amazônia, analisando a cultura do caboclo, detectou-se que na cultura popular da região, o corpo representa um momento secreto e cheiroso para que possa ser percebido muito próximo. Caboclos e caboclas atraem-se pela forma como se desafiaram, expondo suas verdades para que sejam descobertas. Seus cheiros são percebidos na intimidade, quando suas realidades são desnudadas. No culto ao amor não há o desejo unilateral de ser feliz, mas sim o de querer fazer feliz. O caboclo tem por hábito esfregar ervas aromáticas na pele. Ervas, lenhos, sementes e raízes fazem fluir o charme, a positividade e a beleza.

Os novos tempos caracterizam-se por rígida postura dos clientes, voltada para a expectativa de interagir com organizações que sejam éticas, com boa imagem institucional no mercado e que atuem de forma ecologicamente responsável. Sendo assim, a obtenção de ativos da flora brasileira deverá ocorrer de maneira ambientalmente correta, sem o comprometimento do meio ambiente, garantindo sua conservação e preservação para gerações futuras.

Materiais e Métodos

Para que o presente estudo atingisse seus objetivos foram abordadas, através de um questionário, 22 empresas de médio e grande porte, que atuam no segmento cosmético e utilizam ingredientes da biodiversidade brasileira em seu portfólio. Os questionários foram validados utilizando metodologia qualitativa.

As empresas entrevistadas apresentam os seguintes nomes

**Figura 1. Questionário: "O Brasil está na moda".
A utilização de ativos oriundos de planta brasileira
em cosméticos**

1. Nome:
2. Empresa:
3. Cargo:
4. Utiliza em cosméticos princípios ativos extraídos da flora brasileira?
( ) Sim ( ) Não
5. Quais fatores levam em consideração para escolha do fornecedor destes princípios ativos?
6. Por que utiliza princípios ativos extraídos da flora brasileira?
7. Qual a origem da parcela significativa destes princípios ativos?
( ) Cultivo ( ) Extrativismo ( ) Orgânico
8. Quais são as plantas mais utilizadas?
9. Apresenta Certificação/Qual?
( ) Série ISO 14000 Gerenciamento Ambiental
( ) Certificação Socio Ambiental ( ) Certificação Orgânica
10. Pesquisa e desenvolvimento. Faz estudo etnobotânico na Amazônia?
( ) Sim ( ) Não
11. Quais testes realizamos para comprovação da eficácia destes ativos?
( ) Potencial de irritabilidade ( ) Fototoxicidade
( ) Terceirização dos testes ( ) Sensibilização
( ) Fotoalergia cutânea ( ) Não realiza testes, se baseia pelo laudo do fornecedor

fantasia: Amend, Bio Bella, Muriel do Brasil, Extratos da Terra, Avora, Away, Phytotratha, Maxi Bio Cosmética, Valmari Dermo-cosméticos, Fenix Cosméticos, Medicatriz Cosméticos Terapêuticos, Nazca, Vital Cap, Bio Touch, Belofio, Aroma e Vida Cosméticos, OX Cosméticos, Le Cosmetique, Derm Attive, Vita Derm, Natura e Chamma da Amazônia. Todas se destacam por utilizar em suas formulações princípios ativos extraídos de plantas que compõem a flora brasileira.

As empresas foram abordadas durante o evento Cosmoprof-Cosmética 2005, realizado em São Paulo SP, exceto Natura, Chamma da Amazônia e Le Cosmetique, que deram sua contribuição a este trabalho através de pesquisadores e vendedores de pos-

Você sabe quem
é sua aliada?

A Cabot,
que desenvolve
produtos da mais alta
tecnologia para
realçar sua
beleza

CAB-O-SIL®

Agente tixotrópico e de espessamento em líquidos, possui alta fluidez em pós e que também funciona como agente anti-sedimentante de cargas e pigmentos, mantendo também estabilidade em altas temperaturas. O CAB-O-SIL também previne o bloqueio da válvula em sprays.

SpectrAL™

Tem efeito atenuador de rugas em maquiagens, proporcionando uma perfeita cobertura das imperfeições da pele, e gerando opacidade em sombras, máscaras e lápis labiais. Proporciona efeito suave em líquidos/bases anídras e sombras, e prolonga a adesão do cosmético à pele.

Cabot Divisão Sul Americana

CABOT

creating what matters

R. do Paraíso, 148 • 5º andar
Paraíso São Paulo - SP
CEP 04103-000
Tel.: 55 - 11 2144-6400
Fax 55 - 11 3253-0051
SAC: 0800-19 59 59

www.cabot-corp.com

Gráfico 1. Perfil profissional dos entrevistados

Gráfico 2. Principais atributos que as empresas consideram para a escolha dos fornecedores dos princípios ativos da flora brasileira

Gráfico 3. Porquê de princípios ativos da flora brasileira no portfólio de produtos da empresa

Gráfico 4. Origem dos princípios ativos oriundos da flora brasileira

Gráfico 5. Plantas mais utilizadas

Gráfico 6. Certificações apresentadas

Gráfico 7. Estudos etnobotânicos

Gráfico 8. Testes realizados para comprovação da eficácia dos princípios ativos

tos de venda. As indústrias que integram o presente estudo apresentam sede nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Pará e Santa Catarina, representando uma parcela significativa das regiões do Brasil.

Para obter o maior número de informações relevantes, foi aplicado às empresas o questionário (Figura 1) com 11 perguntas abertas e fechadas, respondidas por profissionais envolvidos com os setores de pesquisa e desenvolvimento, marketing, administração e vendas (Gráfico 1). As perguntas propostas referiam-se aos fatores que as indústrias consideravam para a escolha dos fornecedores de princípios ativos oriundos de plantas encontradas nos seis biomas brasileiros.

Outros questionamentos referiram-se ao motivo da utilização dos princípios ativos da biodiversidade brasileira, ao conhecimento da origem destes princípios ativos, às plantas mais utilizadas nas formulações, às certificações apresentadas, a realização de estudos etnobotânicos e aos testes empregados para a identificação e comprovação da eficácia dos princípios ativos.

Para tabulação dos dados do questionário foi empregada análise descritiva, seguida da confecção de gráficos de setor.

Resultados

Para a escolha do fornecedor de princípios ativos naturais, as empresas consideraram como importantes os seguintes fatores: 35% referiram-se à qualidade; 25% citaram o uso sustentável de recursos naturais; 20% levaram em conta a credibilidade e a apresentação de estudos de eficácia por parte dos fornecedores, 15% das empresas consideraram como importantes o custo e o apelo sócioambiental (Gráfico 2).

Com relação às razões para uso dos princípios ativos da flora brasileira em seus produtos, 30% dos entrevistados referiram-se ao apelo natural, 25% à valorização da flora, 15% dos entrevistados referiram-se às propriedades encontradas pelos princípios ativos e ao foco na exportação (Gráfico 4).

Quando questionados sobre a origem dos princípios ativos utilizados, 30% dos entrevistados afirmaram que utilizam princípios ativos originados do extrativismo, 25% deles disseram utilizar os de origem orgânica e cultivo, 10% dos entrevistados afirmaram utilizar o extrativismo controlado.

As plantas mais utilizadas pelas empresas são vulgarmente conhecidas como: Aloe vera (60%); Jaborandi, Cupuaçu e Castanha-do-Brasil (45%); Camomila (40%); Pitanga, Buriti e Copaíba (35%); Andiroba e Maracujá (30%) (Gráfico 5).

Quanto à certificação, 65% dos entrevistados afirmaram não apresentar nenhuma ou alegaram que está em andamento para implantação; 20% deles apresentaram série ISO 14000 e 5% apresentaram certificação sócio-ambiental ou certificação orgânica (Gráfico 6).

Sobre a realização de estudos etnobotânicos na flora brasileira, apenas 10% dos entrevistados afirmaram ter realizado este teste frente 75% que não realizaram e 15% preconizaram este estudo aos fornecedores (Gráfico 7).

Quando abordados sobre os testes que realizam para comprovar a eficácia dos princípios ativos: 60% das empresas terceirizam essas análises; 25% realizam testes básicos e 10% não realizam nenhum teste, baseando-se apenas nas informações declaradas pelos fornecedores em laudo técnico. Dessa forma, é necessário que a obtenção de princípios ativos extraídos da flora brasileira seja ambientalmente correta, socialmente justa e economicamente viável (Gráfico 8).

REMARCA

REGISTRO DE MARCAS E PATENTES
REGISTRO NO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ANVISA

Conte com nossa Experiência

*Em seus 29 anos de
existência, a Remarca legalizou
marcas e idéias, e registrou produtos
da maioria das indústrias brasileiras
de cosméticos.*

**Porque Experiência
também se Conta**

Av. Gaspard Libero 383 - 12º andar - 01033-001 São Paulo SP
Telefone (11) 2182-8000 • Fax (11) 2182-8008
e-mail: remarca@remarca.com.br
www.remarca.com.br

BRASCHEMICAL

**A proteção
da pele
em suas mãos!**

PROTETORES SOLARES COM UV TITAN
DIOXÍDO DE TITÂNIO MICRONIZADO

kemira

Linha UV Titan

Dióxido de titânio rutilo
ultrafino diversos tamanhos
de partícula e tratamentos
de superfície, para melhor
adaptar-se às necessidades
de sua formulação.

LUBRIZOL
Performance Products

Day Glo
Fluorescent Pigments

PKelco
A KELCO COMPANY
KELCO CHEMICAL CORPORATION - USA

(11) 5585-3671

Av. Fagundes Filho 101 - 13º andar - CEP 24304-010
São Paulo - SP - www.bra-chemical.com.br

Tabela 1. Apelos publicitários empregados para os princípios ativos da flora brasileira e propriedades citadas na literatura científica

Princípio Ativo	Apelo	Literatura Científica
Pitanga	Antioxidante, Adstringente	Antioxidante
Maracujá	Adstringente	Adstringente
Castanha-do-Brasil	Emoliente	Umectante e formador de filme que impede a perda de água na pele
Andiroba	Hidratação, anti-frizz	Ação antiinflamatória, antiacne
Copaíba	Hidratação, emoliente	Emulsionante ou co-emulsionante de sistemas O/A
Cupuaçu	Hidratação, emoliente	Umectante, aumento da hidratação cutânea
Guaraná	Anticelulítico, atenuador do brilho capilar	Anticelulítico, sabonetes para peles oleosas

Discussão

É válido salientar que em relação à utilização de princípios ativos oriundos de plantas da flora brasileira, todas as empresas foram unânimes na concordância. No entanto, observou-se que aproximadamente 10% delas apresentavam em seu portfólio produtos com princípios ativos da flora brasileira voltados somente para a exportação, reforçando a idéia de que os países desenvolvidos têm um grande interesse na "marca Brasil" e na biodiversidade brasileira. Observou-se, também, durante a pesquisa, que somente empresas que possuem conceitos bem definidos de uso sustentável do meio ambiente conseguem sucesso na exportação. Os fatores que as empresas consideram para a escolha do fornecedor desses princípios ativos são: qualidade, uso sustentável dos recursos naturais, credibilidade, apresentação de estudos de eficácia pelos próprios fornecedores, custo e apelo sócioambiental.

Uma característica bastante curiosa nesta avaliação foi a citação de 4% dos entrevistados no quesito capacitação profissional dos colaboradores da empresa fornecedora de princípios ativos da flora brasileira. Esse dado reflete forte tendência de que a credibilidade da empresa está seguramente ligada ao nível profissional de seus colaboradores, validando o investimento em treinamento e aperfeiçoamento profissional.

O porquê da utilização de princípios oriundos da flora brasileira está bem segmentado no Gráfico 3, reforçando ainda mais a tendência para a utilização da biodiversidade brasileira em formulações cosméticas.

Sobre a origem dos princípios ativos, existem dois paradigmas: o das empresas que se preocupam de forma cautelosa com a origem dos princípios ativos, utilizando inclusive plantas extraídas por extrativismo controlado, e o das empresas que não conhecem sequer a origem dos princípios ativos. As plantas mais utilizadas, presentes em pelo menos um dos seis biomas brasileiros são: Cupuaçu, Castanha do Brasil, Pitanga, Buriti, Copaíba, Andiroba e Maracujá. O *Aloe vera* foi citado por 10% dos entrevistados, entretanto, é preciso lembrar que esta planta não é originalmente brasileira. Os entrevistados também foram abordados em relação ao apelo publicitário que era dado a cada princípio ativo, com destaque para os constantes da Tabela 1.

Em relação à certificação, 69% das empresas não apresentaram nenhuma ou estão em fase de implantação. Este resultado é preocupante, pois a certificação é uma forma de monitorar o uso sustentável dos princípios ativos. Com relação a realização de estudos etnobotânicos, apenas 10% das empresas os fazem, demonstrando que a importância desses estudos ainda não está totalmente elucidada. Estes estudos são ferramentas imprescindíveis na descoberta e no uso racional dos princípios ativos.

Os testes realizados para avaliar a eficácia dos ativos são em sua maioria terceirizados: 30% das empresas utilizam este serviço. Entretanto, 5% delas confiam plenamente no laudo fornecido pelos fornecedores, o que pode acarretar problemas futuros nas formulações, ocasionando dúvidas e problemas de estabilidade. A falta de análise das matérias-primas pode comprometer a correta identificação ou a realização de testes tardiamente.

Outro fato a ser lembrado é a forte relação entre o uso dos recursos da flora brasileira e a preocupação com o produto final, no que diz respeito à embalagem: aproximadamente 15% das empresas procuram desenvolver embalagens biodegradáveis, sustentando a cultura de preservação do meio-ambiente.

Conclusão

Este trabalho mostrou que a biodiversidade brasileira está em fase de alta valorização. A grande maioria das empresas entrevistadas qualifica seus fornecedores corretamente, no entanto, precisa estar atenta em relação aos testes realizados e não se ater somente aos laudos emitidos pelos fornecedores. A forte tendência da "marca Brasil" deverá estar associada à preocupação com o uso sustentável dos recursos naturais e a valorização da biodiversidade.

O emprego de estudos etnobotânicos é extremamente necessário, pois através deles a integração entre ciência e qualidade de vida poderá ser aplicada. Desta forma, a obtenção de ativos da flora brasileira deverá ocorrer de maneira ambientalmente correta, sem o comprometimento do meio ambiente, garantindo sua conservação e preservação para gerações futuras.

Referências

1. Anuário Brasileiro da Indústria. *Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos*. 2004. Disponível em www.abihpec.org.br/conteudo/material. Acesso em 23/9/2005
2. Baby AR, Maciel CPM, Salgado-Santos IMN, Dias TCS, Kaneko TM, Consiglieri VO, Velasco VR. Uso de extratos de plantas em produtos cosméticos. *Cosmetics & Toiletries* (Ed em Port) 17(1):78-82, 2005
3. *The Healing Power of Rainforest Herbs*. Disponível em www.rain-tree.com/plants. Acesso em 15/9/2005
4. Rouillard et al. *Cosmetic or pharmaceutical composition containing an andiroba extract*. US Patent 5,958,421, September 28, 1999

Joyce Santos Quenca-Guillen, Carla Aiolfi Guimarães, Maria Inês Rocha Miritello Santoro são pós-graduandas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP

Profa. Dra. Erika Rosa Kedor-Hackmann é pesquisadora do Departamento de Controle de Qualidade Físico-Química de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

**COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF ISOTRETINOIN PRODUCTS
AVAILABLE ON THE MARKET BY LASER DIFFRACTION AND THERMAL
BEHAVIOR ANALYSIS.**

Carla Aiolfi Guimarães¹, Joyce S. Quenca-Guillen¹, Farid Mena², Jivaldo do R. Matos³,
Lucildes P. Mercuri⁴, André Borges Braz⁵, Fábila Cristina Rossetti⁶, Anil Kumar Singh¹, Érika
Rosa Maria Kedor-Hackmann¹, Maria Inês Rocha Miritello Santoro¹.

¹Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil.

²Department of Oncology, Sidney Kimmel Cancer Center, San Diego, California, USA.

³Institute of Chemistry, University of São Paulo, Brazil.

⁴Department of Exact and Earth Sciences, Diadema, Federal University of São Paulo, Brazil.

⁵Department of Engineering of Mines and Petroleum, Polytechnic School, University of São Paulo, Brazil.

⁶Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

Keywords: isotretinoin, particle size, thermal analysis.

Corresponding author: Dr. Lucildes P. Mercuri, Faculty of Department of Exact and Earth Sciences, Diadema, Federal University of São Paulo, Diadema Campus. Arthur Ridel Av. 275 - Eldorado Diadema City - São Paulo - Brazil, zip-code: 09972-270, fone: +55 (11) 4059-3618, E-mail: lpmercuri@unifesp.br.

ABSTRACT

This work was proposed to compare the pharmaceutical quality of three isotretinoin products available on the market. This comparative analysis was performed by laser diffraction/polarized light microscopy, thermogravimetry and differential scanning calorimetry techniques in order to characterize, respectively, the particle size distribution and the thermal behavior. The thermal stability has not been found as a variable parameter, the isotretinoin average particle size was a failure in 2/3 formulations. Although the thermal and particle size analysis are currently used in the pharmaceutical industry, the particle size is not a specification defined in the pharmacopeias and should be considered with more interest.

INTRODUCTION

13-cis retinoic acid or isotretinoin is a very effective drug approved in 1982 for the treatment of severe recalcitrant nodular acne by oral route. Isotretinoin, a vitamin A derivate, is a very lipophilic molecule, almost insoluble in water and only partially soluble in oil. It is labile to heat, light and air. These physicochemical properties impose considerable limitations upon formulation options, a simple dry powder formulation would not have a sufficient shelf-life and a suspension of isotretinoin in oil is more stable. The bioavailability is improved by the lipophilic microenvironment provided by an oil suspension, and can be further enhanced by decreasing the particle size of the active ingredient, the composition and dissolution rate of the capsule shell can also influence bioavailability (Taylor & Keenan, 2006). The measurement of particle size for pharmaceutical materials is important because it influences bulk physical properties, and determines the ability of powders to flow, mix, granulate and dissolve (Narayan & Hancock, 2005). The particle size is not yet a specification defined in the pharmacopeias. It would seem important therefore that future research determines the full effects of particle size variation by comparative bioequivalence tests (Taylor & Keenan, 2006). For suspensions of

lipophilic molecules such as isotretinoin formulation, not only the amount of isotretinoin in each capsule is important, but also the size of the isotretinoin particles, which has a direct bearing on absorption from the gastrointestinal tract. Indeed, the smaller particles are more quickly and more completely absorbed. Absorption is a factor that can profoundly affect both efficiency and adverse effects of the medication (Taylor & Keenan, 2006). The thermal analysis is routinely used for drug quality control -whenever possible- usually by combining differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG) (Silva et al., 2007; Cardoso et al., 2005). These analytical techniques evaluates the physical properties of drugs, including melting and vaporization temperatures and with the corresponding enthalpies, glass transitions, vapor pressures, yielding results rapidly and efficiently. Our comparative study reports the characterization of the isotretinoin contained in three products available on the market by using the particle size distribution and the thermal behavior parameters.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The isotretinoin standard 13-*cis*-retinoic acid was United States Pharmacopeia Reference Standard (USPRS). The three products named as [“Branded Original Product A” (BO-Product A), “Branded Original Product B” (BO-Product B) and “Generic Product C” (G-Product C)] were all soft-gel capsules containing 20 mg of isotretinoin commercialized from two different pharmaceutical companies.

Particle size

The particle size analysis was performed by laser diffraction, using a Mastersizer S long bed Ver. 2.19 with MS with a Small Volume Sample Dispersion Unit QS (Malvern®, UK) available to measure samples in the range 0.05 µm to 3500 µm. The content of one capsule was dispersed in acetone and the operation took place at 22°C and at a focal length of 300 mm to achieve a

particle concentration between 5% and 25%. For each assay, three series of ten separate determinations were made to guarantee the representation of the analysis.

Microscopy

The resulting formulations were evaluated by visual observation and by polarized light microscopy (Carl Zeiss, Germany) at a magnification x20.

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC curves were obtained in a DSC-50 cell (Shimadzu) using aluminum crucibles with about 2 mg of samples, under dynamic N₂ atmosphere (50 mL/min) and with a heating rate of 10°C/min in the temperature range from 25 to 800°C.

Thermogravimetry (TG/DTG)

TG/DTG curves were obtained with a thermobalance model TGA-50 (Shimadzu) in the temperature range 25 - 800°C, and using platinum crucibles with about 4 mg of sample, under dynamic N₂ atmosphere (50 mL/min) and with a heating rate of 10°C/min in the temperature range from 25 to 800°C.

RESULTS

Particle size

The particle size distribution data are shown in Table 1, where D (v, 0.1) indicates that 10% of particle are of this size or smaller; D (v, 0.5) indicates that 50% of particle are of this size or smaller; D (v, 0.9) indicates that 90% of particle are of this size or smaller and D [4.3] represents the average particle size (Table 1 and Figure 1).

The visual examinations of samples were also characterized by microscopy (Figure 2) in order to observe the roughness and the differences of the particles morphology.

Thermal Behavior Characterization

The TG/DTG and DSC curves of isotretinoin reference standard are seen in the Figure 3.

The TG/DTG curves illustrated in the Figure 3 indicate that the isotretinoin reference standard is stable thermally up to $\sim 110^{\circ}\text{C}$ and show two thermal decomposition steps : a large mass loss ($\Delta m = 80\%$) between $\sim 110^{\circ}\text{C}$ and $\sim 380^{\circ}\text{C}$ is observed in addition to a small loss ($\Delta m = 19.6\%$) between 380°C and 600°C . The DSC curve shows the melting point for the sample. The melting point of the sample is observed at $\sim 181^{\circ}\text{C}$ with decomposition.

The TG/DTG curves of the three commercial isotretinoin samples are seen respectively in the Figure 4. These curves indicate that the three isotretinoin samples BO-Product A, BO-Product B and G-Product C are stable thermally up to $\sim 180^{\circ}\text{C}$ and show a continuous thermal decomposition between ~ 180 and $\sim 550^{\circ}\text{C}$ where the loss is complete ($\Delta m = 98.9\%$).

DISCUSSION

This study was undertaken to investigate the pharmaceutical quality of three products -named in our study by confidentiality “Branded Original Product A or BO-Product A”, “Branded Original Product B or BO-Product B” and “Generic Product C or G-Product C”- currently available on the market (two brand products and one generic product) and made by two different companies. All the products were gel-soft capsules and were suspensions in oil, protected from direct light and air by their packaging and were not with expired dates. Because a suspension of isotretinoin in oil is known to be more stable, hence the majority of isotretinoin products are suspensions in oil. The composition and dissolution rate of the capsule shell can also influence the bioavailability. The bioavailability is improved by an oil suspension and can be further enhances by decreasing the particle size of the active ingredient. Indeed, not only the amount of isotretinoin in each capsule is important, but also the size of isotretinoin particles, which has a direct bearing on absorption from the gastrointestinal tract. Indeed, the smaller size of

isotretinoin particles will be more rapidly and more completely absorbed, resulting in higher plasma concentrations (Taylor & Keenan, 2006; Chaumeil, 1998) whereas larger particles may be less completely absorbed and released over a longer time period (Taylor & Keenan, 2006). The absorption of the active ingredient is a factor that can profoundly affect both the therapy efficiency and even may adverse the effects of the medication. Interestingly, our study showed clearly that there was a considerable difference between 2/3 of the isotretinoin products analyzed based on the size particle characterization (Table 1 and Figure 1). The size particle distribution was very similar between those found in the “Branded Original Product B” and in the “Generic Product C” but exhibits large particles comparatively to the small particles obtained in the “Branded Original Product A”. Indeed, the median diameters of the smallest (BO-Product A) and the largest (BO-Product B and G-Product C) differed approximately by a factor = 3. Moreover, the visual examination and the microscopic observations confirmed the considerable particle size variation obtained (Figure 2). Besides the particle size analysis, the thermal behavior was similar between the three samples analyzed but more stable thermally comparatively to the reference standard. The latter observation was expected and could be easily explained by the fact that the reference standard is a powder and therefore differed from the isotretinoin samples which were contained in oil suspension.

Indeed, the isotretinoin reference standard was stable thermally up to ~ 110°C (Figure 3) whereas all the isotretinoin samples analyzed were stable thermally up to ~ 180°C (Figure 4).

Together, our results suggest strongly that the particle size and the excipient are two important parameters to ensure the final quality control of some drugs.

CONCLUSIONS

Whereas the thermal stability has not been found as a variable parameter, the isotretinoin average particle size was a failure in 2/3 formulations. Interestingly, the particle size is a factor known to affect the absorption of the molecules from the gastrointestinal tract and, therefore, may have consequences for the safety and the efficiency of the product. Eventually, the design,

the quality control and the characterization of the pharmaceutical formulations are important to ensure the quality of the final product. Although the thermal and particle size analysis are currently used in the pharmaceutical industry, the particle size is not a specification defined in the pharmacopeias and should be considered with more interest. It would seem important; therefore, that future research determines the full effect of particle size variation on patient exposure to isotretinoin by comparative bioequivalence testes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) CAPES (Foundation to Higher Level People Improvement) and FAPESP (Research Support Foundation in the State of São Paulo) for the financial support and FAPESP project number 04/09465-7 for apparatus and Professor Maria Vitória Lopes Barda Bentley.

REFERENCES

- (1) P. W. Taylor and M.H.J. Keenan, *Curr. Med. Res. Opin.*, 22(3) (2006) 603-615.
- (2) M.A.S. Silva., R.G. Kelmam, T. Foppa , A.P. Cruz, C.D.Bertol, Sartori T., A. Granada, F. Carmignan and F.S. Murakami, *J. Therm. Anal. Cal.*, 87 (2007) 463-467.
- (3) T.M. Cardoso, P.O. Rodrigues, H.K. Stulzer and M.A.S. Silva, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31 (2005) 631-637.
- (4) J.C. Chaumeil, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 20 (1998) 211-215
- (5) United States Pharmacopeia Ed. 29 (2006), *United States Pharmacopeial Convention*, Rockville, MD.
- (6) P. Narayan, B.C. Hancock, *Mat. Sci. Eng. A*, 407 (2005) 226-233.
- (7) FDA guidance (2007). *Guide to inspections oral solutions and suspensions*, march: www.fda.gov.

Figure 1. Average particle size distributions (μm) in the three different samples tested. The histogram shows that the median diameters particles found in the “Branded Original Product A” are ~ three times smaller than the “Branded Original Product B” and the “Generic Product C”.

Figure 2. Isotretinoin particles from the (A) Branded Original Product A; (B) Branded Original Product B; (C) Generic Product C. Particles were visualized by a polarized light microscope (Carl Zeiss, Germany) at a magnification x20.

Figure 3. TG/DTG and DSC curves of isotretinoin reference standard. Conditions: reference standard was processed in dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min) and with a heating rate of 10°C/min.

Figure 4. TG/DTG curves of isotretinoin samples. Conditions: Samples were processed in dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min) and with a heating rate of 10°C/min.

Table 1: Particle size distributions (μm).

Sample	D (v, 0.1)	D (v, 0.5)	D (v, 0.9)	D [4.3]
Branded Original Product A	2.94	10.04	22.74	11.66
Branded Original Product B	7.82	29.27	55.30	30.80
Generic Product C	8.26	25.57	64.93	33.37

D (v, 0.5) indicates that 50% of particle are of this size or smaller;
D (v, 0.9) indicates that 90% of particle are of this size or smaller;
D [4.3] represents the average particle size.

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

**CHARACTERIZATION AND ANALYSIS OF MONOMETHYLSILANETRIOL
ASCORBATE IN COSMETIC FORMULATIONS**

Journal:	<i>International Journal of Cosmetic Science</i>
Manuscript ID:	ICS-2007-0068
Manuscript Type:	Original Article
Keywords:	ascorbic acid, monomethylsilanetriol ascorbate, thermoanalysis, particle size, cosmetic formulations

CHARACTERIZATION AND ANALYSIS OF MONOMETHYLSILANETRIOL ASCORBATE IN COSMETIC FORMULATIONS

J. S. Quenca Guillen¹; C. A. Guimarães¹; M. I. R. M. Santoro¹; C. D. Ropke¹; D. P. Rivelli¹; J. R. Matos²; L. P. Mercuri³; F. C. Rosseti⁴; M. V. L. Badra Bentley⁴; J. O. Del Ciampo⁴; F. Mena⁵; P. I. Silva Jr⁶; A. K. Singh¹; E. R. K. Hackmann¹.

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences – University of São Paulo, SP, Brazil.

² Chemistry Institute – University of São Paulo, SP, Brazil.

³ Federal University of São Paulo – Diadema Campus, SP, Brazil.

⁴ Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, SP, Brazil.

⁵ Sidney Kimmel Cancer Center, San Diego, California, USA

⁶ Butantan Institute, SP, Brazil.

Mailing Address: lpmercuri@unifesp.br

e-mail address: lpmercuri@unifesp.br

Keywords: ascorbic acid, monomethylsilanetriol ascorbate, thermoanalysis, particle size, cosmetic formulations

ABSTRACT

The use of ascorbic acid in cosmetic formulations is very difficult because of its low stability in aqueous solutions. Oxidation easily occurs in formulations such as gels and O/W emulsions. To cover these defects monomethylsilanetriol ascorbate (MMSA) has been introduced on the world of cosmetic market. This ascorbic acid derivative is a water-soluble substance, a stable compound and presents the same functional properties of vitamin C besides the presence of a silanol group in its chemical structure. The aim of this study was to characterize the presence of a MMSA as a raw material pure and in cosmetic formulations containing Sepigel 305® (polyacrilamide, C13-14 isoparaffin and Laureth 7), as a main emulsifier, by thermoanalysis, by particle size determination and by evaluating MMSA antioxidant activity by DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. Thermoanalysis was performed using thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC). The evaluation of particle size was performed by laser diffraction using Fraunhofer method. For MMSA *in vitro* antioxidant activity evaluation the DPPH method was used. The results obtained in thermoanalysis demonstrated that MMSA can stabilize cream-gel preparations with Sepigel 305® by retarding the loss of interlamellarly fixed water. The particle size distribution results showed that the average size was approximately 1 µm for pure MMSA, 6.03 µm for gel-cream preparation with 10% of MMSA and 5.18 µm for gel-cream preparation without MMSA. During DPPH experiments, MMSA presented antioxidant properties as good as vitamin C. It was proved that MMSA is a stable derivative of ascorbic acid and its stability can be improved in gel-cream preparations with Sepigel 305®, at the same time preserving the antioxidant activity.

RÉSUMÉ

L'utilisation de l'acide ascorbique en formulations cosmétiques est très difficile à cause de sa faible stabilité en solution aqueuse. L'oxydation est très fréquente en gel et en H/E émulsions. Pour résoudre le problème, mis au marché des cosmétiques mondial. Ce dérivé de l'acide ascorbique est hydrosoluble, stable et présente les mêmes propriétés fonctionnelles de l'acide ascorbique et plus présente un silanol groupe dans son structure chimique. L'objectif de l'étude a été la caractérisation de MMSA isolé et en formulations cosmétiques contenant Sepigel 305® (polyacrilamide, C13-14 isoparaffin and Laureth 7), comme principal tensioactif agent, par thermo-analyse a été par la détermination de la taille de la particule et par la évaluation de l'activité antioxydante de MMSA la méthode de DPPH. La thermo-analyse a été réalisée en utilisant les techniques de thermo-gravimétrie et calorimétrie différentiel et le test de la taille a été réalisé par diffraction par laser en utilisant la méthode de Fraunhofer. Pour faire l'analyse de l'activité antioxydante de MMSA a été utilisé la méthode de DPPH. Les résultats obtenus par thermo-analyse ont démontré que le MMSA peut stabiliser la formule crème-gel contenant Sepigel 305® pour mettre en retardant la sortie de l'eau interlamellaire fixe. Les résultats pour les analyses de la taille de la particule ont été approximativement 1 µm pour MMSA et 6,034 µm pour la formule de gel-crème avec 10% de MMSA et 5,189 µm pour gel-crème sans MMSA. Pendant les tests avec la méthode DPPH, le MMSA a démontré les grosses propriétés antioxydantes autant que les vitamines C. En conséquence de la recherche a été prouvé que le MMSA est un dérivé stable de la vitamine C qui peut stabiliser la formulation gel-crème avec Sepigel 305® et qui présente l'activité antioxydante aussi efficace que la vitamine C.

INTRODUCTION

Vitamin C, chemically known as ascorbic acid, is a water soluble essential vitamin. Unlike most animals, which can form ascorbic acid (AA) by metabolizing glucose, humans require an exogenous source. Ascorbic acid is an essential nutrient involved in many physiological functions. Lack of L ascorbic acid is a key factor in scurvy [1,2,3,4]

The use of AA in cosmetic formulations is difficult because of its low stability in aqueous solutions, oxidation easily occurs in formulations such as gels and O/W emulsions [5]. When AA undergoes oxidation, it can produce dehydro-L-ascorbic acid. Several other degradation occurs when AA stored at temperature, exposed to light and high pH values and in the presence of incorporated oxygen. Although the reaction mechanism of AA with an oxygen molecule has not yet been fully elucidated [5,6]. To cover these stability drawbacks, several AA derivatives have been developed. These derivatives have an action similar to that of AA but with better chemical stability and with comparable percutaneous permeation. As result, monomethylsilanetriol ascorbate (MMSA) have been recently introduced for cosmetic formulations.

According to literature data, MMSA (Figure 1) is a water-soluble, stabilized vitamin C derivative that presents the same functional properties of AA besides present's silanol in its chemical structure [7]. The Silanol is a privileged active ingredient for cosmetics because it is essential for growth, development and regeneration of the cutaneous connective tissue [8]. Water soluble and biologically active, silanols protect efficiently skin from exterior aggressions, aging and dysfunction of the cell metabolism. Silanol have multiple activities: restructuring effects, prevention, protection, reparation, metabolism stimulation and also an excellent skin tolerance [8].

Many methods by which ascorbic acid may be detected, measured, characterization and evaluation of antioxidant activity in foods and pharmaceuticals and cosmetics have been reported in the literature. However, up to now, there never been reports that shown the antioxidant activity of MMAS and that evaluate MMAS by thermoanalysis and particle size and its behavior in cosmetic formulations.

The thermal analysis methods have been used in pharmaceutical area for more than three decades. It refers to a group of techniques in which a physical property of a substance and its reaction product is measured as a function of a controlled temperature program [9,10]. They are established techniques for quality control, preformulation, stability, drug-excipient interactions and purity studies of raw materials and pharmaceutical products [10,11].

The Laser diffraction method is becoming the preferred standard in the pharmaceutical industry for particle size analysis in the range 0.05-3500 μm for characterization and quality. The statistical parameters used for measurement of laser diffraction method are mean, median and mode. Mean is the main and signify some arithmetic average of the data. There are a number of means that can be calculated for particles. The Zeta sizer system determines the size by first measuring the Brownian motion of the particles using Dynamic Light Scattering (DLS). The Brownian motion is defined as the random movement of particles in a liquid due to the bombardment by the molecules that surround them. The measurements are average of the particle size and the polydispersity index (PDI) that is known as the coefficient of the squared term, c , when scaled as $2c/b^2$. The Zeta sizer system can measure particle size for the size range 0.6 nm to 6 μm [12,13].

A method using a different approach has been cited in the literature to evaluate the antioxidative activity of specific compounds or extracts, the latter are allowed to react with a stable radical, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) in a methanol solution. The reduction of DPPH is followed by monitoring the decrease in its absorbance at a characteristic wavelength during the reaction [14,15].

The aim of this study was to characterize the ascorbic acid derivative MMSA isolate and in cosmetic formulations containing Sepigel 305 also known as C13-14 isoparaffin and laureth-7 as a main emulsifier by thermoanalysis, particle size distribution and microscopy, and evaluate antioxidant activity of MMSA by DPPH method.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

The following chemicals were used in the preparation of formulations: 1% aqueous solution of monomethylsilanetriol ascorbate (Ascorbosilane C®) was provided from Exsymol S.A.M (Monaco, France); cyclopentasiloxane (Dow coming®245 fluid) was purchased from Dow Corning (São Paulo, Brazil); polyacrilamide (and) C13-14 isoparaffin (and) laureth-7 (Sepigel 305®) were purchased from Seppic (Paris, France); propileneglycol; methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben (Phenoben®); butylated hydroxytoluene (BHT®); hydrolyzed wheat protein (Wheat pro®) and methyl gluceth-20 (Glucan E-20®) were provided by local Chemical Company, Polytechno (São Paulo, Brazil).

The following materials were used for the DPPH method: standard ascorbic acid was from Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA); DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate 95% free radical) and methanol from Merck® (Darmstadt, Germany).

APPARATUS

Viscometer model RVT, Brookfield (Stoughton, USA); pH meter, Digimed (São Paulo, Brazil); Differential scanning calorimetry, DSC-60 cell, Shimadzu (Kyoto, Japan); Thermobalance TGA-50, Shimadzu (Kyoto, Japan); Coulter LS-13320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer, Beckmann (Miami, FL, USA); Zeta sizer - Nano series Nano ZS, Malvern (Malvern, UK); Visual and polarized light microscopic, Carl Zeiss (Jena, Germany) and Spectrophotometer UV 1601-PC, Shimadzu (Kyoto, Japan).

METHODS

Preparation of sample formulation

A standard gel-cream formulation (presented in Table I) were prepared with 10% of MMSA (F1) and without MMSA (F2). The gel-cream preparations were obtained at room temperature.

Stability Studies

Accelerate stability of the formulations was investigated at 5 ± 1 , 25 ± 1 , $40\pm1^\circ\text{C}$ and photostability at $25\pm1^\circ\text{C}$ for 90 days according to the Guide of Stability of Cosmetic Products of Anvisa (Brazilian National Agency of Sanitary Vigilance) [16].

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The DSC measurements were performed on a Shimadzu DSC-60 cell. Approximately 2 mg of samples were weighted and placed in a sealed aluminum pan. An empty aluminum pan was used for reference. The temperature range tested was from 25 to 150°C and 25 to 200°C and heating rate of $5^\circ\text{C}/\text{min}$ in dynamic nitrogen atmosphere with the flow rate of 50 mL/min. The cycles of heating and freezing were performed from -5 to -60°C ; 10 to 25°C ; -5 to -60°C and 10 to 50°C for MMSA sample and distilled water using liquid nitrogen with the flow rate of 100mL/min.

Thermogravimetric analysis (TG)

The TG curve was measured on a Shimadzu thermobalance TGA-50. Approximately 5.0 mg of sample was used in a platinum pan, in a temperature range from 25°C to 200°C with dynamic nitrogen atmosphere at a flow rate of

50mL/min and heating rate of 5° C/min. The decomposition was monitored as a function of temperature and weight loss. The TG curve was performed only for MMSA sample.

Loss on drying

The MMSA TG curve results were used to analyze loss on drying, according to method described in USP Pharmacopeia 30th Ed [17]. This method consists in the determination of the amount of volatile matter in the sample under the specified conditions.

Particle size

The particle size distribution of the samples was determined with a Beckmann Coulter LS-13320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer for F1 and F2. For particle size analysis, the gel-cream preparations were diluted to 1:100 with purified water and mixed in a vortex. The Zeta sizer system was used to analyze MMSA particle size. An amount of sample equivalent to 3 mL was introduced into the system and all measurements were made in triplicate.

Microscopy

The resulting formulations were evaluated by visual and polarized light microscopy (Carl Zeiss, Germany). The samples were examined one month after preparation.

DPPH method

The free radical-scavenging capacity of MMSA was tested by its ability to bleach the stable DPPH. The reaction contained DPPH in a concentration of 55 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and ascending concentrations of MMSA in 10 ml of methanol. The ascorbic acid standard solution in 10 mL was used as reference. The reaction was carried out at room temperature for 2 hours and the absorbances of the solutions were recorded at 515 nm. The antiradical activity was defined as the concentration of the antioxidizing agent that lowers the DPPH concentration (blank value) to 50% of the initial amount (efficient concentration 50 % EC50).

RESULTS AND DISCUSSION

Stability Studies

All gel-cream preparations were submitted to technical tests to check their physico-chemical and organoleptic characteristics at time zero and three months after the preparation. No phase separation was observed in samples after centrifugation test. The organoleptic and subject features were observed after T1, T30, T60 and T90 days after the preparation of the formulations (Table II).

The organoleptic features of gel-cream preparations remained stable throughout stability studies period, except cream-gel preparation with 10% of MMSA that presented a slight color change when submitted to a photostability chambet at $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

The pH and viscosity of prepared formulations were monitored during 90 day stability study period. Results are presented on Tables III and IV.

The pH values of the prepared formulations were between 5.36 and 5.50 for gel-cream preparations with 10% of MMSA and between 5.24 and 5.35 for cream-gel preparation without MMSA and remained stable for the entire assay period.

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The DSC curves of MMSA show that sample remained stable at temperature range from 25 to 150 °C (Figure 2).

The Figure 3 shows the DSC curves of MMSA (water solution with 1% of MMSA) in a curve obtained at cycles of freezing and heating, corresponding to crystallization at -13.5° C and melting point at 5.7° C. The analysis was performed using purified water as standard. The DSC curves can be seen in Figure 3.

The DSC curves of the gel-cream samples preparation are presented in Figure 4. The DSC curve of F1 (with 10% of MMSA) showed two peaks, the first represents bulk water and the second interlamellarly fixed water. The DSC curve of F2 (without MMSA) showed two peaks, the first represents dehydration and the second the decomposition process. It can be observed that MMSA stabilize the formulation, since in DSC curves without MMSA it was observed that bulk water and interlamellarly fixed water needed a higher energy amount in order to be dislocated, leading to a more stable gel-cream preparation.

The excipients of the gel-cream preparations were evaluated by DSC curves for improve the develop pf the formulations and the results of the analysis are presented in Figure 5. The DSC curves showed the thermal stability of the excipients.

Thermogravimetric analysis (TG)

The TG curve of MMSA (1% aqueous solution) shows a total mass loss at 100° C (Figure 6). The results of loss on drying obtained with TG curve showed a value of 1.8% of solid material. Its can be inferred that the mass loss is due to water evaporation and the concentration of MMSA in a water solution is in accordance with the parameters established in the manufacturer specifications.

Particle size

The particle size analysis results of formulation F1 and F2 are presented in Table V. The size distribution curves are presented in Figures 7, 8 and 9. The visual examinations of samples were also characterized by microscopy to make possible the observation of roughness and variation in morphology of the particles.

It can be observed in Figure 7 that: (a) F1 presented a unimodal particle size distribution because it showed one well definite populations with particle size distribution between 1-20 μm (Figure 7). The averages of the particle size of the samples can be observed on Table V. (b) F2 presented a unimodal particle size distribution because presented only one population between 1 - 20 μm (Figure 8). (c) MMSA presented an average of particle size the approximately 1 μm and polidispersity index the 0.1.

Microscopy

Representative photomicrographs of gel-cream preparations are shown in Figure 11. Both formulations (F1 and F2) presented inhomogeneous distribution of internal phase droplets with two distinct sizes. It is also evident that the addition of MMSA in the formulation does not interfere in the stability of the gel-cream preparation.

DPPH method

The *in vitro* results obtained with DPPH tests shows that the MMSA antioxidant properties are as good as that of vitamin C. The results of statistical evaluation were presented in Figures 11 and 12. The ascorbic acid EC50 was 6.65 $\mu\text{g/ml}$. MMSA sample presented EC50 of 5.92 $\mu\text{g/ml}$. According to T student test, $P=0.1408$ is not considered significant, thus the *in vitro* antioxidant activity of MMSA is as efficient as that of ascorbic acid.

CONCLUSIONS

All gel-cream formulations remained stable during three month study period, showing that gel-cream preparations containing Sepigel 305® as main emulsifier agent and 10% of MMSA present stable behavior when submitted to different storage conditions.

The DSC curves of F1 (with 10% of MMSA) and F2 (without MMSA) showed that MMSA stabilize the formulation. This fact could be confirmed because when compared with these curves were those of preparations without MMSA it was observed that bulk water and interlamellarly fixed water needed a higher energy in order to be displaced, thus to a gel-cream preparation more stable.

According to the comparison between results of loss on drying and evaluation by TG it can be concluded that mass loss is due to the evaporation of water and that the concentration of MMSA in aqueous solution is in compliance with the parameters established in the manufacturer specification.

The evaluation of the mean particle size was approximately 1 μm for MMSA sample, 6.034 μm for gel-cream preparation with 10% of MMSA and 5,189 μm for gel-cream preparation without MMSA.

During DPPH experiments, MMSA demonstrated strong antioxidant properties as good as that vitamin C.

In conclusion, MMSA might have interesting applications in cosmetic products and can be a good alternative as ascorbic acid derivative because it is as efficient as and more stable than vitamin C in cosmetics formulations. Besides that it can stabilize gel-cream preparations using Sepigel 305® as emulsifier agent.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Prof. Silvia Berlanga de Moraes Barros for her technical assistance in this study. We are thankful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for the financial support and FAPESP project number 04/09465-7 acquisition of Beckmann Coulter LS-13320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer.

BIBLIOGRAPHY

1. Chiu, A., Kimball, A.B. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *British Journal of Dermatology*.149, 681-691 (2003).
2. Ochiai, Y., Kaburagi, S., Obayashi, K., Ujjie, N., Hashimoto, S., Okano, Y., Masaki, H., Ichihashi, M and Sakurai, H. A new lipophilic pro-vitamin C, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid (VC-IP), prevents UV-induced skin pigmentation through its anti-oxidative properties. *Journal of Dermatological Science*.44, 37-44 (2006).
3. Thormahlen, S. Vitamins in cosmetic formulations. A new generation of products. A new generation of products. *In IFSCC International Congress XXIst*, 459-467 (2000).
4. Kameyama, K., Sakai, C., Kondoh, S., Yonemoto, K., Nishiyama, S., Tagawa, M., Murata, T., Ohnuma, T., Quigley, J., Dorsky, A., Bucks, D and Blanock, K. Inhibitory effect of magnesium L-ascorbyl-2-phosphate(VC-PMG) on melanogenesis in vitro and in vivo. *Journal of the American Academy of Dermatology*.34, 29-33 (1996).
5. Chang, M.L and Chang, C.M. Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and its derivatives in cosmetics using epoxy-carbon composite electrodes. *Journal of food and drug analysis*.13, 205-211 (2005).
6. Gallarate, M., Carlotti, M.E., Trotta, M and Bovo, S. On stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *International Journal of Pharmaceuticals*.188, 233-241 (1999).
7. Technical Literature of Ascorbosilane C®. Available in: <http://www.exsymol.com>. Access in 12/12/2006.
8. Fructus, A., Montet, F and Lazar,G. Cosmetic and dermatological composition containing a derivative of methylated silanol and a derivative of hydrolysed plant protein. Available in: <http://www.freepatentsonline.com/20020025303.html>. Access in 11/01/2007.
9. Mura, P., Gratteri, P and Fuccini, M.T. Compatibility studies of multicomponent tablet formulation. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*.68, 541-551 (2002).
10. Silva, M.A.S., Kelmann, R.G., Foppa, T., Cruz, A.P., Bertol., C.D., Sartori, T., Granada, A., Carmignan, F and Murakami, F.S. Thermal analytical study of fluoxetine hydrochloride. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*.87, 463-467 (2007).

11. Cardoso, T.M., Rodrigues, P.O., Stulzer, H.K. and Silva, M.A.S. Physical-chemical characterization and polymorphism determination of two nimodipine samples deriving from distinct laboratories. *Drug development and Industrial Pharmacy*. **31**, 631-637 (2005).
12. Washington, C. Particle Size analysis in the pharmaceuticals and other industries, Ellis Horwood (1993).
13. Malvern Instruments Ltd. Zeta sizer Nano Series User Manual. 270 p, Malvern , UK (2004).
14. Brand-Williams,W.,Cuvelier, M.E and Berset,C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel - Wissenschaft+ Technologie- cat.inist.fr* (1995).
15. Buenger,J., Ackermann., Jentzch, A et-al. An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. *International Journal of Cosmetic Science*. **28**, 135-146 (2006).
16. Brazil. Ministry of Health. ANVISA. Guide of stability of cosmetic products..Brasília:Ministry of health , 47p, (2004).
17. United States Pharmacopeia, 30^{ed}, U.S Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2006.

Table I. Composition of the gel-cream preparations.

Components (Brand name)	Concentration (%)		Function
	F1	F2	
Sepigel 305 ®	2.5	2.5	tensoactive
Propilene glycol ®	2.0	2.0	humectant
Glucan E20 ®	2.0	2.0	humectant
Phenoben ®	0.5	0.5	preservative
Dow corning 245 fluid ®	5.0	5.0	emolient
Versene Na ₂ ®	0.1	0.1	quelant
BHT ®	0.1	0.1	antioxidant
Wheat pro ®	2.0	2.0	humectant
Ascorbosilane C ®	10.0	-	active principle
Distillated Q.S.P 100	75.8	85.8	vehicle

Table II. Organoleptic features of gel-cream preparations.

Sample	Storage Conditions (T1;T30;T60;T90)	Appearance	Color	Smell	Spreadability
F1(gel cream with MMSA 10%)	5 ± 1° C	Homogeneous	White	Odorless	Good
	25 ± 1° C	Homogeneous	White	Odorless	Good
	40 ± 1° C	Homogeneous	White	Odorless	Good
	photostability at 25 ± 1° C	Homogeneous	Lightly yellow	Odorless	Good
F2 (gel cream without MMSA 10%)	5 ± 1° C	Homogeneous	White	Odorless	Good
	25 ± 1° C	Homogeneous	White	Odorless	Good
	40 ± 1° C	Homogeneous	White	Odorless	Good
	photostability at 25 ± 1° C	Homogeneous	White	Odorless	Good

Table III. pH measurements of gel-cream preparations

pH	Storage Condition		Storage Condition		Storage Condition		Storage Condition	
	5 ± 1° C		25 ± 1° C		40 ± 1° C		25 ± 1° C (photo)	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
T1	5.46	5.32	5.46	5.32	5.44	5.31	5.43	5.30
T30	5.50	5.35	5.42	5.31	5.42	5.30	5.39	5.26
T60	5.47	5.34	5.40	5.30	5.41	5.30	5.39	5.25
T90	5.48	5.32	5.39	5.28	5.39	5.29	5.36	5.24

Table IV. Measurements of apparent viscosity of gel-cream preparations

Study (days)	period	Apparent viscosity (cP)		Apparent viscosity (cP)		Apparent viscosity (cP)		Apparent viscosity (cP)	
		Storage Condition		Storage Condition		Storage Condition		Storage Condition	
		5 ± 1° C		25 ± 1° C		40 ± 1° C		25 ± 1° C (photo)	
		F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
T1		9300	12500	9300	12500	9300	12500	9100	12300
T30		10800	14000	8700	12000	8900	12200	8650	11800
T60		11100	14250	8500	11800	8600	11900	8400	11500
T90		10900	14000	8400	11000	8550	11700	8100	11200

Table V. Measurements of particle size distributions of the samples F1 and F2.

Sample	D [4,3]	D [0,9]	D [0,5]
F1(with 10% of MMSA)	6.034 μm	5.578 μm	6.453 μm
F2 (without MMSA)	5.189 μm	4.623 μm	4.878 μm

D (v, 0.5) indicates that 50% of particles are of this size or smaller;

D (v, 0.9) indicates that 90% of particles are of this size or smaller;

D [4.3] represents the average particle size.

Figure 1. Chemical Structure of monomethylsilanetriol ascorbate.

Figure 2. DSC curves of MMSA sample obtained at temperature range from 25° C to 150° C and heating rate of 5° C/min in dynamic nitrogen atmosphere with the flow rate of 50mL/min.

Figure 3. DSC curves of cycles of heating and freezing performed at -5 to -60°C ; 10 to 25°C ; -5 to -60°C and 10 to 50°C for MMSA (1% MMSA in aqueous solution) and distilled water using liquid nitrogen with the flow rate of 100mL/min .

Figure 4. DSC curves of F1 (gel-cream preparation with 10% of MMSA) and F2 (gel-cream preparation without MMSA) obtained at temperature range from 25 to 150°C and heating rate of 5°C/min in dynamic nitrogen atmosphere with the flow rate of 50mL/min .

Figure 5. DSC curves of excipients presenting in the gel-cream preparations at temperature range from 25 to 200° C and heating rate of 5° C/min in dynamic nitrogen atmosphere with the flow rate of 50mL/min.

Figure 6. TG/DTG curves of MMSA at temperature range from 25° C to 200° C and heating rate of 5° C/min in dynamic nitrogen atmosphere with the flow rate of 50mL/min.

Figure 7. Particle size distribution of F1 (with 10% of MMSA).

Figure 8. Particle size distribution of F2 (without 10% of MMSA).

Figure 9. Particle size distribution of MMSA.

Figure 10. Photomicrographs of gel-cream preparations: (A) F1 (with 10% of MMSA) (B) F2 (without MMSA).

Figure 11. Statistical evaluation of antioxidant activity of ascorbic acid by DPPH method.

Figure 12. Statistical evaluation of antioxidant activity of MMSA sample by DPPH method.