

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

Avaliação da fotoestabilidade de acetazolamida e loratadina e da capacidade de fotoproteção de seus complexos com ciclodextrinas

**Patricia Elizabeth Rivas Granizo**

São Paulo  
2012

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

Avaliação da fotoestabilidade de acetazolamida e loratadina e da capacidade de fotoproteção de seus complexos com ciclodextrinas

Patricia Elizabeth Rivas Granizo

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador:  
Prof. Assoc. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo  
2012

Patricia Elizabeth Rivas Granizo

Avaliação da fotoestabilidade de acetazolamida e loratadina e da capacidade de fotoproteção de seus complexos com ciclodextrinas

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Assoc. Humberto Gomes Ferraz  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

---

4º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... A vida é muita para ser insignificante”

por *Charles Chaplin*.

Dedico este trabalho a DEUS, que está presente em cada instante de nossas vidas.

A minha pequena INARA, por ser minha companheira e amiga, por me emprestar seu tempo, por nossas conversas e por compreender minha ausência... "mamãe"..... Tenshi...

A Lu por todo...

A mis padres, JULIO Y VICKY, que a pesar de la distancia los llevo siempre presente, gracias por la vida y por enseñarnos el valor del estudio y de ser cada día mejores.

A mis hermanas, JULLIANA, JANET, KARINA y ELIANA por su ayuda incondicional... y por las experiencias compartidas

A meus amigos/ mis amigos de todos os / los momentos....obrigada/gracias

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa concedida,

À FAPESP, pelo auxílio financeiro no projeto,

Ao Prof. Humberto, pela oportunidade brindada, pela confiança, pelo apoio e pelo incentivo ao longo destes 7 anos....muchas gracias por las enseñanzas!

Agradeço a todos os amigos que sempre estão prontos a compartilhar e ajudar nos desafios: Michele, Leandro, Eremita, Katia, Fagner, Bruno, Cintia, Karina, Missael...

À Claudinéia, por nossos papos, pelas horas de desabafo e pela ajuda incondicional...  
Será que vai chover..!!

A Mary Eliana, Catherine, Irina, Jackie, Edel, que a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes con un mensaje en la hora cierta....

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1. Fotodegradação e fotoestabilidade em fármaco e medicamentos</b>	<b>1</b>
Lista de abreviaturas e símbolos .....	2
I. Fotodegradação .....	3
1. Introdução .....	3
2. Definição de termos .....	5
3. Luz visível (VIS) e luz ultravioleta (UV) .....	7
4. Fotodegradação de fármacos .....	10
4.1 Comportamento de grupos funcionais frente à ação da luz .....	12
4.2 Fármacos sensíveis à fotodegradação .....	17
4.3 Comportamento fotoquímico de alguns fármacos .....	27
4.4 Fotodegradação de fármacos em associação .....	39
5. Fotodegradação de fármacos no estado sólido .....	41
5.1 Tamanho de partícula .....	42
5.2 Polimorfismo .....	43
5.3 Excipientes .....	43
6. Fotodegradação em solução .....	44
6.1 Concentração do fármaco .....	44
6.2 pH do meio .....	45
6.3 Força iônica .....	45
6.4 Presença de oxigênio .....	45
7. Estratégias para proteção de fármacos fotossensíveis .....	46
7.1 Proteção interna .....	46
7.2 Proteção externa .....	49
8. Fototoxicidade .....	50
Referências .....	53

II. Fotoestabilidade	73
1. Introdução .....	73
2. O teste de fotoestabilidade segundo o guia Q1B-ICH .....	77
2.1 Fontes de luz .....	78
2.2 Calibração de fonte de luz UV: sistema químico actinométrico....	80
2.3 Qualificação de luz VIS: fluorescente branca utilizando luxímetro.....	84
3. Desenvolvimento de ensaio de fotoestabilidade para fármaco.....	85
3.1 Tempo de exposição à luz .....	87
3.2 Irradiação do fármaco no estado sólido .....	87
3.3 Irradiação do fármaco em solução .....	89
3.4 Fonte de luz (opção 1 ou 2) .....	90
3.5 Desenvolvimento de metodologia analítica .....	91
3.6 Outros fatores .....	91
4. Ensaio de fotoestabilidade em produto acabado .....	92
4.1 Considerações para conduzir ensaios de fotoestabilidade de medicamentos .....	92
4.2 Ensaio em produto a granel .....	94
4.3 Produto na embalagem primária (embalagem imediata) .....	95
4.4 Produto na embalagem secundária (embalagem de mercado)	96
4.5 Avaliação dos resultados .....	96
5. Equipamentos para ensaios de fotoestabilidade .....	98
Referências .....	102

<b>Capítulo 2. Fotoestabilidade e identificação dos produtos de fotodegradação da loratadina em solução aquosa e no estado sólido</b>	107
1. Introdução .....	108
2. Material e métodos .....	110

3. Resultados e discussão .....	113
4. Conclusões .....	129
5. Referências .....	129

**Capítulo 3. Desenvolvimento e validação de método CLAE para loratadina e sua aplicação em estudos de fotoestabilidade de comprimidos e xaropes** 131

1. Introdução .....	132
2. Material e métodos .....	133
3. Resultados e discussão .....	138
4. Conclusões .....	149
5. Referências .....	150

**Capítulo 4. Avaliação da fotoestabilidade de complexos de inclusão da loratadina com ciclodextrinas naturais** 153

1. Introdução .....	154
2. Material e métodos .....	155
3. Resultados e discussão .....	158
4. Conclusões .....	168
5. Referências .....	168

**Capítulo 5. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para avaliação da fotoestabilidade da acetazolamida utilizando-se condições do guia Q1B da ICH** 171

1. Introdução .....	172
2. Material e métodos .....	173
3. Resultados e discussão .....	177
4. Conclusões .....	186
5. Referências .....	186

## RESUMO

A fotoestabilidade é uma propriedade das moléculas que, quando utilizada como parâmetro farmacêutico, descreve como um fármaco responde à exposição à luz (solar ou artificial). No presente trabalho, foi avaliada a fotoestabilidade dos fármacos loratadina (LORA) e acetazolamida (ACZ) e de complexos LORA-ciclodextrinas. O estudo de fotoestabilidade de LORA (Capítulo 2) indicou que o fármaco é estável quando no estado sólido, porém, ocorre surgimento de coloração intensa. Por outro lado, quando em solução, observou-se degradação do fármaco, com surgimento de vários fotoprodutos denominados F<sub>1</sub> a F<sub>15</sub>, dentre os quais foi possível identificar cinco compostos: F<sub>4</sub> (C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N), F<sub>10</sub> (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>ClN), F<sub>8</sub> (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>O), F<sub>9</sub> (C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>) e F<sub>14</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClN). A validação do método analítico CLAE, utilizado para quantificação de LORA em especialidades farmacêuticas (comprimidos e xaropes) é descrita no Capítulo 3. Na avaliação da fotodegradação forçada de formulações líquidas contendo LORA, foram degradados até 50% do fármaco. As formulações sólidas apresentaram-se fotoestáveis, observando-se perda de menos de 5% do fármaco. Não foram encontrados produtos de fotodegradação nas formulações, quando analisadas tal qual, obtidas do mercado. Dessa forma, as embalagens primárias garantiram sua estabilidade. A complexação de LORA com ciclodextrinas (Capítulo 4) mostrou-se um recurso bastante interessante para melhorar a fotoestabilidade do fármaco, uma vez que, após 12 horas de irradiação luminosa, é possível recuperar até 99% deste, quando na forma de complexo com  $\gamma$ -CD na proporção 1:1. Finalmente, o Capítulo 5 traz o método CLAE desenvolvido e validado para avaliação da acetazolamida (ACZ), o qual mostrou-se adequado para a quantificação do fármaco, obtendo-se ótima linearidade, precisão, exatidão e seletividade. Segundo as condições do guia Q1B, a ACZ se manteve estável quando submetida à radiação luminosa utilizando meios aquosos e no estado sólido. No entanto, a fotoestabilidade da ACZ foi afetada na presença de metanol, sendo possível quantificar três impurezas.

Palavras-chave: loratadina, acetazolamida, fotoestabilidade, fotodegradação, ciclodextrinas, CLAE.

## ABSTRACT

Photostability is a property of molecules that, when used as a pharmaceutical parameter, can describe how a drug responds to exposure to light (either solar or artificial). In this study, the photostability of the drugs loratadine (LORA) and acetazolamide (ACZ), as well as LORA-cyclodextrin complexes, was evaluated. A study of the photostability of LORA (Chapter 2) indicated that the drug is stable in its solid form, however intense coloring does occur. On the other hand, when in solution form, degradation of the drug was observed, with the appearance of several photoproducts that we labeled F<sub>1</sub> to F<sub>15</sub>, among which it was possible to identify five compounds: F<sub>4</sub> (C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N), F<sub>10</sub> (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>CIN), F<sub>8</sub> (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>CIN<sub>2</sub>O), F<sub>9</sub> (C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>CIN<sub>2</sub>) and F<sub>14</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>CIN). The validation of the analytical method by HPLC, used for the quantification of LORA in pharmaceutical products (tablets and syrups) is detailed in Chapter 3. In the evaluation of forced photodegradation of liquid formulations containing LORA, up to 50% of the drug was degraded. The solid formulations proved to be photostable, with a loss of less than 5% of the drug. No photodegradation products were found in the formulations when they were analyzed "as is" (the way they were obtained from the commercial market). Accordingly, their primary packaging protected their stability. The complexation of LORA with cyclodextrins (Chapter 4) proved to be an effective resource for improving the photostability of the drug, since, after 12 hours of luminous radiation, it was possible to recover up to 99% of the drug, when in the complex form with  $\gamma$ -CD, in the proportion 1:1. Finally, Chapter 5 describes the HPLC method developed and validated for the evaluation of acetazolamide (ACZ), which proved to be adequate for the quantification of the drug, with the attainment of optimal linearity, precision, exactness and selectivity. According to the conditions of the Q1B guideline, ACZ was stable when subjected to luminous radiation using aqueous means and in its solid state. However, the photostability of ACZ was affected by the presence of methanol, and we were able to quantify three impurities.

Keywords: loratadine, acetazolamide, photostability, photodegradation, cyclodextrins, HPLC.

## **CAPÍTULO 1.**

# **FOTODEGRADAÇÃO E FOTOESTABILIDADE EM FARMACO E MEDICAMENTOS**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ICH	:	International Conference on Harmonisation
ISO	:	International Organization for Standardization
IV	:	infravermelho
VIS	:	visível
USP 32	:	United States Pharmacopeia XXXII
UV	:	ultravioleta
UVA	:	ultravioleta A
UVB	:	ultravioleta B
UVC	:	ultravioleta C
C $\alpha$ -C $\beta$	:	carbono alfa-carbono beta
E/Z	:	isomeria geométrica
CD	:	ciclodextrinas
Me	:	metil
HP	:	hidroxipropil
HE	:	hidroxietil
DM	:	dimetil
$\lambda$	:	comprimento de onda
cm	:	centímetros
nm	:	nanômetros
$\mu$ m	:	micrômetros
GHz	:	gigahertz
Hz	:	gertz
MHz	:	megahertz
THz	:	terahertz

## I. FOTODEGRADAÇÃO

### 1. INTRODUÇÃO

Fotodegradação é a transformação de uma molécula em pequenos fragmentos de menor peso molecular, mediante uma reação química causada pela absorção de radiação — ultravioleta (UV), visível (VIS) ou infravermelha (IV) — que se manifesta em efeitos como fotodecomposição, fotossensitização e fototoxicidade (VERHOEVEN, 1996; TØNNESEN, 2004).

Para que um processo de fotodegradação aconteça, existem três componentes essenciais: um substrato a ser degradado (substância química, matéria orgânica), um agente que efetue a degradação (neste caso, fontes de luz UV ou VIS), além de condições favoráveis e fatores específicos (temperatura, umidade, oxigênio). A interação desses três fatores principia o processo de fotodegradação (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2003).

O termo fotodegradação, aplicado à degradação de fármacos, é usado para descrever como uma substância química responde à exposição à luz, incluindo-se não somente o efeito de degradação ou de quebra da molécula, mas também processos como formação de radicais, transferência e associação de energia e emissão de energia lumínica, luminescência, etc. (ALBINI; FASANI, 1998; TØNNESEN, 2004).

As reações de fotodegradação, na maioria dos casos, são processos de oxidação associados à absorção de energia, que dependem do comprimento de onda da radiação incidente, sendo inversamente proporcional a esta. Assim, a energia da radiação UV é maior que a VIS que, por sua vez, é maior do que a radiação do IV. Como consequência, as radiações absorvidas nas zonas UV e VIS do espectro são

mais ativas na iniciação de reações químicas em relação a outras zonas de maior comprimento de onda (MOORE, 2004a; VILA JATO, 2001).

A fotodegradação pode ser resultado da absorção da radiação incidente por parte dos componentes da reação principal; pode acontecer, ainda, que essas moléculas não tomem parte diretamente na reação, mas atuem como doadoras, passando sua energia a outras moléculas que participarão da reação. Nesse caso, produz-se uma excitação indireta, denominada “fotossensitização”. Uma reação fotoquímica pode, também, estar acompanhada de uma reação térmica (com liberação de calor), tornando ainda mais complexa a fotodegradação (MOORE, 2004a; VERHOEVEN, 1996; VILA JATO, 2001).

Algumas vezes é necessário um período de indução para que a reação ocorra com velocidade significativa que possibilite sua avaliação e medida. Caso contrário, se este período de tempo não for considerável, é possível que fenômenos de fotodegradação sejam induzidos e apresentem velocidade muito lenta, de forma que a mudança não seja observável. Neste caso, as metodologias de quantificação ou identificação não permitem observar a fotodegradação, até que a reação alcance velocidades mais rápidas. Também é frequente que, depois de iniciadas, essas reações continuem, mesmo na ausência da fonte luminosa desencadeante (MOORE, 2004b; VILA JATO, 2001).

Por outro lado, quando uma substância é passível de fotodegradação, cuidados especiais podem ser necessários durante as etapas de formulação, manipulação e armazenagem do produto. As reações fotoquímicas, embora complexas e difíceis de explicar, devem ser cuidadosamente estudadas, uma vez que a boa compreensão dos processos de fotodecomposição é de fundamental importância para otimizar a estabilidade do produto final.

De fato, o estudo da degradação do fármaco pela exposição à luz UV ou VIS (fotodegradação) é relevante para os processos de desenvolvimento de um medicamento e por diferentes razões. A primeira de todas é que a exposição à irradiação luminosa pode afetar a estabilidade da formulação, promovendo mudanças nas propriedades físico-químicas do produto acabado. Porém, é

importante destacar, ainda, que interações do ativo com os excipientes presentes na forma farmacêutica podem catalisar a fotodegradação desta, levando à formação de fotoprodutos e até de produtos fototóxicos. Do mesmo modo, é importante considerar tais estudos na fase de escolha da embalagem, de maneira a obter a proteção adequada no caso de fármacos que se alteram na presença da luz (TØNNESEN, 2004).

## **2. DEFINIÇÕES DE TERMOS**

A seguir, são definidos os termos utilizados nesta obra para descrever alguns dos fenômenos que ocorrem por ação da luz (VERHOEVEN, 1996; TØNNESEN, 2004).

**Fotodecomposição:** decomposição química causada pela energia luminosa incidente.

**Fotofísica:** processo que resulta da excitação eletrônica de uma molécula por meio da radiação eletromagnética não ionizante (fótons de luz). A absorção de um fóton pela molécula pode levar à excitação de uma única ligação de um grupamento ou da molécula inteira, sendo que o fator determinante é o valor da energia utilizada para a excitação. Não resulta em mudanças químicas.

**Fotoestabilidade:** é uma propriedade utilizada como parâmetro na avaliação da estabilidade de um fármaco ou de um produto acabado frente à exposição luminosa.

**Fotoexcitação:** produção de um estado excitado pela absorção das radiações ultravioleta, visível ou infravermelha.

**Foto-hidrólise:** reação química catalisada pela luz, que utiliza água para produzir a quebra da molécula.

**Fotoindução:** geração de uma força eletrodinâmica, originando efeito de reorientação de moléculas quando submetidas à ação da luz.

**Fotoisomerização:** transição geométrica cis ou trans (isômeros geométricos), induzida pela luz.

**Fotolabilidade:** instabilidade característica de moléculas que se degradam frente à luz.

**Fotólise:** efeito de indução pela luz, ocasionando quebra ou clivagem de uma ligação dentro de uma molécula.

**Foto-oxidação:** reação de oxidação induzida pela luz, que pode ser resultado da reação direta da molécula com o oxigênio, por meio da ação da luz ou, ainda, pela perda de um ou mais elétrons da molécula resultante da fotoexcitação.

**Fotoquímica:** reação química causada por absorção de radiação ultravioleta, visível ou infravermelha.

**Fotorreação:** processo que se desencadeia por ação da luz frente à reação química das moléculas.

**Fotorredução:** reação de redução química induzida pela luz.

**Fotorreatividade:** capacidade de uma substância reagir frente à luz.

**Fotossensibilidade:** reações adversas provocadas pela luz, que podem acontecer na substância livre ou quando distribuída nos tecidos no organismo, convertendo-se em reações fototóxicas ou fotoalérgicas.

**Fotossensitividade:** processo pelo qual ocorre uma alteração fotoquímica de uma entidade molecular, como resultado da absorção inicial de radiação por outra entidade molecular chamada de fotossensitizadora.

**Fototoxicidade:** transformação de uma substância não tóxica em um ou vários produtos ou substâncias tóxicas para o organismo, por ação da luz.

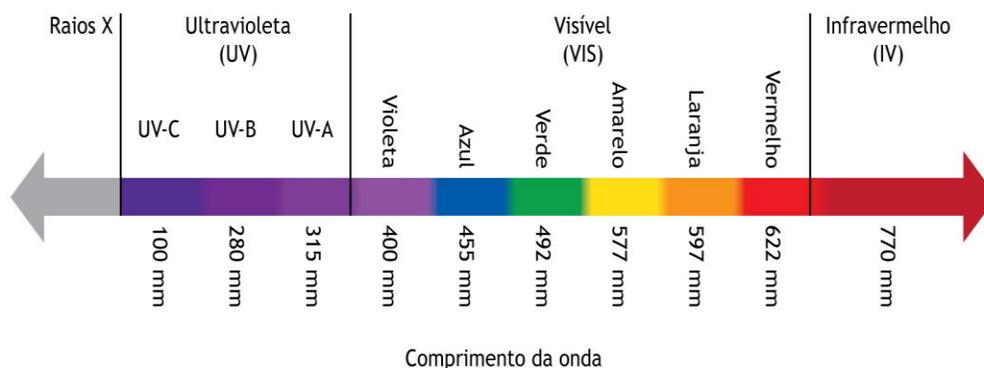
### **3. LUZ VISÍVEL (VIS) E LUZ ULTRAVIOLETA (UV)**

A luz VIS é uma pequena banda no espectro de radiação eletromagnética, entre 400 e 700nm, que contém todas as cores do espectro. Na forma como a conhecemos, é uma gama de comprimentos de onda produzida por transições eletromagnéticas, possível de ser percebida pelo olho humano. A frequência da luz VIS determina sua cor, o que não é por acaso, já que a atmosfera terrestre é transparente para esse tipo de radiação. Trata-se de radiação eletromagnética pulsante ou, em sentido mais geral, qualquer radiação eletromagnética que se situa entre as radiações IV e UV, como mostrado na FIGURA 1.1 (CUEVAS ORTIZ, 2009; ADUSTUM, 2006).

Dentro do espectro eletromagnético, a faixa visível tem a particularidade de estimular o órgão da visão tanto dos animais como dos humanos. Assim, a luz branca proveniente do sol possui todos os comprimentos de onda e forma um espectro eletromagnético mais amplo que o espectro visível que podemos enxergar.

Por outro lado, os raios ultravioletas constituem uma parte importante da radiação do sol que chega à Terra. Encontra-se entre o espectro do raio X e da luz visível (FIGURA 1.2), com comprimento de onda de aproximadamente 80nm até cerca de 400nm. Este tipo de luz possui energia que produz ionização de átomos e, como consequência, leva à formação da ionosfera da Terra. Seu forte efeito químico faz com que seja prejudicial para a vida, produzindo mutações cancerígenas na pele (GARRALÓN, 2006).

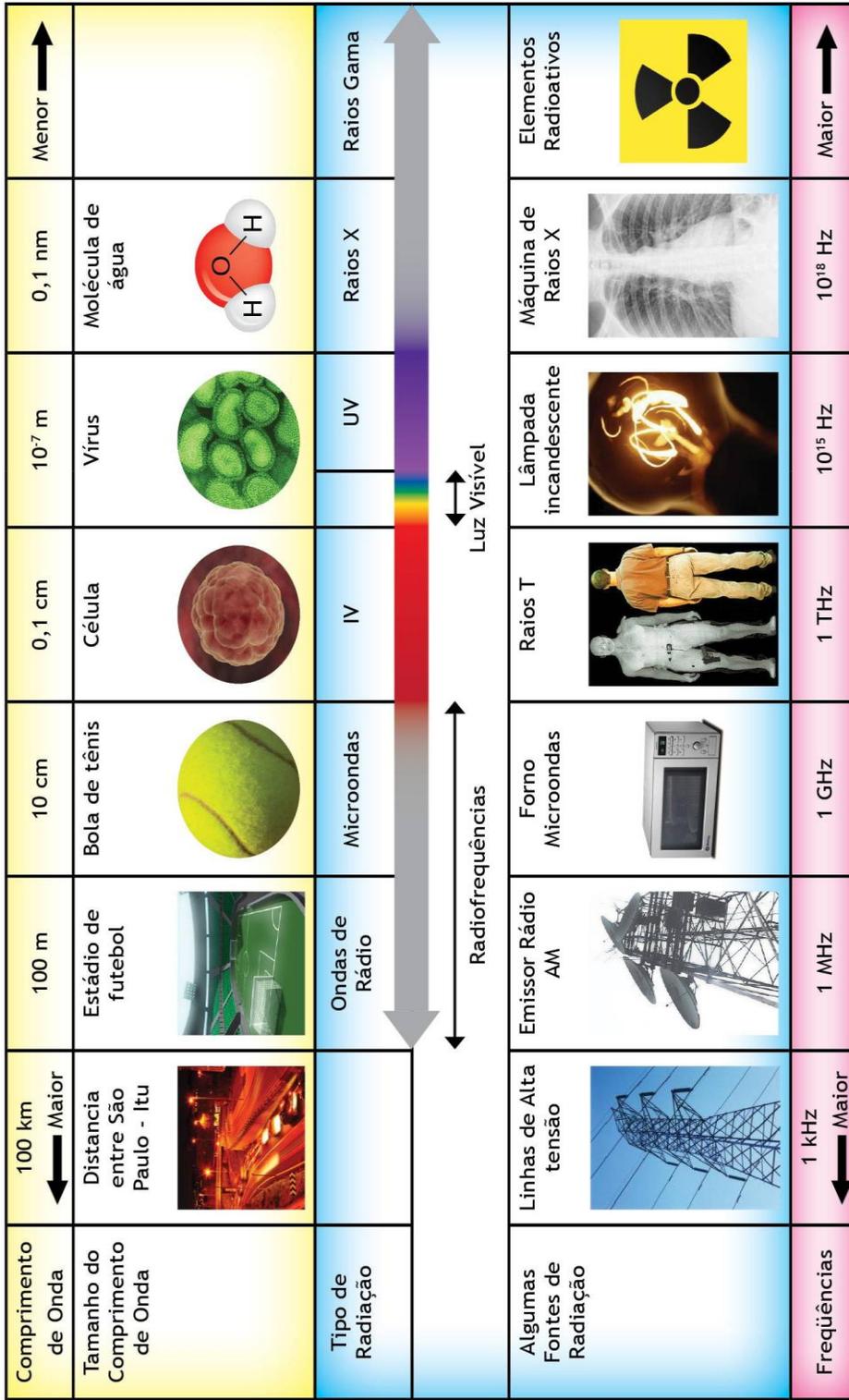
A radiação UV natural é produzida principalmente pelo sol, mas nem todos os comprimentos de onda chegam à superfície terrestre. Este é o tipo de radiação invisível ao olho humano, com comprimentos de onda menores que a luz VIS e mais longos que os raios X. Alguns animais, como, por exemplo, abelhas e pombos, são capazes de reagir ao espectro ultravioleta (UFRJ, 2003; INCHEM, 1994).



**FIGURA 1.1.** Espectro eletromagnético da luz visível situada entre as radiações infravermelha e ultravioleta.

A radiação UV cobre a faixa de comprimentos de onda ( $\lambda$ ) entre 100 e 400nm, sendo subdividida em raios ultravioleta C (UVC), ultravioleta B (UVB) e ultravioleta A (UVA). Os raios ultravioleta C ( $\lambda$  de 100 a 280nm) são os de maior energia e os mais perigosos para a saúde, porém são absorvidos pela camada de ozônio e praticamente não alcançam a superfície terrestre. Os raios ultravioleta B ( $\lambda$  de 280 a 315nm), de energia intermediária, penetram em nível epidérmico, sendo os principais causadores de câncer cutâneo. Os menos nocivos, os raios ultravioleta A ( $\lambda$  de 315 a 400nm), são os de menor energia e chegam a níveis profundos da derme, sendo responsáveis pelo bronzeado e pelo envelhecimento prematuro (UFRJ, 2003; INCHEM, 1994).

A luz solar encontra-se num intervalo de comprimento de onda entre 280 e 780nm, dos quais somente a radiação ultravioleta B (UVB), de comprimento de onda entre 280 e 315nm, apresenta maior potencial para causar fotodegradação de substâncias (VILA JATO, 2001).



**FIGURA 1.2.** Espectro eletromagnético: cada parte do espectro tem aplicações específicas, que vão desde as linhas de alta tensão, com grandes comprimentos de onda, até os raios X e gama, que têm comprimentos de onda muito pequenos. Entre estes extremos, encontram-se a radiação infravermelha, a luz visível e a radiação ultravioleta (Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2000).

#### 4. FOTODEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS

A fotodegradação de um fármaco é a decomposição e a consequente quebra da molécula em fragmentos de menor peso molecular. É decorrente da absorção da luz (solar ou artificial) e leva, invariavelmente, à inatividade terapêutica do fármaco (ALBINI; FASANI, 1998; TØNNESEN, 2004).

A degradação pela luz segue, em geral, uma cinética mais complexa que as reações térmicas e os efeitos podem ser observados tanto no princípio ativo livre, quanto no produto acabado. A fotodegradação de uma determinada substância depende essencialmente de três fatores: (a) o comprimento de onda, (b) a intensidade e (c) o tempo de exposição à radiação (MOORE, 2004b).

Quando se prevê que o composto é capaz de absorver a luz natural do ambiente, é de grande importância que estudos de fotoestabilidade sejam realizados, já que, sob esta condição, os fármacos são manipulados, armazenados e, normalmente, sofrem exposição à radiação, o que significa riscos de alteração e modificações diversas (ALBINI; FASANI, 1998).

Entretanto, a fotodegradação *in vitro* durante as etapas de manipulação e armazenamento de um fármaco sensível não é a única preocupação com relação à exposição à luz. É importante destacar a existência da chamada fotodegradação *in vivo*, que corresponde ao aparecimento de efeitos fototóxicos no organismo, após administração do fármaco, com posterior surgimento de efeitos colaterais (MOAN; JUZENAS, 2004; ANDRISANO *et al.*, 2001a). A FIGURA 1.3 ilustra as possíveis consequências da fotodegradação em ambas as interações descritas *in vitro* e *in vivo* (TØNNESEN, 2004).

De acordo com Tønnesen (2004), existem mais de 400 fármacos para os quais a decomposição induzida pela luz é descrita nas farmacopeias britânica (BRITISH..., 2009), europeia (EUROPEAN..., 2007) e americana (USP 32, 2009). Este número continua crescendo, uma vez que novos fármacos são frequentemente adicionados à lista de compostos fotossensíveis (HUNG, 2004).

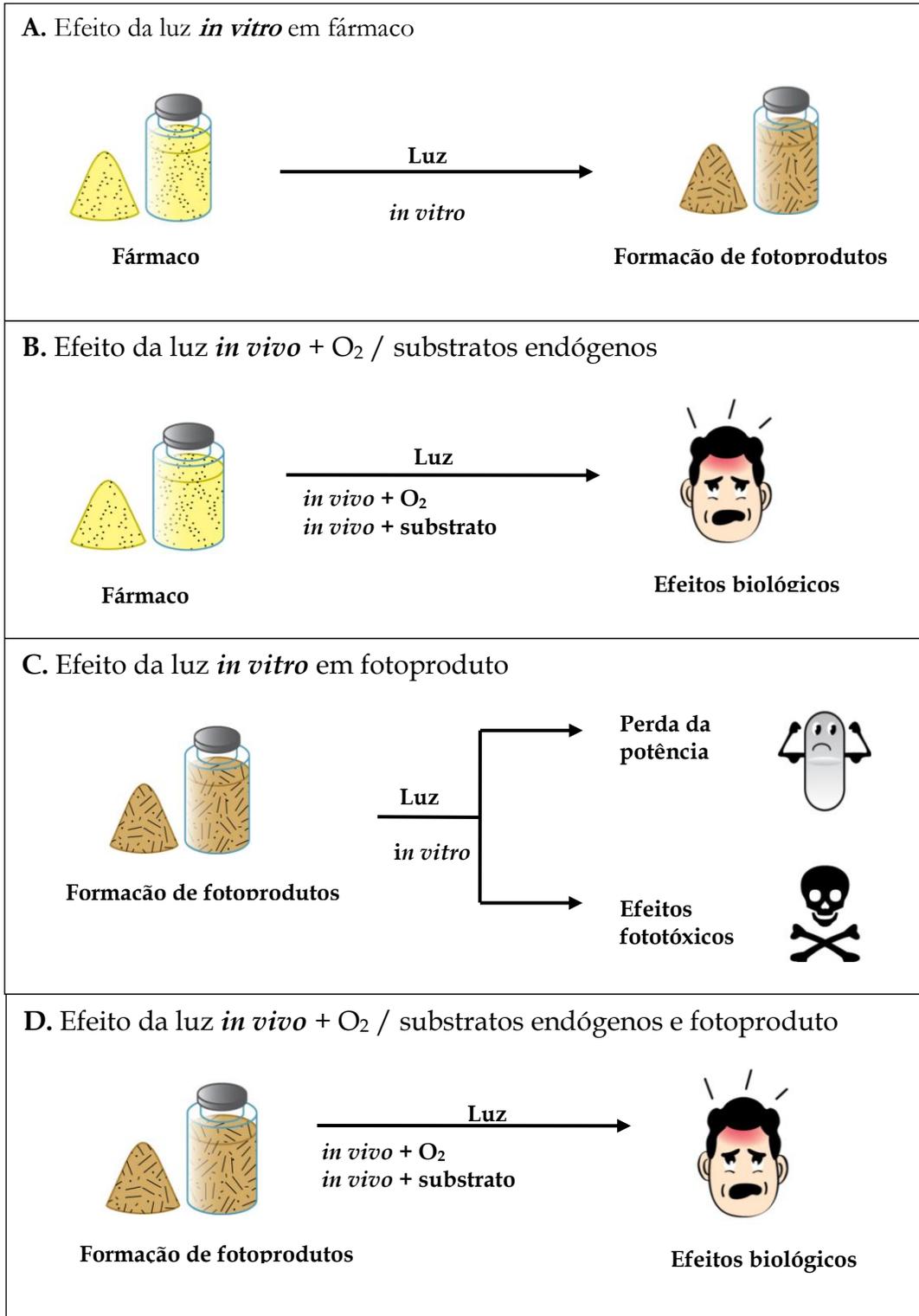
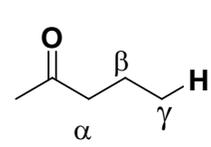
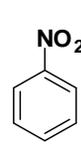
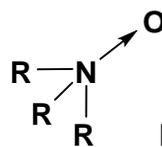
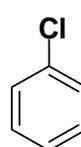
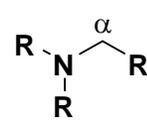
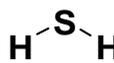
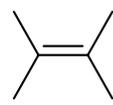
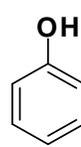
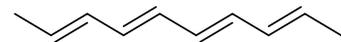


FIGURA 1.3. Possíveis efeitos da fotodegradação de fármacos *in vitro* e *in vivo*

#### 4.1 Comportamento de grupos funcionais frente à ação da luz

Os principais grupos funcionais que apresentam sensibilidade à luz são apresentados no QUADRO 1.1, estes grupos têm grande probabilidade de induzir a fotorreatividade (ALBINI; FASANI, 1998; GLASS; NOVÁK; BROWN, 2004).

**QUADRO 1.1.** Grupos funcionais que apresentam fotorreatividade.

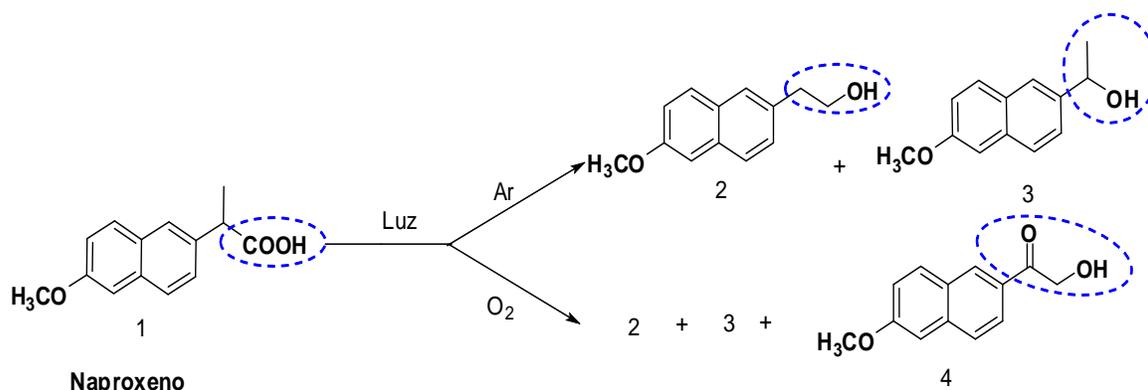
<p>Grupo carbonila</p> 	<p>Grupo nitroaromático</p> 
<p>Função N-óxido</p>  <p>R= arila ou alquila</p>	<p>Cloreto de arila</p> 
<p>Dupla ligação e dupla ligação conjugada</p> 	<p>Ligação fraca C-H (posição benzílica ou <math>\alpha</math> para N da amina)</p> 
<p>Sulfeto</p> 	<p>Alceno</p> 
<p>Fenol</p> 	<p>Polieno</p> 

Fonte: Adaptado de ALBINI; FASANI, 1998. **E/Z**: isomeria geométrica;

**E**: opostos, **Z**: do mesmo lado; **R**: sequência de cadeia carbônica.

### Grupo carbonila

Comporta-se como um grupamento eletrofílico no estado excitado ( $n\pi^*$ ), promovendo reações características de redução via abstração do hidrogênio intermolecular ou fragmentação, ambas reações via  $\alpha$ -clivagem. A redução via intramolecular ocorre mediante a abstração do  $\gamma$ -hidrogênio, seguida de  $C\alpha$ - $C\beta$  clivagem. Os fármacos flumequina (BAZIN *et al.*, 2000) e naproxeno (BOSCÁ *et al.*, 1990; 2001; JIMÉNEZ; MIRANDA; TORMOS, 1997) apresentam fotodescarboxilação segundo tais mecanismos (ESQUEMA 1.1).

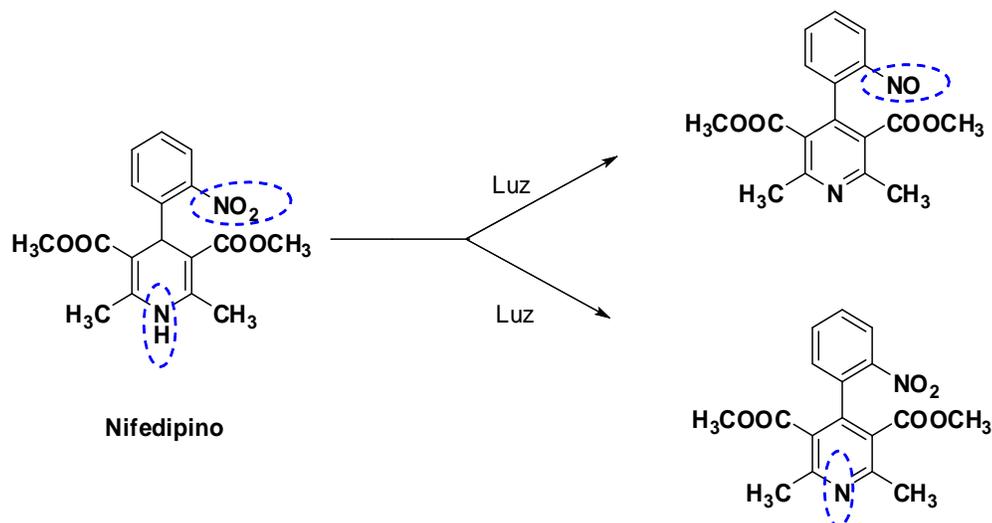


ESQUEMA 1.1. Fotodegradação por descarboxilação do naproxeno

### Grupo nitroaromático

Este grupo químico comporta-se, também, como um grupamento eletrofílico, que origina uma reação de abstração do hidrogênio intermolecular ou rearranjo da molécula para originar um nitrito éster. Os fármacos bloqueadores dos canais de cálcio estão neste grupo, como, por exemplo, o nisoldipino (ÁLVAREZ-LUEJE *et al.*, 1998) e o nifedipino, descrito no ESQUEMA 1.2 (MATSUDA; TERAOKA;

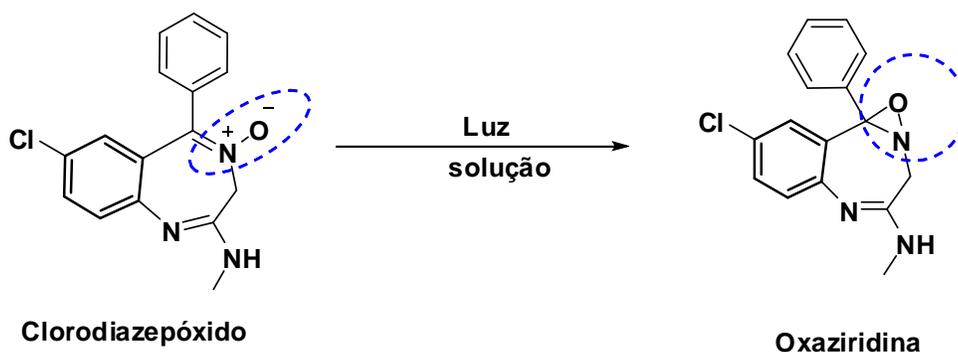
SUGIMOTO, 1989; GIBBS *et al.*, 1992; TERAOKA; OTSUKA; MATSUDA, 1999; AMAN; THOMA, 2002; BAYOMI; ABANUMAY; AL-ANGARY, 2002)



ESQUEMA 1.2. Fotodegradação do grupo nitroaromático do nifedipino

### Função N-óxido

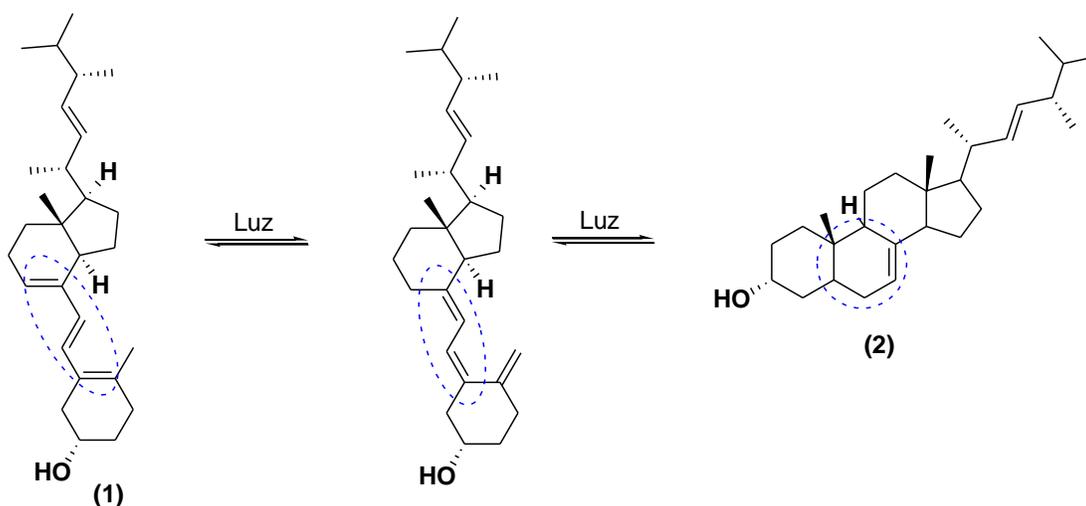
Moléculas que apresentam N-óxido se rearranjam facilmente em oxaziridinas, como reação adicional de seus produtos intermediários, originando produtos finais. O fármaco clordiazepóxido (ESQUEMA 1.3) responde a esta fotorreação, promovendo rearranjo molecular para oxaziridina e intermediários, com posterior formação de outros produtos finais (BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1991).



**ESQUEMA 1.3.** Fotodegradação de N-óxido e formação de oxaziridina em clordiazepóxido

### Dupla ligação conjugada C=C

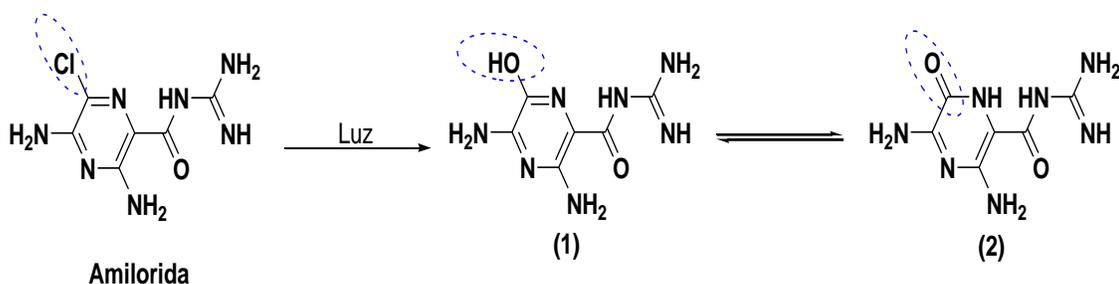
As reações de oxidação de duplas ligações são responsáveis pela isomerização E/Z (cis-trans), observada em vitamina A, ácido retinoico e derivados (BRISAERT; PLAIZIER-VERCAMMEN, 2000; IOELE *et al.*, 2005), vitamina D (ALBINI; FASANI, 1998) vitamina K e seus derivados (TERAOKA; MATSUDA, 1993). O ESQUEMA 1.4 apresenta a isomerização da vitamina D.



**ESQUEMA 1.4.** Fotodegradação da dupla ligação conjugada (isomerização) da vitamina D

### Cloreto de arila

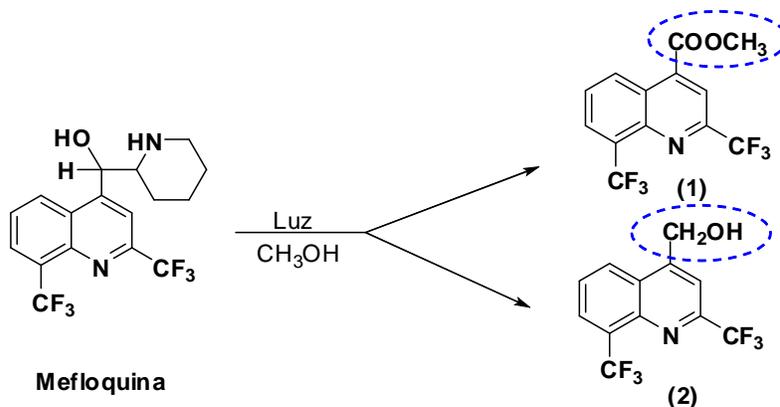
A presença deste grupo funcional é responsável pela descloração homolítica e/ou heterolítica do fármaco amilorida (ESQUEMA 1.5), que sofre fotodesalogenação, com perda do substituinte cloro (LI; MOORE; TATTAM, 1999).



**ESQUEMA 1.5.** Fotodegradação do cloreto de arila presente na molécula da amilorida

### Ligação C-H

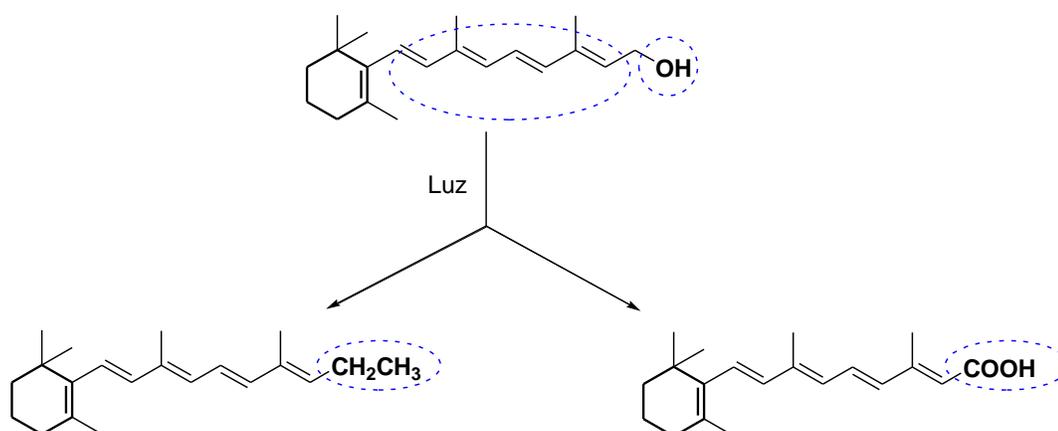
Os compostos que possuem ligações C-H fracas, como, por exemplo, na posição benzílica ou na posição  $\alpha$  ao nitrogênio da amina, são passíveis de fotodecomposição via transferência de hidrogênio ou de elétron-próton. Observa-se esta reação na cloroquina (NORD; KARLESEN; TØNNESEN, 1991) e na mefloquina (ESQUEMA 1.6), que sofrem fragmentação da ligação C-H do anel na posição benzílica (TØNNESEN; GRISLINGAAS, 1990).



**ESQUEMA 1.6.** Fotodegradação por fragmentação da ligação C-H na molécula da mefloquina

### Sulfitos, alcenos, polienos e fenóis

Estes grupos funcionais são altamente reativos com o singlete de oxigênio, que é formado através de fotossensitização de estados de oxigênio relativamente inócuos. Uma reação de sulfitos ocorre na acetazolamida (VARGAS; MÉNDEZ; ROJAS, 1998) e uma típica fotorreação de polienos (ESQUEMA 1.7) ocorre com a estrutura da vitamina A (IOELE *et al.*, 2005).



**ESQUEMA 1.7.** Fotodegradação de polienos na molécula da vitamina A

### 4.2 Fármacos sensíveis à fotodegradação

Quando se discute fotodegradação, é importante destacar que a maioria das informações disponíveis na literatura acerca dos processos de fotorreação envolve complexa fotoquímica e fotofísica. Portanto, é difícil definir as condições de fotorreatividade dos fármacos, uma vez que cada molécula tem comportamento diferente. Pode-se inferir, entretanto, que a fotorreatividade vai depender do estado físico em que se encontra o material (sólido ou em solução), das condições externas e da fonte de irradiação (MOORE, 2004a; ALBINI; FASANI, 1998).

O efeito da luz deve ser avaliado na etapa de pré-formulação, quando são desenvolvidos estudos de degradação forçada. Entretanto, ainda não existe nenhum método com o qual se possa extrapolar os dados obtidos nessas situações de degradação forçada para condições lumínicas normais (VILA JATO, 2001; TØNNESEN, 2004).

Assim, as especificações empregadas em um teste de fotodegradação em condições forçadas e aceleradas podem estar longe daquelas nas quais um fármaco ou uma formulação esteja normalmente exposta. Os dados obtidos podem indicar como a substância se comporta frente à luz; então, podem também revelar boa estabilidade, indicando que a mesma não é afetada pela luz (HUNG, 2004).

As pesquisas sobre fotodegradação de fármacos vêm ganhando destaque nas últimas décadas e é possível encontrar na literatura grande número de estudos descritos para fármacos, tais como anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, antibióticos, ansiolíticos, antimaláricos, diuréticos e vitaminas (QUADRO 1.2).

**QUADRO 1.2.** Exemplos de fármacos que apresentam degradação frente à luz

Fármaco	Uso terapêutico <sup>(*)</sup>	Referência
Acetazolamida	Oftálmico	VARGAS; MÉNDEZ; ROJAS, 1998, SRINIVASU <i>et al.</i> , 2010
Ácido mefenâmico	Depressor do SNC: analgésico	WERNER; MCNEILL; ARNOLD, 2005
Ácido nalidíxico	Anti-infeccioso: quimioterápico	VERMEERSCH <i>et al.</i> , 1989
Alprazolam	Psicotrópico: sedativo ansiolítico	NUDELMAN; GALLARDO CABRERA, 2002
Amilorida	Diurético	LI; MOORE; TATTAM, 1999
Anfotericina B	Anti-infeccioso: antifúngico	THOMA; KÜBLER, 1997
Anlodipino	Cardiovascular: dilatador coronário	JANG <i>et al.</i> ; 2006; RAGNO <i>et al.</i> , 2003b; RAGNO; GAROFALO; VETUSCHI, 2002
Atenolol	Cardiovascular: Anti-hipertensivo	ANDRISANO <i>et al.</i> , 1999
Atorvastatina	Antilipêmico	CERMOLA <i>et al.</i> , 2006
Azitromicina	Anti-infeccioso: antibiótico	TONG <i>et al.</i> , 2011
Barnidipina	Cardiovascular: Anti-hipertensivo(**)	IOELE <i>et al.</i> , 2010

Continua.....

Fármaco	Uso terapêutico <sup>(*)</sup>	Referência
Cefalexina	Anti-infeccioso: antibiótico	RAY <i>et al.</i> , 2002
Cefradina	Anti-infeccioso: antibiótico (**)	RAY <i>et al.</i> , 2002
Cetoprofeno	Antirreumático: anti- inflamatório não- esteroide	MOSER <i>et al.</i> , 2000
Cloranfenicol	Anti-infeccioso: antibiótico	BAUTISTA; MATEO; CALATAYUD, 2000; ICARDO <i>et al.</i> , 2003b
Cloroquina	Anti-infeccioso: antiprotozoário	NORD; KARLESEN; TØNNESEN 1991; ELFATIH <i>et al.</i> , 1994; NORD; ANDERSEN; TØNNESEN, 1997; NORD <i>et al.</i> , 1997; TØNNESEN; KRISTENSEN; NORD, 1998; TØNNESEN; BAERTSCHI, 2004
Ciprofloxacino	Anti-infeccioso: quimioterápico	TORNIAINEN; TAMMILEHTO; ULVI, 1996; OUÉDRAOGO <i>et al.</i> , 2000 ; VAN DOORSLAER <i>et al.</i> , 2011
Clorotiazida	Diurético (**)	ULVI, 1998.
Daunorrubicina	Antineoplásico: antibiótico	ISLAM; ASKER, 1995
Diltiazem	Cardiovascular: Anti-hipertensivo	ANDRISANO <i>et al.</i> , 2001a

Continua.....

Fármaco	Uso terapêutico <sup>(*)</sup>	Referência
Digoxina	Cardiovascular: insuficiência cardíaca congestiva	REISCH; ZAPPEL, RAGHU- RAMRAO, 1994; VASIC <i>et al.</i> , 2006
Dipirona (Metamizol)	Depressor do SNC: analgésico-antipirético	PITARELLO <i>et al.</i> , 2005
Ditranol	Queratolítico e queratoplástico	THOMA; HOLZMANN, 1998
Duloxetina	Psicotrópico: antidepressivo	RAMAN <i>et al.</i> , 2010
Enalapril	Cardiovascular: anti-hipertensivo	OLIVA <i>et al.</i> , 2005.
Flupentixol	Antipsicótico, neuroléptico (**)	MAQUILLE <i>et al.</i> , 2010
Flutamida	Antineoplásico: hormônio e análogo	SORTINO <i>et al.</i> , 2001
Furosemida	Diurético	MOORE; SITHIPITAKS, 1983; VARGAS <i>et al.</i> , 1998b
Hidroclorotiazida	Diurético	ULVI, 1998
Hidroxiprogesterona	Hormônio	ZHAN <i>et al.</i> , 1998
Ibuprofeno	Depressor do SNC: analgésico-antipirético	GABRIELE-CAVIGLIOLI <i>et al.</i> , 2002; PACKER <i>et al.</i> , 2003; MUSA; ERIKSSON, 2007.
Indometacina	Antirreumático: anti- inflamatório não- esteroide	WEEDON; WONG, 1991

Continua.....

Fármaco	Uso terapêutico <sup>(*)</sup>	Referência
Irbesartano	Cardiovascular: anti-hipertensivo	SHAH; SAHU; SINH, 2010
Irinotecana	Antineoplásico	DODDS; ROBERT; RIVORY, 1998
Isradipino	Cardiovascular: dilatador coronário	MIELCAREK; DACZKOWSKA, 1999
Labetalol	Anti-hipertensivo <sup>(**)</sup>	ANDRISANO <i>et al.</i> , 2001b
Lercanidipino	Cardiovascular: anti-hipertensivo	FIORI <i>et al.</i> , 2006
Linezolida	Anti-infeccioso: antibiótico	LOPES; SALGADO, 2010
Lomefloxacino	Anti-infeccioso: quimioterápico	OUÉDRAOGO <i>et al.</i> , 2000
Loratadina	Antialérgico: anti-histamínico H <sub>1</sub>	ABOUNASSIF; EL-OBEID; GADKARIEM, 2005
Manidipino	Cardiovascular: anti-hipertensivo	RAGNO <i>et al.</i> , 2003a
Mefloquina	Anti-infeccioso: antiprotozoário	TØNNESEN; GRISLINGAAS, 1990; TØNNESEN, 1999; NAVARATNAM; HAMBLETT; TØNNESEN, 2000
Metildopa	Cardiovascular: anti-hipertensivo	RAMADAN <i>et al.</i> , 2006

Continua.....

Fármaco	Uso terapêutico <sup>(*)</sup>	Referência
Metotrexato	Antineoplásico: antimetabólitos	McELNAY <i>et al.</i> , 1988
Midazolam	Depressor do SNC: sedativo-hipnótico	ANDERSIN; TAMMILEHTO, 1995
Minoxidil	Cardiovascular: anti-hipertensivo	CHINNIAN; ASKER, 1996
Molsidomina	Vasodilatador coronário <sup>(**)</sup>	AMAN; THOMA, 2002
Moxifloxacino	Anti-infeccioso: quimioterápico	SUNDERLAND <i>et al.</i> , 2001; MOTWANI <i>et al.</i> , 2007; VAN DOORSLAER <i>et al.</i> , 2011
Nabumetona	Antirreumático: anti- inflamatório não- esteroide	MORIWAKI <i>et al.</i> , 2001; VALERO; COSTA, 2003; VALERO, 2004
Naproxeno	Depressor do SNC: analgésico-antipirético	BOSCÁ <i>et al.</i> , 1990; BOSCÁ; MARÍN; MIRANDA, 2001 JIMÉNEZ; MIRANDA; TORMOS, 1997; VALERO; CARRILLO, 2004; VALERO; ESTEBAN, 2004
Nelfinavir	Anti-infeccioso: quimioterápico antiviral	KAUL <i>et al.</i> , 2004; SINGH; MEHROTRA; BAKHSHI, 2010
Nicardipino	Anti-hipertensivo <sup>(**)</sup>	SQUELLA; NUÑEZ- VERGARA, 1990; TERAOKA; OTSUKA; MATSUDA, 2004; POMPONIO <i>et al.</i> , 2004

Continua...

Fármaco	Uso terapêutico <sup>(*)</sup>	Referência
Nimodipino	Cardiovascular: vasodilatador	RAGNO; VERONICO; VETUSCHI, 1995
Nifedipino	Cardiovascular: dilatador coronário	SQUELLA <i>et al.</i> , 1989; MATSUDA; TERAOKA; SUGIMOTO, 1989; SQUELLA; NUÑEZ- VERGARA, 1990; BÉCHARD; QURAIISHI; KWONG, 1992; GIBBS <i>et al.</i> , 1992; GRUNDY; KHERANI; FOSTER, 1994; DE VRIES; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1998; TERAOKA; OTSUKA; MATSUDA, 1999; ABOU- AUDA <i>et al.</i> , 2000; AMAN; THOMA, 2002; BAYOMI; ABANUMAY; AL- ANGARY, 2002
Nisoldipino	Cardiovascular: dilatador coronário	ÁLVAREZ-LUEJE <i>et al.</i> , 1998
Nistatina	Anti-infeccioso: antifúngico	RAY <i>et al.</i> , 2002
Nitrendipino	Cardiovascular: anti-hipertensivo	SQUELLA; NUÑEZ- VERGARA, 1990; RAGNO; VERONICO; VETUSCHI, 1993; TIPRE; VAVIA, 2001
Nitrofurazona	Pele e mucosas: anti- infeccioso tópico	SHAHJAHAN; ENEVER 1996a, 1996b

Continua...

Fármaco	Uso terapêutico <sup>(*)</sup>	Referência
Norfloxacino	Anti-infeccioso: quimioterápico	CÓRDOBA-DIAZ; CÓRDOBA-BORREGO; CÓRDOBA-DÍAZ, 1998; QUÉDRAOGO <i>et al.</i> , 2000
Pergolida	Depressor do SNC: antiparkinsoniano	KOTZAGIORGIS; MICHALEAS; ANTONIADOU-VYZA, 2007
Piroxicam	Antirreumático: anti- inflamatório não- esteroide	SERRANO <i>et al.</i> , 1992; BARTSCH; EIPER; KOPELENT-FRANK, 1999
Pirazinamida	Anti-infeccioso: tuberculostático	VARGAS <i>et al.</i> , 2003
Pizotifeno	Depressor do SNC: analgésico	ABOUNASSIF; EL-OBEID; GADKARIEM, 2005
Primaquina	Anti-infeccioso: antiprotozoário	KRISTENSEN <i>et al.</i> , 1993; 1998; KRISTENSEN; GRINBERG; TØNNESEN, 1997
Propranolol	Cardiovascular: antiarrítmico	UWAI <i>et al.</i> , 2005
Riboflavina	Vitamina hidrossolúvel	LOUKAS; VRAKA; GREGORIADIS, 1996; AHMAD; FASIHULLAH; VAID, 2004; 2005; 2006; AHMAD <i>et al.</i> , 2004
Rosuvastatina	Antilipêmico	ASTARITA <i>et al.</i> , 2007

Continua...

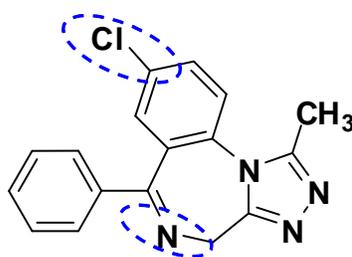
Fármaco	Uso terapêutico(*)	Referência
Sulfametoxazol	Anti-infeccioso: sulfonamida	ZHOU; MOORE, 1994; ICARDO <i>et al.</i> , 2003a; RYAN; TAN; ARNOLD, 2011
Sulfanilamida	Pele e mucosas: anti- infeccioso tópico	ICARDO <i>et al.</i> , 2003a
Sulfatiazol	Pele e mucosas: anti- infeccioso tópico	ICARDO <i>et al.</i> , 2003a
Telmisartano	Cardiovascular: anti-hipertensivo	SHAH; SINGH, 2010
Tolmetina	Anti-inflamatório(**)	GIUFFRIDA <i>et al.</i> , 1995
Triantereno	Diurético	VARGAS <i>et al.</i> , 1998a; FIORI <i>et al.</i> , 2003
Ubidecarenona (Ubiquinona)	Vitamina: coenzima	TAKEUCHI <i>et al.</i> , 1992
Vitamina A	Vitamina lipossolúvel	BRISAERT; PLAIZIER- VERCAMMEN, 2000; IOELE <i>et al.</i> , 2005
Vitamina C	Vitamina hidrossolúvel	SIDHU; SUGDEN, 1992; GARNERO; LONGHI, 2010.
Vitamina K	Vitamina lipossolúvel	TERAOKA; MATSUDA, 1993

Fonte: (\*)KOROLKOVAS; FRANÇA, 2009; (\*\*)MERCK index, 2006

### 4.3 Comportamento fotoquímico de alguns fármacos

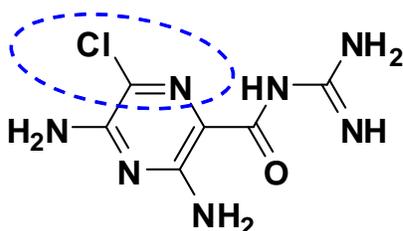
É descrito, a seguir, o comportamento fotoquímico de alguns fármacos sensíveis à fotodegradação *in vivo* e *in vitro*, com potenciais efeitos fototóxicos e que podem levar à fotossensibilização de moléculas dentro do organismo.

#### Alprazolam



O alprazolam pertence a um grupo de fármacos (benzodiazepinas) de conhecida fotolabilidade. Portanto, o mecanismo proposto para a sua fotodegradação é a quebra do anel heterocíclico, que reage mediante decolorinação no anel benzênico e abertura do anel benzodiazepinona, com subsequente formação de três fotoprodutos: triazoaminoquinoleína, 8H-alprazolam e 5-cloro-[5-metil-4H-1,2,4-triazol-4-il]benzofenona (NUDELMAN; GALLARDO CABRERA, 2002).

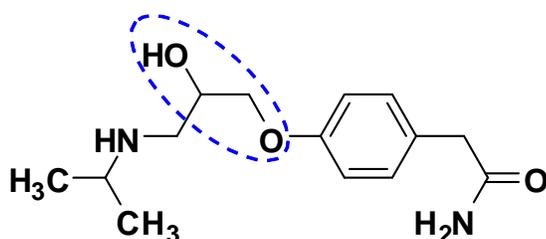
#### Amilorida



Foram observadas reações cutâneas adversas em pacientes tratados com amilorida, relacionadas à exposição à luz do sol. O mecanismo de fotodegradação

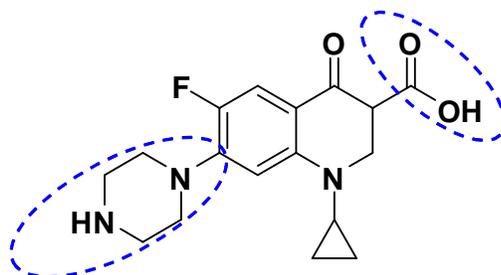
proposto acontece por dechlorinação do fármaco, originando o produto N-amidino-3,5-diamino-6-hidroxi pirazina-carboxamida e a consequente fotossensitização via singlete de oxigênio. O fármaco é capaz de absorver a radiação UVA presente na luz solar e luz artificial, que parece estar relacionado aos efeitos adversos mencionados (LI; MOORE; TATTAM, 1999).

### Atenolol



Sob determinadas condições, tais como variação de pH (4,0-7,4-9,0), este fármaco é capaz de absorver a radiação UVA e UVB presente na luz solar e na artificial. O mecanismo proposto para a fotodegradação é a reação de desidratação na ligação éter (ANDRISANO *et al.*, 1999).

### Ciprofloxacino

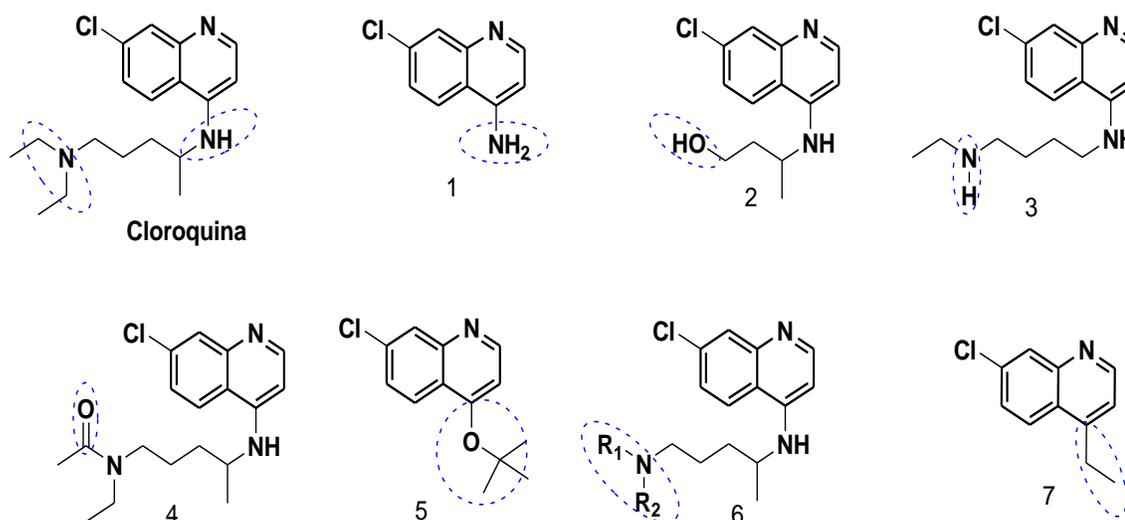


Este fármaco apresenta-se fotossensível sob determinadas condições, tais como a concentração e o pH do meio, sendo que a maior estabilidade é alcançada em pH

3,0 - 4,0. O mecanismo da possível fotodegradação envolve o anel piperazínico, no qual o nitrogênio pode ser completamente protonado, e o grupo carboxila, que sofre completa ionização (TORNIAINEN; TAMMILEHTO; ULVI, 1996).

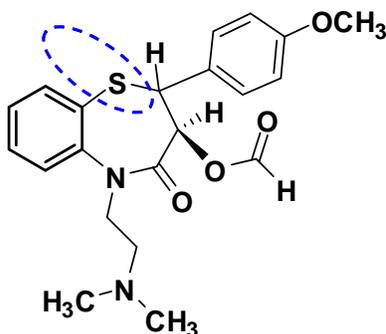
### Cloroquina

Para a cloroquina foi proposto um mecanismo de fotodegradação em solvente orgânico (isopropanol), que indica a quebra da molécula em até quinze subprodutos de fotodegradação, dos quais somente sete foram isolados e considerados os mais importantes (ESQUEMA 1.8). O início do processo de degradação, com quebra da molécula, acontece na ligação  $\alpha$ -C-H da cadeia lateral. Este processo de degradação é fortemente dependente da quantidade de oxigênio presente no meio, ou seja, se desencadeia e acontece sob condições aeróbicas (NORD; KARLESEN; TØNNESEN, 1991; NORD; ANDERSEN; TØNNESEN, 1997; NORD *et al.*, 1997; TØNNESEN; KRISTENSEN; NORD, 1998).



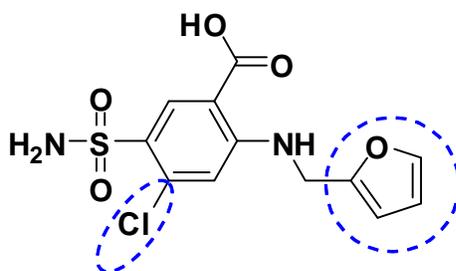
**ESQUEMA 1.8.** Produtos da fotodegradação de difosfato de cloroquina em isopropanol (NORD; KARLESEN; TØNNESEN, 1991).

## Diltiazem



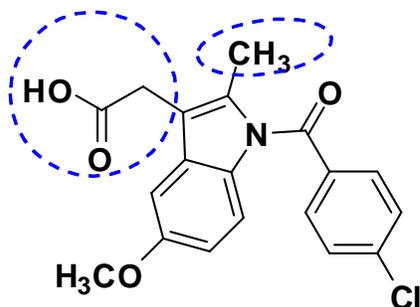
Para o diltiazem foram descritos efeitos de fotossensitização cutânea, resultando em lesões como acne, dermatite e urticária. Este fármaco tem grande capacidade de absorver as radiações UVA e UVB da luz solar e da artificial. As reações de fotodegradação são fortemente dependentes do pH, ocorrendo principalmente em pH 9,0 com formação de um S-óxido (ANDRISANO *et al.*, 2001a).

## Furosemida



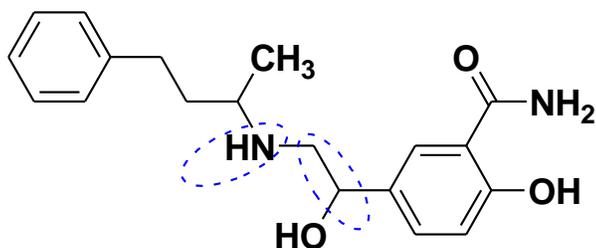
O mecanismo de fotodegradação descrito na literatura indica que a molécula sofre fotorredução do cloro do anel aromático e foto-hidrólise do anel furfurílico e que ambas ocorrem em presença de oxigênio (MOORE; SITHIPITAKS, 1983; VARGAS *et al.*, 1998b).

## Indometacina



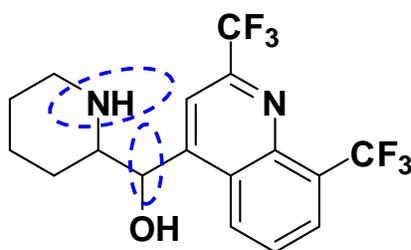
Estudos realizados em diferentes solventes revelaram reações fotoquímicas do tipo fotocicloadição de alcenos, rearranjo de Fries e descarboxilação do ácido acético. Os produtos de degradação obtidos foram considerados potencialmente fototóxicos e indutores de fotorreações alérgicas cutânea e ocular (WEEDON; WONG, 1991).

## Labetalol



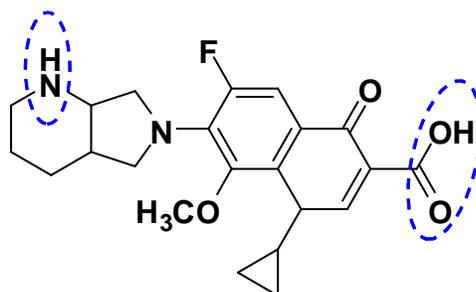
O fármaco exposto à radiação UVA ou UVB mostra significativa fotodegradação dependente do pH, uma vez que o meio alcalino favorece a degradação frente à luz, envolvendo reações de N-dealquilação e quebra homolítica da ligação carbono-carbono (ANDRISANO *et al.*, 2001b).

## Mefloquina



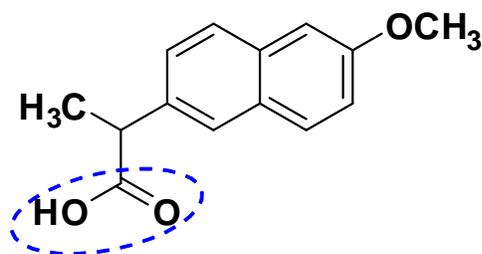
A fotossensibilidade e a formação de produtos de degradação da mefloquina são dependentes das condições aeróbicas. O mecanismo de reação mostra o tripleto de mefloquina como o principal responsável pela fotodegradação e pela fotossensitização, como os responsáveis pela fototoxicidade e pelas reações fotoalérgicas os radicais livres, singletos de oxigênio e superóxidos (TØNNESEN; GRISLINGAAS, 1990; TØNNESEN, 1999; NAVARATNAM; HAMBLETT; TØNNESEN, 2000).

## Moxifloxacino



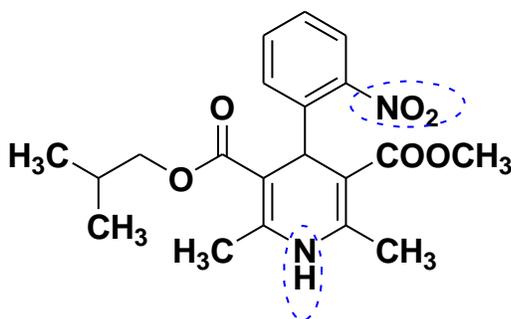
Estudos revelam que, após a fotodegradação, a potência do fármaco diminui em até 50%. O possível mecanismo de fotodegradação envolve o nitrogênio do anel piperazínico, que é completamente protonado. Ocorre também completa ionização do grupo carboxila (SUNDERLAND *et al.*, 2001; MOTWANI *et al.*, 2007).

## Naproxeno



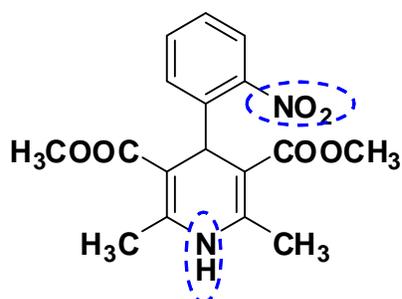
A fotodegradação deste fármaco é resultado da fotodescarboxilação, que leva à formação de etilo, 1-hidroxietilo e acetil, com quebra da cadeia lateral. Por outro lado, o mecanismo que envolve a fotorreação no organismo humano deriva de processo de fotoionização, por desativação de uma molécula excitada sob condições apropriadas de irradiação, levando à formação de radicais livres e, sob condições aeróbicas, à formação de oxigênio singlete (BOSCÁ *et al.*, 1990; BOSCÁ; MARÍN; MIRANDA, 2001; JIMÉNEZ; MIRANDA; TORMOS, 1997).

## Nisoldipino



A formação dos produtos de fotodegradação mais importantes deriva da redução dos grupos nitro e nitroso derivado, sendo que este último é formado em maior quantidade pela coplanaridade do anel benzênico e do anel piridínico, originando a nitrosopiridina (ÁLVAREZ-LUEJE *et al.*, 1998).

## Nifedipino

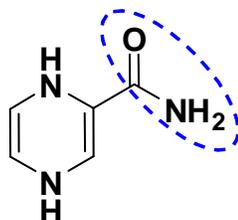


É usado como fármaco modelo em ensaios e testes de fotodegradação exatamente por sua conhecida fotossensibilidade. Foram descritas reações de fototoxicidade e fotossensitização na pele de pacientes submetidos à terapia com nifedipino. Estudos reportam elevada fotossensibilidade mesmo no estado sólido, com acentuada mudança da cor do produto, passando de amarelado para marrom, em poucas horas de exposição (AMAN; THOMA, 2002).

O mecanismo de fotodegradação proposto está fundamentado na presença de dois centros redox, um no anel di-hidropiridínico e outro no anel nitro aromático (SQUELLA *et al.*, 1989; GIBBS *et al.*, 1992; DE VRIES; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN 1998).

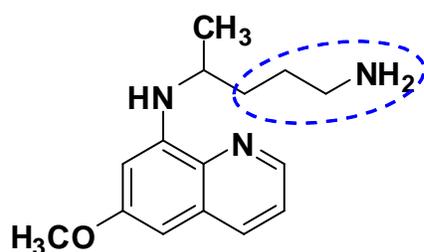
De acordo com Matsuda e colaboradores (1989), existem dois produtos de fotodegradação, um nitroso derivado (nitrosopiridina) e um nitro derivado, originados por reações de redução. Esses produtos de degradação possuem pouco ou nenhum efeito farmacológico.

## Pirazinamida



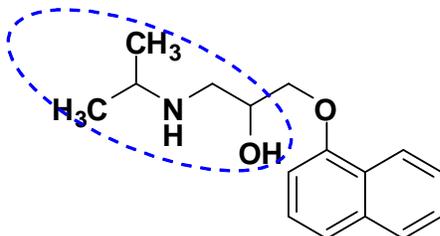
Este fármaco apresenta fotossensibilidade à luz (UVA, principalmente) sob condições aeróbicas, sendo descritos quatro fotoprodutos. O mecanismo proposto para explicar esse processo de fotodegradação envolve a  $\alpha$ -clivagem da ligação carbono-carbono entre a carbonila do grupo amino e o anel aromático da cadeia lateral, com posterior formação de um radical fenil como intermediário, via abstração de hidrogênio e dimerização (VARGAS *et al.*, 2003).

### Primaquina



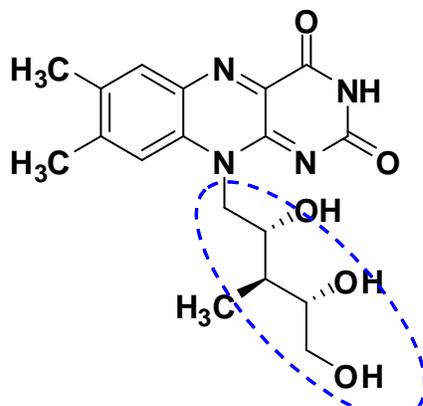
Pertence ao grupo dos fármacos quinolínicos cuja fotossensibilidade é bastante conhecida. Foram observados efeitos oculares e cutâneos de fotossensibilidade, manifestados como irritação cutânea e efeitos oculares de acumulação na retina. Estudos reportam que a fotodegradação em meio aquoso ocorre por mecanismos de clivagem da cadeia lateral, deixando a estrutura quinolínica inalterada. Foi observado, ainda, que a fotodecomposição da molécula é acelerada na presença de oxigênio. Os produtos de degradação obtidos não são fotoquimicamente inertes e podem participar de reações secundárias dentro do organismo humano. Os maiores produtos de fotodegradação nem sempre são formados *in vivo*, podendo também ser originados *in vitro* após exposição à luz. Tais produtos apresentam potencial efeito de fototoxicidade cutânea na pele e na retina (KRISTENSEN *et al.* 1993; 1998; KRISTENSEN; GRINBERG; TØNNESEN, 1997).

## Propranolol



Esta molécula é bastante fotossensível e, mesmo no estado sólido, o fármaco passa da cor amarelada para marrom, chegando finalmente ao preto, de acordo com o tempo e a intensidade de exposição. Foram isolados três produtos de fotodegradação (N-acetilpropranolol, 1-naftol e N-formilpropranolol) e os mecanismos propostos para a formação destes sugerem uma acetilação do grupo amino (UWAI *et al.*, 2005).

## Riboflavina

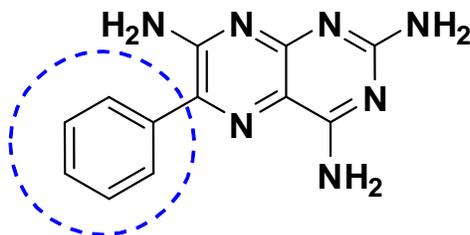


Estudos revelam que a fotoquímica desse composto é dependente do pH e que a menor fotodegradação ocorre entre pH 5,0 e 6,0. A riboflavina é fotossensível às radiações UV e VIS, degradando-se via formação de oxigênio singlete ou via

radicais, incluindo oxigênio reativo do tipo íon superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (AHMAD *et al.*, 2004).

São propostos dois mecanismos de formação dos produtos de fotodegradação por fotoadição e fotorredução, sendo ambos fortemente dependentes da intensidade e do comprimento de onda da fonte de irradiação. Podem ser formados até quatro produtos de degradação: 7,8-dimetil-10-(formilmetil)-isoaloxazina, lumicromo, lumiflavina e ciclodi-hidrorriboflavina (AHMAD; FASIHULLAH; VAID, 2004; 2005, 2006; AHMAD *et al.*, 2004).

### Triantereno



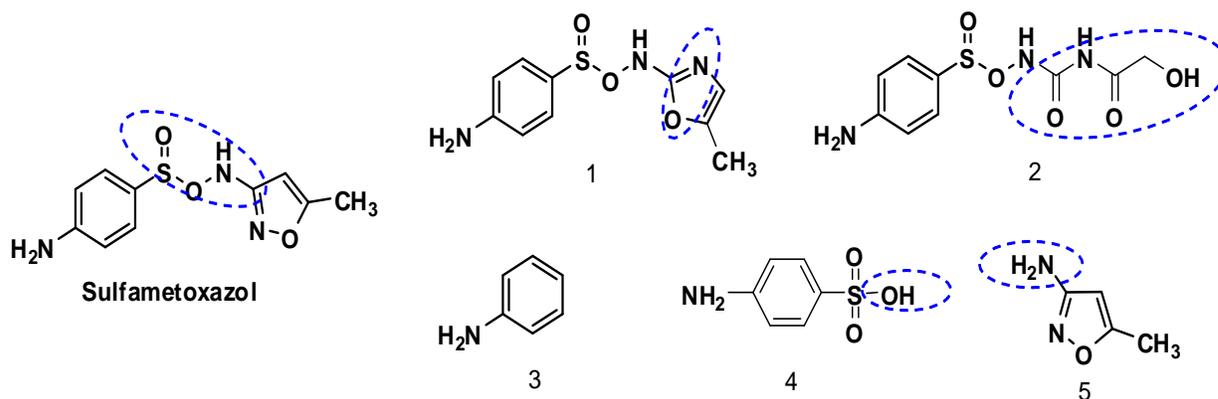
Estudos revelaram que o fármaco é fotossensível à irradiação UVB, originando a quebra da molécula e formando produtos de degradação considerados não tóxicos. Entretanto, sob irradiação UVA e em condições aeróbicas, é capaz de transmitir energia ao oxigênio molecular, com formação de oxigênio singleto, que vai gerar o efeito de fototoxicidade, como demonstrado em ensaios desenvolvidos em fluidos biológicos simulando condições *in vivo* (VARGAS *et al.*, 1998a; FIORI *et al.*, 2003).

### Sulfametoxazol

Esse fármaco é extremamente fotossensível, especialmente em meio ácido, e o principal produto de fotodegradação resulta da fotoisomerização do anel isoxazol, formando 4-amino-N-(5-metil-2-oxazolyl) benzenesulfonamida, além de anilina, ácido

sulfanílico, 3-amino-5-metilisoxazol e um produto hidratado da 2H-azirina (ESQUEMA 1.9). O mecanismo inicia-se com a clivagem da ligação do nitrogênio-oxigênio, e conseqüente obtenção de um composto intermediário, e a posterior formação do produto hidratado da 2H-azirina, sendo que este último atua como intermediário na formação dos outros fotoprodutos (ZHOU; MOORE, 1994).

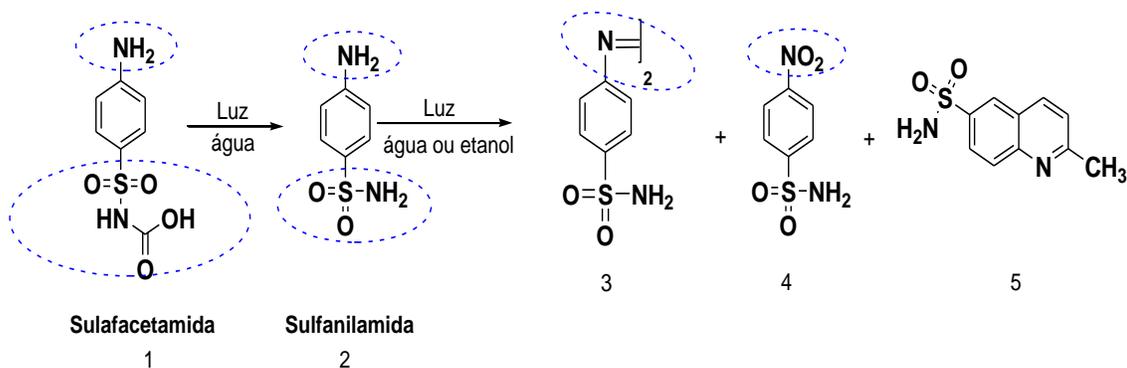
Os estudos também indicam que o produto majoritário de degradação, 4-amino-N-(5-metil-2-oxazolil) benzenesulfonamida, é responsável pela conhecida reação de fotossensitização por exposição à luz (ZHOU; MOORE, 1994; ICARDO *et al.*, 2003a). Entretanto, estudos realizados por Ryan e colaboradores (2011) atribuem fotodegradação indireta devido a radicais hidroxila e tripleto no estado excitado, provenientes de matéria orgânica.



**Esquema 1.9.** Fotodegradação do sulfametoxazol indicando a formação dos cinco produtos de fotodegradação: 4-amino-N-(5-metil-2-oxazolil) benzenesulfonamida (1), um produto hidratado da 2H-azirina (2), anilina (3), ácido sulfanílico (4) e 3-amino-5-metilisoxazol (5).

### Sulfacetamida e sulfanilamida

A sulfacetamida apresenta alta fotossensibilidade, sendo facilmente fotolisada por desacetilação, originando sulfanilamida. Na sequência, o grupo amino desta sulfanilamida pode sofrer oxidação, tanto em solução aquosa como em etanol, resultando na formação de composto azo, um nitro e um acetaldeído (via oxidação), formando-se, também, 2-metil-quinolina-6-sulfonamida, como mostrado no ESQUEMA 1.10 (AHMAD, 1982; ICARDO *et al.*, 2003a).



**ESQUEMA 1.10.** Fotodegradação da sulfacetamida (1) e da sulfanilamida (2) e seus produtos derivados: composto azo (3), nitro (4) e 2-metil-quinolina-6-sulfonamida (5).

### 4.4 Fotodegradação de fármacos em associação

Existem fármacos que, quando em associação, apresentam fotodegradação mais intensa, conforme demonstram estudos conduzidos com diuréticos e antineoplásicos. No QUADRO 1.3, são indicados alguns exemplos de associações nas quais a ação da luz resulta em degradação dos fármacos.

**QUADRO 1.3.** Fármacos que, em associação, apresentam fotodegradação mais acentuada.

Associação	Uso terapêutico	Referência
Riboflavina + tetraciclina	Vitamina B2 e tetraciclina	CASTILLO <i>et al.</i> , 2007
Riboflavina + fenilefrina	Vitamina B2 e simpaticomiméticos	MASSAD <i>et al.</i> , 2005
Triantereno + furosemida	Associação de fármacos com ação diurética	FIORI <i>et al.</i> , 2003
Triantereno + hidroclorotiazida	Associação de fármacos com ação diurética	MOORE; MALLESCHE, 1991
Metotrexato + vimblastina	Antineoplásicos	McELNAY <i>et al.</i> , 1988

#### 4.4.1 Riboflavina + tetraciclina / riboflavina + fenilefrina

A riboflavina é conhecida por exercer efeito sinérgico na fotodegradação de outros fármacos, como as tetraciclina e a fenilefrina. Os mecanismos pelos quais ocorrem reações entre estes fármacos envolvem a formação de radicais livres sob condições aeróbicas ou anaeróbicas e, que como consequência, levam à diminuição de suas respectivas atividades terapêuticas (CASTILLO *et al.*, 2007; MASSAD *et al.*, 2005).

#### 4.4.2 Triantereno + furosemida / triantereno + hidroclorotiazida

O triantereno apresenta incremento da fotodegradação quando administrado com furosemida ou com hidroclorotiazida, que são fármacos diuréticos comumente utilizados em associação. Os vários produtos de fotodegradação obtidos mostraram

maior fotossensibilidade e maior toxicidade (FIORI *et al.*, 2003, MOORE; MALLESCCH, 1991).

#### **4.4.3 Metotrexato e vimblastina**

O metotrexato é considerado um fármaco altamente fotossensível; quando associado à vimblastina, ocorre aumento na velocidade das reações de fotodegradação. O início da fotodegradação é observado mesmo com luz ambiente natural e, em poucos minutos, ocorre degradação e mudança de cor (McELNAY *et al.*, 1988).

### **5. FOTODEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS NO ESTADO SÓLIDO**

A fotodegradação no estado sólido é consideravelmente diferente daquela observada em solução. O mecanismo pela qual os fármacos se degradam é muito mais difícil e complexo de medir, controlar e explicar. Em geral, as reações no estado sólido acontecem de forma lenta; porém, condições extremas são frequentemente empregadas a fim de se obter, de maneira mais rápida, previsões do comportamento frente à exposição luminosa (ORFORD *et al.*, 1998; VILA JATO, 2001).

No estado sólido, as substâncias encontram-se sob diferentes tamanhos de partícula ou, algumas vezes, em aglomerados de pó. Esses fatores exercem influência sob as condições de fotodegradação dos produtos. Por outro lado, os recipientes que contêm as substâncias podem permitir a exposição superficial do produto e, de modo que, o processo fotoquímico se inicie na porção do produto que está diretamente exposta à luz.

Em alguns casos, o produto que se encontra nas camadas internas do recipiente pode também ser afetado. No entanto, esta probabilidade depende do tempo de exposição, uma vez que, quanto maior o tempo de exposição, maior a probabilidade de que o produto (que se encontra no interior do recipiente) sofra degradação como consequência da ativação molecular. Isto acontece por interação de moléculas que

desencadeiam a reação nas camadas seguintes. Cabe destacar que, nestes casos, estão envolvidas reações bastante complexas, o que torna difícil estabelecer um mecanismo exato para este tipo de degradação (TØNNESEN, 2001; VILA JATO, 2001).

O resultado mais comum de uma amostra sólida irradiada é a mudança de sua aparência, como, por exemplo, a descoloração dos compostos coloridos e a coloração de produtos brancos. Entretanto, a mudança na aparência não necessariamente está relacionada à degradação do composto e vice-versa. Algumas vezes, as reações de fotodegradação sofrem influência da temperatura, da umidade e de outros fatores relacionados (TØNNESEN; KRISTENSEN; NORD, 1998).

No estado sólido, algumas características físicas, como cor, tamanho de partícula, área de superfície e polimorfismo, exercem influência sobre os processos de fotodegradação, conforme discutido a seguir.

### **5.1 Tamanho de partícula**

Quanto maior a área superficial das partículas, maior será a área de exposição à luz. Conseqüentemente, a degradação correspondente será mais acelerada.

Para fármacos altamente sensíveis à luz, o nifedipino e a molsidomina, a influência do tamanho da partícula na degradação pela luz é constatada após duas horas de exposição, quando é observada degradação de 5 a 10% maior para pós mais finos e homogêneos em comparação com aqueles de maior granulometria (AMAN; THOMA, 2002).

Porém, estudos com furosemida demonstraram que, após separação de diferentes tamanhos de partículas do fármaco, aquelas com diâmetro de 22 $\mu$ m sofrem degradação mais rapidamente, quando comparadas às partículas de 2,5 $\mu$ m. A explicação para este tipo de ocorrência está relacionada com a coesão do pó e a formação de aglomerados de partículas que acabam, na verdade, diminuindo a área superficial e, conseqüentemente, a capacidade de exposição do fármaco à luz (DE VILLIERS; VAN DER WATT; LÖTTER, 1993).

## 5.2 Polimorfismo

Estudos mostram que as várias formas polimórficas de um mesmo fármaco podem apresentar diferenças de comportamento na fotodegradação, indicando a grande influência da estrutura cristalina na estabilidade frente à exposição luminosa. Estudos já demonstraram este efeito para alguns antagonistas dos leucotrienos B4 (ORFORD *et al.*, 1998, TØNNESEN *et al.*, 2004). Os fármacos mefloquina, cloroquina e carbamazepina exibem diferentes níveis de fotodecomposição, dependendo da forma polimórfica na qual o material se encontra (DE VILLIERS; VAN DER WATT; LÖTTER, 1992; NORD; ANDERSEN; TØNNESEN, 1997; NORD *et al.*, 1997; TØNNESEN, 1999).

Um exemplo da influência dos polimorfos na fotodegradação pode ser observado na furosemida, para a qual amostras sólidas de polimorfo I foram fotoquimicamente mais estáveis que o polimorfo II, quando estudadas sob atmosfera de nitrogênio. Quando na presença de oxigênio, entretanto, a forma polimórfica II não foi afetada. Assim, a presença de produtos de fotodegradação depende das condições de atmosfera de gás utilizada (DE VILLIERS; VAN DER WATT; LÖTTER, 1992).

## 5.3 Excipientes

Muitas reações fotoquímicas são afetadas pela presença de excipientes, o que, em algumas vezes, pode resultar em degradação significativa do fármaco. Assim, um excipiente pode iniciar, propagar ou participar de uma determinada reação fotoquímica, resultando em degradação ou formação de produtos de degradação que podem desencadear efeitos tóxicos nos indivíduos, comprometendo a segurança e a tolerabilidade do fármaco.

É importante considerar, também, que os excipientes, ao interagirem com os demais componentes da formulação, podem dar origem a radicais livres (via abstração de hidrogênio), atuando como agentes de transferência, o que pode conduzir ao início de um processo de degradação.

Os excipientes não são substâncias puras e seus resíduos, mesmo em baixos níveis, podem gerar impacto na fotoestabilidade de uma formulação. Assim, por

exemplo, os fenóis derivados da povidona podem alterar a formulação de um comprimido, já que a molécula de fenol tem grande tendência de perder o hidrogênio de seu grupo hidroxila, resultando no fenóxido, com oxigênio altamente reativo à luz (TØNNESEN, 2001).

Outro exemplo são os aldeídos derivados da lactose (formados durante a secagem por *spray dried* ou durante a autoclavação), que podem dar origem a reações de adição com grupos amino primários, resultando na coloração dos produtos. Do mesmo modo, os lipídeos, que frequentemente contêm peróxidos, sofrem decomposição sob influência da luz, gerando radicais livres (BUXTON; JAHNKE; KEADY, 1994).

## 6. FOTODEGRADAÇÃO EM SOLUÇÃO

Como já mencionado, existe diferença entre as reações de fotodegradação em solução e aquelas que ocorrem no estado sólido. Um aspecto importante a ser considerado é a possibilidade de formação de reação secundária com o solvente a partir de compostos oriundos da degradação do fármaco pela luz, fato que não é possível no estado sólido (GLASS; NOVÁK; BROWN, 2004).

Adicionalmente, é importante considerar alguns fatores, tais como concentração do fármaco, pH do meio, força iônica e presença de oxigênio, todos apresentados a seguir.

### 6.1 Concentração de fármaco

Em solução, a luz é absorvida na superfície ou nas camadas superiores da amostra. Se o fármaco estiver em alta concentração, as moléculas posicionadas mais no interior do volume se tornarão protegidas da irradiação, observando-se efeito fotoestabilizante, que não resulta em reação. Portanto, uma solução menos concentrada provavelmente será menos estável que uma solução concentrada, que se mostrará mais fotoestável (TØNNESEN, 2001; THOMA; SPILGIES, 2007).

## 6.2 pH do meio

Para muitas das substâncias em solução, a fotodegradação é um processo dependente do pH, como demonstrado para ciprofloxacino (TORNIAINEN; TAMMILEHTO; ULVI, 1996), midazolam (ANDERSIN; TAMMILEHTO, 1995), cloroquina (NORD; ANDERSEN; TØNNESEN, 1997; NORD *et al.*, 1997; TØNNESEN; KRISTENSEN; NORD, 1998) e mefloquina (TØNNESEN, 1999). Por outro lado, os vários tipos de solução tampão exercem diferentes efeitos nos processos de fotodegradação, conforme demonstrado para daunorrubicina (ISLAM; ASKER, 1995) e mefloquina (TØNNESEN, 1999).

## 6.3 Força iônica

A transferência de prótons para o estado excitado das espécies em reação é facilitada pela presença de íons, tais como fosfato e citrato. Assim, os sais de tampões podem mudar a característica de absorção da radiação na formulação no medicamento, originando um complexo com outros componentes que podem estar presentes na solução (TØNNESEN, 2001; GLASS; NOVÁK; BROWN, 2004).

Um exemplo é o minoxidil, para o qual o incremento da força iônica da solução resulta em efeitos protetores na fotoestabilidade deste fármaco. Isso ocorre devido à formação de um filme protetor de solvatos ao redor da molécula, mantendo, assim, a estabilidade da solução frente à luz (CHINNIAN; ASKER, 1996).

## 6.4 Presença de oxigênio

Um fator de grande importância nas reações fotoquímicas é a presença de oxigênio. O mecanismo de participação do oxigênio na fotodegradação é muito complexo e envolve reações com singleto de oxigênio e radicais livres. Um fármaco, que em ausência de oxigênio (condições anaeróbicas) é estável frente a luz, pode ser desestabilizado e gerar fotodegradação quando submetido a condições aeróbicas.

A avaliação da influência do oxigênio na reação de fotodegradação pode ser conduzida por intermédio da comparação de duas soluções: uma contendo oxigênio

e a outra na qual um gás inerte é injetado no recipiente, eliminando o oxigênio. Nestas condições, é possível observar as reações secundárias e a desestabilização da solução, como aquelas descritas para os antimaláricos, como cloroquina (NORD; ANDERSEN; TØNNESEN, 1997); primaquina (KRISTENSEN *et al.*, 1998) e mefloquina (TØNNESEN, 1999), que sofrem degradação na presença de oxigênio.

## **7. ESTRATÉGIAS PARA PROTEÇÃO DE FÁRMACOS FOTOSSENSÍVEIS**

Existem várias estratégias capazes de proteger fármacos passíveis de fotodegradação. Tais procedimentos podem ser adotados em qualquer fase da produção de um medicamento e é usual dividi-los em duas categorias: (a) proteção interna e (b) proteção externa.

### **7.1 Proteção interna**

Considera-se proteção interna qualquer procedimento capaz de atuar diretamente sobre o fármaco a ser protegido, conferindo-lhe capacidade de resistir à ação da luz independentemente de qualquer outra providência.

A proteção interna é representada, especialmente, pela utilização de ciclodextrinas, que são oligossacarídeos obtidos a partir do amido. As ciclodextrinas são muito utilizadas para encapsulação por inclusão molecular, uma vez que possuem a forma de um cone truncado com uma cavidade interior, o que possibilita sua utilização como hospedeiros na formação de complexos de inclusão, permitindo sua complexação com moléculas que tenham dimensões e polaridade compatíveis com a cavidade (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998; BIBBY; DAVIES; TUCKER, 2000; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

As ciclodextrinas (CD) são bastante eficientes em promover aumento da fotoestabilidade de fármacos sensíveis à luz. O QUADRO 1.4 apresenta alguns exemplos de fármacos encapsulados em ciclodextrinas e que se mostraram mais estáveis frente à ação da luz. É também conhecido que a estrutura rígida das diferentes ciclodextrinas permite o isolamento e o estudo de apenas um confômero

(cis ou trans), facilitando a compreensão de eventos fotofísicos e fotoquímicos, quando ocorre a complexação de outras substâncias dentro de suas cavidades (UEKAMA, 2002).

**QUADRO 1.4.** Exemplo de fármacos fotossensíveis complexados com ciclodextrinas, para os quais há incremento da fotoestabilidade.

Fármacos	Tipo de CD	Referência
Anlodipino	Me- $\beta$ -ciclodextrina	RAGNO <i>et al.</i> , 2003b
Dipirona	$\beta$ -ciclodextrina e $\gamma$ -ciclodextrina	PITARELLO <i>et al.</i> , 2005
Ibuprofeno	HP- $\beta$ -ciclodextrina	GODWIN; WILEY; FELTON, 2006
Isradipino	Me- $\beta$ -ciclodextrina	MIELCAREK; DACZKOWSKA, 1999
Nicardipino	$\beta$ -ciclodextrina, HP- $\alpha$ -ciclodextrina, HE- $\beta$ -ciclodextrina	POMPONIO <i>et al.</i> , 2004
Nifedipino	HP- $\beta$ -ciclodextrina, $\beta$ -ciclodextrina, DM- $\beta$ -ciclodextrina	BAYOMI; ABANUMAY; AL- ANGARY, 2002
Naproxeno	HP- $\beta$ -ciclodextrina (PVP), $\beta$ -ciclodextrina (PEG)	VALERO; CARRILLO, 2004; VALERO; ESTEBAN, 2004
Riboflavina	HP- $\beta$ -ciclodextrina	LOUKAS; VRAKA; GREGORIADIS, 1996

Me: metil, HP: hidroxipropil, HE: hidroxietil, DM: dimetil

A complexação do anlodipino com ciclodextrinas é capaz de promover a melhora significativa na fotoestabilidade do fármaco, especialmente quando se utiliza a metil- $\beta$ -ciclodextrina, na qual o nível de inativação do fármaco foi de somente 3%, após nove horas contínuas de exposição à luz (RAGNO *et al.*, 2003b).

A dipirona apresenta melhor fotoestabilidade após complexação com  $\gamma$ -ciclodextrina, com resultados de 58,5% da fotodegradação do fármaco em pH 3,0. No entanto, a  $\beta$ -ciclodextrina também estabiliza o fármaco (36,7%, no mesmo pH, e de, aproximadamente, 13,5% em pH 7), mas com efeito menor (PITARELLO *et al.*, 2005).

O ibuprofeno aplicado por via tópica também apresenta melhora em sua estabilidade fotoquímica com HP- $\beta$ -ciclodextrina. Resultados mostraram que o fármaco na pele é protegido da exposição à luz UV, quando comparado com o fármaco na forma não complexada (GODWIN; WILEY; FELTON, 2006).

Do mesmo modo, os fármacos isradipino, nicardipino e nifedipino, todos de conhecida fotossensibilidade, também apresentam melhora significativa na fotoestabilidade após encapsulação com diferentes ciclodextrinas (MIELCAREK; DACZKOWSKA, 1999). Para o isradipino, foi utilizada a Me- $\beta$ -ciclodextrina, que, além de apresentar melhores índices de complexação e fotoproteção, possui baixa polaridade e melhor solubilidade, em relação à  $\beta$ -ciclodextrina.

O nicardipino apresentou melhora na fotoestabilidade quando complexado com  $\beta$ -ciclodextrina, HP- $\alpha$ -ciclodextrina e HE- $\beta$ -ciclodextrina. Além disso, foram testadas outras ciclodextrinas, como  $\gamma$ -ciclodextrina, HP- $\beta$ -ciclodextrina, HP- $\gamma$ -ciclodextrina e Me- $\beta$ -ciclodextrina, porém, os resultados não foram significativos (POMPONIO *et al.*, 2004). É possível, ainda, proteger o nifedipino por intermédio da complexação com  $\beta$ -ciclodextrina, HP- $\beta$ -ciclodextrina e DM- $\beta$ -ciclodextrina, utilizando métodos de co-evaporação para obtenção dos complexos (BAYOMI; ABANUMAY; AL-ANGARY, 2002).

Estudos de complexação ternária para o naproxeno, com adição de polímeros, como polivinilpirrolidona e polietilenoglicol associados à HP- $\beta$ -ciclodextrina e  $\beta$ -

ciclodextrina, respectivamente, indicaram aumento da fotoestabilidade do fármaco, quando comparado ao complexo binário (VALERO; CARRILLO, 2004; VALERO; ESTEBAN, 2004). A fotodegradação da riboflavina pode ser, do mesmo modo, reduzida de maneira bastante significativa quando complexada com a HP- $\beta$ -ciclodextrina (LOUKAS; VRAKA; GREGORIADIS, 1996).

## 7.2 Proteção externa

Um fármaco pode facilmente receber proteção contra a ação da luz por intermédio de uma intervenção na sua formulação ou ainda pela simples utilização de uma embalagem adequada.

Assim, na fase de preparação e de análise do produto, podem ser utilizados recipientes opacos que protejam o produto da luz. Nas áreas de fabricação podem ser instaladas luzes do tipo âmbar ou amarela, uma vez que estas apresentam espectro de irradiação luminosa que não leva à fotodegradação de substâncias (TØNNESEN, 2004).

Durante a formulação de comprimidos, é de vital importância conhecer as características de fotoestabilidade do fármaco para, se necessário, formular o produto com um revestimento fotoprotetor adequado. Para cápsulas, é possível utilizar envoltórios opacos, de modo a garantir proteção frente à exposição à luz (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Uma proteção externa de grande importância é aquela conferida simplesmente pela embalagem do medicamento. Parece óbvio, mas a utilização de uma embalagem primária adequada (um blister de cor âmbar, por exemplo) é capaz de proteger o fármaco da degradação pela luz, sem necessidade de recorrer à operação de revestimento (ICH, 1996; SILVA *et al.*, 2009).

As preparações líquidas (xaropes, soluções e suspensões) devem receber atenção especial. Nesses casos, recomenda-se o uso de embalagens primárias de plástico ou vidro (âmbar ou opacos). Cabe mencionar que a espessura da parede da embalagem também exerce influência, pois paredes mais espessas absorvem maior

quantidade de luz devido à maior densidade ótica e, portanto, menor será a transmissão de luz. É importante considerar, ainda, que as embalagens transparentes podem desencadear fotorreações ou decomposição fotoquímica quando expostas à luz ambiente (ALVES *et al*, 2008).

Por outro lado, a embalagem secundária não é menos relevante, já que oferece certa margem de proteção e segurança ao produto. A embalagem apresenta-se, ainda, como um espaço bastante adequado para inclusão de recomendações ao paciente sobre as condições de proteção contra à luz com indicação do tipo “proteger da luz”.

## 8. FOTOTOXICIDADE

Alguns fármacos se mostram fotoquimicamente inertes, na medida em que não se decompõem durante exposição à luz. No entanto, podem atuar como potenciais fontes de formação de radicais livres e de metabólitos fototóxicos e fotorreativos *in vivo*. Essa fotorreatividade pode ser observada após administração do fármaco ou após a exposição do paciente a fontes de luz natural ou artificial, induzindo efeitos adversos, os quais são considerados reações fototóxicas ou fototoxicidade (ALBINI; FASANI, 1998; MOORE, 2004b).

Existe ainda a possibilidade de que os fármacos desencadeiem reações fototóxicas, que resultem em grandes decomposições e origem de fotoprodutos tóxicos, quando afetados por radiações com comprimento de onda, entre 300 e 400nm (UVA), mesmo que, sob este comprimento de onda a quantidade de energia envolvida seja menor, porém com grande capacidade de gerar efeitos nocivos. Isso significa que, em poucos minutos ou algumas horas após exposição à luz, surgem efeitos no organismo e, principalmente, nas células mais expostas, como as da superfície cutânea (MOORE 2004a, HENRY; FOTI, ALSANTE, 2009).

Por outro lado, o maior efeito adverso reportado é a fotossensitização, principalmente de reações cutâneas, que são consideradas reações fototóxicas. Os sintomas ou as manifestações clínicas são, eritemas (por vezes exagerados),

eczemas, edemas sob a forma de erupções na forma de vesículas sobre a pele exposta, hiperpigmentação, descamação e inchaço. Estas reações aparecem imediatamente após a primeira exposição ao sol e podem ocorrer em extensas áreas da pele. Este fenômeno está associado com a imediata resposta das células imunológicas (BOSCÁ; MARÍN; MIRANDA, 2001; HENRY; FOTI, ALSANTE, 2009).

Os efeitos fototóxicos apresentam mecanismo de reação bastante complexo e são dependentes da exposição do indivíduo às fontes de luz (artificial ou solar) após administração do fármaco. Do mesmo modo, o fármaco ou seus produtos de fotodegradação transportados até os tecidos próximos da superfície do organismo, como olhos (retina), pele e cabelo, podem desencadear efeitos tóxicos após exposição à luz (ALBINI; FASANI, 1998; TØNNESEN; KRISTENSEN; NORD, 1998).

Numerosos fármacos podem desencadear efeitos adversos fototóxicos no organismo humano, dentre os quais destacam-se os descritos a seguir:

### **Cloroquina**

Mostrou efeitos de fototoxicidade por fotossensitização de células em níveis cutâneo e ocular, dando origem a mudanças na pigmentação, incluindo retinopatia. Também foi descrito efeito indutor da foto-hemólise de glóbulos vermelhos, gerando certo nível de anemia nos pacientes (NORD; KARLESEN; TØNNESEN, 1991; ELFATIH *et al.*, 1994; NORD; ANDERSEN; TØNNESEN, 1997; NORD *et al.*, 1997; TØNNESEN; KRISTENSEN; NORD, 1998; TØNNESEN, 2004).

### **Mefloquina**

É um potente indutor de reações fototóxicas nos glóbulos vermelhos, nos quais, sob ação da luz, é observada hemólise em sua presença. Outro efeito é observado sobre a melanina da pele, que sofre modificações após tratamento com mefloquina, pois ocorre acumulação no tecido cutâneo. Efeitos de mudanças na pigmentação da pele, da córnea e da retina são também descritos e associados à fotorreação (TØNNESEN; GRISLINGAAS, 1990; TØNNESEN; KRISTENSEN; NORD, 1998).

### **Naproxeno**

Sua fotossensibilidade e seus efeitos adversos foram observados de maneira mais intensa na pele. Os pacientes apresentaram hipersensibilidade cutânea, que foi a principal manifestação do potencial efeito fototóxico da molécula (BOSCÁ *et al.*, 1990; BOSCÁ; MARÍN; MIRANDA, 2001; JIMÉNEZ; MIRANDA; TORMOS, 1997).

### **Triantereno**

Apresenta elevada fototoxicidade em glóbulos vermelhos, produzindo hemólise por ação da luz. Foi observada, também, alteração nos linfócitos e neutrófilos, indicando envelhecimento celular, além de reações de peroxidação lipídica, formando peróxidos e oxigênio singlete (VARGAS *et al.*, 1998a).

### **Sulfametoxazol**

Os efeitos fototóxicos do sulfametoxazol estão ligados à formação de produtos de fotodegradação. Os principais efeitos são manifestados na pele e na retina dos pacientes. Alguns testes em animais de laboratório indicam o possível efeito carcinogênico desta e de outras sulfonamidas, quando degradadas pela luz (ZHOU; MOORE, 1994; ICARDO *et al.*, 2003a).

## REFERÊNCIAS

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

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

ADUSTUM: AN ADUSTUM AN ENLIGHTENING JOURNEY. 2006. Disponível em: <http://library.thinkquest.org/C006027/html-ver/intro.html>. Acesso em: 13 ago. 2009.

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

AHMAD, I.; FASIHULLAH, Q.; VAID, F.H.M. A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.75, p.13–20, 2004.

AHMAD, I.; FASIHULLAH, Q.; NOOR, A.; ANSARI, I.A.; MANZAR ALI, Q.N. Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.280, n.1/2, p.199–208, 2004.

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

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

ALBINI, A.; FASANI, E., eds. **Drugs, photochemistry and photostability**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. 326p. (Special publication, n.225) [International Meeting on Photostability of Drugs, 2., Pavia, 1997].

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

ALVES, R.M.V.; JAIME, S.B.M.; GONÇALVES, M.P.; SUZUKI, P.W. Embalagens plásticas e de vidro para produtos farmacêuticos: avaliação das propriedades de barreira à luz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.2, p.169-180, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

AZEVEDO FILHO, C.A.; FILGUEIRAS GOMES, D.; MÉLO GUEDES, J.P.; MUNIZ FALCÃO BATISTA, R.; SAEGESSER SANTOS, B. Considerations on the quinine actinometry calibration method used in photostability testing of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.54, p.886–888, 2011.

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

BAZIN, M.; BOSCA, F.; MARIN, M.L.; MIRANDA, M.J.A.; PATTERSON, L.K.; SANTUS, R. A laser flash photolysis and pulse radiolysis study of primary photochemical processes of flumequine. **Photochemistry and Photobiology**, v.72, n.4, p.451–457, 2000.

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

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

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

BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G.M.J. (Systemic) phototoxicity of drugs and other xenobiotics. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.10, n.3, p.183-210, 1991.

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

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

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

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

BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: Stationary Office, 2009. v.1, 1172p, v.2, p. 2252p.

BUXTON, P.C.; JAHNKE, R.; KEADY, S. Degradation of glucose in the presence of electrolytes during heat sterilization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.40, p.172-175, 1994.

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

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

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

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

CUEVAS ORTIZ, A. La luz. In: **Monografias.com**. Disponível em: <http://www.monografias.com/trabajos10/lalu/lalu.shtml>. Acesso em: 13 ago. 2009.

DE FILIPPIS, P.; BOVINA, E.; DA ROS, L.; FIORI, J.; CAVRINI, V. Photodegradation studies on lacidipine in solution: basic experiments with a cis–trans reversible photoequilibrium under UV-A radiation exposure. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27, n.5, p.803–812, 2002.

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

DE VILLIERS, M.M.; VAN DER WATT, J.G.; LÖTTER, A.P. Kinetic study of the solid-state photolytic degradation of two polymorphic forms of furosemide. **International Journal of Pharmaceutics**, v.88, p.275–283, 1992.

DE VILLIERS, M.M.; VAN DER WATT, J.G.; LÖTTER, A.P. Influence of the cohesive behaviour of small particles on the solid-state photolytic degradation of furosemide. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.19, p.383–394, 1993.

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

DREW, H.D. Photostability of drug substances and drug products: a validate reference method for implementing the ICH photostability study guidelines, In: ALBINI, A.; FASANI, E., eds. **Drugs, photochemistry and photostability**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. cap.13, p.227-242. (Special publication, n.225) [International Meeting on Photostability of Drugs, 2., Pavia, 1997].

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

EUROPEAN Pharmacopoeia. 6.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2007. 2737p.

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

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

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3.ed. São Paulo: Edusp, 2003. p.711.

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

GARNERO, C.; LONGHI, M. Development of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of ascorbic acid using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and triethanolamine as photostabilizing agents. **Analytica Chimica Acta**, v.659, p.159–166, 2010.

GARRALÓN, J.L. **Tecnología de ondas electromagnéticas**. Extremadura: Universidade de Extremadura, spd. Disponível em: [http://alcazaba.unex.es/old/departamentos/34/105/3801016/A001\\_ondas\\_electromag.pdf](http://alcazaba.unex.es/old/departamentos/34/105/3801016/A001_ondas_electromag.pdf). Acesso em: 13 ago. 2009.

GAUGLITZ, G.; HUBIG, S.M. Chemical actinometry. In: PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. cap.8, p.139-161. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

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

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

GLASS, D.B.; NOVÁK, C.S.; BROWN, M.E. The thermal and photostability of solid pharmaceuticals. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.77, p.1013-1036, 2004.

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

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

HENRY, B.; FOTI, C.; ALSANTE, K. Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule? **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.96, p.57-62, 2009.

HUNG, J.C. Inconsistencies and deficiencies which exist in the current official regulations concerning the photolytic degradation of drugs. In: TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap.8, p.173-187.

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

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

INCHEM. International Programme on Chemical Safety. **Ultraviolet radiation**. Geneva: WHO, 1994. (Environmental Health Criteria 160). Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc160.htm#SectionNumber:2.1>. Acesso em: 13 ago. 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Stability Q1A - Q1F. **Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products**. 1996. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf). Acesso em: 15 set. 2010.

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.

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

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

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

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

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

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. **Dicionário terapêutico Guanabara: 2009-2010**. 16.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

KOTZAGIORGIS, E.C.; MICHALEAS, S.; ANTONIADOU-VYZA, E. Improved photostability indicating ion-pair chromatography method for pergolide analysis in tablets and in the presence of cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, n.4, p.1370-1375, 2007.

KRAMER, I. Photodegradation and photoprotection in clinical practice. In: PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. cap.19, p.397-427. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

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

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

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

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

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

LOPES, C.C.G.O.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of linezolid in tablets in the presence of photodegradation products. **Talanta**, v.82, p.918–922, 2010.

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

MAQUILLE, A.; SALEMBIER, S.; HÉRENT, M.-F.; HABIB, J.-L.J. Photodegradation of flupentixol in aqueous solution under irradiation at 254 nm: identification of the photoproducts generated. **Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry**, v.214, p.224–229, 2010.

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

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

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

MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Whitehouse Station: Merck, 2006. 1756p.

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

MOAN, J.; JUZENAS, P. Biological effects of combinations of drug and light. In: TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. p.189-211.

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

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

MOORE, D.E. Photophysics and photochemistry: aspects of drug stability. In: TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004a. cap.2, p.10-40.

MOORE, D.E. Standardization of photodegradation studies and kinetic treatment of photochemical reactions. In: TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004b. cap.3, p.41-65.

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

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

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

MUSA, K.A.K.; ERICSSON, L.A. Theoretical study of ibuprofen phototoxicity. **Journal of Physical Chemistry B**. v. 111, n. 46, p. 13345-13352, 2007.

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

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

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

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

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

NYQVIST, H.; WADSTEN, T. Preformulation of solid dosage forms: light stability testing of polymorphs as a part of a preformulation program. **Acta Pharmaceutica Technologica**, v.32, n.3, p.130–132, 1986.

OLIVA, M.A.; SOMBRA, L.L.; OLSINA, R.A.; MASI, A.N. A new fluorescent assay for enalapril maleate. **Journal of Fluorescence**, v.15, n.5, p.723-728, 2005.

OLIVEIRA, C.; FERNANDES, C.; CARPINTEIRO, G.; CORREIA, L. **ABC das ondas eletromagnéticas**. Lisboa: Instituto de Telecomunicações, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2000. 13p. (Projeto ITEM). Disponível em: [http://193.136.221.5/item/docs/ABC\\_OEM.pdf](http://193.136.221.5/item/docs/ABC_OEM.pdf). Acesso em: 12 jan. 2008.

ORFORD, C.; WEBB, M.L.; CATTANACH, K.H.; COTTEE, F.H.; ESCOTT, R.E.; PITFIELD, I.D.; RICHARDS, J.J. An analytical and structural study of the photostability of some leukotriene B4 antagonist, In: ALBINI, A.; FASANI, E., eds. **Drugs, photochemistry and photostability**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. cap.10, p.182-193. (Special publication, n.225) [International Meeting on Photostability of Drugs, 2., Pavia, 1997].

PACKER, J.L.; WERNER, J.J.; LATCH, D.E.; McNEILL, K.; ARNOLD, W.A. Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibrac acid, and ibuprofen. **Aquatic Sciences**. v. 65, p. 342-351, 2003.

PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. 427p. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

PIECHOCKI, J. Selecting the right source for pharmaceutical photostability testing. In: ALBINI, A.; FASANI, E., eds. **Drugs, photochemistry and photostability**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. cap.15, p.247-271. (Special publication, n.225) [International Meeting on Photostability of Drugs, 2., Pavia, 1997].

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

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

OUÉDRAOGO, G.; MORLIÈRE, P.; MAZIÈRE, C.; MAZIÈRE, J.C.; SANTUS, R. Alteration of the endocytotic pathway by photosensitization with fluoroquinolones. **Photochemistry and Photobiology**, v.72, n.4, p.458–463, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

RAMAN, N.V.V.S.S.; HARIKRISHNA, K.A.; PRASAD, A.V.S.S.; REDDY, K.R.; RAMAKRISHNA, K. Determination of duloxetine hydrochloride in the presence of process and degradation impurities by a validated stability-indicating RP-LC method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, p.994–997, 2010.

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

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

RYAN, C.C.; TAN, D.T.; ARNOLD, W.A. Direct and indirect photolysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in wastewater treatment plant effluent. **Water Research**, v.45, p.1280-1286, 2011.

SERRANO, G.; FORTEA, J.M.; LATASA, J.M.; SanMARTIN, O.; BONILLO, J; MIRANDA, M.A. Oxycam-induced photosensitivity: Patch and photopatch testing studies with tenoxicam and piroxicam photoproducts in normal subjects and in piroxicam-droxicam photosensitive patients. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 26, n. 4, p. 545-548, 1992.

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

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

SHAH, R.P.; SINGH, S. Identification and characterization of a photolytic degradation product of telmisartan using LC-MS/TOF, LC-MS<sup>n</sup>, LC-NMR and on-line H/D exchange mass studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.53, p.755-761, 2010.

SHAH, R.P.; SAHU, A.; SINGH, S. Identification and characterization of degradation products of irbesartan using LC-MS/TOF, MS<sup>n</sup>, on-line H/D exchange and LC-NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, p.1037-1046, 2010.

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

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

SINGH, P.; MEHROTRA, R.; BAKHSHI, A.K. Stress degradation studies of nelfinavir mesylate by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.53, p.287–294, 2010.

SORTINO, S.; GIUFFRIDA, S.; DE GUIDI, G.; CHILLEM, R.; PETRALIA, S.; MARCONI, G.; CONDORELLI, G.; SCIUTO, S. The photochemistry of flutamide and its inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin. Dramatic effect of the microenvironment on the nature and on the efficiency of the photodegradation pathways. **Photochemistry and Photobiology**, v.73, n.1, p.6-13, 2001.

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

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

SRINIVASU P.; SUBBARAO, D.V.; VEGESNA, R.V.K.; BABU, K.S. A validated stability-indicating LC method for acetazolamide in the presence of degradation products and its process-related impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.52, p.142-148, 2010.

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

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

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

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

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

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

THOMA, K.; KÜBLER, N. Current methods for the analytical investigation of the photodegradation of active pharmaceutical ingredients and products. In: PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. cap.14, p.293-303. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

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

THOMA, K.; SPILGIES, H. Photostabilization of solid and semisolid dosage forms. In: PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. cap.16, p.323-342. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

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

TONG, L.; EICHHORN, P.; PÉREZ, S.; WANG, Y.; BARCELÓ, D. Photodegradation of azithromycin in various aqueous systems under simulated and natural solar radiation: Kinetics and identification of photoproducts. **Chemosphere**, v.83, p.340–348, 2011.

TØNNESEN, H.H.; KRISTENSEN, S.; NORD, K. Photoreactivity of selected antimalarial compounds in solution and in the solid state, In: ALBINI, A.; FASANI, E.,

eds. **Drugs, photochemistry and photostability**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. cap.3, p.87-99. (Special publication, n.225) [International Meeting on Photostability of Drugs, 2., Pavia, 1997].

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

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

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

TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. 435p.

TØNNESEN, H.H.; BAERTSCHI, S.W. The questions most frequently asked. In: TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap.7, p.161-165.

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

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

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

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

UNITED States Pharmacopeia: 32; The National Formulary: 27. Rockville: United States pharmacopeial Convention, 2009. v.1, 1381p.; v.2, 1383-2819p.; v.3, 3745p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. **Índice Ultravioleta (IUV)**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2003. Disponível em: [http://www.indiceuv.ufrj.br/2003/iuv2003\\_radiacao.html](http://www.indiceuv.ufrj.br/2003/iuv2003_radiacao.html). Acesso em: 13 ago. 2009.

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

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

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

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

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

VAN DOORSLAER, X.; DEMEESTERE, K.; HEYNDERICKX, P.M.; VAN LANGENHOVE, H.; DEWULF, J. UV-A and UV-C induced photolytic and photocatalytic degradation of aqueous ciprofloxacin and moxifloxacin: reaction kinetics and role of adsorption. **Applied Catalysis, B: Environmental**, v.101, p.540–547, 2011.

VARGAS, F.; FUENTES, A.; SEQUERA, J.; MÉNDEZ, H.; FRAILE, G.; VELÁSQUEZ, M.; MEDINA, R. *In vitro* approach to investigating the phototoxicity of the diuretic drug triamterene. **Toxicology in Vitro**, v.12, p.661-667, 1998a.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WIKIPEDIA. **Lux**. Disponível em: <http://es.wikipedia.org/wiki/Lux>. Acesso em: 9 ago. 2010.

YOSHIOKA, S.; ISHIHARA, Y.; TERAZONO, T.; TSUNAKAWA, N.; MURAI, M.; YASUDA, T.; KITAMURA, T.; KUNIHIRO, Y.; SAKAI, K.; HIROSE, Y.; TONOOKA, K.; TAKAYAMA, K.; IMAI, F.; GODO, M.; MATSUO, M.; NAKAMURA, K.; ASO, Y.; KOJIMA, S.; TAKEDA, Y.; TERAU, T. Quinine actinometry as a method for calibrating ultraviolet radiation intensity in light stability testing of pharmaceutical. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.20, n.13, p.2049-2062, 1994.

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

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

## II. FOTOESTABILIDADE

### 1. INTRODUÇÃO

A fotoestabilidade é uma propriedade das moléculas que, quando utilizada como parâmetro farmacêutico, descreve como um fármaco responde à exposição à luz (solar ou artificial) e envolve não somente as reações de fotodegradação, mas também outros processos, como formação de radicais, transferência de energia e reações de rearranjo molecular de cada substância (TØNNESEN, 2004).

Os estudos de fotoestabilidade permitem avaliar a estabilidade intrínseca da molécula de um fármaco (ou do produto final) frente à exposição à luz, indicando se tal exposição representa riscos de alteração ou mudanças inaceitáveis. Também permitem determinar padrões de degradação e validação do método analítico, estabelecendo o quão adequados são os procedimentos de análise propostos para o fármaco em questão (ICH, 1996, ALSANTE *et al.*, 2007).

Dentro das atividades de pesquisa e desenvolvimento de produtos e do controle de qualidade das indústrias, os ensaios de fotoestabilidade são parte importante, principalmente nas áreas farmacêutica, cosmética, química e alimentícia (ICH, 1996).

Para condução de um estudo de fotoestabilidade é necessário submeter o fármaco a condições de estresse frente à luz, o que permite obter informações sobre sua fotorreatividade. Tais ensaios devem ser conduzidos como parte de um trabalho de pré-formulação, ou seja, deve-se levar em consideração que o fármaco precisa ser caracterizado antes do início da etapa de formulação. Daí serão obtidas as informações necessárias para se fornecer a fotoproteção adequada, quando necessário, sendo possível, então, garantir a estabilidade, a segurança e a eficácia do produto final (ALBINI; FASANI, 1998; TØNNESEN, 2004).

Um produto farmacêutico que contenha um fármaco fotossensível pode ter sua estabilidade comprometida quando exposto à luz. Nesse caso, um teste de fotoestabilidade de produto acabado deve ser executado para verificação da capacidade de fotoproteção conferida pela estratégia adotada pelo formulador.

É importante destacar que cada fármaco apresenta um comportamento peculiar frente à luz. Existem casos nos quais uma formulação que contém um fármaco fotossensível, mesmo quando exposto à luz, não apresenta perda considerável do conteúdo do princípio ativo. Em outros casos, como, por exemplo, nifedipino e alguns de seus derivados, a exposição à luz pode representar um grande problema para a sua estabilidade.

Em função disso, é muito importante, conforme já discutido, estabelecer, logo no início do trabalho de pré-formulação, se o fármaco em estudo apresenta ou não fotossensibilidade, pois o conhecimento da interação do fármaco com a luz é uma etapa importante no desenvolvimento de um medicamento.

O ensaio de fotoestabilidade encontra-se descrito no guia Q1B da International Conference on Harmonisation - ICH (1996). Nesse guia, estão indicadas as condições do teste, dentre as quais: fontes de luz, procedimentos, metodologia para monitoramento da exposição, calibração das fontes de luz.

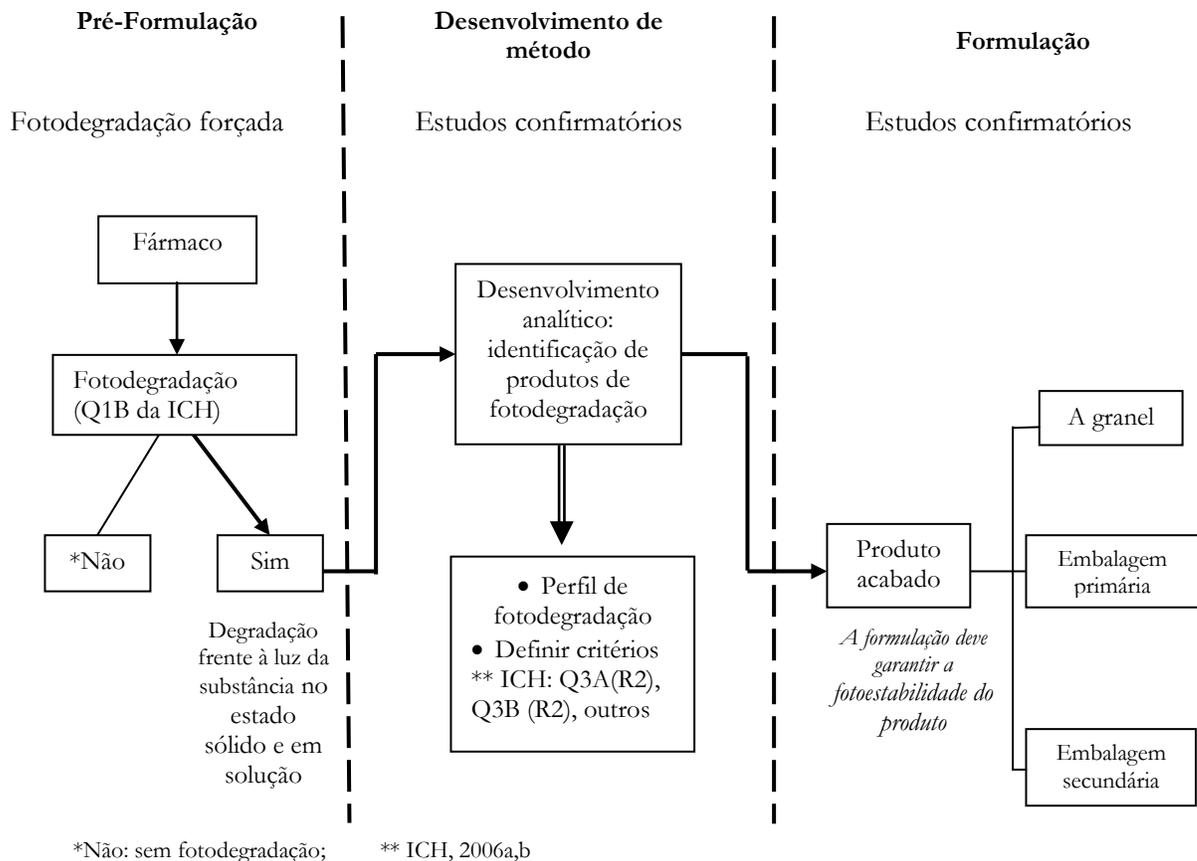
É importante destacar que os ensaios devem ser conduzidos primeiro para as substâncias ativas (estudos de fotodegradação forçada), empregando-se, quando aplicável, as condições sugeridas pela ICH ( $UV=200\text{watt.h/m}^2$  e  $VIS=1,2\text{milhões lux/hora}$ ). Caso o fármaco se apresente resistente à luz, não são necessários estudos adicionais (ICH, 1996; ALSANTE *et al.*, 2007).

Entretanto, nos casos em que ficar estabelecida a sensibilidade à luz, o ensaio deve ser executado novamente, como estudos confirmatórios sob condições padronizadas, estabelecendo, por exemplo, um perfil de fotodegradação, durante tempo adequado, que será determinado nos estudos de degradação forçada, de modo individual, para cada fármaco, sendo que algumas especificações descritas no guia Q1B da ICH deverão ser cumpridas, como utilização de fontes de luz calibradas e padronizadas.

Quando necessário, os produtos de fotodegradação obtidos durante estes estudos devem ser identificados e quantificados, utilizando metodologia adequada e validada mediante desenvolvimento analítico apropriado para cada substância.

Na sequência, dentro dos estudos confirmatórios, são realizados os ensaios de fotoestabilidade do produto acabado. Cabe mencionar que na etapa de formulação deve ser desenvolvida uma fórmula capaz de fotoprotger o fármaco, garantindo a fotoestabilidade do produto desde o granel até as embalagens, primária (imediata) e secundária (de mercado). Assim, os estudos confirmatórios realizados nesta etapa assegurariam a capacidade de a formulação resistir à luz.

Embora existam muitas discrepâncias com relação à condução de ensaios de fotoestabilidade em fármacos, é possível propor o ESQUEMA 2.1. para condução destes estudos. É importante ressaltar que o desenvolvimento de ensaios de fotoestabilidade sugeridos no guia Q1B da ICH é basicamente para moléculas de medicamentos novos ou em desenvolvimento. Existem moléculas de medicamentos que, mesmo conhecidas e disponíveis no mercado, ainda continuam em estudo.



**ESQUEMA 2.1.** Estudo de fotoestabilidade: etapas de pré-formulação, desenvolvimento de método e formulação.

São descritos, a seguir, dois termos que serão usados nesta parte da obra, para estabelecer uma sequência no desenvolvimento dos estudos de fotoestabilidade. São eles:

- (i) *Fotodegradação forçada*: são ensaios realizados para fotodegradar a amostra deliberadamente, uma vez que cada fármaco tem comportamento distinto frente à luz, o que requer avaliação caso a caso. Este tipo de degradação avalia a

fotossensibilidade total da substância, seguindo as especificações do guia Q1B da ICH (sempre que possível). Os resultados permitem tomar medidas de precaução e projetar uma boa formulação do produto, estabelecendo-se, também, embalagens resistentes à luz e/ou rotulagem especiais para reduzir a exposição à luz.

- (ii) *Estudos confirmatórios*: são os ensaios realizados para estabelecer as características de fotoestabilidade sob condições padronizadas, nas quais seja necessário estabelecer um perfil de fotodegradação, identificar fotoprodutos, quando se julgue importante, utilizar metodologias adequadas e/ou de ser possível elucidar as vias de degradação do fármaco. Estes ensaios devem ser realizados em produto acabado a granel ou embalagem primária e secundária.

## **2. O TESTE DE FOTOESTABILIDADE SEGUNDO O GUIA Q1B-ICH**

Diante da necessidade de padronização dos ensaios de fotoestabilidade, a International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) elaborou um guia de orientação para estes estudos a Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, denominado Ensaio de fotoestabilidade para fármacos e produtos novos (ICH, 1996).

Nesse documento, é descrito um protocolo básico e útil para testes de substâncias novas e produtos acabados. Na prática, é aplicável para fármacos e produtos que estão no mercado e que ainda não foram testados ou para os quais não se tem informação suficiente. No guia, são indicados, também, as fontes de luz que podem ser usadas nos testes de fotoestabilidade, assim como os métodos de calibração para aquelas fontes, utilizando sistema químico actinométrico (padrão de monoclórato de quinino diidratado) ou ainda luxímetros ou radiômetros.

De acordo com esse guia, os testes têm por finalidade demonstrar que a exposição do fármaco à luz não terá resultados dramáticos e significativos capazes de produzir alterações no produto ou na forma farmacêutica.

## 2.1 Fontes de luz

O guia Q1B (ICH, 1996) propõe duas opções de fontes de luz para condução de ensaios de fotoestabilidade (QUADRO 2.1). Porém, a avaliação da fotoestabilidade não é tão simples como a de estabilidade térmica, devido à complexidade da fotoexposição. Além do mais, os resultados dos ensaios entre diferentes fontes de radiação podem variar de acordo com as características do espectro de absorção do fármaco testado.

**QUADRO 2.1.** Fontes de luz segundo Q1B

Opção 1	Opção 2
<p>Combinação de luz similar ao padrão de emissão D65/ID65</p> <p style="text-align: center;"><b>Tipo de lâmpadas</b></p> <p>Luz do dia artificial: lâmpada do tipo fluorescente.</p> <p>D65 vapor metálico: lâmpada do tipo arco curto. Utilizam-se filtros para remover radiação maior de 320nm.</p> <p>D65 xenônio: lâmpada dos tipos arco curto e arco longo. Utilizam-se filtros para remover radiação maior de 320nm.</p> <p>ID65: lâmpadas do tipo fluorescente</p> <p><b>Nota:</b> D65: é o padrão internacional para luz do dia ao ar livre ou nos exteriores (ISO, 1993; ICH, 1996). ID65: é o padrão internacional para a luz do dia, indireta ou nos interiores (ISO, 1993; ICH, 1996).</p>	<p>Combinação de duas fontes de emissão de luz</p> <p>Luz branca-fria: lâmpada do tipo fluorescente similar à ISO 10977 (ISO,1993).</p> <p>Luz UV próximo: lâmpada do tipo fluorescente. Largura da banda: entre 320nm e 400nm. Comprimento de onda máximo: entre 350nm e 370nm. Duas importantes faixas de UV: entre 320-360nm e 360-400nm.</p> <p><b>Nota:</b> Filtro normalmente não é exigido para estas fontes; isso ocorre porque apenas uma pequena fração (cerca de 0,5%) da radiação na região UV está situada abaixo de 320nm (PIECHOCKI, 2007).</p>

É importante destacar que a recomendação contida no guia Q1B em relação à necessidade de irradiar a amostra a 1,2 milhões lux/hora e integrada à energia UV de 200 watt.hora/m<sup>2</sup>, não é aplicável em todas as situações, pois é necessário considerar cada fármaco em particular. Existem situações em que essa exposição pode representar uma degradação em larga escala, como no caso de nitrofurazona (SHAHJAHAN; ENEVER, 1996a,b). Por outro lado, a mesma radiação pode não ser suficiente, exigindo tempo de irradiação maior, como no caso do difosfato de quinino (RIVAS-GRANIZO; JORGE SANTOS, FERRAZ, 2009).

Assim, é importante considerar que a recomendação está baseada na necessidade de padronização internacional. No entanto, é fundamental avaliar o fármaco em estudo e decidir sobre sua aplicabilidade.

A utilização da opção 1 baseia-se no fato de que essas fontes de radiação tentam imitar a luz do dia ou indiretamente a luz do dia filtrada, expondo a amostra às radiações UVA, UVB e luz visível simultaneamente (semelhante à exposição à luz solar). Porém, na prática, é improvável que o produto seja exposto diretamente à luz do sol por algum período de tempo durante a manipulação e o transporte (TØNNESEN; BAERTSCHI, 2004).

Na opção 2, as fontes de radiação tentam imitar as condições de iluminação interna, que são compostas de luz do dia e radiação artificial proveniente de lâmpadas fluorescentes. Diferentemente da luz natural, a condição de iluminação interna não é padronizada e o espectro de emissão das lâmpadas fluorescentes varia em grande escala. Filtros de vidro, normalmente, não são exigidos para essas fontes de luz. Isso ocorre porque apenas uma pequena fração (cerca de 0,5%) da radiação na região UV situa-se abaixo de 320nm (PIECHOCKI; THOMA, 2007).

Esta opção permite o uso de duas lâmpadas separadamente: uma de emissão UVA e outra de luz visível. A contribuição de UV é inferior e pode ser obtida de lâmpadas segundo o padrão de emissão D65 ou ID65. As lâmpadas podem ser usadas em combinação ou sequencialmente.

No entanto, no uso sequencial, é recomendado expor as amostras, primeiro, à radiação ultravioleta e, logo depois, à visível. Uma vez que ensaios prévios

demonstrem que esta sequência de irradiação não é relevante, o ensaio será conduzido indistintamente na ordem que se julgue interessante (UV+VIS ou VIS+UV). A sequência de irradiação pode influenciar os resultados se o fármaco originar diferentes produtos de degradação, em comprimentos de onda distintos (TØNNESEN; BAERTSCHI, 2004).

De início, a incorporação de duas opções responde às diferentes práticas e condições ambientais em países dos cinco continentes, durante a manipulação dos fármacos. Mas a escolha da opção, como já indicado, pode afetar a degradação, dando origem a resultados drasticamente diferentes, sobretudo quando as fontes emitem comprimentos de onda muito variáveis, o que pode originar velocidades de degradação significativamente distantes umas das outras (DREW, 1998).

Do ponto de vista científico, as duas opções estabelecidas no guia do ICH são muito diferentes. No entanto, sob perspectiva regulatória, ambas são consideradas suficientemente iguais para avaliar a fotoestabilidade de fármacos. Assim, nenhuma orientação é dada para escolha da opção 1 ou 2. Recomenda-se, entretanto, que a mesma opção seja usada para estudos de fotodegradação forçada e estudos confirmatórios em produto acabado, para evitar discrepâncias na velocidade ou no perfil de degradação (PIECHOCKI, 1998; ALSANTE; MARTIN; BAERTSCHI, 2003).

## **2.2 Calibração de fonte de luz UV: sistema químico actinométrico**

O sistema químico actinométrico é um método para calibrar a intensidade da luz UV próxima, que se obtém das fontes de luz artificiais que simulam a luz do sol ou a luz do dia (ICH, 1996).

Esse sistema é citado no anexo do guia Q1B e é considerado um método universalmente estabelecido, que permite padronizar a intensidade de todas as fontes de emissão de luz UV utilizadas em testes de fotoestabilidade. Tais fontes podem ser lâmpadas fluorescentes UV, lâmpadas UV próximas, lâmpadas de vapor metálico e lâmpadas de xenônio (YOSHIOKA *et al.*, 1994; ICH, 1996).

As bases para utilização do método actinométrico foram estabelecidas por Yoshioka e colaboradores (1994), que conduziram um estudo colaborativo para

avaliar o potencial desse método na calibração da intensidade da radiação UV em testes de fotoestabilidade na área farmacêutica, utilizando como fármaco modelo o nifedipino. Concluiu-se que o sistema actinométrico pode ser usado para medir a intensidade da radiação UV até 330nm, embora não determine a intensidade total da radiação responsável pela fotodegradação do fármaco.

Este tipo de calibração é muito importante para avaliar a fonte de luz UV utilizada pela câmara de fotoestabilidade, que eventualmente poderá modificar seu comportamento ao longo do tempo. Assim, o equipamento deve ser calibrado periodicamente, a fim de que se estabeleça o tempo de ensaio necessário para conduzir um estudo de fotoestabilidade (ICH, 1996).

Cabe mencionar que a escolha de cloridrato de quinino como padrão para testes de fotoestabilidade tem aberto uma grande discussão na comunidade farmacêutica, pois existem alguns parâmetros que afetam a estabilidade da solução de quinino, como a temperatura, o pH e a quantidade de oxigênio presente na solução. Embora existam alternativas de métodos actinométricos para o mesmo intervalo de comprimento de onda, o guia indica o uso de monoclórídrico de quinino (GAUGLITZ; HUBIG, 2007; AZEVEDO FILHO *et al.*, 2011).

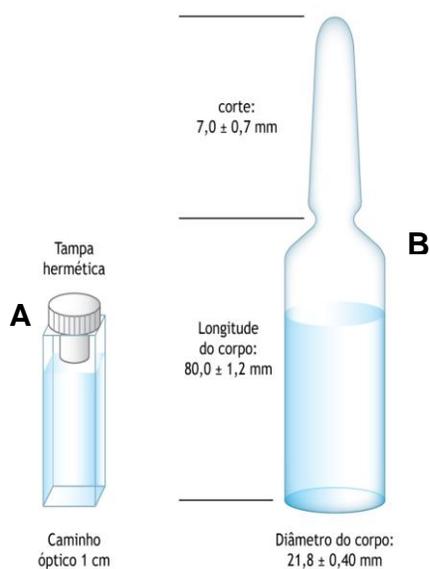
Este método actinométrico utiliza uma solução calibradora de monoclórídrico de quinino di-hidratado a 2%, preparada no momento do ensaio. Oferece também, tal qual ocorre com as fontes de luz, duas opções de recipiente, para conter a solução calibradora de quinino, como mostrado no QUADRO 2.2.

Os recipientes recomendados para calibração da fonte de luz também podem ser utilizados para conduzir os ensaios de fotoestabilidade, tanto em amostras em solução como no estado sólido. Porém, a absorção da irradiação será diferente, pois o quartzo absorve comprimentos de onda menores, quando comparado com o vidro.

**QUADRO 2.2.** Opções de recipiente para calibração de fontes de luz (ICH, 1996)

Opção 1	Opção 2
<p>Ampola de vidro de 20mL, incolor, selada hermeticamente, cujas dimensões são apresentadas na FIGURA 2.1(A).</p> <p><i>Volume:</i> Deve-se colocar 10mL de solução calibradora em cada frasco-ampola.</p> <p>Cut-off (transmissão da radiação): 320 nm</p>	<p>Cubeta de quartzo de 1,0cm de caminho ótico, com as quatro faces lisas e tampa apropriada, FIGURA 2.1(B).</p> <p><i>Volume:</i> Deve-se preencher a cubeta completamente, não permitindo a existência de ar, o que poderia conduzir a resultados inadequados.</p> <p>Cut-off (transmissão da radiação): 185 nm</p>

Após o preparo da solução de quinino, o material é exposto à fonte luminosa (que será calibrada) por um número apropriado de horas até chegar à especificação estabelecida pelo guia Q1B. São feitas, então, leituras em intervalos de tempo (recomenda-se a cada hora), determinando as absorbâncias da amostra (Aa) e do controle (Ac) no comprimento de onda de 400nm.



**FIGURA 2.1.** Opções de recipiente para calibração de fontes de luz: (A) cubeta de quartzo com tampa; (B) ampola de vidro (ICH,1996)

Empregando-se a equação 1 (QUADRO 2.3) é possível calcular a Variação da Absorbância ( $\Delta A$ ). O cálculo é feito subtraindo-se a absorbância do controle ( $A_c$ ) da absorbância da amostra irradiada ( $A_a$ ).

A variação da absorbância,  $\Delta A$  (delta A), é a energia associada ao espectro de distribuição que permite medir a intensidade da fonte de luz ultravioleta que está sendo utilizada.

**QUADRO 2.3.** Equação da variação da absorbância e parâmetros de aceitação, sistema químico actinométrico (ICH, 1996)

Tempo (horas)	Varição da absorbância $\Delta A = (A_a - A_c)$ (Equação 1)	Parâmetro de aceitação
t1	$\Delta A_1 = (\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. controle})$	Mínimo para ampolas de vidro: $\Delta A \geq 0,9$
t2	$\Delta A_2 = (\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. controle})$	
t3	$\Delta A_3 = (\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. controle})$	Mínimo para cubetas de quartzo: $\Delta A \geq 0,5$
tn	$\Delta A_n = (\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. controle})$	

tn: tempo n em horas,  $\Delta A_n$ : variação da absorbância em tempo n.

Os dados obtidos são tratados estatisticamente (absorbância vs tempo), construindo-se uma curva de calibração para cada recipiente, com a qual estima-se o tempo de exposição (horas) necessário para que se cumpram os parâmetros estabelecidos na guia Q1B.

Os resultados calculados em ensaio com cubeta de quartzo e com ampola de vidro serão sempre diferentes, pois o espectro de absorção da fonte luminosa será diferente em ambos os recipientes testados. Assim, um ensaio conduzido em ampola de vidro sempre precisará de mais tempo de exposição do que o conduzido em cubeta de quartzo, pois o limite de transmissão do quartzo é em 185nm e o do vidro é em 320nm (ALSANTE *et al*, 2007).

### 2.3 Qualificação de luz VIS: fluorescente-branca utilizando luxímetro

A calibração da fonte de luz visível para os estudos de fotoestabilidade pode ser feita utilizando-se um luxímetro. No entanto, é necessário primeiramente definir o que é intensidade de iluminação para se entender o uso do luxímetro na qualificação. Intensidade luminosa é a relação entre o fluxo de luz que é alcançado por área de superfície. Tem como unidade o lux ( $1\text{lux} = 1\text{lumen}/\text{m}^2$ ); assim, 1lux expressa 1lumen de intensidade por cada metro quadrado de área de superfície na qual se está

medindo a radiação luminosa. Cabe mencionar que essa intensidade de luz é função da distância da fonte de luz, ou seja, quanto maior a distância, menor será o valor (PIECHOCKI; THOMA, 2007).

Para se estabelecer uma referência, diz-se que, ao ar livre e em um dia ensolarado ao meio-dia, a intensidade luminosa é de 80.000 a 100.000lux (WIKIPEDIA, 2010).

O guia Q1B estabelece o tempo mínimo de exposição à irradiação de luz branca, definindo como 1,2milhões lux/h de luz visível fluorescente branca fria (opção 2), semelhante à luz do dia, medido através de luxímetro.

O luxímetro é o dispositivo utilizado para medir a intensidade de iluminação das fontes de luz em equipamentos, ambientes e locais de trabalho que precisam de fontes de luz controladas. Este aparelho pode discernir, também, quatro tipos de luz: fluorescente branca, de tungstênio, de sódio e de mercúrio, expressando os resultados em unidades de lux (MOORE, 2004a,b).

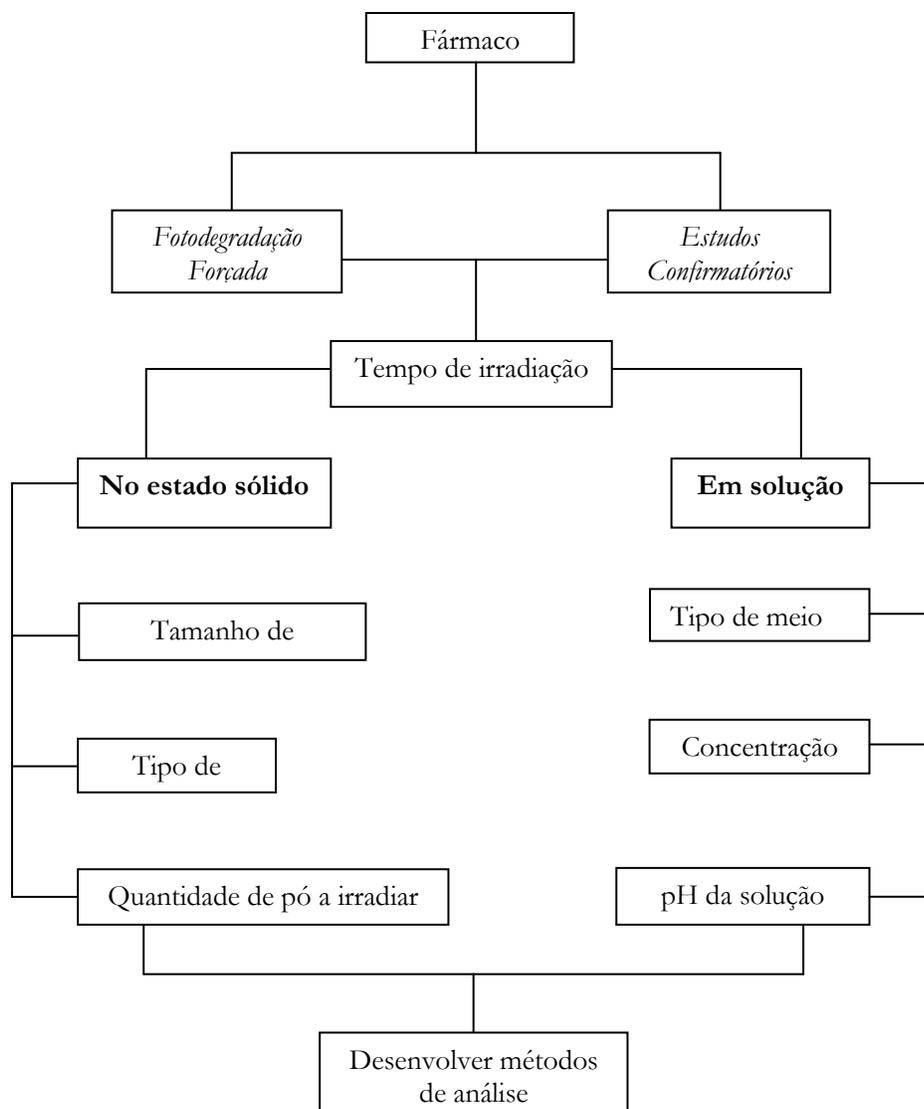
### **3. DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DE FOTOESTABILIDADE PARA FÁRMACO**

Um ensaio de fotoestabilidade, executado para determinado fármaco, como parte do estudo de pré-formulação, deve responder, objetivamente, à seguinte questão: O fármaco é sensível à luz? A resposta deverá ser, simplesmente, sim ou não.

O comportamento de um fármaco frente à luz é peculiar para cada molécula. Em vista disso, existe a necessidade de se estabelecer parâmetros e desenvolver estudos independentes para cada molécula. Se confirmada a resposta positiva à questão acima, devem ser realizados estudos confirmatórios, os quais são mais completos.

Caso o fármaco se apresente como uma molécula sensível à luz (resposta sim para a questão acima), isto deverá desencadear uma série de providências por parte dos responsáveis pelas etapas de formulação, produção e controle de qualidade do medicamento que contenha o fármaco.

Os principais aspectos envolvidos em um ensaio de fotoestabilidade em substância ativa na etapa de pré-formulação são mostrados no ESQUEMA 2.2 e descritos a seguir:



**ESQUEMA 2.2.** Fatores que influenciam os ensaios de fotoestabilidade de fármacos.

### 3.1 Tempo de exposição à luz

#### 3.1.1 Na fotodegradação forçada

Este é um parâmetro sem norma estabelecida, uma vez que o tempo de exposição é único para cada fármaco, dependendo da fotossensibilidade de cada molécula. No entanto, é de suma importância conhecer as características químicas da molécula, estimando o tempo suficiente de irradiação e, assim, garantindo o máximo de estresse pela luz para que possam ocorrer as reações de degradação, quando possíveis.

O guia Q1B sugere que a irradiação do fármaco seja medida em função do tempo de exposição em horas, determinada durante a calibração da fonte de luz. Entretanto, para alguns fármacos, esse tempo (dado pela calibração da fonte) é tão pouco significativo que não se observa fotodegradação; mas em outros casos, este tempo é drástico o suficiente que pouco ou nada do fármaco é recuperado, ou se inicia uma fotodegradação dos subprodutos.

#### 3.1.2 Nos estudos confirmatórios

Quando indícios de fotodegradação do fármaco são obtidos, é necessário conduzir os estudos confirmatórios para avaliar o fármaco mais profundamente. Perfis de degradação podem ser estabelecidos para confirmar o tempo limite de fotodegradação, ou seja, o tempo suficiente de irradiação que permita obter fotoprodutos quantificáveis (quando necessários) e o limite de perda do conteúdo do fármaco.

### 3.2 Irradiação do fármaco no estado sólido

A necessidade de proteger uma substância ativa da irradiação luminosa depende de sua resposta frente aos estudos de fotoestabilidade durante a pré-formulação. Porém, a definição da necessidade de conduzir um estudo de fotoestabilidade no estado sólido pode ser pautada pela forma farmacêutica que se deseja produzir.

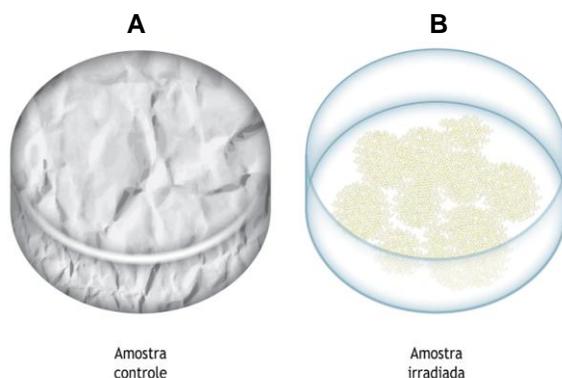
É importante considerar que, em geral, a degradação pela luz, quando o material analisado apresenta-se sob a forma sólida, é bastante diferente daquela observada quando em solução. Assim, a distribuição da irradiação é diferente, pois o fármaco contido na camada mais superficial é exposto à luz e irradiado com grande intensidade em relação ao contido nas camadas mais profundas, que estão mais protegidas THOMA; SPILGIES, 2007).

Independentemente do tempo de exposição, outra diferença é o comportamento frente à irradiação que, quando em estado sólido, costuma ser bem menos drástico e com maior dificuldade de ser estudado, pois os mecanismos envolvidos são mais complexos. O ensaio de fotoestabilidade no estado sólido é influenciado pelo tamanho de partícula do sólido. Porém, é importante sempre observar o seu comportamento. Sugere-se, nesse caso, separar o material sólido em diferentes faixas granulométricas, usando um tamisador contendo diferentes tamanhos de malha (por exemplo, números 60, 45, 30 e outras). As amostras de diferentes tamanhos de partículas são então colocadas sob irradiação e o comportamento frente à luz é observado.

A fotodegradação de fármaco no estado sólido também é influenciada pelo tipo de cristal ou polimorfo. Desta maneira, sugere-se que, quando se trabalhe com substâncias que apresentem diferentes formas polimórficas, estas sejam avaliadas de modo independente.

Para exposição à radiação luminosa de pós, podem ser utilizadas placas de vidro, nas quais são espalhadas as amostras. A quantidade de pó deve alcançar a altura aproximada de 3mm em relação ao fundo da placa. As placas devem ser posicionadas sob as fontes luminosas, considerando a distância de, no máximo, 20cm entre a fonte de luz e a amostra.

Deve-se preparar também uma amostra controle, representada por uma placa com pó protegida da luz com papel alumínio (FIGURA 2.2). Cabe mencionar que a descrição dada aqui é uma proposta de como conduzir o teste de fotoestabilidade, em virtude de ainda não haver normatização específica relacionada a esse tipo de estudo.



**FIGURA 2.2.** Preparação de uma amostra no estado sólido para exposição à radiação luminosa utilizando como recipiente placa de vidro: A - amostra controle protegida com papel alumínio; B - amostra irradiada em pó.

### 3.3 Irradiação do fármaco em solução

Nos ensaios de fotoestabilidade em solução, é possível considerar o mesmo critério estabelecido para amostras no estado sólido, embora a degradação pela luz, nesse caso, seja mais rápida e mais fácil de ser estudada. No entanto, é importante definir o meio a ser empregado, que depende da solubilidade do fármaco e de sua compatibilidade química com diferentes solventes, tanto orgânicos como inorgânicos.

Definir a concentração e o pH da solução são dois fatores importantes, pois permitem prever as interações moleculares que ocorreram em cada caso (THOMA; SPILGIES, 2007). Por isso, um estudo de fotoestabilidade deve começar pela pesquisa das características químicas e moleculares do fármaco, tendo-se, assim, conhecimento amplo do que pode ocorrer durante o desenvolvimento dos ensaios.

Ao submeter uma amostra em solução à exposição luminosa, podem ser utilizadas ampolas de vidro tipo 1 ou cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico (recipientes sugeridos no guia Q1B para a calibração com quinino, sistema químico actinométrico) e que podem ser utilizados em estudos de fotoestabilidade em solução (ICH,1996).

Uma vez definida a opção de recipiente, as soluções das amostras (10mL para ampola de vidro e 3,5mL para cubeta de quartzo) são hermeticamente fechadas. Ambas são colocadas em posição horizontal, de maneira que alcancem o máximo de irradiação, considerando-se distância de, no máximo, 20cm entre a fonte de luz e a amostra.

Uma amostra controle também é preparada, colocando-se uma ampola ou uma cubeta com solução protegida da luz com papel alumínio (FIGURA 2.3).



**FIGURA 2.3.** Amostra em solução utilizando como recipiente as ampolas de vidro 20mL (Opção 2): A - amostra controle protegida com papel alumínio; B - amostra irradiada em solução.

### 3.4 Fonte de luz (opção 1 ou 2)

É recomendado que a mesma opção de fonte de luz seja usada tanto para estudos de degradação forçada como para estudos confirmatórios; e tanto para fármacos como para produtos acabados, evitando, assim, discrepâncias nos resultados. É

possível que alguns produtos possam se decompor à velocidade igual em sistemas com diferentes tipos de fontes de irradiação. No entanto, outros produtos podem reagir de forma bastante distinta (TØNNESEN, 2004; PIECHOCKI; THOMA, 2007).

### 3.5 Desenvolvimento de metodologia analítica

A metodologia analítica para identificar e quantificar produtos oriundos da fotodegradação além de, avaliar as concentrações inicial e final do fármaco, é uma etapa muito importante e deve ser desenvolvida e validada cuidadosamente, antes da análise dos fotoprodutos, para, assim, garantir que os resultados obtidos sejam adequados e confiáveis (ICH, 2003; 1996).

Os métodos cromatográficos de quantificação com detector de arranjo de diodos, cromatografia em camada delgada ou métodos cromatográficos acoplados à massa (LC-MS) ou acoplados à ressonância magnética nuclear (LC-RMN) são os mais indicados para esses usos. Outros métodos, como calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN), são também indicados para a identificação dos produtos da fotodegradação (REYNOLDS *et al.*, 2002; TØNNESEN, 2004; THOMA; KÜBLER, 2007).

### 3.6 Outros fatores

Em geral, apenas uma amostra da substância testada é suficiente para avaliar as características de fotoestabilidade do fármaco. Entretanto, caso restem dúvidas acerca do comportamento do fármaco frente à exposição à luz, testes adicionais em duas outras amostras da substância (de preferência de diferentes fornecedores) podem ser necessários para confirmação dos resultados (ICH, 1996; PIECHOVKY; THOMA, 2007).

Vale ressaltar que as características físicas da amostra devem ser mantidas durante o andamento do ensaio. Dessa maneira, as amostras devem ser protegidas contra fenômenos, como resfriamento, sublimação, evaporação ou fusão, sendo suficiente colocá-las em recipientes hermeticamente fechados, garantindo, assim,

pouca ou quase nenhuma interferência dos fatores externos durante os ensaios (ICH, 1996).

#### **4. ENSAIO DE FOTOESTABILIDADE EM PRODUTO ACABADO**

O ensaio de fotoestabilidade de um produto acabado que contenha um fármaco fotossensível é considerado um estudo confirmatório, haja visto que os estudos prévios de degradação forçada já devem ter mostrado sua sensibilidade à luz. Assim, são necessárias medidas a fim de garantir a fotoproteção do produto durante a etapa de formulação.

A fotoestabilidade deve ser avaliada nas condições estabelecidas pelos ensaios dos estudos confirmatórios, nos quais é obtido o tempo necessário para que a fotodegradação seja significativa. Nessa fase, os resultados dos estudos confirmatórios indicam se a formulação apresentará boa estabilidade quando sofrer exposição à luz.

Um estudo de fotoestabilidade de produto acabado deve ser desenvolvido sequencialmente (ESQUEMA 2.3), iniciando-se pelo produto a granel, seguido do produto na embalagem primária (imediate) e, então, se necessário, na sua embalagem secundária.

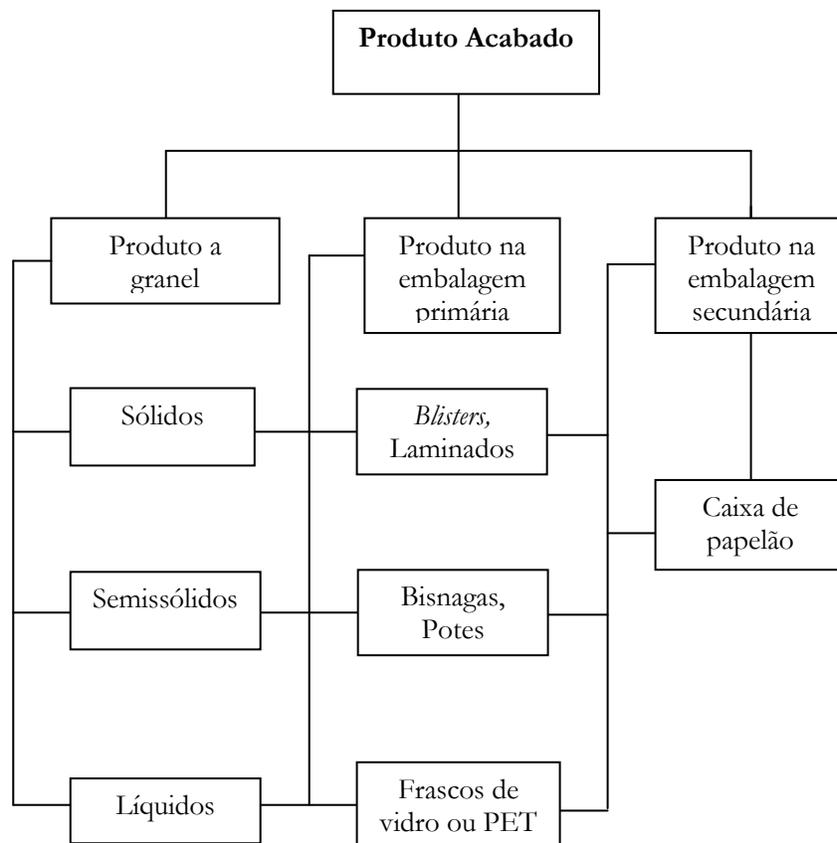
##### **4.1 Considerações para conduzir ensaios de fotoestabilidade de medicamentos**

Descreve-se, a seguir, algumas considerações que devem ser observadas durante os ensaios de fotoestabilidade em produto acabado:

- Alguns ajustes das condições do ensaio podem ser necessários, quando se trata de conduzir testes em recipientes de grandes volumes, como, por exemplo, embalagens de soluções intravenosas ou parenterais (KRAMER, 2007).
- As análises devem ser conduzidas sempre com a presença de um controle (amostra protegida com papel alumínio), que deve ser colocado junto com as amostras teste. Isso permite observar falsos resultados frente a mudanças

causadas por outras condições (ex. temperatura) que não sejam consequência da exposição à luz (ICH, 1996).

- Geralmente, só um lote de produto (pode ser o piloto) é analisado durante a fase de estudos de estabilidade do produto acabado. Quando as características de fotoestabilidade do produto são claramente confirmadas nesse lote, então não é necessário testar outros lotes. Caso contrário, é necessário conduzir os testes em outros dois lotes adicionais.



**ESQUEMA 2.3.** Sequência dos ensaios de fotoestabilidade em produto acabado.

#### 4.2 Ensaio em produto a granel

O produto a granel, que ainda está fora da embalagem, fica totalmente exposto à luz. Assim, é importante adotar estratégias ou condições em relação às amostras nas diferentes formas farmacêuticas, de modo que se tenham resultados reproduzíveis e controlados. As condições de como conduzir estes estudos no produto a granel é mostrado no QUADRO 2.4.

**QUADRO 2.4.** Condições do ensaio de fotoestabilidade em produto a granel, nas diferentes formas farmacêuticas

<b>Formas Farmacêuticas</b>		<b>Condições</b>		
<b>Sólidas</b>	Altura da amostra espalhada (2 a 3 mm)	Exposição em cada face	Número de amostras (até 20 unidades)	Recipiente hermeticamente fechado
Comprimidos	-	x	x	x
Cápsulas	-	x	x	x
Pós	x	-	-	x
Granulados	x	-	-	x
Péletes	x	-	-	x
<b>Semissólidas</b>	Altura da amostra espalhada (2 a 3 mm)	-	-	Recipiente hermeticamente fechado
Creμες	x	-	-	x
Pomadas	x	-	-	x
Géis	x	-	-	x
<b>Líquidas</b>	Recipiente para teste: cubeta de quartzo ou ampola de vidro	Volume de líquido 3,5 ou 10 mL (tipo de recipiente)	Presença ou ausência de oxigênio	Recipiente hermeticamente fechado
Xaropes	x	x	-	x
Gotas	x	x	-	x
Injetáveis	x	x	x	x
Parenterais	x	x	x	x

Durante os estudos confirmatórios envolvendo produto a granel, é importante adotar estratégias, tais como as descritas a seguir:

- Assegurar a manutenção das características físicas durante o andamento do teste, protegendo as amostras de possíveis influências, como temperatura e ar circulante no interior da câmara (evitando, por exemplo, oxidação do produto em contato com o ar). Para tanto, o material deve ser colocado em recipiente transparente e inerte (como o quartzo) e hermeticamente fechado, para garantir mínima interferência durante o ensaio. No caso de comprimidos, placas petri ou cubetas de quartzo de maior volume devem ser utilizadas.
- Com relação à área de exposição, as amostras devem ser posicionadas de maneira que se permita a máxima exposição à fonte de luz. Comprimidos e cápsulas, nesse caso, devem ser distribuídos em uma única camada com até 20 unidades. Quando necessário essas formas são irradiadas em ambas as faces, como é o caso de alguns tipos de comprimidos.
- Os cremes, as pomadas, as suspensões e os pós, representativos do lote, devem ser espalhados em camadas muito finas e homogêneas sobre o recipiente, para permitir a adequada exposição. Os recipientes sugeridos para os ensaios são as placas de vidro do tipo petri.
- As formas líquidas devem ser acondicionadas em recipientes inertes, tais como frascos de vidro tipo 1 ou cubetas de quartzo, podendo ser utilizados os mesmos recipientes apresentados como opções 1 e 2 na calibração de fontes de luz (ICH, 1996).

#### 4.3 Ensaio em produto na embalagem primária (embalagem imediata)

Esse ensaio só se faz necessário quando a embalagem é transparente e se prevê uma possível irradiação durante seu uso. O ensaio deve ser conduzido colocando-se diretamente o produto em blister (sólido), pote (semissólido) ou frasco (líquido), em posição apropriada, preferencialmente horizontal, e aproximadamente a 20cm da fonte de luz, para atingir maior área de irradiação. O tempo de irradiação, já deve ter

sido definido durante os estudos de pré-formulação em fármaco ativo (BHUTANI; MARIAPPAN; SINGH, 2003; THOMA; AMAN, 2007; USP, 2009a,b).

No caso de produtos em que a embalagem primária é completamente impenetrável à luz (por exemplo, frascos de alumínio, bisnagas de plástico opaco ou alumínio), o ensaio deve ser conduzido apenas no produto a granel (ICH, 1996).

#### 4.4 Ensaio em produto na embalagem secundária (embalagem de mercado)

A embalagem secundária é considerada como proteção anexa da embalagem primária. É importante destacar que a embalagem secundária é o primeiro contato que o paciente tem com o produto e, assim, esta deve ser utilizada para descrever as condições de segurança, com relação à proteção à luz, à forma de armazenagem e à manipulação do produto durante o consumo (THOMA; AMAN, 2007).

Da mesma maneira que a embalagem primária, o ensaio é realizado no produto tal qual disponível no mercado, ou seja, junto com a caixa de papelão, o envelope, o sachê ou algum outro tipo de proteção em que o medicamento é apresentado. A exposição deve ser feita de maneira a obter a maior área de irradiação durante tempo adequado.

#### 4.5 Avaliação dos resultados

É importante considerar que, após o encerramento do período de exposição, as amostras devem ser avaliadas quanto a dois aspectos fundamentais (ANDERSON; BYARD, 2004):

(i) Mudanças nas propriedades físicas: alterações, tais como aparência, limpidez, cor da solução (líquidos), desintegração, dissolução (comprimidos e cápsulas), homogeneidade, cor, etc.

(ii) Teor e produtos de degradação: devem ser identificados e quantificados, utilizando método adequadamente validado (REYNOLDS *et al.*, 2002).

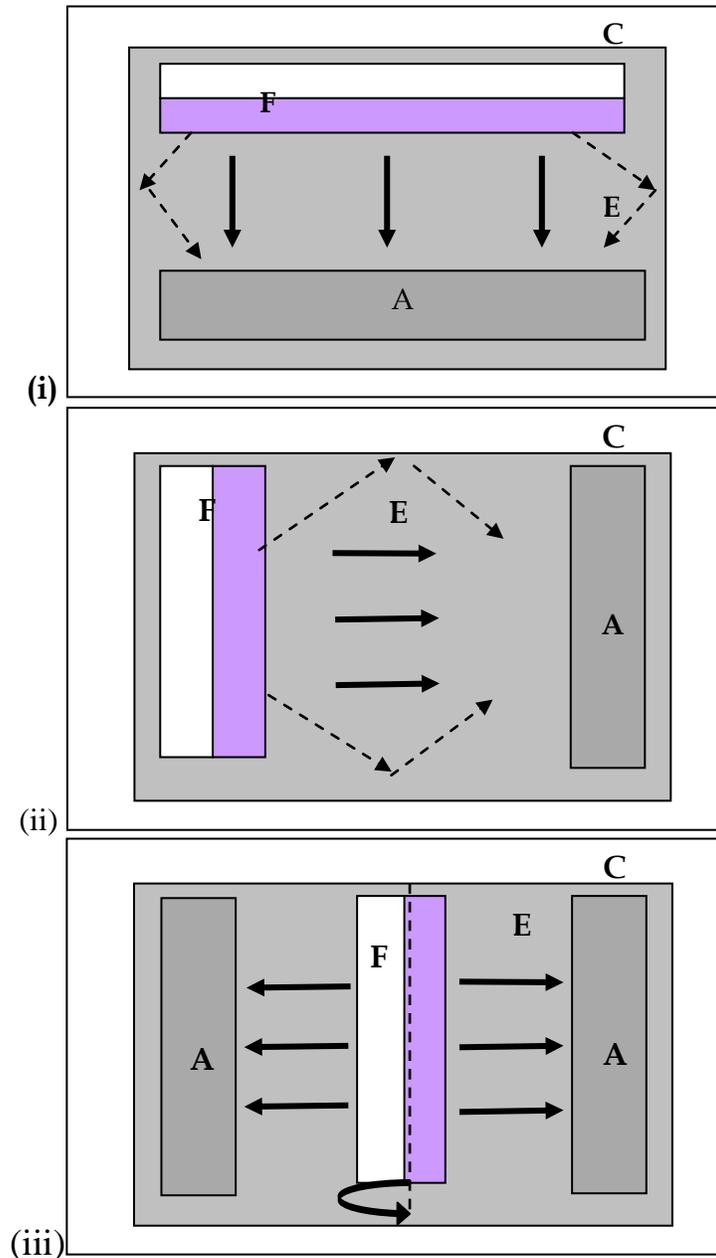
Os parâmetros ou as especificações de avaliação dos resultados são estabelecidos a partir de estudos de degradação forçada e estudos confirmatórios na etapa de pré-formulação:

- Perfil de fotodegradação no tempo apropriado para ser significativo.
- Produtos de fotodegradação que serão identificados e/ou quantificados. Devem ser considerados aqueles passíveis de serem quantificáveis e significativos na degradação.

As especificações aqui estabelecidas servem também para prosseguir com as análises do produto acabado dentro dos estudos confirmatórios.

É importante considerar alguns estudos de fototoxicidade *in vitro*, especialmente tratando-se de novas moléculas. Na verdade, trata-se de um grande desafio, pois a obtenção de produtos de fotodegradação em quantidades suficientes para realizar estudos de fototoxicidade é uma tarefa muito complicada e difícil de ser executada (ANDRESON; BYARD, 2004).

## 5. EQUIPAMENTOS PARA ENSAIOS DE FOTOESTABILIDADE



**FIGURA 2.4.** Princípios da exposição à luz em uma câmara de fotoestabilidade. (i) configuração horizontal, (ii) configuração vertical, (iii) configuração vertical rotatória. A - área de exposição das amostras, C - gabinete da câmara, E - superfície espelhada, F - fontes de luz (Adaptado de BOXHAMMER; WILLWOLDT, 1998).

Nas últimas décadas, os fabricantes disponibilizaram muitos equipamentos com alta qualidade e tecnologia para condução de estudos de fotoestabilidade, o que permite a escolha de diferentes configurações. Porém, o desenvolvimento dos ensaios de fotoestabilidade mais adequados depende das necessidades específicas de cada caso.

De todo modo, o princípio de exposição à luz deve ser o mesmo para qualquer equipamento, sendo que as diferenças mais significativas aparecem no tipo de configuração: vertical ou horizontal (FIGURA 2.4).

Assim, independentemente da configuração, o sistema de irradiação artificial (fontes de luz) deve garantir a distribuição uniforme sobre a área de exposição das amostras, quando as substâncias e os produtos sejam dispostos. Na configuração horizontal (FIGURA 2.4i), a bandeja na qual as amostras serão colocadas permanece estacionária e o sistema de irradiação é instalado na parte superior. Na configuração vertical, a bandeja e o sistema de irradiação estão instalados na posição vertical e são do tipo estacionários (FIGURA 2.4ii).

Cabe mencionar que existe outra configuração vertical na qual o sistema de irradiação é instalado na parte central e permanece em rotação. Nesse caso, as bandejas da área de exposição permanecem estacionárias, posicionadas ao lado da fonte de luz, como mostrado na FIGURA 2.4iii (BOXHAMMER; WILLWOLDT, 1998).

As dimensões das áreas de exposição podem variar de poucos centímetros quadrados até alguns metros quadrados, dependendo da finalidade ou do tipo de ensaio que será realizado. Para ensaios farmacêuticos, não é necessário um equipamento de grandes dimensões.

Com relação ao sistema de irradiação, as especificações são mencionadas na norma Q1B da ICH, que apresenta duas opções de fontes luminosas (ICH, 1996), conforme detalhado no QUADRO 2.1.

Entretanto, o equipamento poderá dispor, além das lâmpadas, de um ou mais dos seguintes componentes: elementos filtrantes de luz, espelhos ou dispositivos refletores e elementos de resfriamento e difusão, caso se julgue necessário para

ensaios em produtos farmacêuticos. Cabe mencionar que a fonte de energia elétrica deverá ser estável e adequada para manter o equipamento com emissão constante de irradiação.



Câmara de fotoestabilidade com a porta aberta

Câmara de fotoestabilidade com a porta fechada



Painel de controle

**FIGURA 2.5** Representação de uma câmara de fotoestabilidade. (A) área de exposição das amostras, (C) gabinete da câmara, (E) espelhado, (F) fontes de luz (adaptado de câmara de fotoestabilidade FARMA 424/CF. Nova Ética. São Paulo. Brasil).

A FIGURA 2.5. mostra a estrutura básica de uma câmara de fotoestabilidade na configuração horizontal, na qual a bandeja de amostras (A) permanece estacionária e na parte inferior. O sistema de irradiação está instalado na parte superior (F), de forma paralela, seguindo o princípio de exposição horizontal. O desenho do interior da câmara apresenta um sistema de espelhos (E) como parte do sistema de irradiação, o que permite um espectro de distribuição de luz uniforme e homogêneo, dentro das características de estrutura e desenho exigidos em uma câmara de fotoestabilidade.

## REFERÊNCIAS

ALBINI, A.; FASANI, E., eds. **Drugs, photochemistry and photostability**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. 326p. (Special publication, n.225) [International Meeting on Photostability of Drugs, 2., Pavia, 1997].

ALSANTE, K.M.; MARTIN, L.; BAERTSCHI, S.W. A stress testing benchmarking study. **Pharmaceutical Technology**, v.1, p.60-72, 2003.

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

ANDERSON, N.H.; BYARD, S.J. Photostability testing: design and interpretation of test on new drug substances and dosage forms. In: TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap.6, p.137-159.

AZEVEDO FILHO, C.A.; FILGUEIRAS GOMES, D.; MÉLO GUEDES, J.P.; MUNIZ FALCÃO BATISTA, R.; SAEGESSER SANTOS, B. Considerations on the quinine actinometry calibration method used in photostability testing of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.54, p.886–888, 2011.

BHUTANI, H.; MARIAPPAN, T.T.; SINGH, S. Behavior of uptake of moisture by drugs and excipients under accelerated conditions of temperature and humidity in the absence and the presence of light. Part II: Packaged and unpackaged antituberculosis drug products. **Pharmaceutical Technology**, v.6, p.44-52, 2003.

BOXHAMMER, J.; WILLWOLDT, C. Design and validation characteristics of environmental chambers for photostability testing. In: ALBINI, A.; FASANI, E., eds. **Drugs, photochemistry and photostability**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. cap16, p.272-287. (Special publication, n.225) [International Meeting on Photostability of Drugs, 2., Pavia, 1997].

DREW, H.D. Photostability of drug substances and drug products: a validate reference method for implementing the ICH photostability study guidelines, In: ALBINI, A.; FASANI, E., eds. **Drugs, photochemistry and photostability**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. cap.13, p.227-242. (Special publication, n.225) [International Meeting on Photostability of Drugs, 2., Pavia, 1997].

GAUGLITZ, G.; HUBIG, S.M. Chemical actinometry. In: PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. cap.8, p.139-161. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Stability Q1A - Q1F. **Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products**. 1996. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf). Acesso em: 15 set. 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Stability Q1A - Q1F. **Q1A(R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products**. 2003. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf). Acesso em: 07 ago. 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and methodology**. 1996. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf). Acesso em: 02 jun. 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Impurities Q3A – Q3D. **Q3A(R2). Impurities in new drug substances**. 2006. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3A\\_R2/Step4/Q3A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf). Acesso em: 18 mai. 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Impurities Q3A – Q3D. **Q3B(R2). Impurities in new drug products**. 2006. Disponível em:

[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3B\\_R2/Step4/Q3B\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf). Acesso em: 18 mai. 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10977**: photography-processed photographic color films and paper prints - methods for measuring image stability. Genebra: ISO, 1993.

KRAMER, I. Photodegradation and photoprotection in clinical practice. In: PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. cap.19, p.397-427. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

MOORE, D.E. Photophysics and photochemical: aspects of drug stability. In: TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004a. cap.2, p.10-40.

MOORE, D.E. Standardization of photodegradation studies and kinetic treatment of photochemical reactions. In: TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004b. cap.3, p.41-65.

PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. 427p. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

PIECHOCKI, J. Source. In: PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. cap.6, p.99-119. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

REYNOLDS, D.W.; FACCHINE, K.L., JUNE, F.; MULLANEY, J.F.; ALSANTE, M.K.; HATAJIK, T.D.; MOTTO, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, Febr., p.44-56, 2002. Disponível em: <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/data/articlestandard//pharmtech/072002/9668/article.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2008.

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

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

THOMA, K.; AMAN, W. Photostabilization by packaging. In: PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. cap.15, p.305-321. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

THOMA, K.; KÜBLER, N. Current methods for the analytical investigation of the photodegradation of active pharmaceutical ingredients and products. In: PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. cap.14, p.293-303. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

THOMA, K.; SPILGIES, H. Photostabilization of solid and semisolid dosage forms. In: PIECHOCKI, J.T.; THOMA, K., eds. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. New York: Informa Healthcare, 2007. cap.16, p.323-342. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.163).

TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. 435p.

TØNNESEN, H.H.; BAERTSCHI, S.W. The questions most frequently asked. In: TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap.7, p.161-165.

UNITED States Pharmacopeia: 32; The National Formulary: 27. Rockville: United States pharmacopeial Convention, 2009a. v.1, [Light transmission In: <660> Containers-Glass. p.246-250.

UNITED States Pharmacopeia: 32; The National Formulary: 27. Rockville: United States pharmacopeial Convention, 2009b. v.1, [Light transmission In: <661> Container-Plastics. p.243-246.

YOSHIOKA, S.; ISHIHARA, Y.; TERAZONO, T.; TSUNAKAWA, N.; MURAI, M.; YASUDA, T.; KITAMURA, T.; KUNIHIRO, Y.; SAKAI, K.; HIROSE, Y.; TONOOKA, K.; TAKAYAMA, K.; IMAI, F.; GODO, M.; MATSUO, M.; NAKAMURA, K.; ASO, Y.; KOJIMA, S.; TAKEDA, Y.; TERAO, T. Quinine actinometry as a method for calibrating

*Capítulo 1 - Fotodegradação e fotoestabilidade*

ultraviolet radiation intensity in light stability testing of pharmaceutical. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.20, n.13, p.2049-2062, 1994.

WIKIPEDIA. **Lux**. Disponível em: <http://es.wikipedia.org/wiki/Lux>. Acesso em: 9 ago. 2010.

## **CAPÍTULO 2.**

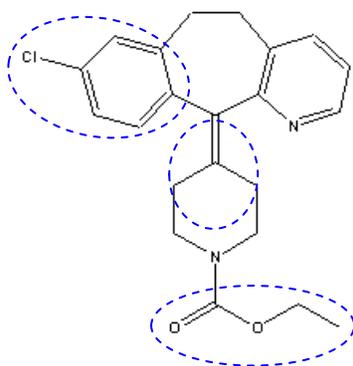
### **FOTOESTABILIDADE E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE FOTODEGRADAÇÃO DA LORATADINA EM SOLUÇÃO AQUOSA E NO ESTADO SÓLIDO**

## 1. INTRODUÇÃO

A luz é um dos agentes que pode causar alterações e modificações em determinados compostos, uma vez que a energia associada com essa radiação aumenta à medida que o comprimento de onda diminui. Quando as moléculas sensíveis são expostas à radiação eletromagnética, absorvem luz (fótons) em comprimentos de onda característicos, causando modificação da sua energia, o que pode gerar reações de decomposição. Desta maneira, é importante conhecer a fotoestabilidade dos fármacos e seus possíveis produtos de degradação (ALBINI & FASANI, 1998; TONNENSEN, 2004).

As degradações fotolíticas de fármacos são complexas e incluem reações, tais como reduções, isomerizações cis-trans, rearranjos estruturais, hidrólises, declorinações e oxidação, sendo, esta última, uma das principais vias de reações fotoquímicas (PIECHOVKY; THOMA, 2007). É interessante notar que existem grupos funcionais suscetíveis de serem degradados em presença de luz (ALBINI; FASANI, 1998) e, dependendo da conformação estrutural da molécula, esses sofrem fácil fotodegradação.

A molécula de LORA (FIGURA 1) apresenta em sua estrutura molecular grupos, tais como, carboxila, duplas ligações e alógenos no anel benzênico, que são capazes de reagir com a radiação luminosa e gerar degradação da molécula.



**FIGURA 1.** Estrutura química da LORA. Em destaque, as partes da estrutura passíveis de fotodegradação

Foi demonstrado que a LORA apresenta instabilidade frente à luz ultravioleta (254nm) quando irradiada utilizando solventes polares, como metanol, acetonitrila e água. Do mesmo modo as misturas proporcionais destes solventes polares com água incrementaram a degradação do fármaco em presença de luz (ABOUNASSIF; EL-OBEID; GADKARIEM, 2005).

A loratadina (LORA) é um fármaco antagonista H<sub>1</sub>, utilizado como anti-histamínico, indicado principalmente como terapia em sintomas associados com rinite alérgica, urticária e outras afecções dermatológicas e sistêmicas (MARTINDALE, 2009).

Por outro lado, estudos de degradação exigem o uso de técnicas analíticas que sejam confiáveis e de custos acessíveis. Dentre as técnicas indicadas na literatura para a identificação e a quantificação da fotodegradação de fármacos e de seus fotoprodutos, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a espectrometria de massas (Ms/Ms) e a ressonância magnética nuclear (RMN) (TONNENSEN, 2004; PIECHOVKY & THOMA, 2007; VLASE *et al.*, 2007).

No caso específico da LORA, a espectrometria de massas (Ms/Ms) foi utilizada na identificação de metabolitos (PICARD *et al.*, 2009), e em plasma humano (VLASE *et al.*, 2007), bem como para identificação de suas impurezas (REDDY *et al.*, 2003).

Considerado que não existirem estudos de identificação dos produtos de fotodegradação da LORA, a proposta do presente trabalho foi desenvolver um estudo de fotoestabilidade em solução aquosa e no estado sólido e identificar os seus produtos de fotodegradação, utilizando método CLAE.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes

Loratadina (LORA), origem Chemo Lugano Branch (Lugano, Suíça). Ácido clorídrico 37%, acetonitrila, acetato de amônia, ácido fórmico, ácido ortofosfórico MERCK, (Darmstadt, Alemanha).

### Equipamentos

Utilizou-se cromatógrafo líquido HITACHI ELITE LaChrome L-2000 (Tokyo, Japão); bomba HITACHI ELITE LaChrome L-2130 (Tokyo, Japão), detector HITACHI ELITE LaChrome Diode array L-2455 (Tokyo, Japão) e *software* EZChrom Elite para processamento dos dados.

Para os ensaios de fotoestabilidade utilizou-se câmara de fotoestabilidade FARMA 424 Nova Ética (São Paulo, Brasil), equipada com fontes de luz que correspondem à opção 2 do guia Q1B da International Conference on Harmonisation (ICH, 1996), as quais foram calibradas e qualificadas de acordo com o guia, obtendo-se um total de 60 horas de exposição.

As varreduras espectrofotométricas foram realizadas entre 190nm e 400nm de comprimentos de onda, em espectrofotômetro Vankel VK 710 VARIAN Inc. (California, EUA).

As análises por espectrometria de massas (LC-MS/MS) foram realizadas em equipamento BRUKER Daltonics Esquire 3000 Plus (Bremen, Alemanha), com fonte de ionização *electrospray* (ESI) foi controlado pelo *software* Bruker Daltonics Esquire 5.0. A aquisição de dados e o processamento foram realizados com o auxílio do *software* Data Analyses 3.2.

### Condições analíticas CLAE

Utilizou-se coluna tipo PurosPher® STAR RP-18e de 5micra, 250mm x 4,6mm MERCK (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel binária foi constituída de acetonitrila e acetato de amônia 0,01M, pH 3,0, inicialmente isocrático (60:40 v/v), sob vazão de

1,5mL min<sup>-1</sup>. Para a obtenção de boa resolução dos picos dos produtos da fotodegradação, foi utilizada gradiente nas proporções: 0min 30:70; 5min 40:60; 10min 50:50; 25min 60:40 e 30min 30:70, mais 2min de reequilíbrio de coluna, com vazão de 1,0mL min<sup>-1</sup>. O volume injetado foi de 20µL e a detecção foi por arranjo de diodos (DAD), no comprimento de onda adequado para identificação dos produtos de fotodegradação 235nm.

Foi utilizado, como diluente, uma mistura de água ultrapura e acetonitrila na proporção 50:50, homogeneizada e filtrada.

#### Fotoestabilidade da LORA

##### Em solução

A fotodegradação da LORA foi avaliada nas seguintes condições:

*Concentração:* foram preparadas soluções nas concentrações de 1.000µg.mL<sup>-1</sup>, 500µg.mL<sup>-1</sup>, 250µg.mL<sup>-1</sup>, 100µg.mL<sup>-1</sup> e 50µg.mL<sup>-1</sup> do fármaco no meio correspondente.

*Tipo de recipiente:* foram preenchidas cubetas de quartzo (1cm de caminho óptico) e frasco-ampola de vidro tipo 1 transparente, com 10mL de solução, ambos hermeticamente fechados, considerando-se um controle protegido da luz com papel de alumínio, durante o ensaio.

*Tempo de irradiação:* iniciando em 2h até 12h de irradiação, foram desenvolvidos os testes de duas em duas horas, visando obter picos de degradação quantificáveis. Após este tempo foram conduzidos testes durante 18h, 24h, 48h e 60h, sendo este último o tempo final estabelecido pela calibração das fontes de luz.

Foi utilizado ácido clorídrico 0,1M para os estudos de fotoestabilidade em função da sua boa solubilidade da LORA neste meio. Após o preparo das soluções, estas foram filtradas em membrana Millex 0,45µm e expostas à em câmara de fotoestabilidade, pelo tempo de 60 horas, à temperatura de 25°C±0,5.

#### No estado sólido

O fármaco foi passado por tamis 0,25mm de abertura (malha # 60) e o pó, assim, classificado, foi distribuído em placas de vidro de 10cm de diâmetro, em finas camadas (1 a 2mm), com a finalidade de aproveitar a maior incidência de radiação. Durante o ensaio foi utilizado um controle protegido da luz com papel alumínio. As placas foram expostas à luz em câmara de fotoestabilidade durante tempos de 60, 120, 180 e 240 horas, sob temperatura de  $25^{\circ}\text{C}\pm 0,5$ .

#### Análise por CLAE

Após irradiação, as amostras em solução foram injetadas no cromatógrafo. No entanto, para as amostras sólidas, foram preparadas soluções de  $500\mu\text{g mL}^{-1}$  em HCL 0,1M, que após filtração em membranas Millex 0,45um foram injetadas no cromatógrafo.

#### Análise por espectrometria de massas (LC/ MsMs)

As análises de foram conduzidas no modo de íon positivo  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , usando varredura completa na faixa de massa de 100 a 800m/z. Os parâmetros de massa foram os seguintes: temperatura capilar e temperatura de secagem  $300^{\circ}\text{C}$ ; voltagem do capilar 3,5kV; fluxo do gas de nebulização 12psi, fluxo do gás de secagem  $5\text{L min}^{-1}$  de  $\text{N}_2$ . Fluxo de injeção  $240\mu\text{L h}^{-1}$  e volume injetado 50uL.

Os dados de massas foram plotados com ajuda do programa ChemBioDraw Ultra 11.0, para identificação de suas respectivas estruturas moleculares.

#### Validação do método analítico CLAE

O método cromatográfico proposto para identificação e quantificação do fármaco e dos picos correspondentes aos produtos de fotodegradação foi validado segundo os parâmetros do guia Q2(R1) da ICH (2005), como linearidade, LQ, LD, seletividade, precisão e exatidão intradia e interdias.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Validação do método analítico

Na avaliação da linearidade, foi construída uma curva de calibração de 2 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  plotando as áreas de pico (medido em unidades nominais) em relação à correspondente concentração de LORA. A equação e o coeficiente de correlação obtidos foram os seguintes:  $y = 116288x + 832565$  e  $r^2 = 0,9980$ .

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram, respectivamente, em 3 e 10 vezes a relação sinal-ruído (ICH, 2005), obtendo-se LQ de 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A repetibilidade e a reprodutibilidade foram avaliadas através da análise da mesma solução padrão, três vezes no mesmo dia, e de preparações e análise de soluções padrão de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em três dias diferentes. O DPR (desvio padrão relativo) para a variação intradia observada foi de 1,65% e o DPR interdia foi de 1,92%.

Os tempos de retenção (TR) dos fotoprodutos variaram entre 2 e 27 min, demonstrando que estes estão adequadamente resolvidos, devido à adequada força de eluição da fase móvel. Os valores de resolução em alguns picos não foram superiores a dois, pois existe co-eluição de produtos de fotodegradação. Os valores de fator de cauda foram próximos da unidade, indicando simetria dos picos, minimizando erros na quantificação do fármaco.

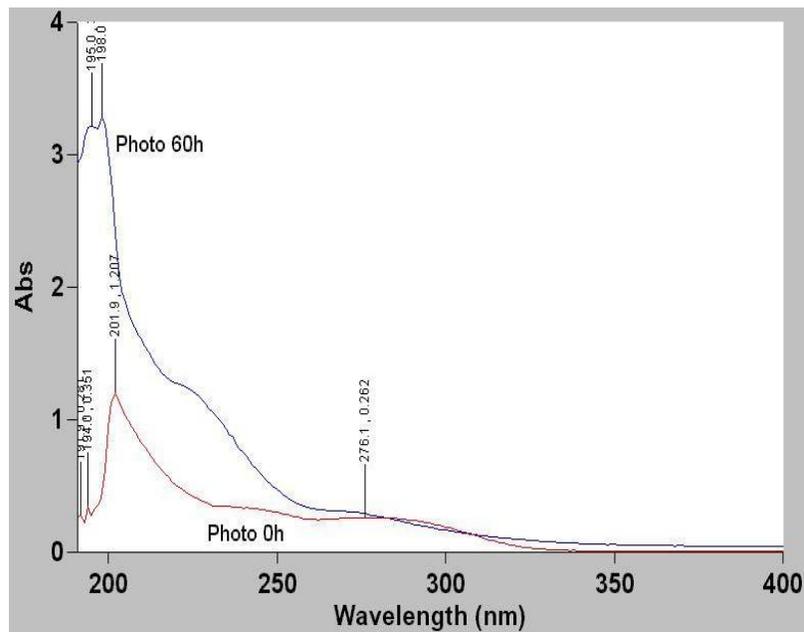
#### Estudo de fotoestabilidade

Quando em solução, a concentração do fármaco é fator importante, pois a luz será absorvida na superfície da amostra e, assim, se essa contém o fármaco em alta concentração, as moléculas posicionadas mais no interior do volume se tornarão protegidas da irradiação (TONNENSEN, 2001).

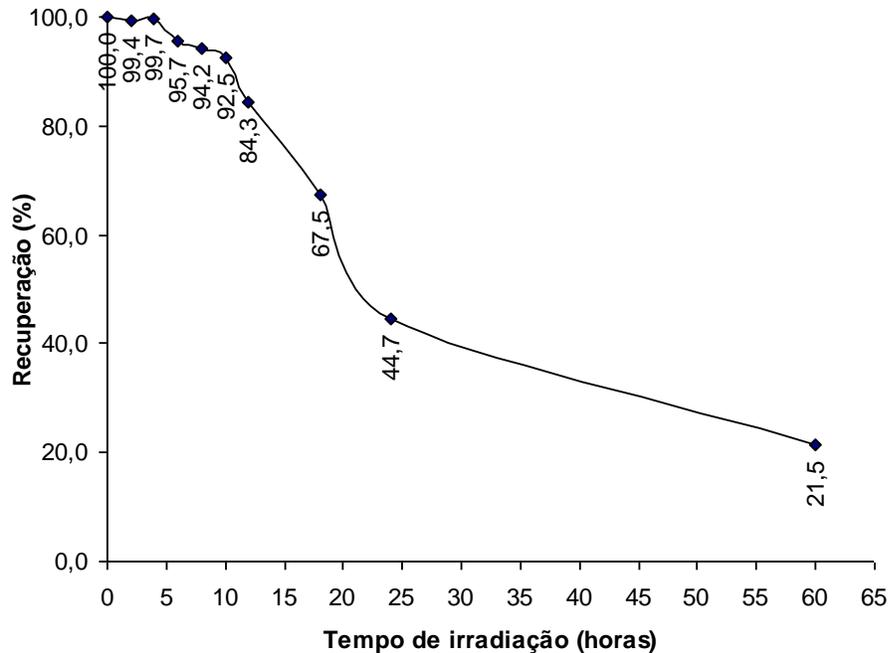
Desta maneira, em amostras pouco concentrada, pode não ser possível a detecção dos produtos oriundos da fotodegradação do fármaco, além de serem menos estáveis. Em vista dessa condição ser relevante, a LORA foi submetida a sucessivos ensaios sob diferentes concentrações, onde foram avaliados de forma

qualitativa o seu comportamento após irradiação, finalmente foram estabelecidos 100 e  $500\mu\text{g mL}^{-1}$  para a execução dos testes de fotoestabilidade.

Para avaliar qualitativamente a fotodegradação da LORA foram traçadas as varreduras dos espectros de absorção entre 190 e 400nm (FIGURA 2) e o que se verifica é que a amostra de fármaco, após 60 horas de irradiação, apresenta o perfil deslocado e os máximos de absorção incrementados, quando comparado com o controle, principalmente na faixa do ultravioleta (190 a 250nm).



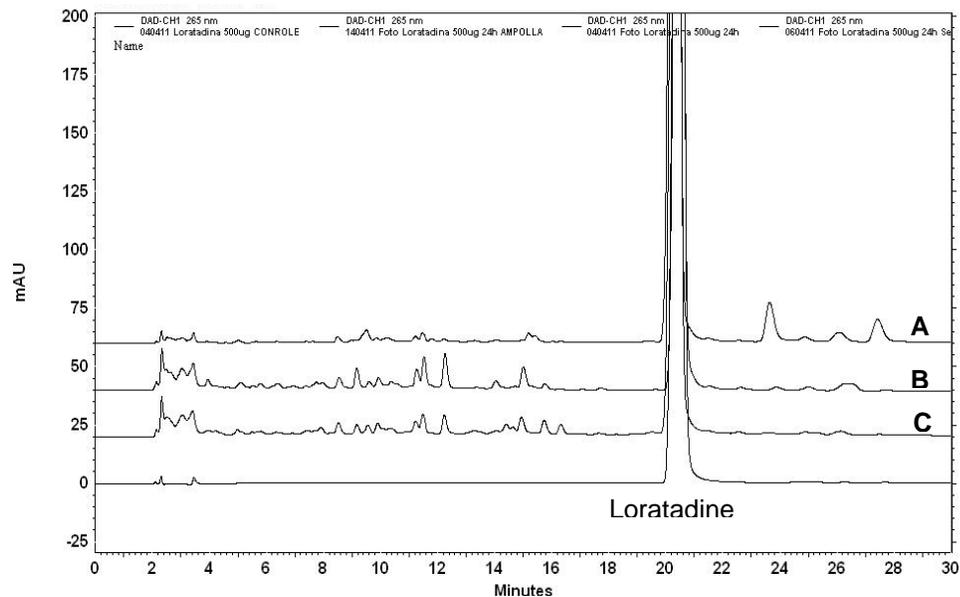
**FIGURA 2.** Espectros de absorção 190-400 nm, da LORA. Após fotodegradação. em HCL 0,1M. Photo 0h: Controle; Photo 60h: após 60 horas de irradiação. Concentração de fármaco  $500\mu\text{g mL}^{-1}$  em HCL 0,1M.



**FIGURA 3.** Porcentagem de LORA recuperada, a partir de 2 horas (99,4%) até 60 horas de irradiação (21,5%). Concentração de fármaco  $500\mu\text{g mL}^{-1}$  em HCL 0,1M.

Na FIGURA 3 é mostrada a concentração de LORA remanescente em função do tempo de irradiação, na qual se verifica, que foram recuperados 44,7% da concentração inicial do fármaco após irradiação de 24 horas. Para o tempo de irradiação 60 horas, a concentração remanescente foi de apenas 21,5%.

Neste caso o tempo de irradiação máximo estabelecido na calibração das fontes de luz foi de 60 horas. Para um estudo qualitativo, este tempo seria adequado, quando precisa-se saber se a LORA é fotossensível ou não à luz. No caso de estudos de identificação de produtos de degradação foram estabelecidas 12 horas de teste, podendo desta maneira, controlar a fotodegradação e não gerar subprodutos de fotoderadação.



**FIGURA 4.** Cromatogramas da fotodegradação de LORA utilizando cubeta de quartzo 1cm: A - sem ar atmosférico, B - com ar atmosférico e C - ampola de vidro, durante irradiação de 24 horas. Concentração do fármaco  $500\mu\text{g mL}^{-1}$  em HCL 0,1M.

Considerando a degradação de 24 horas de exposição, e quando comparados os cromatogramas do fármaco, utilizando cubetas de quartzo, com e sem ar atmosférico, foram observadas diferenças significativas nos picos de fotoprodutos (FIGURA 4).

A variação de picos cromatográficos, aqui observada, se deve a possível presença ou à ausência de ar atmosférico (presença oxigênio), em ambos os recipientes utilizados, uma vez que, nesses recipientes, existe diferença na quantidade de ar presente. Na ampola de vidro, o espaço vazio, preenchido com ar atmosférico é maior, que não ocorre com a cubeta de quartzo, na qual a solução preenche completamente o recipiente.

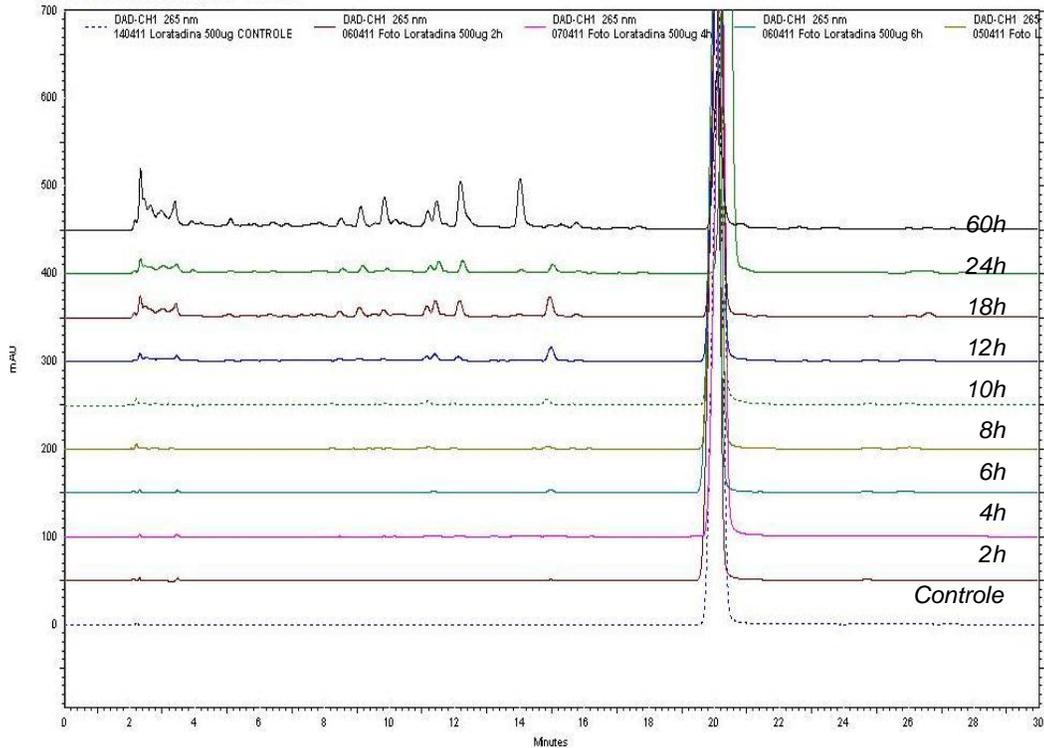
A variação dos picos da LORA, nos cromatogramas, frente à luz mostrou de maneira qualitativa que as reações são possivelmente dependentes de condições

aeróbicas. Quando comparados os TR de 8 a 16 min, há picos que se apresentam com maior área quando na presença de O<sub>2</sub> (porcentagem de LORA recuperada foi de 83,9%). Da mesma maneira, quando no TR 20 a 30 min, picos diferentes, com maior área. são formados na ausência de O<sub>2</sub>, não obstante a LORA sofrer menor degradação, conseguindo-se recuperar até 89,25% do fármaco.

É importante destacar, então. a influência do preenchimento dos recipientes (ampolas de vidro ou cubetas de quartzo) para o ensaio de fotoestabilidade de LORA. Conforme demonstram os resultados aqui obtidos, a utilização de um ou outro recipiente, preenchido completamente ou não com a solução do fármaco, produz efeitos distintos, levando a um perfil de degradação diferente para cada caso.

Quando a LORA é irradiada até 60 h e HCL 0,1M, utilizando-se como recipiente cubeta quartzo (FIGURA 5) é possível observar que, a partir de 2 horas de exposição, ainda não são observados picos de fotodegradação. Entretanto, os picos aparecem em maior destaque a partir das 12 horas de irradiação e esse tempo foi considerado adequado e suficiente, para continuar com os estudos de identificação de produtos de fotodegradação de LORA.

Quando alcançadas 24 e 60h, foi observado o incremento dos picos dos produtos de fotodegradação, assim como também a diminuição de alguns outros picos formados. Isto se deve, provavelmente, à formação de produtos secundários de fotodegradação, ou seja, o resultado da degradação da degradação.



**FIGURA 5.** Cromatogramas da fotodegradação de LORA utilizando cubeta de quartzo. Tempos de irradiação: 2 horas a 60 horas. Concentração de fármaco  $500\mu\text{g mL}^{-1}$  em HCL  $0,1\text{M}$ .

O tempo de irradiação é um parâmetro que deve ser avaliado adequadamente no momento de desenvolver um estudo de fotoestabilidade, uma vez que este resultado permitirá elucidar realmente a capacidade de resisitência de uma molécula à radiação luminosa. O comportamento de cada substância é único e requer condições específicas de irradiação, principalmente quando se trata de moléculas altamente fotossensíveis.

Esse tempo deverá ser suficiente para que seja possível demonstrar a sensibilidade da molécula à luz, mas ao mesmo tempo não deve levar a uma degradação muito drástica, formando subprodutos, e com reações difíceis de serem controladas.

**TABELA 1.** Produtos de fotodegradação da LORA em solução aquosa, obtidos por CLAE, identificados segundo o tempo de retenção (TR) e expressos em percentagem (% $\pm$ DPR). Concentração de fármaco 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em HCL 0,1M.

Produto	TR (min)	0 h	2h	12h
LORA	20,2	100,03 $\pm$ 0,32	99,24 $\pm$ 0,25	83,99 $\pm$ 1,71
*F1	3,5	0,12 $\pm$ 0,71	0,13 $\pm$ 0,71	NR
F2	5,0	ND	ND	0,09 $\pm$ 0,45
F3	8,4	ND	ND	0,19 $\pm$ 0,35
F4	9,0	ND	ND	0,25 $\pm$ 0,54
F5	9,7	ND	ND	0,10 $\pm$ 0,24
F6	11,0	ND	ND	0,28 $\pm$ 0,54
F7	11,4	ND	<LQ	0,33 $\pm$ 0,98
F8	12,1	ND	<LQ	0,36 $\pm$ 0,87
F9	13,9	ND	ND	0,04 $\pm$ 0,44
F10	14,8	ND	ND	0,80 $\pm$ 0,65
F11	15,0	ND	0,07 $\pm$ 0,65	0,16 $\pm$ 0,11
F12	23,4	ND	<LQ	0,11 $\pm$ 0,27
*F13	24,8	0,07 $\pm$ 0,79	0,12 $\pm$ 0,70	0,09 $\pm$ 0,82
F14	26,0	ND	0,10 $\pm$ 0,48	0,22 $\pm$ 0,54
F15	26,4	ND	0,06 $\pm$ 0,45	0,20 $\pm$ 0,71

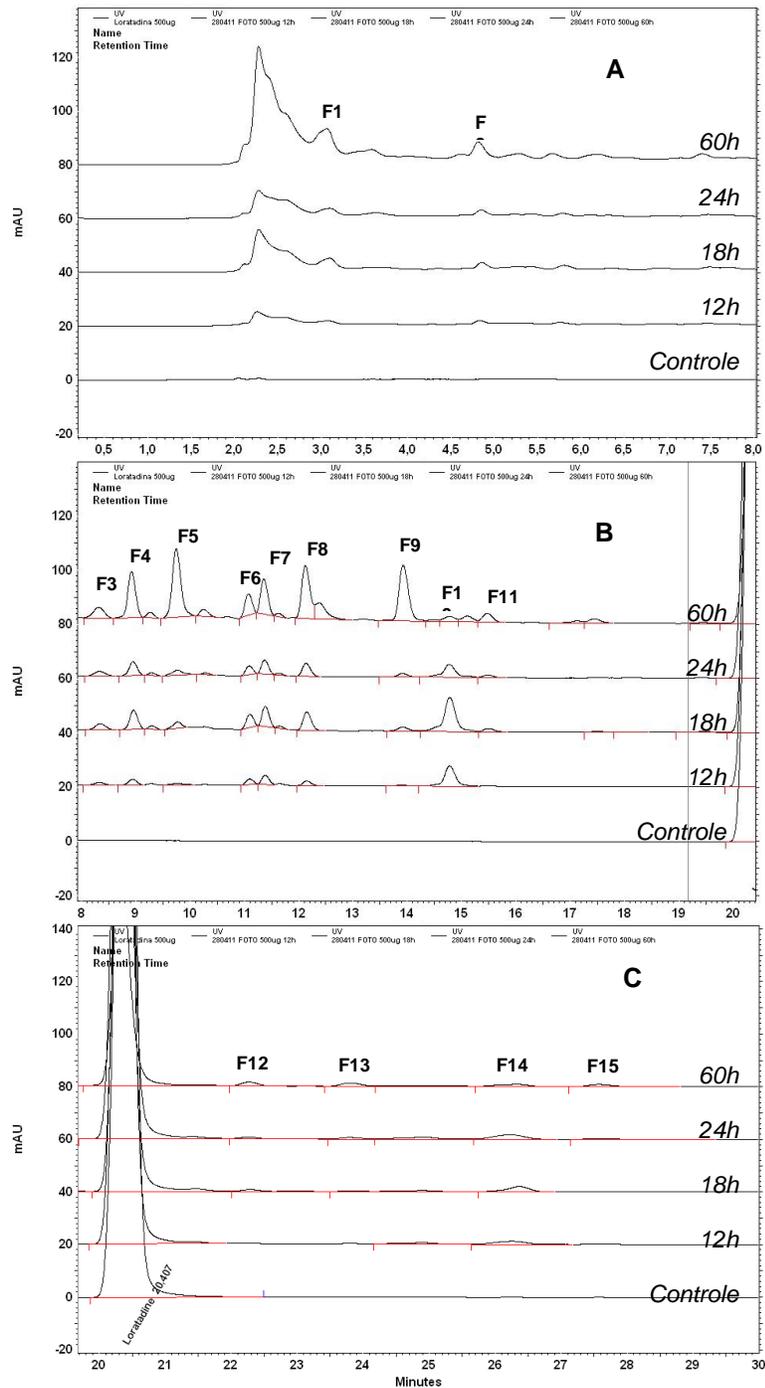
ND: não detectável; LQ: limite de quantificação; NR: não resolvido; DPR: desvio padrão relativo

A quantificação da LORA e de seus produtos da fotólise foi realizada em função da concentração inicial do fármaco ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e expressos em porcentagem. Como nenhum padrão estava disponível para esses produtos, e de acordo com as orientações do guia Q1A(R2) da ICH (2003), foram quantificados como LORA, admitindo que os fotoprodutos têm fatores de resposta semelhantes aos do fármaco original.

Os resultados da quantificação dos principais produtos da fotólise são apresentados na TABELA 1. Os picos de fotodegradação obtidos após 12 horas de irradiação foram enumerados com relação ao incremento sequencial dos tempos de retenção, denominados  $F_1$  a  $F_{15}$ , e foram considerados os produtos que apresentaram maior porcentagem e melhor seletividade com o método cromatográfico proposto. A quantificação dos produtos da fotodegradação foi menor que 1% do conteúdo inicial do fármaco.

Uma sobreposição dos cromatogramas em 12, 24, 48 e 60 horas de irradiação de LORA é mostrada na FIGURA 6. Os picos,  $F_1$  e  $F_{13}$ , já estavam presentes nas amostras controle não irradiadas, indicando que tratam-se de impurezas e não exatamente de produto de fotodegradação.  $F_1$  teve incremento durante os tempos de irradiação; no entanto, foi perdendo sua resolução e apareceu como um pico largo co-eluíndo-se junto com outros produtos de degradação (FIGURA 6A). Por outro lado  $F_{13}$  foi diminuindo gradativamente com os tempos de irradiação, não sendo quantificável após 12 horas (FIGURA 6C).

## Capítulo 2 – Fotoestabilidade da loratadina

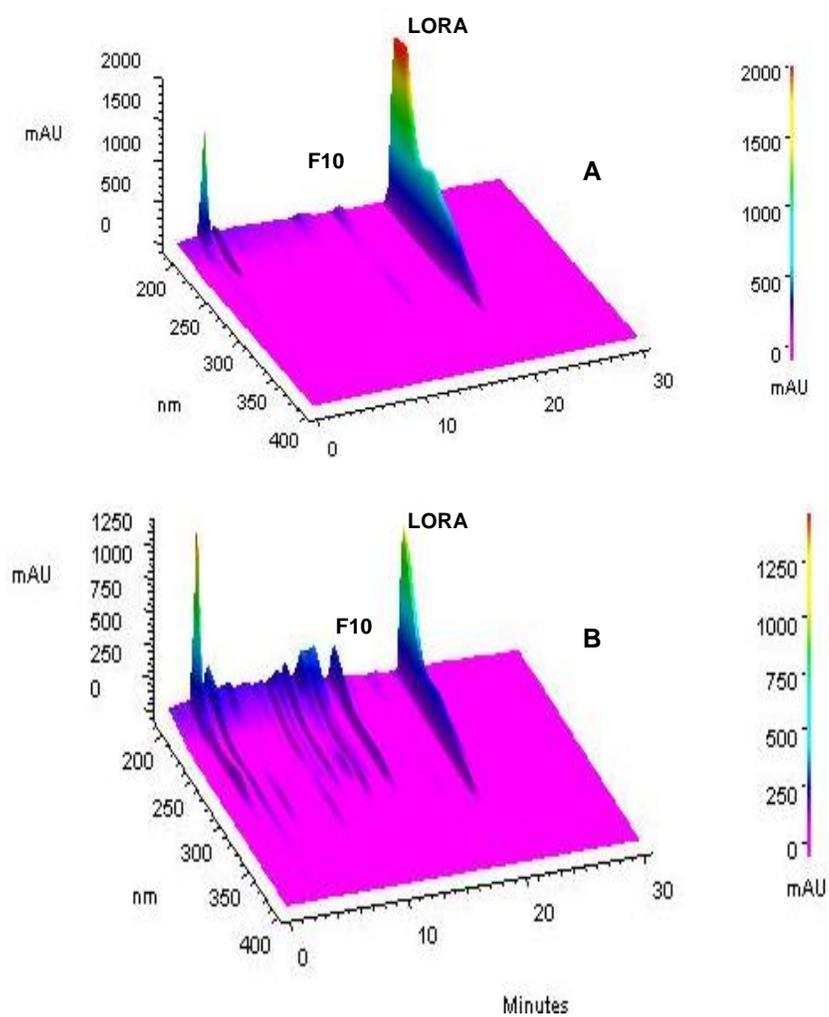


**FIGURA 6.** Cromatogramas indicando os picos de fotoprodutos de LORA, denominados F<sub>1</sub> e F<sub>15</sub>, após 12, 18, 24 e 60 horas de irradiação. A – tempo de eluição de 0-8 min, B – tempo de eluição 8-20 min e C – tempo de eluição de 20-30 min. Concentração de fármaco 500 µg mL<sup>-1</sup> em HCL 0,1M.

Para o pico de degradação de maior área,  $F_{10}$ , que, quantificado, corresponde a 0,8% da concentração inicial da LORA, após exposição à luz por 18 horas observou-se incremento de sua área (FIGURA 6B). Nos cromatogramas em 3D obtidos por CLAE-DAD, foi possível observar que este pico é mais intenso e a LORA ainda em destaque (FIGURA 7A), com pouca intensidade dos outros fotoprodutos.

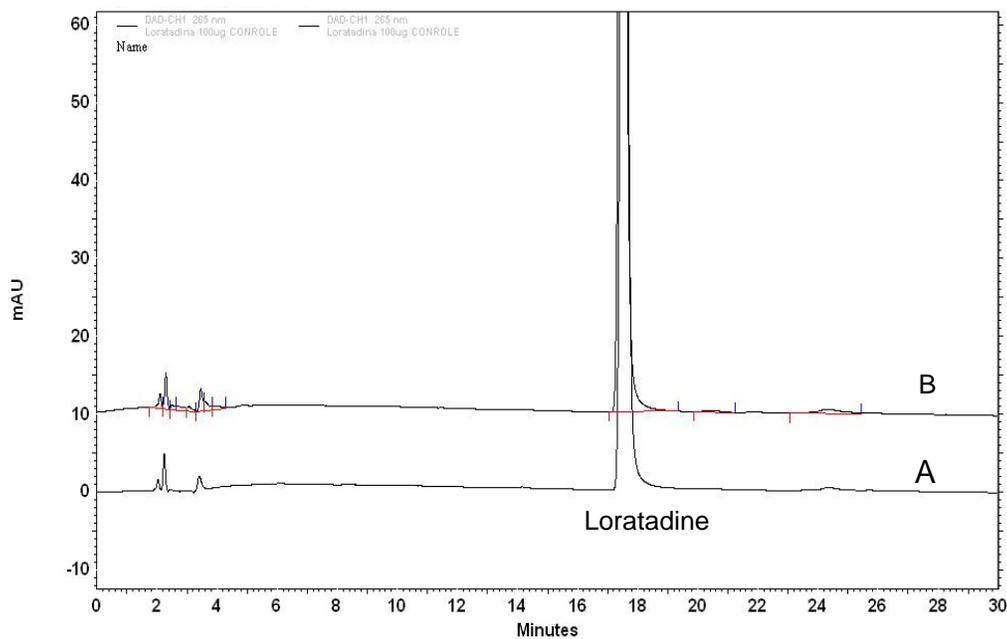
Entretando, a partir das 24 horas de fotodegradação, ocorreu um decréscimo do pico e, em 60 horas (FIGURA 6B), quando observado em 3D, há incremento da intensidade dos sinais; por outro lado,  $F_{10}$  se mostrou menos intenso; ou seja, parece haver fotólise desde composto, levando à formação de produtos secundários, enquanto o pico principal de LORA foi diminuindo, mostrando a perda da intensidade do pico tridimensional (FIGURA 7B).

. Outros picos ( $F_3$ ,  $F_4$ ,  $F_5$ ,  $F_6$ ,  $F_7$ ,  $F_8$ ,  $F_9$  e  $F_{11}$ ) mostraram aumento gradativo com o tempo de irradiação, com porcentagens que variam de 0,19% a 0,34% após 12 horas (TABELA 1). Os mesmos picos apresentam-se mais intensos após 60 horas de irradiação, com destaque para  $F_4$ ,  $F_5$  e  $F_9$ . O pico  $F_8$  apresentou co-eluição de um produto secundário, indicando formação de novos fotoprodutos (FIGURA 6B). Por outro lado, a recuperação da LORA após 12 horas foi de 83,99%, ou seja, uma perda de 16,01% do conteúdo inicial



**FIGURA 7.** Cromatogramas em 3D da fotodegradação de LORA, mostrando os picos de fotoprodutos. A - após 12 horas de irradiação e B- após 60 horas de irradiação. Concentração de fármaco  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  em HCL 0,1M.

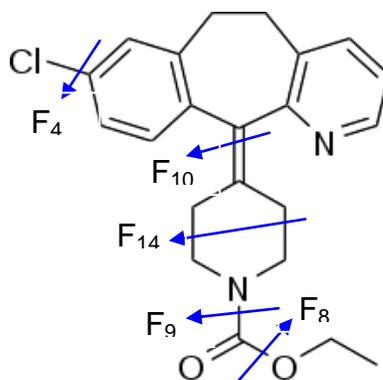
Na FIGURA 8, são mostrados os cromatogramas da LORA no estado sólido, após 240 horas de irradiação frente ao controle, onde é possível verificar a ausência de produtos de fotodegradação. Entretanto, houve grande mudança na coloração, passando de branco para marrom-alaranjado. A intensidade de cor obtida mostrou a presença de grupos cromóforos (-C=O) e auxócromos (-CL), que foram eletronicamente ativados com a energia fornecida pela radiação luminosa, produzindo a interação cromóforo-auxócromo o que levou à mudança na coloração (TONNENSEN, 2004; PIECHOVKY; THOMA, 2007).



**FIGURA 8** Fotodegradação da LORA no estado sólido: A – amostra controle e B – amostra de pó irradiada durante 240 horas, utilizando como recipiente placa de petri de vidro, 10 cm de diâmetro.

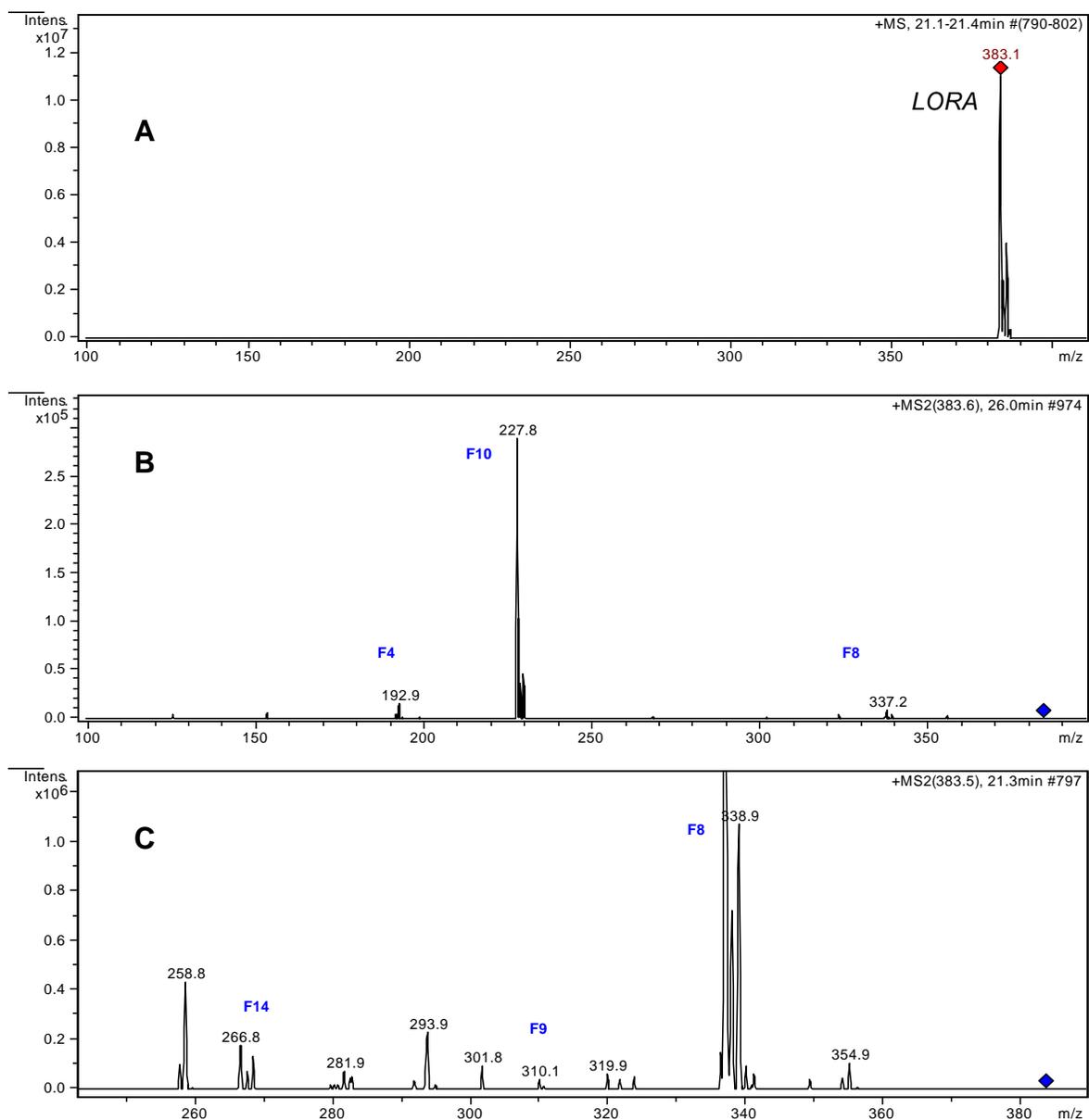
Para identificação das possíveis estruturas químicas dos produtos da fotólise de LORA foi utilizada amostra após 12 horas de irradiação em fonte de luz. Foram comparadas as massas correspondentes e os tempos de retenção dos fragmentos iônicos da colisão induzida, com os produtos da quebra oriundos da fotólise do fármaco. Esses novos cátions foram de  $m/z$  193, 227, 266, 310 e 337 (entre os mais abundantes), existindo outros  $m/z$  259, 282 e 294 de frações menos abundantes.

Na FIGURA 9 é mostrada a estrutura da LORA indicando as quebras das ligações moleculares após fotodegradação, as quais deram origem aos cinco fotoprodutos identificados, em maior abundância. Por outro lado, o espectro de massa do cátion de  $m/z$  383,1, relativa ao ESI(+)-MS da solução original de LORA, indica a forma protonada do fármaco, antes da fragmentação induzida (FIGURA 10A).



**FIGURA 9.** Estrutura da LORA indicando os lugares das quebras moleculares dos seus produtos de fotodegradação mais abundantes, obtidos após 12 horas de irradiação.

Capítulo 2 – Fotoestabilidade da loratadina



**FIGURA 10.** Espectros LC-MS/MS por infusão direta, da LORA e seus produtos de fotodegradação mais abundantes, obtidos após 12 horas de irradiação. A- LORA, B e C- F<sub>4</sub>, F<sub>10</sub>, F<sub>8</sub>, F<sub>14</sub>, F<sub>9</sub>. Concentração de fármaco 100 µg mL<sup>-1</sup> em HCL 0,1M.

Os fragmentos de maior abundância, foram identificados após 12 horas de irradiação, e correspondem aos seguintes fotoprodutos (FIGURA 9B e 9C):

- Íon-produto de  $m/z$  227,2 que corresponderia a  $F_{10}$ , que foi originado pela perda do anel piperidínico como consequência da quebra da dupla ligação que liga ao anel ciclo-heptano;

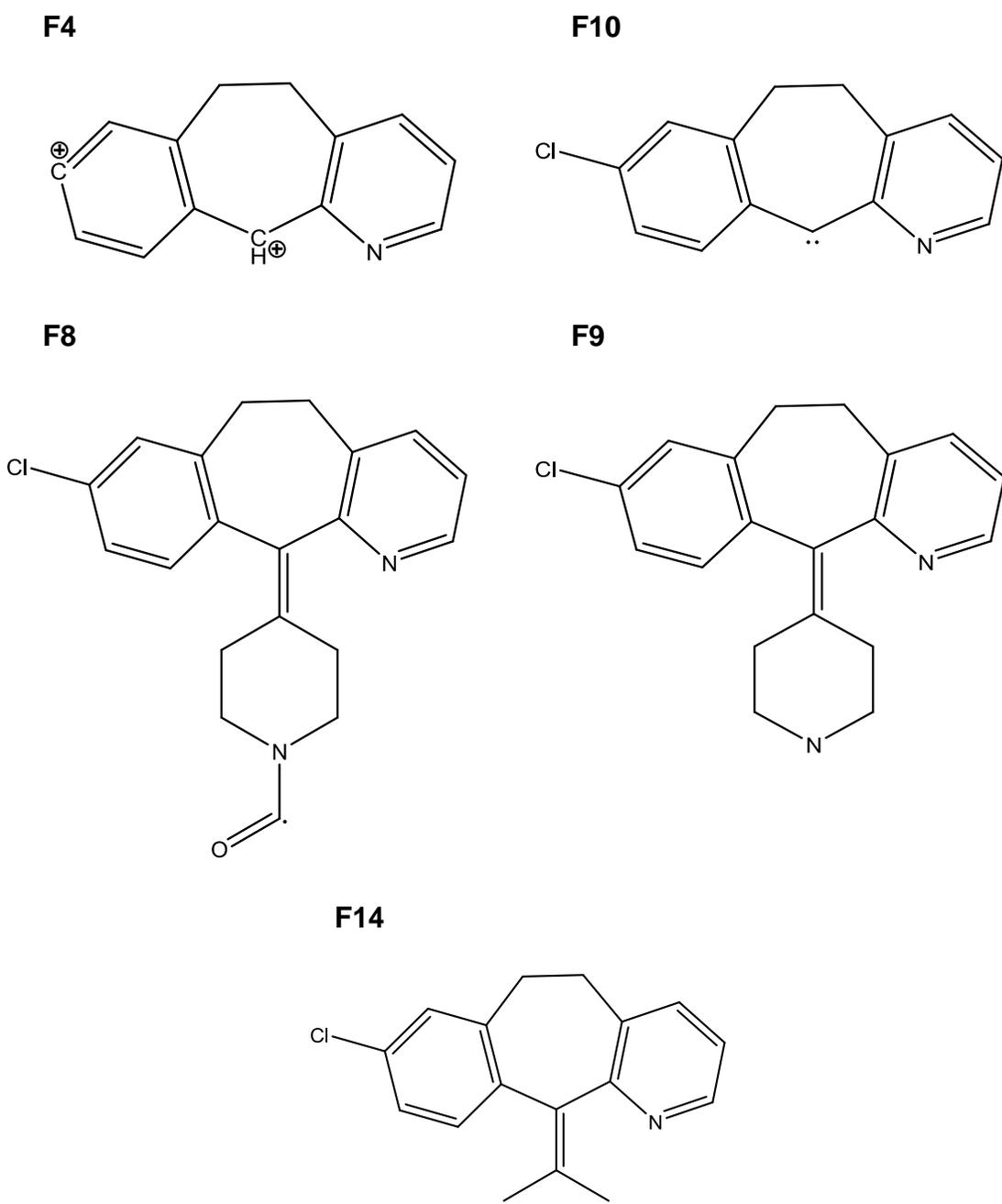
- Íon produto de  $m/z$  337,2 que corresponde a  $F_8$ , originado pela perda do radical etil ( $C_2H_5^*$ ) da cadeia lateral do anel piperidínico;

- Íon produto de  $m/z$  192,9 ( $F_4$ ), resultado da perda do anel piperidínico junto com sua cadeia lateral, além da saída do cloro, deixando os carbonos dos anéis aromáticos e ciclo-heptano protonados.

- O íon produto, que corresponde a  $m/z$  de 310,1 ( $F_9$ ) e corresponde à desloratadina, que é o metabólito ativo do fármaco LORA e sua formação leva a perda da cadeia lateral do hidroxietil ( $C_2H_5O^*$ ) deixando o anel piperidínico ativo.

- O íon com massa  $m/z$  de 266,8 corresponde ao fotoproduto  $F_{14}$ , e se forma pela quebra do anel piperidínico, restando uma pequena cadeia alifática unida à dupla ligação.

As estruturas químicas dos cinco fotoprodutos ( $F_4$ ,  $F_8$ ,  $F_9$ ,  $F_{10}$  e  $F_{14}$ ), mostradas na FIGURA 11, foram identificadas, confrontando as massas teóricas com suas respectivas massas experimentais e com o auxílio de *software* apropriado.



**FIGURA 11.** Principais produtos da fotodegradação da LORA e suas estruturas moleculares, identificados utilizando CL/MsMs: **F<sub>4</sub>** - C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N (m/z de 192,9); **F<sub>10</sub>** - C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>ClN (m/z de 227,8); **F<sub>8</sub>** - C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>O (m/z de 337,2); **F<sub>9</sub>** - C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub> (m/z de 310,1) e **F<sub>14</sub>** - C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClN (m/z de 266,8)

#### 4. CONCLUSÕES

O estudo de fotoestabilidade aqui conduzido indicou que a LORA é estável à luz quando no estado sólido, porém, com o surgimento de coloração intensa.

Por outro lado, quando em solução, observou-se fotodegradação do fármaco, com o surgimento de vários fotoprodutos denominados F<sub>1</sub> a F<sub>15</sub>, dentre os quais foi possível identificar os cinco compostos F<sub>4</sub> (C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N), F<sub>10</sub> (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>CIN), F<sub>8</sub> (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>CIN<sub>2</sub>O), F<sub>9</sub> (C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>CIN<sub>2</sub>) e F<sub>14</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>CIN).

#### REFERÊNCIAS

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

ABOUNASSIF; EL-OBEID; GADKARIEM. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 59, p. 29-37, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Stability Q1A - Q1F. **Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products**. 1996. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf). Acesso em: 3 Jun. 2008.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Stability Q1A - Q1F. **Q1A(R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products**. 2003. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf). Acesso em: 5 Ago. 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and methodology.** 2005. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf). Acesso em: 16 Nov. 2011

**MARTINDALE: The Complete Drug Reference.** 36 ed. Pharmaceutical Press, 2009, p.413.

PICARD, N., DRIDI, D. SAUVAGE, F-L.; BOUGHATTAS, N.A.; MARQUET, P. General unknown screening procedure for the characterization of human drug metabolites: Application to loratadine phase I metabolism. **Journal of Separation Science.** v. 32, p. 2209 – 2217, 2009.

PIECHOCKI, J.; THOMA, K. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology.** Nova Iorque: Informa healthcare, 2007. 427p.

REDDY, K.K.S.R; BABU, J.M.; KUMAR, Y.R.; REDDY, S. V..V.; KUMAR, M.K; S. ESWARAIHAH, S.; REDDY, K.R.S, M.; REDDY, S.;BHASKAR, B.V.; DUBEY, P.K.; VYAS, K. Impurity profile study of loratadine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v.32, p.29-39, 2003.

TONNENSEN, H.H. **Photostability of Drugs and Drug Formulations.** 2ed. Florida: CRC Press LLC, 2004. 435p.

VLASE, L., IMRE, S., MUNTEAN, D., LEUCUTA, S.E. Determination of loratadine and its active metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 44, p. 652-657, 2007.

## **CAPÍTULO 3.**

### **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO CLAE PARA LORATADINA E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS DE FOTOESTABILIDADE DE COMPRIMIDOS E XAROPES**

## 1. INTRODUÇÃO

A loratadina (LORA), quimicamente denominada (etil-4-(8-cloro-5,6-di-hidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-ilideno)-1-piperidinacarboxilato, de fórmula  $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$ , é um fármaco anti-histamínico tricíclico, de segunda geração, derivado da azatadina, de ação prolongada, muito potente e possui atividade seletiva e antagônica nos receptores H1 periféricos (BRITISH..., 2009; MERCK, 2006; USP 32, 2009).

É muito utilizada para diminuir os sintomas associados à rinite alérgica temporal e crônica (por exemplo, ocasionadas por poluição e febre do feno) e ao resfriado comum, tais como coceira nasal, coriza, espirros, ardor e coceira nos olhos. É também indicada para o alívio dos sinais na dermatite alérgica e em outras alergias da pele (MARTINDALE, 2009).

A LORA é um fármaco de muita importância para o sistema de saúde nacional, encontrando-se no mercado brasileiro como produto genérico e similar, somando até 15 fabricantes diferentes. Atualmente, encontra-se incluído na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), como antialérgico e usado em anafilaxia para crianças e adultos (BRASIL, 2010),

Assim, por seu amplo uso, é preciso garantir adequada estabilidade, permitindo que o medicamento mantenha suas características até sua chegada ao paciente e até o seu prazo de validade. Nesse sentido, uma das preocupações do formulador é a estabilidade do fármaco frente a diferentes fatores, tais como a radiação luminosa. Visto que, de maneira geral, todos os fármacos, por sua complexidade química, apresentam-se como potenciais candidatos a serem degradados pela luz (ALBINI; FASANI, 1998). Desta maneira, a LORA é um exemplo de fármaco em solução comprovadamente capaz de se degradar na presença de luz, como demonstrado no capítulo 2 deste trabalho.

Adicionalmente, para a execução de estudos de estabilidade, é preciso desenvolver métodos apropriados para avaliação do fármaco, depois de submetido aos distintos fatores que possam produzir alterações. A literatura reporta alguns

métodos utilizados para avaliação da presença e da quantificação de produtos de degradação em LORA, dentre eles RMN, LC-MsMs, embora o mais utilizado e acessível em análises de rotina seja a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Assim, com relação a esta técnica cromatográfica, foram publicados, vários métodos para quantificação deste fármaco em sistemas biológicos (AMINI; AHMADIANI, 2004; SALEM; IDREES; AL TAMIMI, 2004; VLASE *et al.*, 2007).

Outros métodos encontrados nas referências foram indicados, para quantificação de LORA de suas respectivas impurezas oriundas da síntese do próprio fármaco (ABOUNASSIF *et al.*, 2005; EL RAGEHY; BADAWEY; EL KHATEEB, 2002; REDDY *et al.*, 2003). Entretanto, todos esses métodos citados apresentaram-se com fases móveis ternárias ou quaternárias e bastante difíceis de serem reproduzidos.

Muito embora a fotoestabilidade da LORA em produtos que contenham o fármaco seja um aspecto de reconhecida importância, não foram encontrados estudos em medicamentos que indiquem a estabilidade frente à radiação luminosa. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver método CLAE que permita avaliar a fotoestabilidade de especialidades farmacêuticas, contendo LORA em comprimidos de 10mg e xaropes 1mg mL<sup>-1</sup>.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes

Loratadina, origem Chemo Lugano Branch (Lugano, Suíça). Acetonitrila grau HPLC obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido clorídrico 37%, fosfato de potássio monobásico, ácido cítrico, Nipagin<sup>®</sup> e Nipazol<sup>®</sup>, propilenoglicol, benzoato de sódio e sacarose foram de grau analítico.

### Produtos farmacêuticos do mercado

Produtos do mercado brasileiro contendo LORA (descritos no QUADRO 1) foram obtidos no comércio farmacêutico varejista da cidade de São Paulo e analisados tais como foram adquiridos.

**QUADRO 1.** Amostras do mercado contendo LORA 10mg comprimidos e 1mg mL<sup>-1</sup> xaropes, utilizadas no presente estudo

Amostras de comprimidos	Amostras de xaropes	Tipo
L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub> , L <sub>3</sub> , L <sub>4</sub> , L <sub>5</sub>	X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub>	Genérico
L <sub>6</sub>	X <sub>4</sub>	Referência
L <sub>7</sub> , L <sub>8</sub> , L <sub>9</sub> , L <sub>10</sub> , L <sub>11</sub> , L <sub>12</sub> , L <sub>13</sub>	X <sub>5</sub> , X <sub>6</sub> , X <sub>7</sub> , X <sub>8</sub> , X <sub>9</sub>	Similar

### Equipamentos

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) foi desenvolvido em cromatógrafo líquido HITACHI ELITE LaChrome L-2000 (Tokyo, Japão); bomba HITACHI ELITE LaChrome L-2130 (Tokyo, Japão), detector HITACHI ELITE LaChrome UV L-2400 (Tokyo, Japão), forno HITACHI ELITE LaChrome L-2300 (Tokyo, Japão), autoinjeter HITACHI ELITE LaChrome L-2200 (Tokyo, Japão) e *software* EZChrom Elite para processamento dos dados.

Para os ensaios de fotoestabilidade, utilizou-se uma câmara de fotoestabilidade Farma 424 Nova Ética (Sao Paulo, Brasil), previamente calibrada e qualificada. As fontes de luz da câmara correspondem à opção 2 do guia Q1B da International Conference on Harmonisation (ICH, 1996), sob temperatura controlada 25°C±0,5. Os recipientes utilizados para submeter as amostras ao estudo foram placas de vidro (10cm de diâmetro) para as amostras de comprimidos. Cubetas de quartzo (1cm de caminho óptico) e ampola de vidro tipo 1 (20mL) para as amostras dos xaropes.

#### Condições cromatográficas

Utilizou-se coluna tipo PurosPher® STAR RP-18e de 5µm, 250mm x 4,6mm Merck (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel binária foi constituída de fosfato de potássio monobásico 0,05M (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 3,0 e acetonitrila (40:60 v/v), sob vazão de 1,5mL min<sup>-1</sup>, à temperatura de 25°C. O volume injetado foi de 10µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda 265nm (melhor para detecção de produtos de fotodegradação). Foi utilizada, como diluente, uma mistura de água ultrapura e acetonitrila, na proporção 50:50, previamente filtrada e homogeneizada.

#### Preparação da solução padrão

A preparação da solução padrão foi feita pesando-se analiticamente 25mg de LORA ativo farmacêutico, que foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico âmbar de 25mL. Em seguida, adicionaram-se cerca de 20mL de HCL 0,1M ao balão, e foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos até completa solubilização do ativo, completando-se o volume. A concentração final foi de 1mg mL<sup>-1</sup>.

#### Preparação da solução amostra

A solução amostra foi preparada a partir da solução padrão, tomando-se 25mL e transferindo-os para um balão volumétrico de 50mL, completado com diluente, homogeneizado e filtrado em membrana Millex de 0,45µm de porosidade e 13mm de diâmetro, descartando-se os primeiros 2mL do filtrado e obtendo-se concentração final de 500µg mL<sup>-1</sup> de LORA.

#### Validação do método analítico CLAE

Para a quantificação do fármaco e a detecção de seus respectivos produtos de fotodegradação, um método por CLAE foi validado, de acordo com o guia ICH (2005). Os parâmetros analisados foram linearidade, seletividade, precisão e exatidão (intradia e interdias).

A seletividade foi avaliada observando-se a separação dos picos de produtos de fotodegradação e a possível interferência do pico do fármaco com os picos dos seguintes excipientes: parabenos (metilparabeno e propilparabeno), ácido cítrico, benzoato de sódio, sacarose e propilenoglicol (todos presentes nas formulações dos diferentes xaropes).

A precisão intradia (repetibilidade) foi avaliada através da injeção de seis replicatas de padrão {à baixa, à média e à altas concentrações (10, 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente). A precisão interdia (intermediária) foi analisada pela injeção das três concentrações durante três dias diferentes. Todos os resultados foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR). A precisão de adequabilidade do equipamento foi verificada com o fator de cauda, a simetria de pico e os pratos teóricos de coluna.

A exatidão foi determinada pela interpolação de cinco replicatas da área dos picos, de três concentrações 10, 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sob uma curva de calibração previamente construída (linearidade), avaliada tanto intradia como interdias em três diferentes dias.

A linearidade foi definida a partir da curva de calibração, que foi preparada para cada dia de análise e em dias consecutivos. As concentrações de LORA foram de 5 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , preparadas e injetadas em triplicata. A equação de regressão linear e o coeficiente de correlação foram calculados.

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido como a menor concentração possível de ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, a partir da curva de calibração. Por sua vez, o limite de detecção (LD) foi a menor concentração detectável da curva de calibração, definido como 0,5 vezes o LQ. As determinações foram baseadas na análise de 6 replicatas.

A estabilidade de curta duração foi determinada pela análise de amostras mantidas por 24 horas no rack do autoamostrador e sob temperatura ambiente de 25°C; a de longa duração foi determinada em amostras armazenadas por 100 dias em geladeira a 8°C.

#### Preparação das amostras dos comprimidos

As amostras foram preparadas colocando-se um comprimido, direto da embalagem, em um balão de 25mL, no qual foram adicionados 15mL de HCL 0,1M. O balão foi levado a ultrassom durante 15 minutos, sendo, em seguida, submetido à agitação mecânica durante 2 minutos. O volume do balão foi completado com fase móvel, originando uma solução de  $400\mu\text{g mL}^{-1}$ , posteriormente filtrada em membrana Millex 0,45 $\mu\text{m}$  e injetada no cromatógrafo. Realizou-se o ensaio em triplicata para três comprimidos de cada lote. A solução de HCL 0,1M foi usada como branco.

#### Preparação das amostras dos xaropes

O volume de 2mL de xarope (equivalente a 2mg de LORA) foi transferido quantitativamente para um balão de 5mL, no qual foram adicionados 2mL de HCL 0,1M e 2mL de fase móvel. Em seguida, o balão foi levado a ultrassom durante 10 minutos, completando-se o volume com fase móvel, o que resultou em uma solução de concentração  $400\mu\text{g mL}^{-1}$ . Foi realizado o ensaio em triplicata para três alíquotas diferentes de cada lote. Utilizou-se uma solução de propilenoglicol como branco.

#### Identificação de parabenos (Nipagin<sup>®</sup> e Nipazol<sup>®</sup>)

Foram pesados 10mg de metilparabeno (Nipagin<sup>®</sup>) e de propilparabeno (Nipazol<sup>®</sup>) em balão de 25mL, no qual foram adicionados 10mL de propilenoglicol. O balão foi levado a ultrassom durante 10 minutos e, em seguida, completou-se o volume com propilenoglicol. Uma alíquota de 4mL da solução anterior foi transferida para um balão de 25mL, no qual adicionaram-se 10mL de HCL 0,1M e 10mL de fase móvel. Após 10 minutos no ultrassom, o volume do balão foi completado com fase móvel, originando uma solução de  $64\mu\text{g mL}^{-1}$ . A solução foi filtrada em membrana Millex 0,45 $\mu\text{m}$  e injetada em cromatógrafo. Utilizou-se propilenoglicol como branco.

#### Identificação de outros excipientes: ácido cítrico, benzoato de sódio e sacarose

Foram preparadas soluções de ácido cítrico, benzoato de sódio e sacarose em concentração de  $50\mu\text{g mL}^{-1}$  em água purificada, que foram, em seguida, filtradas em

membrana Millex 0,45µm e injetadas no sistema cromatográfico. Estas amostras foram utilizadas para determinar a seletividade do método.

#### Fotodegradação forçada de comprimidos e xaropes

Os comprimidos de LORA foram submetidos à fotodegradação forçada em câmara de fotoestabilidade, utilizando-se três comprimidos de cada amostra, colocados sobre placas de vidro com tampa. O tempo de irradiação foi de 60 horas para cada face do comprimido, constituindo o total de 120 horas. Foi considerada uma amostra controle protegida com papel alumínio.

Os xaropes, por sua vez, foram submetidos à fotodegradação em cubetas de quartzo (colocando-se 3,5mL de xarope) e ampola de vidro tipo 1 (colocando-se 10mL de xarope), as amostras foram irradiadas em triplicata, por período de 60 horas. Foi colocada uma amostra controle protegida com papel alumínio. As amostras de xaropes e comprimidos, após irradiação, foram preparadas conforme citado anteriormente e analisadas utilizando-se método cromatográfico.

O tempo de irradiação de 60 horas foi definido mediante a calibração da câmara de fotoestabilidade, utilizando o método actinométrico do quinino e luxímetro, para UV e visível, respectivamente, segundo o guia Q1B da ICH (ICH, 1996).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Desenvolvimento de método e validação

A fase móvel utilizada foi composta de fosfato de potássio monobásico 0,05M (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 3,0 e acetonitrila 40:60 v/v (REDDY *et al.*, 2003). Com a finalidade de separar produtos de fotodegradação, foi otimizada a força do tampão, para melhor definição do pico. Utilizou-se vazão de 1,5mL min<sup>-1</sup>, para conseguir se obter adequado afastamento do pico do fármaco e melhorar a resolução dos produtos de fotodegradação. O comprimento de onda de 265nm foi o mais adequado para detectar os produtos de fotodegradação, de acordo com o observado na CLAE-DAD.

Após adequar satisfatoriamente o método para sua utilização nos estudos de fotoestabilidade, este foi validado segundo o guia da ICH (2005) e se mostrou adequado para a análise de produtos de fotodegradação de LORA em comprimidos e xaropes.

#### Seletividade

A seletividade do método foi analisada de acordo com a interferência que os excipientes apresentaram durante os testes. O TR do fármaco foi de aproximadamente 11 minutos; dos excipientes (dos xaropes), os tempos de retenção (TR) foram: 2,3 min para o metilparabeno, 3,9 min para o propilparabeno, 1,4 min para o ácido cítrico e 2,8 min para o benzoato de sódio. O fator de separação desses, com relação ao pico principal da LORA, foi maior do que dois. A seletividade dos três picos de produtos de fotodegradação, Foto1, Foto2 e Foto3, foi ótima, não sendo observada interferência no método. As resoluções de pico foram também adequadas. (FIGURA 1B).

#### Precisão

##### Precisão do equipamento - Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi observada durante o início das análises, permitindo avaliar a conformidade do sistema cromatográfico, com relação à *performance* do equipamento e da coluna cromatográfica. No QUADRO 2, são apresentados os resultados para seis determinações da solução padrão de referência LORA de  $400\mu\text{g mL}^{-1}$ , de uma mesma preparação. Pode-se observar que as especificações estão conforme foram estabelecidas na farmacopeia americana (USP 32, 2009).

**QUADRO 2.** Valores da performance do sistema utilizado durante o desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação de LORA e sus produtos de fotodegradação. De acordo com a USP 32

Parâmetros	Critérios aceitáveis	Resultados
Tempo de retenção	± 10,5 minutos	10,57 minutos
Fator de cauda	Entre 0,8 e 1,5	1,1
Pratos teóricos	Mínimo: 5.000 pratos/coluna	11.340
Desvio Padrão Relativo* (DPR)	DPR ≤ 2,0%	0,6%

\* DPR desvio padrão relativo

#### Precisão do método - Repetibilidade

Foi avaliada com injeções consecutivas, no mesmo dia, de três padrões, a baixa, média e alta concentração e o resultado (TABELA 1) mostrou desvio padrão relativo (DPR) com valores menores que 1%, indicando método adequado para a quantificação do fármaco em ambas as formas farmacêuticas.

#### Precisão intermediária

Foi avaliada com a injeção de seis replicatas de cada um dos três padrões à baixa, à média e à alta concentrações em três dias diferentes, calculando-se adequadamente o DPR. Os resultados menores do que 2% (TABELA 1) se mostraram adequados para o método desenvolvido.

**TABELA 1.** Resultados analíticos da precisão e exatidão intradia (repetibilidade) e interdia (intermediária) do método validado para LORA

Amostra ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Intradia (repetibilidade)			Interdia (intermediário)		
	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão
	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	DPR	%	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	DPR	%
10	10,60	3,20	106,58	10,24	1,31	100,09
100	99,70	0,85	99,70	99,08	0,85	99,08
500	499,63	0,67	99,13	498,52	0,73	99,070

#### Exatidão

Os resultados da concentração mínima  $10\mu\text{g mL}^{-1}$ , da concentração média  $100\mu\text{g mL}^{-1}$ , e para a concentração máxima  $500\mu\text{g mL}^{-1}$  estão descritos na TABELA 1, os quais foram adequados com valores iguais próximos a 100% de recuperação da amostra, demonstrando que o método desenvolvido é exato.

#### Linearidade

A linearidade do método analítico foi determinada no intervalo de cinco concentrações de 10 a  $500\mu\text{g mL}^{-1}$ . O coeficiente de correlação obtido foi de  $r^2=0,9998$ . Os valores de b (inclinação) e a (intercepto) estão indicados na TABELA 2. A partir da linearidade, foram obtidos o limite de detecção (LD), estabelecidos como  $2,5\mu\text{g mL}^{-1}$ , e o limite de quantificação (LQ), que foi de  $5\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**TABELA 2.** Resultados da linearidade obtidos a partir das curvas de calibração da LORA nas condições do método. Valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Parâmetros	LORA
Intervalo de linearidade ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	10,0 – 500,0
Equação da reta ( $y=ax+b$ )	$y=40772x-12142$
Inclinação: b (DPR)	12 928 (0,859)
Intercepto: a (DPR)	40 857 (0,029)
Coefficiente de correlação linear ( $r^2$ )	0,9998
LD (DPR)	2,5 (4,34)
LQ (DPR)	5,0 (1,08)

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; DPR: desvio padrão relativo

### Estabilidade

A estabilidade do fármaco nas formulações farmacêuticas depende das condições de armazenamento e das propriedades químicas inerentes à molécula, assim como a presença de conservantes e impurezas. No caso do estudo de estabilidade de curta duração (24 a 48 horas), este deve refletir situações que poderiam acontecer durante a manipulação e a análise da amostra.

A estabilidade de curta duração foi estabelecida pelo armazenamento da solução amostra no rack no autoamostrador do cromatógrafo, sob temperatura ambiente (25°C), por 24 horas. As soluções foram reanalisadas após esse tempo e comparadas com uma amostra recém-preparada. A estabilidade de 100 dias foi determinada pelo armazenamento da solução em geladeira, à temperatura de  $\pm 8^\circ\text{C}$ .

Os resultados da estabilidade são apresentados na TABELA 3. As soluções analisadas mostraram perda de  $\pm 1\%$  da amostra inicial, quando armazenadas à temperatura ambiente e no rack do autoamostrador em até 24h, e de  $\pm 2\%$  na estabilidade de longa duração.

**TABELA 3** Resultados de estabilidade de curta duração para LORA (autoamostrador, temperatura ambiente, longa duração)

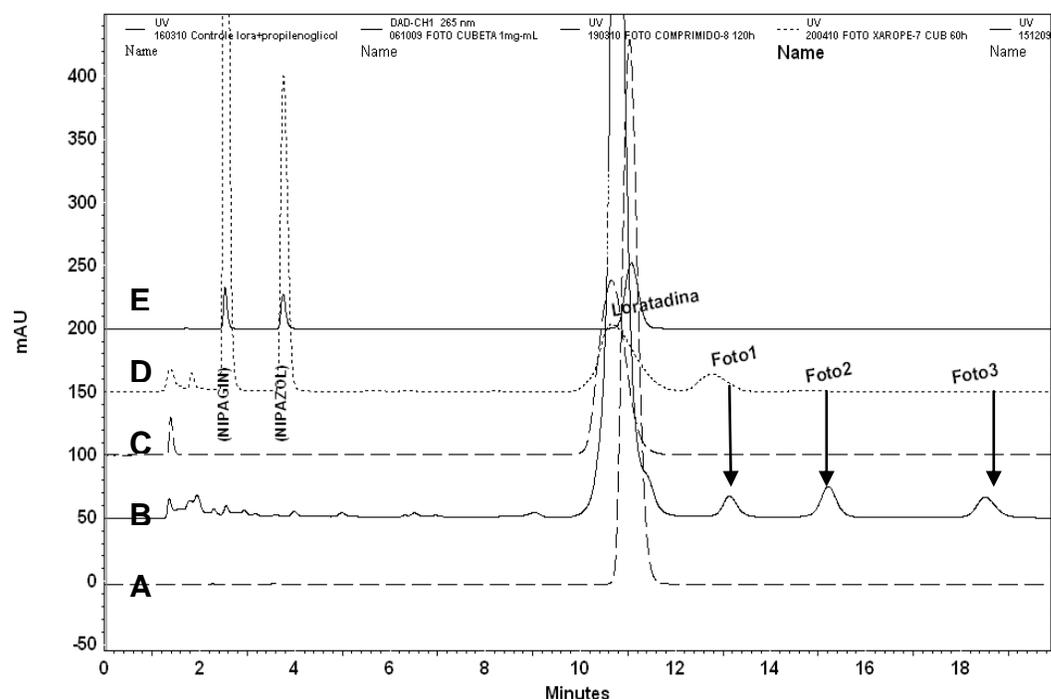
Amostra	LORA
Inicial (%)	100,14
Autoamostrador 24h (%)	99,84
Temperatura ambiente 24h (%)	99,75
Longa duração 100 days 8°C (%)	98,96

Aplicação do método CLAE para estudos de fotoestabilidade

#### *Fotoestabilidade dos comprimidos*

A FIGURA 1 mostra a comparação dos cromatogramas obtidos a partir dos testes de fotoestabilidade do padrão de LORA, antes da fotodegradação (A) e depois de 60 horas de irradiação (B). Pode ser observado que, após exposição à luz, a amostra exibe três picos de produtos de fotodegradação, indicados como Foto1 ( $\pm 13$  min), Foto2 ( $\pm 15$  min) e Foto3 ( $\pm 18,5$  min), os quais mostraram-se com ótima resolução. A eluição do pico principal do fármaco LORA foi de  $\pm 10,5$  minutos observando-se, também, boa resolução e simetria de pico.

Na mesma figura (1, item C), é mostrado o cromatograma do comprimido, que não acusa presença de produtos de fotodegradação, quando comparado com o item 1.B (amostra com produtos de fotodegradação). Isso indica que o fármaco se manteve estável quando as formulações foram submetidas à fotodegradação forçada (120 horas de irradiação). Neste sentido, os resultados para os comprimidos das 13 marcas analisadas, denominadas de L<sub>1</sub> a L<sub>13</sub> (referencia, genéricos e similares), mostraram-se estáveis.



**FIGURA 1.** Cromatogramas da fotoestabilidade das especialidade farmacêuticas. A - controle padrão LORA, B - fotodegradação 60h padrão LORA, C - fotodegradação comprimido LORA 10mg, D - fotodegradação xarope LORA 1mg mL<sup>-1</sup>, E - placebo xarope com parabenos.

Sobre a estabilidade dos comprimidos, frente à luz, essa pode ser atribuída ao fato das formulações serem na forma sólida, uma vez que os processos fotoquímicos ocorrem de maneira mais lenta e sob a superfície das substâncias e, na maioria dos casos, o interior dessa forma farmacêutica não é afetado.

A TABELA 4 mostra a média (%) e o desvio padrão relativo (DPR) do fármaco, contido nos comprimidos, após 120 horas de irradiação, quando se observa que a quantidade do fármaco LORA encontra-se ainda dentro das especificações estabelecidas pela farmacopeia americana (USP 32, 2009), para comprimidos 90%-

110%. Observou-se também que existe variação analítica aceitável, que não pode ser atribuída a uma possível fotodegradação do fármaco.

Segundo o guia Q1A(R2) para testes de estabilidade (ICH, 2003), a ação da luz é significativa quando a degradação resultar em perda maior que 5% da concentração inicial, o que não foi observado na análise de degradação forçada para os comprimidos.

**TABELA 4.** Resultados da quantificação da LORA (Média ± DPR) em comprimidos de 10mg, após fotodegradação, tempo de irradiação 120 horas (n=3)

Amostra	Controle	Fotoirradiados
L <sub>1</sub>	101,86±0,57	96,90±3,38
L <sub>2</sub>	99,87±1,33	96,42±1,05
L <sub>3</sub>	100,49±1,24	101,05±5,28
L <sub>4</sub>	101,02±0,85	100,74±7,17
L <sub>5</sub>	101,60±0,42	99,03±5,60
L <sub>6</sub>	102,38±0,24	100,40±0,05
L <sub>7</sub>	104,57±0,01	100,71±0,04
L <sub>8</sub>	100,51±0,03	96,26±0,03
L <sub>9</sub>	99,29±0,04	96,26±0,04
L <sub>10</sub>	103,97±0,01	101,27±0,12
L <sub>11</sub>	101,21±0,02	97,50±0,05
L <sub>12</sub>	99,64±0,10	97,71±0,08
L <sub>13</sub>	100,38±0,02	101,17±0,11

#### *Fotoestabilidade dos xaropes*

Foram analisadas nove diferentes formulações, denominadas de X<sub>1</sub> a X<sub>9</sub>, entre referência, genéricos e similares. Com o intuito de avaliar possíveis interações entre

fármaco e excipiente, capazes de interferir no método cromatográfico, foram estudadas a presença e a interferência de nipagin e nipazol (FIGURA 1.E), do ácido cítrico, do benzoato de sódio e da sacarose, componentes na maioria das formulações. Observou-se que o método cromatográfico é seletivo para a separação desses conservantes e excipientes.

Com relação aos tempos de retenção (TR) dos excipientes avaliados, estes tempos foram de 1 min a 4 min, enquanto o TR da LORA foi de  $\pm 10,5$  min. Observou-se, também, boa resolução, boa separação e boa simetria de pico, o que torna possível afirmar que o método cromatográfico é apropriado para o estudo.

Os estudos de fotoestabilidade foram desenvolvidos inicialmente nas formulações conforme encontradas nas embalagens primárias. Os resultados indicaram que o conteúdo de LORA encontra-se dentro das especificações estabelecidas pela farmacopeia americana para xarope (USP 32, 2009), ou seja, de 94 a 105%. É importante destacar que não foram encontrados produtos de degradação.

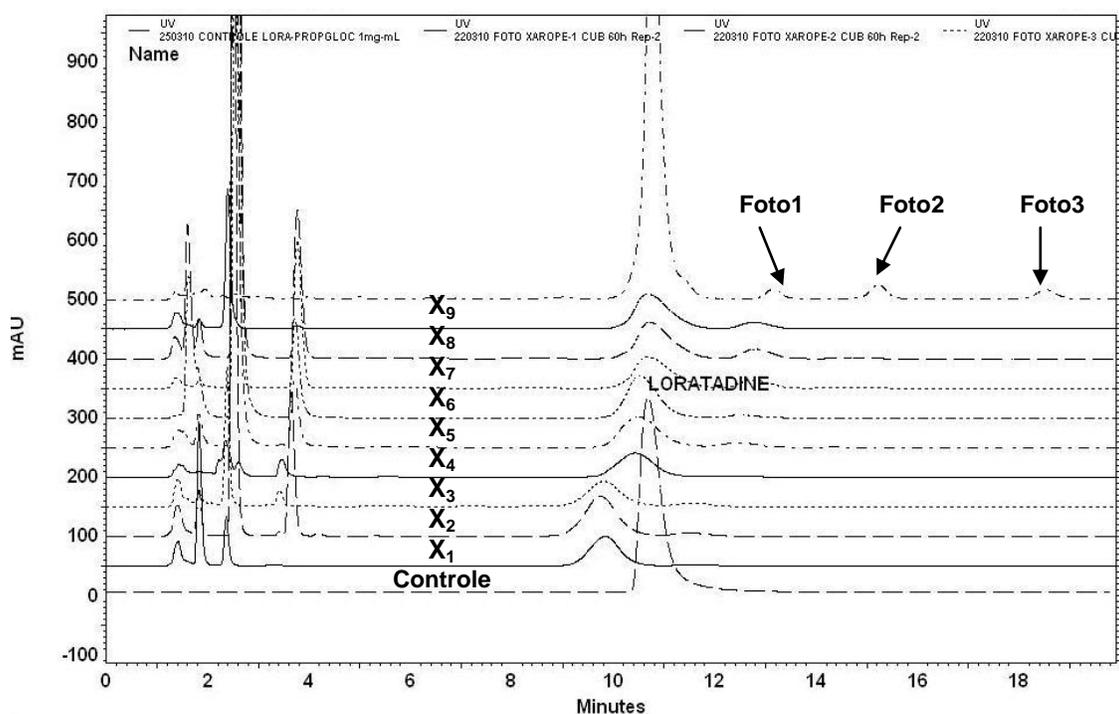
Entretanto, em duas das amostras ( $X_3$  e  $X_5$ ) houve suspeita de presença de produtos de fotodegradação. Porém, por corresponder a aproximadamente 0,5% da dose do fármaco, essa quantidade pode ser considerada desprezível, segundo o guia Q3B(R2) da ICH (2006). Esses vestígios de degradação encontrados podem ser oriundos, também, de impurezas provenientes da síntese do fármaco e não exatamente resultantes da fotodegradação.

Foi avaliada, também, a capacidade de fotoproteção dessas formulações, quando as mesmas encontraram-se fora de suas embalagens primárias (frascos de vidro, PET âmbar e branco opaco). Com este intuito, volumes determinados de amostras de xaropes foram colocados em cubetas de quartzo e em ampolas de vidro tipo 1, sendo que as amostras assim preparadas foram submetidas a 60 horas de irradiação em câmara de fotoestabilidade.

Os resultados indicaram que há degradação dos xaropes pela radiação luminosa, observando-se presença de picos de fotodegradação (FIGURA 2), assim

como diminuição da área do pico principal do fármaco pela perda da concentração inicial.

Da mesma maneira, esses resultados indicam que todas as formulações analisadas são susceptíveis à fotodegradação, quando submetidas à radiação luminosa fora de suas embalagens primárias. Portanto, todas as formulações são estáveis quando acondicionadas em frasco âmbar ou polietileno opaco, permitindo concluir que a embalagem primária constitui-se uma barreira de fotoproteção indispensável para tais produtos.



**FIGURA 2.** Cromatogramas da fotodegradação em cubetas de quartzo dos xaropes de LORA 1mg mL<sup>-1</sup>, em nove especialidades farmacêuticas (X<sub>1</sub>-X<sub>9</sub>) obtidas do mercado brasileiro, após 60 horas de irradiação.

A TABELA 5 indica a quantidade de LORA recuperada após 60 horas de fotoirradiação dos xaropes, sendo possível observar a diminuição de até 50% do conteúdo de fármaco. Os resultados também apontam as diferenças na degradação quando são utilizadas cubeta de quartzo e ampola de vidro, no teste de fotoestabilidade, pela presença de ar (com oxigênio).

**TABELA 5.** Resultados da quantificação da LORA (Média ± DPR), em xaropes 1mg mL<sup>-1</sup>, após fotodegradação, tempo de irradiação 60 horas (n=3)

Amostra	Controle	Ampolas de vidro	Cubeta de quartzo
X <sub>1</sub>	95,55 ± 1,27	77,49±1,05	60,17±0,69
X <sub>2</sub>	97,16 ± 1,12	82,83±1,77	74,54±1,15
X <sub>3</sub>	95,36 ± 1,93	53,19±1,69	44,61±1,81
X <sub>4</sub>	98,21 ± 1,91	90,97±1,05	65,96±1,93
X <sub>5</sub>	96,46 ± 0,53	79,18±1,65	57,82±1,91
X <sub>6</sub>	100,02 ± 1,59	67,37±0,87	62,45±1,92
X <sub>7</sub>	96,47 ± 1,45	71,62±1,85	66,94±1,07
X <sub>8</sub>	102,18 ± 1,97	86,89±1,70	72,10±1,40
X <sub>9</sub>	94,29 ± 1,79	80,47±0,77	69,75±1,12

Para as cubetas de quartzo, a fotodegradação mostrou-se um tanto mais acentuada, sendo que somente 44,61% do fármaco foram recuperados. Na fotodegradação em ampolas de vidro, 53,11% foram recuperados, após irradiação.

O preenchimento dos recipientes com ar atmosférico com a conseqüente presença de oxigênio, poderia desencadear reações diferentes pelas condições aeróbias ou anaeróbias as quais a molécula pode ser susceptível.

Por outro lado, o comprimento de onda pode ser outra condição que modifica a fotodegradação. O limite de absorção (o chamado cutt-off) das cubetas de quartzo é de 185 nm. Esses recipientes absorvem comprimentos de onda em quase toda a faixa de UV. Nessa faixa, os comprimentos de onda fornecem maior quantidade de energia de ativação; portanto, as reações se desencadeiam mais rapidamente, acontecendo o contrário, nas ampolas de vidro, que absorvem comprimentos de onda em uma pequena faixa do UV e em maior faixa no visível, já que o seu limite de absorção é de 320nm (TØNNENSEN, 2004, PIECHOCKY; THOMA, 2007).

Pela característica da formulação, formas farmacêuticas líquidas são mais susceptíveis de serem fotodegradadas, pois a maior parte da luz irradiada é absorvida próxima da superfície da amostra, o que desencadeia reações com maior velocidade (TØNNENSEN, 2001).

#### **4. CONCLUSÕES**

O método cromatográfico utilizado foi adequado para a quantificação do fármaco e separação dos produtos de fotodegradação. A validação mostrou boa precisão, exatidão, linearidade e seletividade.

Na avaliação da fotodegradação forçada de formulações líquidas contendo LORA, foram degradados até 50% do fármaco. E das formulações sólidas foram fotoestáveis observando-se perda de menos de 5%.

Não foram encontrados produtos de fotodegradação nas formulações quando analisadas, tal qual, obtidas do mercado. As embalagens primárias garantiram sua estabilidade.

## REFERÊNCIAS

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

ALBINI, A.; FASANI, E. **Drugs. Photochemistry and Photostability**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 1998. 326p.

AMINI, H.; AHMADIANI, A. Rapid determination of loratadine in small volume plasma samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**. v. 809, p.227–230, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME**. 7.ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2010. p. 25, 72. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/renome2010final.pdf>. Acesso em: 3 mar. 2011.

BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: Stationary Office, 2009. v.2, p.1290-1292.

EL RAGEHY, N.A.; BADAWEY, A.M.; EL KHATEEB, S.Z. Stability indicating methods for the determination of loratadine in the presence of its degradation product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.28, p.1041–1053, 2002.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Stability Q1A - Q1F. **Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products**. 1996. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public Web Site/ICH Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public Web Site/ICH Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf). Acesso em: 3 Jun. 2008.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN

USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Stability Q1A - Q1F. **Q1A(R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products.** 2003. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf). Acesso em: 5 Ago. 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and methodology.** 2005. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf). Acesso em: 16 Nov. 2011

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Impurities Q3A - Q3D. **Q3B(R2) Impurities in New Drug Products.** 2006. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3B\\_R2/Step4/Q3B\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf). Acesso em: 21 Mai. 2010.

**MARTINDALE: The Complete Drug Reference.** 36 ed. Pharmaceutical Press, 2009, p.413.

**MERCK index.** 14 ed. Whitehouse Station, 2006. 1636 p.

PIECHOCKI, J.; THOMA, K. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology.** Nova Iorque: Informa healthcare, 2007. p. 247-271.

REDDY, K.V.S.R. K., BABU, J.M., KUMAR, Y.R., REDDY, S.V.V., KUMAR, M.K., ESWARAI AH, S., REDDY, K.R.S., REDDY, M.S., BHASKAR, B.V., DUBEY, P.K., VYAS, K. Impurity profile study of loratadine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 32, p. 29-39, 2003.

SALEM, I.I.; IDREES, J.; AL TAMIMI, J.I. Determination of loratadine in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v.34, p.141–151, 2004.

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

TONNENSEN, H.H. **Photostability of Drugs and Drug Formulations**. 2ed. Florida: CRC Press LLC, 2004. 435p.

VLASE, L.; IMRE, S.; MUNTEAN, D.; LEUCUTA, S.E. Determination of loratadine and its active metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.44, p.652–657, 2007.

UNITED states pharmacopeia: 32; The National Formulary 27, Rockville: United States pharmacopeia Convention, 2009.v.2, p. 2805-2809.

## **CAPÍTULO 4.**

### **AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DA LORATADINA COM CICLODEXTRINAS NATURAIS**

## 1. INTRODUÇÃO

A loratadina (LORA) é um fármaco anti-histamínico de segunda geração utilizada no tratameto de alergias, como a rinite e prevenção de estados alérgicos cutâneos e sistêmicos Apresenta-se como um pó branco, pouco solúvel em água e solúvel em HCL 0,1M. Sua fórmula é  $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$ , seu peso molecular é 382,8 g mol<sup>-1</sup> e em sua estrutura química é possível identificar alguns grupamentos considerados sensíveis à luz (ALBINI; FASANI, 1998; BRITISH...,2009; MARTINDALE, 2009; MERCK, 2006).

Dentre as estratégias para estabilização de fármacos frente à ação da radiação luminosa, a formação de complexos em nível molecular como ciclodextrinas (CDs) tem sido objeto de inúmeros estudos. Tais complexos são originados como resultado da interação entre o fármaco e uma substância farmacologicamente inerte, como as CDs e sua formação resulta, na maioria das vezes, na melhoria da fotoestabilidade dos fármacos. As CDs são os agentes complexantes mais comumente utilizados, pela sua baixa toxicidade, disponibilidade e pelo custo acessível. Existe grande número de investigações focadas na melhora da fotoestabilidade de fármacos em solução utilizando as CDs como agentes fotoprotetores (ASKER, 2007; THOMA; SPILGIES, 2007).

Estudos na literatura, mostraram o efeito positivo das CDs na fotoestabilidade de diferentes fármacos, como colchicina (AMMAR; EL-NAHHAS, 1995), emetina e cefalina (TESHIMA *et al.*, 1989), clofibrato (UEKAMA *et al.*, 1983a, 1983b). Fármacos altamente fotossensíveis, como nimodipino (MIELCAREK, 1998), nifedipino (BAYOMI *et al.*, 2002), isradipino (MIELCAREK; DACZKOWSKA, 1999) e ibuprofeno (GODWIN *et al.*, 2006), também foram complexados com CD e ficou demonstrado que foi reduzida significativamente sua velocidade de fotodegradação.

A complexação da LORA com CDs, já foi objeto de vários estudos, cuja finalidade, em geral, é a melhora da solubilidade do fármaco. Dentre os diferentes tipos de CD utilizadas na obtenção de complexos de inclusão com LORA, se encontram as ciclodextrinas naturais (OMAR *et al.*, 2007), hidroxipropil- $\beta$ -CD (OMAR

*et al.*, 2007; SHAN-YANG ; CHENG-HUNG; MING-THAU, 2010; SINGH POOJA; BAJPAI MEENAKSHI; SRIVATAVA SHRUTI, 2011) e dimetil- $\beta$ -CD (NACSA *et al.*, 2009; SZABADOS-NACSA *et al.*, 2011). A utilização destas CDs mostrou adequada complexação mediante o uso de técnicas de coevaporação, liofilização e outras.

Porém, é interessante notar que não são encontrados, na literatura científica, estudos nos quais a fotoestabilidade da LORA fosse avaliada na presença de CDs, portanto, não se tem conhecimento sobre a possibilidade da utilização destes como agentes de proteção ao fármaco frente à ação da luz.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto da complexação da LORA com CDs naturais, mais especificamente  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD), na fotoestabilidade do fármaco.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes

Loratadina (LORA), origem Chemo Lugano Branch (Lugano, Suíça). Acetonitrila grau cromatográfico. Ácido clorídrico 37%, fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), etanol, Merck, (Darmstadt, Alemanha), Cavamax<sup>®</sup> W6 Pharma ( $\alpha$ -CD), Cavamax<sup>®</sup> W7 ( $\beta$ -CD) e Cavamax<sup>®</sup> W8 ( $\gamma$ -CD) Wacker Chemie AG (Burghausen, Alemanha).

### Obtenção dos complexos com ciclodextrinas

Foram utilizadas três ciclodextrinas naturais:  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) e os complexos foram obtidos pelo método de co-evaporação e liofilização, utilizando proporção estequiométrica fármaco-CD de 1:1, 1:2 e 1:3. Foram preparadas soluções de LORA em etanol (10mL) e de cada uma das CDs, em água, as quais foram, em seguida, colocadas, sob agitação em agitador magnético Speedlab Nalgon (São Paulo, Brasil), em velocidade de 500rpm, por 48 horas.

Quando utilizado método de coevaporação, o material foi levado para rotaevaporador Tecnal TE 210 (São Paulo, Brasil) e secagem em estufa de circulação forçada de ar Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil) a 50°C, para completar o processo de secagem.

#### Caracterização físico-química dos complexos

##### Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Foi utilizado equipamento DSC 2920 TA Instruments (New Castel, EUA), empregando-se cadinho hermético de alumínio, com cerca de 2mg de amostra, submetidos a aquecimento no intervalo de 25°C a 300°C, sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>, fluxo de 50mL min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>.

##### Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)

As curvas TG foram obtidas em equipamento TGA 2950 TA Instruments (New Castel, EUA), empregando-se cadinho de platina com cerca de 10mg de amostra e submetida a aquecimento no intervalo de 25°C a 500°C, sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>, com fluxo de 100mL min<sup>-1</sup>.e razão de aquecimento de 50°C min<sup>-1</sup>. Para melhor compreensão do fenômeno de perda de massa, foi calculada a derivada (DTG) de cada curva obtida.

#### Fotoestabilidade dos complexos

A fotoestabilidade dos complexos foi avaliada preparando-se soluções na concentração de 1mg mL<sup>-1</sup> em meio HCL 0,1M e filtradas por membrana Millex 0,45µm.

As soluções foram colocadas em cubetas de quartzo (1cm de caminho óptico) e em ampolas de vidro transparente tipo I (10mL de solução), ambos hermeticamente fechados. Foi considerado, ainda, um controle protegido da luz com

papel alumínio durante o ensaio. Os recipientes foram expostos à luz em câmara de fotoestabilidade FARMA 424 Nova Ética (São Paulo, Brasil), mantendo a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}\pm 0,5$ , durante 12 horas. As fontes de luz da câmara correspondem à opção 2 do guia Q1B da International Conference on Harmonisation (ICH, 1996) e foram adequadamente calibradas e qualificadas.

Após a irradiação, o teor de LORA remanescente foi avaliado empregando-se método cromatográfico descrito a seguir.

#### Condições cromatográficas

Foi analisada a quantidade de fármaco remanescente e a presença ou a ausência dos picos correspondentes a produtos de fotodegradação, utilizando cromatógrafo líquido HITACHI ELITE LaChrome L-2000 (Tokyo, Japão); bomba HITACHI ELITE LaChrome L-2130 (Tokyo, Japão), detector HITACHI ELITE LaChrome UV L-2400 (Tokyo, Japão), forno HITACHI ELITE LaChrome L-2300 (Tokyo, Japão), autoinjeter HITACHI ELITE LaChrome L-2200 (Tokyo, Japão) e *software* EZChrom Elite para processamento dos dados.

Utilizou-se coluna tipo Purospher® 100 RP-18e de  $5\mu\text{m}$ , 250mm x 4mm (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel binária foi constituída de acetonitrila/ acetato de amonia 0,01M. Utilizando gradiente 0min 30:70, 5min 40:60, 10min 50:50, 25min 40:60 e 30min 30:70. Tempo de corrida 30min, sob vazão de  $1,5\text{ mL min}^{-1}$ . O volume injetado foi de  $10\mu\text{L}$  e a detecção foi realizada no comprimento de onda 235 nm.

#### Preparação da solução amostra de LORA

A amostra foi preparada a partir da solução  $1\text{mg mL}^{-1}$  em HCL 0,1M de LORA, tomando 25mL e transferidos para um balão volumétrico de 50mL, foi completado com diluente, homogeneizado e filtrado em membrana Millex de  $0,45\mu\text{m}$  de porosidade e 13mm de diâmetro, descartando-se os primeiros 2mL do filtrado (concentração final de LORA  $500\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### Validação do método analítico CLAE

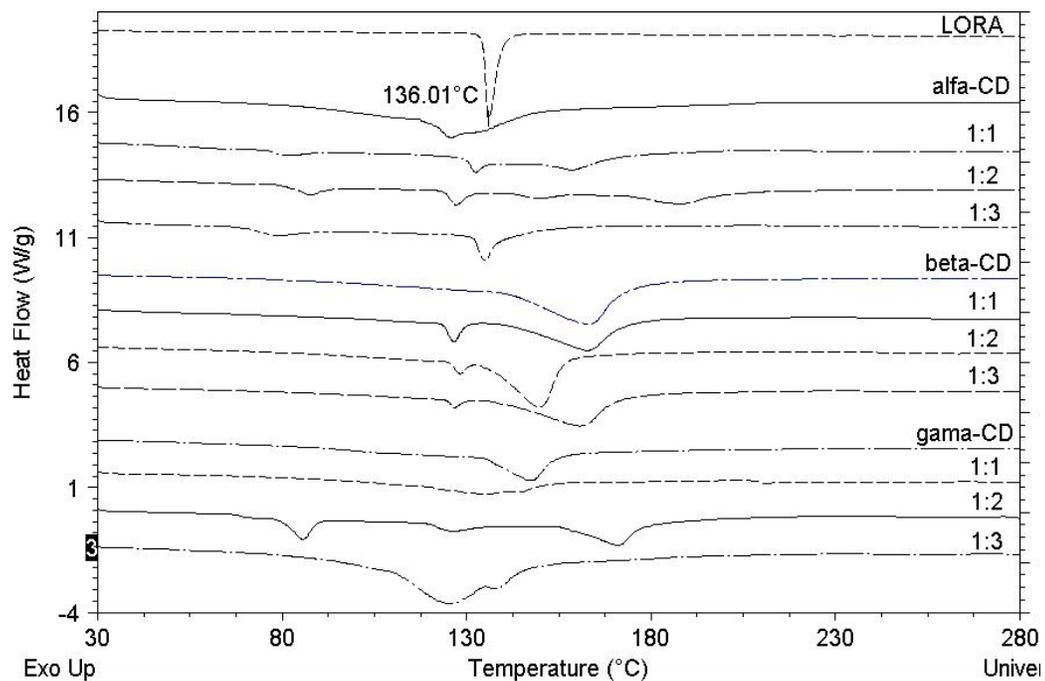
O fármaco foi quantificado pelo método CLAE, previamente validado de acordo com o guia da ICH (2005), os parâmetros analisados foram linearidade, seletividade, precisão e exatidão, intradia e interdias, e estabilidade de curta duração em 24 horas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Caracterização dos complexos binários

Na FIGURA 1, são mostradas as curvas de DSC dos complexos de LORA: $\alpha$ -CD, LORA: $\beta$ -CD e LORA: $\gamma$ -CD nas três proporções testadas. O fármaco apresentou evento característico, correspondente ao seu pico de fusão em 136,01°C. Quando comparado com os complexos utilizando  $\alpha$ -CD, nas proporções 1:1 e 1:2, observou-se o deslocamento bastante significativo do pico de fusão para 127,23°C e 132,45°C, respectivamente, o que evidencia a inclusão do fármaco dentro da cavidade da CD, e no caso da proporção 1:1 o complexo se mostrou melhor caracterizado.

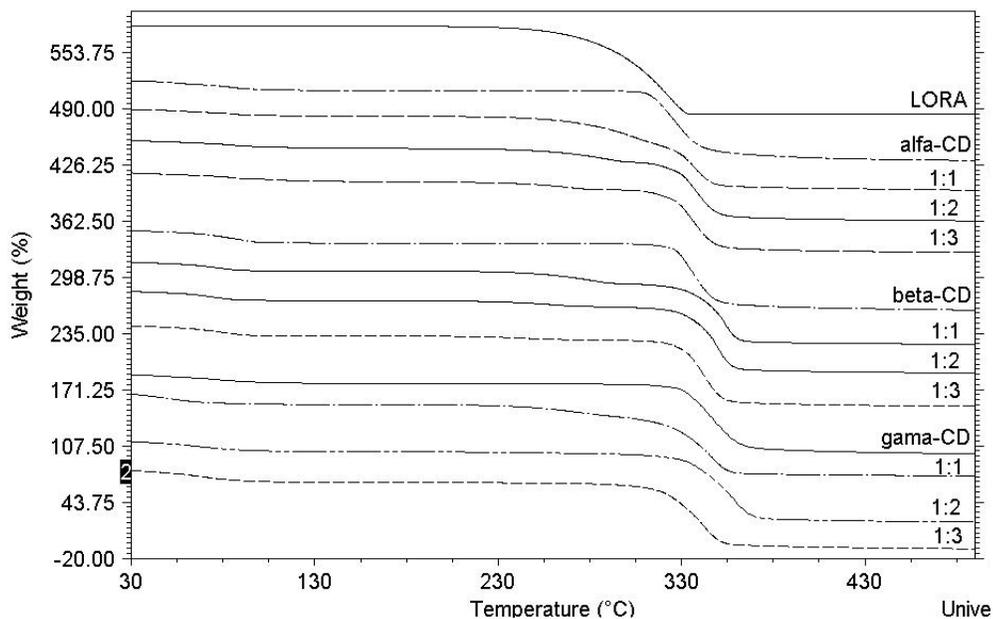
Entretanto, na proporção 1:3 quase não é observado deslocamento do pico do fármaco e este aparece com maior intensidade em 135,0°C, o que faz supor que a complexação se mostrou, pouco vantajosa, quando colocada maior proporção de CD. Alguns outros eventos característicos da  $\alpha$ -CD foram observados entre 70,67°C e 188,15 °C para as três CDs testadas.



**FIGURA 1.** Curvas DSC da LORA, CDs e dos complexos de LORA:α-CD, LORA:β-CD e LORA:γ-CD (proporções 1:1, 1:2 e 1:3), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>.

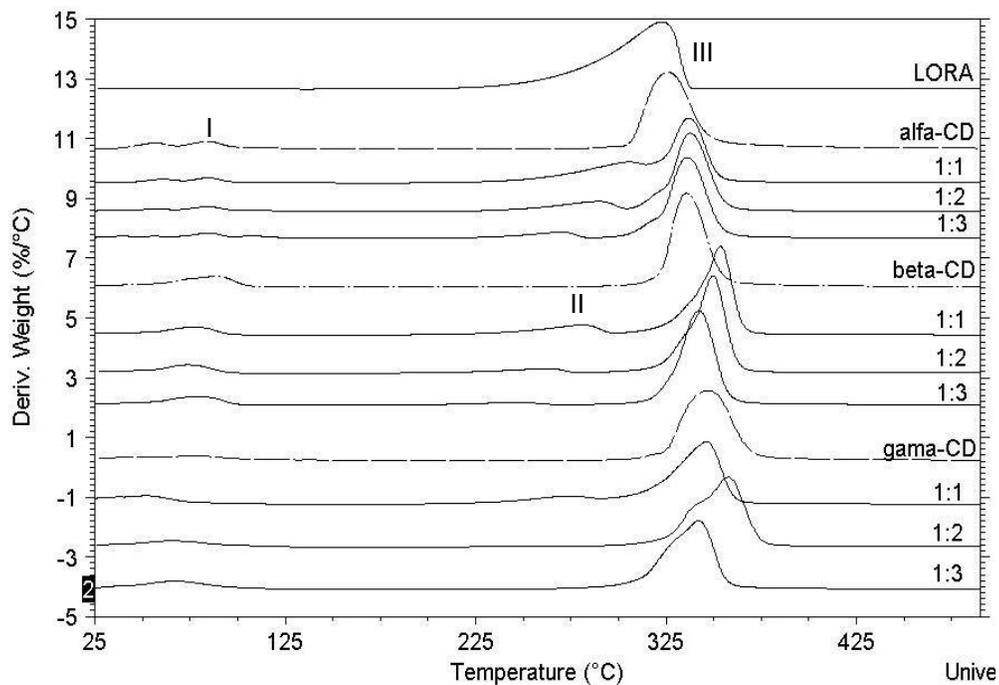
Do mesmo modo, observou-se que os complexos com β-CD apresentaram modificação nos eventos de fusão, no entanto ainda pode-se notar a presença de picos característicos do fármaco os quais foram deslocados para 126,63°C (1:1), 128,18°C (1:2) e 126,84°C (1:3) e dos picos da β-CD que foram deslocados para 162,79°C (1:1), 149,59°C (1:2) e 160,62°C (1:3). O deslocamento dos picos, mesmo em menor escala de temperatura, evidencia a possível encapsulação do fármaco.

Entretanto, para os complexos com  $\gamma$ -CD, é possível observar a complexação, através do deslocamento do pico do fármaco para 125,89°C (1:1), 134,87°C (1:2) e 125,31°C (1:3) mostrados como uma fusão dos eventos da CD e do fármaco resultando em picos largos e característicos de formação de complexos, sendo dessa maneira evidenciada a adequada encapsulamento do fármaco dentro da cavidade da  $\gamma$ -CD. Neste caso, foi observada que a maior quantidade de CD não acusa eficiência na encapsulação e na formação de complexos de inclusão, pois foi mostrado que na proporção 1:1 o pico da LORA desaparece completamente, indicando melhor complexação.



**FIGURA 2.** Curvas TG da LORA, CDs e dos complexos LORA:α-CD, LORA:β-CD e LORA:γ-CD (proporções 1:1, 1:2 e 1:3), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>.

As curvas TG dos complexos de LORA com  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (proporções 1:1, 1:2, e 1:3), são mostradas na FIGURA 2, é possível observar alguns deslocamentos de perda de massa, acorde com o incremento da temperatura. Para aperfeiçoar a resolução das perdas de massa, utilizou-se como ferramenta o cálculo da DTG (derivada da TG) o que permitiu comparar os valores de três perdas (I, II e III) entre os complexos (FIGURA 3) e os resultados obtidos são mostrados na TABELA 1.



**FIGURA 3.** Curvas DTG da LORA, CDs e dos complexos LORA: $\alpha$ -CD, LORA: $\beta$ -CD e LORA: $\gamma$ -CD (proporções 1:1, 1:2 e 1:3). Perdas de massa (I), (II) e (III), obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$  ( $100\text{mL min}^{-1}$ ) e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ .

Os resultados da primeira perda de massa (I) mostraram eventos em temperaturas menores, por volta de 51,57°C e 89,04°C, com porcentagem de perda entre 7% e 12 %, que podem ser indicação do início da evaporação das moléculas de água, que foi utilizada como solvente para a solubilização das CDs durante a preparação dos complexos. Não foi observada esta perda de massa para o fármaco, esse apresenta-se anidro.

É interessante notar a existência de um evento de perda de massa (II), que ocorre em alguns complexos de  $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD (1:1, 1:2 e 1:3) a temperatura se encontra entre 260°C e 305°C, se bem é um pico adjacente a perda de massa (III), presumivelmente, seja do início da decomposição dos complexos e/ou da parte não complexada do fármaco fora da cavidade, pois a porcentagem de perda é menor de 15% e foi observada para alguns complexos.

Um terceiro evento de perda de massa (III) parece corresponder às perdas de massa dos complexos formados LORA-CDs e ocorre entre 325°C e 357°C, e a perda observada foi de 60% a 77%, embora o fármaco puro em 322°C atinge 99,92% de perda. Desta maneira, pode ser considerado um parâmetro importante para avaliação da formação de complexos de inclusão. No caso das CDs, a perda de massa alcançou 73% a 77% e é possível observar, em todos os casos, queda nestes valores, alcançando até 64% para os complexos LORA- $\alpha$ -CD e LORA: $\gamma$ -CD, na proporção 1:1, caracterizando a formação de complexos.

Por outro lado, quando comparada às proporções testadas, observou-se que houve melhor complexação para os complexos 1:1, pois as porcentagens de perda de massa foram diminuídas, indicando maior interação fármaco-CD. No entanto, nas outras proporções (1:2 e 1:3), as porcentagens de perda de massa são mais próximas às das CD puras e as temperaturas sofreram ligeiro incremento, o que pode indicar que existe excesso de CD.

**TABELA 1.** Perdas de massa obtidas por DTG (derivada TG), da LORA, dos complexos com  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (proporções 1:1, 1:2, e 1:3)

Amostra	Perda de massa I % (°C)	Perda de massa II % (°C)	Perda de massa III % (°C)
LORA	---	---	99,94 (322,68)
$\alpha$ -CD	9,04 (84,49)	---	77,37 (325,83)
Proporção 1:1	6,61 (84,43)	5,23 (305,94)	64,14 (336,84)
Proporção 1:2	7,06 (84,00)	13,02 (289,32)	64,23 (337,63)
Proporção 1:3	7,34 (84,86)	7,28 (270,23)	68,27 (336,30)
$\beta$ -CD	13,83 (89,04)	---	73,02 (335,68)
Proporção 1:1	9,84 (77,64)	12,47 (280,13)	66,35 (353,52)
Proporção 1:2	10,11 (73,90)	5,67 (261,89)	72,24 (349,45)
Proporção 1:3	11,07 (79,53)	4,34 (247,73)	70,99 (342,38)
$\gamma$ -CD	8,85 (76,54)	---	77,22 (346,61)
Proporção 1:1	12,13 (51,57)	---	64,71 (346,18)
Proporção 1:2	10,60 (65,22)	---	71,33 (357,42)
Proporção 1:3	12,65 (66,86)	---	73,15 (342,11)

#### Avaliação da fotoestabilidade dos complexos

O método cromatográfico utilizado para a quantificação do fármaco após estudo de fotoestabilidade dos complexos foi validado inclusive na presença das CDs ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD), sendo foi possível observar mudança de eluição do pico da LORA. Esta mudança mostrou-se dependente da solubilidade da CD utilizada.

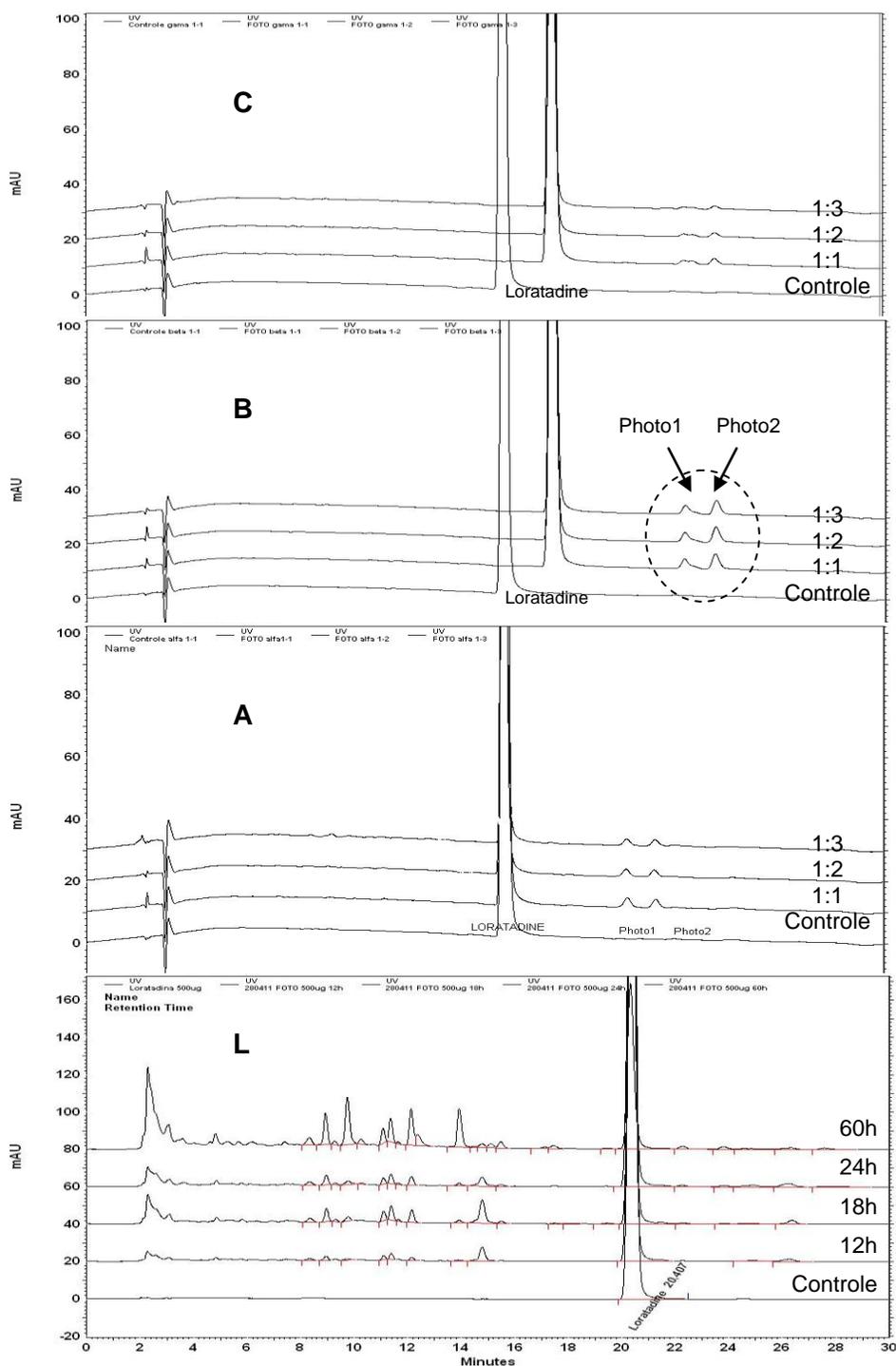
Entretanto, o método desenvolvido foi adequado e apresentou-se de acordo com os parâmetros estabelecidos no guia Q2(R1) da ICH (2005).

Os fotoprodutos dos complexos foram identificados em função do tempo de retenção (TR) e denominados photo1 e photo2 e as quantidades foram calculadas como a porcentagem da concentração inicial do fármaco de acordo com as diretrizes do guia Q3B(R2) da ICH (2006), uma vez que não estavam disponíveis os padrões respectivos, assumindo-se, assim, que os produtos da fotodegradação têm fator de resposta semelhante à LORA.

Na FIGURA 4, são mostrados os cromatogramas dos complexos obtidos mediante método de coevaporação após serem submetidos à irradiação luminosa durante 12 horas. O uso de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, mostrou modificação do tempo de retenção (TR) da LORA, a pesar do mesmo método cromatográfico utilizado o TR sofre deslocamentos, dado pela diferente solubilidade e quantidades de CDs utilizadas nos complexos formados.

Quando comparados os cromatogramas da fotodegradação da LORA sem complexar (FIGURA 4L) com os cromatogramas dos complexos, após 12 horas de irradiação, observou-se que o número de produtos de degradação foi reduzido notavelmente, somente dois (photo1 e photo2) foram observados e as quantidades de fármaco recuperado atingiram valores maiores, isto demonstra que a formação de complexos de inclusão foi adequada para o fim de fotoproteção da molécula.

A área dos picos dos fotoprodutos photo1 e photo2 sofre muitas variações dependendo da quantidade e tipo de CDs utilizada. Ao serem quantificados os picos do complexo LORA: $\beta$ -CD (FIGURA 4B), esse mostrou maior porcentagem na formação de fotoprodutos, o que presumivelmente indicaria que o complexo com esta CD foi o menos eficiente, quando for utilizado como mecanismo de proteção frente à radiação luminosa.



**FIGURA 4.** Cromatogramas da L - LORA e dos complexos com: **A** -  $\alpha$ -CD, **B** -  $\beta$ -CD e **C** -  $\gamma$ -CD, após 12 horas de irradiação. Em destaque, os produtos de fotodegradação (Photo1 e Photo2) para os complexos com  $\beta$ -CD.

Os valores de photo1 e photo2 são mostrados na TABELA 2. Quando utilizada  $\alpha$ -CD a porcentagem foi menor do que 1% e a quantidade máxima de LORA recuperada foi de 96,36% (1:1). Quando os fotoprodutos são provenientes da  $\beta$ -CD, as porcentagens de ambos fotoprodutos se encontram entre 1,1% e 2,1% e a porcentagem máxima de fármaco recuperado foi de 93,63% (1:1). Para  $\gamma$ -CD, as porcentagens de fotoprodutos foram também menores do que 1%, e a LORA recuperada foi de 99,15%.

De todas as CDs utilizadas a  $\gamma$ -CD mostrou-se a melhor alternativa para seu uso como mecanismo de fotoproteção, sobre tudo quando utilizada proporção 1:1. Os picos dos fotoprodutos formados (photo1 e photo2) quase não são observados (FIGURA 4C), pois as quantidades formadas são menores que 0,5%.

Quando analisadas as proporções estequiométricas das CDs utilizadas, observou-se que, em todos os casos, se tem maior fotoestabilidade na proporção estequiométrica 1:1. Ao serem comparadas as proporções 1:2 e 1:3, notou-se que o incremento de quantidade de CDs, aumenta a fotodegradação da LORA. Este excesso de CDs pode, segundo Sortino e colaboradores (2001), promover o aumento da fotodegradação do fármaco, atuando como catalisadores na reação frente à radiação luminosa.

O uso de complexos de inclusão com CDs é uma boa alternativa para ser usada como mecanismo de fotoproteção de moléculas sensíveis a radiação luminosa, os resultados obtidos neste trabalho se mostraram promissórios no desenvolvimento de técnicas alternativas para a estabilidade de produtos que sofrem fotodegradação.

**TABELA 2.** Porcentagem de LORA recuperada dos complexos binários com  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, obtidos por coevaporação, após 12 horas de irradiação em solução. Os valores correspondem à média de cinco determinações  $\pm$  desvio padrão relativo ( $\pm$ DPR)

Complexo	$\alpha$ -CD			$\beta$ -CD			$\gamma$ -CD		
	LORA	*Photo1	*Photo2	LORA	*Photo1	*Photo2	LORA	*Photo1	*Photo2
1:1	96,36 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 2,95	0,46 $\pm$ 3,22	93,63 $\pm$ 0,15	1,16 $\pm$ 1,36	1,36 $\pm$ 0,44	99,15 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 2,83	0,48 $\pm$ 1,84
1:2	94,64 $\pm$ 1,01	0,84 $\pm$ 2,12	0,77 $\pm$ 3,67	92,29 $\pm$ 1,19	1,49 $\pm$ 4,41	2,10 $\pm$ 0,54	96,11 $\pm$ 0,16	0,71 $\pm$ 1,15	0,65 $\pm$ 1,73
1:3	93,86 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 2,66	0,92 $\pm$ 1,55	89,80 $\pm$ 0,75	1,18 $\pm$ 3,12	1,66 $\pm$ 1,14	94,29 $\pm$ 0,41	0,81 $\pm$ 4,47	0,71 $\pm$ 3,05

(\*) Média das porcentagens relativas à concentração do complexo inicial

#### 4. CONCLUSÕES

A complexação da LORA com ciclodextrinas mostrou-se um recurso bastante interessante para melhorar a fotoestabilidade do fármaco, uma vez que, após 12 horas de irradiação luminosa, é possível recuperar até 99% deste, quando na forma de complexo com a  $\gamma$ -CD, na proporção 1:1.

#### REFERÊNCIAS

ALBINI, A.; FASANI, E. **Drugs. Photochemistry and Photostability**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 1998. 326p.

AMMAR H.O; EL-NAHHAS S.A. Improvement of some pharmaceutical properties of drugs by cyclodextrin complexation. 2. Colchicine . **Pharmazie**. v. 50, n. 4, p. 269-272, 1995 .

ASKER. A.F. Photostability Studies of Solutions and Methods of Preventing Photodegradation, In: PIECHOCKI, J.; THOMA, K. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. Nova Iorque: Informa healthcare, 2007. cap. 17, p. 345-373.

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

BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: Stationary Office, 2009. v.2, p.1290-1292.

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

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Stability Q1A - Q1F. **Q1B**

**Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.** 1996. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf). Acesso em: 15 set. 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Impurities Q3A - Q3D. **Q3B(R2) Impurities in New Drug Products.** 2006. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3B\\_R2/Step4/Q3B\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf). Acesso em: 21 Mai. 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and methodology.** 2005. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf). Acesso em: 16 Nov. 2011

**MARTINDALE: The Complete Drug Reference.** 36 ed. Pharmaceutical Press, 2009, p.413.

**MERCK index.** 14 ed. Whitehouse Station, 2006. 1636 p.

MIELCAREK, J . Analytical study of photodegradation of inclusion complexes of nimodipine with  $\alpha$ ,  $\beta$ -cyclodextrin, methyl- $\beta$  -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$  -cyclodextrin. **Drug Development and Industrial Pharmacy.** v.24, n.2, p.197-200, 1998.

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

NACSA, Á.; BERKESI, O.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.; AIGNER, Z. Achievement of pH-independence of poorly-soluble, ionizable loratadine by inclusion complex formation with dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.** v 64, p. 249–254, 2009.

OMAR, L.; EL-BARGHOUTHY. M.I.; MASOUD, N.A.; ABDOH, A.A.; AL OMARI, M.M.; ZUGHUL, M.B.; BADWAN, A.A. Inclusion complexation of loratadine with natural and

modified cyclodextrins: phase solubility and thermodynamic studies. **Journal Solution Chemistry**. v. 36: p. 605–616, 2007.

SZABADOS-NACSA, Á.; SIPOS, P.; MARTINEK, T.; MÁNDITY, I.;BLAZSÓ, G.; BALOGH, Á.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.;AIGNER, Z. Physico-chemical characterization and in vitro/in vivo evaluation of loratadine:dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 55, 294–300, 2011.

SHAN-YANG, L.; CHENG-HUNG, H.; MING-THAU, S. Curve-fitting FTIR studies of loratadine/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex induced by co-grinding process. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 53, p. 799–803, 2010.

SINGH POOJA; BAJPAI MEENAKSHI; SRIVATAVA SHRUTI. Physicochemical Characterization and Dissolution Enhancement of Loratadine–Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin Binary Systems. **Journal Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 3, n. 4, p. 1170-1175, 2011.

SORTINO, S.; GIUFFRIDA, S.; DE GUIDI, G.; CHILLEMI, R.; PETRALIA, S.; MARCONI, G.; CONDORELLI, G.; SCIUTO, S. The photochemistry of flutamide and its inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin. Dramatic effect of the microenvironment on the nature and on the efficiency of the photodegradation pathways. **Photochemistry and Photobiology**, v.73, n.1, p.6-13, 2001.

TESHIMA D., OTSUBO K., HIGUCHI S., HIRAYAMA F., UEKAMA K., AOYAMA T. Effects of cyclodextrins on degradations of emetine and cephaeline in aqueous solution. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 37, n.6, p. 1591-1594, 1989.

THOMA, K.; SPILGIES, H. Photostabilization of Solid and Semisolid Dosage Forms. In: PIECHOCKI, J.; THOMA, K. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. Nova lorque: Informa healthcare, 2007. cap. 16, p. 323-342.

UEKAMA, K., NARISAWA, S., HIRAYAMA, F., OTAGIRI, M., KAWANO, OHTANI, T., OGINO, H. Improvement of thermal and photochemical stability of benzaldehyde by cyclodextrin complexation. **International Journal of Pharmaceutics**. v.13 p. 253-61, 1983a.

UEKAMA, K., OH, K., OTAGIRI, M., SEO, H., TSUROKA, M. Improvement of some pharmaceutical properties of clofibrate by cyclodextrin complexation. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 58, p.338-342, 1983b.

## **CAPÍTULO 5.**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA  
POR CLAE PARA AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE DA  
ACETAZOLAMIDA UTILIZANDO-SE CONDIÇÕES DO GUIA Q1B DA  
ICH**

## 1. INTRODUÇÃO

Acetazolamida (ACZ), conhecida também como acetamida, quimicamente é N-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida, fórmula molecular  $C_4H_6N_4O_3S_2$  e peso molecular  $222,25 \text{ g mol}^{-1}$ . É um inibidor da anidrasa carbônica, utilizado principalmente como diurético e como redutor da pressão intraocular no tratamento de glaucoma. É ainda empregada como parte do tratamento de aclimatação em alpinistas e indivíduos susceptíveis ao mal da montanha (WISTRAND, 1984; SRINIVATSU *et al.*, 2010; USP 32, 2009).

ACZ pertence ao grupo de fármacos conhecidos como sulfas, que têm em sua estrutura o farmacóforo (fragmento da molécula responsável pelo efeito terapêutico do fármaco) p-amino-benzenosulfonamida. Exemplos de fotodegradação e fototoxicidade são comuns nos medicamentos que possuem fármacos desta categoria (ICARDO *et al.*, 2003; VALENCIA *et al.*, 2008, ZHOU; MOORE, 1994).

Alguns estudos revelam a instabilidade da ACZ frente à radiação luminosa, demonstrando significativa fotodegradação entre 300 e 337nm, quando se utiliza metanol, que ocorre em condições aeróbicas, com intervenção do oxigênio singleto (VARGAS; MÉNDEZ; ROJAS, 1998). No entanto, outro estudo indicou que o fármaco é fotoestável frente à radiação luminosa, embora não tenham sido especificadas as condições do ensaio (SRINIVASU *et al.*, 2010).

Por outro lado, não existem estudos de fotoestabilidade da ACZ nas condições estabelecidas pelo guia Q1B da International Conference on Harmonisation (ICH), na qual existem parâmetros, bem estabelecidos para o desenvolvimento de estudos de fotoestabilidade, dentre os quais se destaca o uso de duas opções de fontes de luz. A opção 1 sugere fontes de luz do tipo vapor metálico, xenônio e artificial-dia e a opção 2 indica o uso de luz fluorescente branca fria em conjunto com luz fluorescente ultravioleta-próximo, sendo esta última opção menos dispendiosa e de maior acessibilidade (ICH, 1996).

De qualquer modo, quando uma molécula se mostra fotossensível, apresentando produtos de fotodegradação, é importante dispor de um método analítico adequado para a identificação desses produtos. Assim, os métodos cromatográficos apresentam-se como uma técnica de rotina, por serem os mais adequados para a detecção e a quantificação do fármaco, das suas impurezas e dos

seus produtos de degradação (PIECHOCKI; THOMA, 2007).

Os sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresentam elevada sensibilidade e robustez, assim como algumas vantagens, como menor custo e equipamentos com maior acessibilidade. Vários métodos utilizando CLAE são apresentados na literatura para quantificação de ACZ, principalmente em sistemas biológicos, como urina humana (HERRÁEZ-HERNÁNDEZ; CAMPÍNS-FALCÓ; SEVILLANO-CABEZ, 1992; CAMPÍNS-FALCÓ; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ; SEVILLANO-CABEZA, 1994; GUCHELAAR *et al.*, 1999; MOREIRA; MORAES, 2005), plasma humano e de rato (ICHIKAWA *et al.*, 1998; ZARGHI; SHAFATI, 2002) e, inclusive, para estudos de identificação de produtos de degradação e impurezas (SRINIVATSU *et al.*, 2010). No entanto, são métodos com fases móveis ternárias ou quaternárias, o que os torna pouco estáveis e difíceis de serem reproduzidos, além de dispendiosos.

Assim, o presente estudo teve por finalidade desenvolver e validar metodologia analítica CLAE para avaliar a fotoestabilidade da ACZ empregando-se as condições descritas no guia Q1B da ICH.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes

Acetazolamida (ACZ), ativo farmacêutico, origem NAKODA Chemicals (Andhra Pradesh, Índia), acetonitrila e metanol grau CLAE. Amônio acetato, ácido clorídrico 37%, ácido ortofosfórico 85%, fosfato de potássio monobásico-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, hidróxido de sódio, grau analítico Merck (Darmstadt, Alemanha).

### Equipamentos

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência CLAE-UV foi desenvolvida em cromatógrafo líquido HITACHI ELITE LaChrome L-2000 (Tokyo, Japão); bomba HITACHI ELITE LaChrome L-2130 (Tokyo, Japão), detector HITACHI ELITE LaChrome UV L-2400 (Tokyo, Japão), forno HITACHI ELITE LaChrome L-

2300 (Tokyo, Japão), autoinjeter HITACHI ELITE LaChrome L-2200 (Tokyo, Japão) e *software* EZChrom Elite para processamento dos dados.

Para os testes de fotodegradação, utilizou-se uma câmara de fotoestabilidade Farma 424 Nova Ética (São Paulo, Brasil). As fontes de luz da câmara correspondem à opção 2 do guia Q1B (ICH, 1996), calibradas e qualificadas sob temperatura controlada de 25°C. Após calibração, se estabeleceu o tempo de 60 horas como mínimo, para cumprir com o indicado no guia Q1B.

#### Condições analíticas CLAE

Utilizou-se coluna tipo Purospher® STAR RP-18e (5µm), LiChroCART® 125-4 (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel binária foi constituída de (A) acetato de amônia 0,01M pH 3,1 (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>): (B) acetonitrila (MOREIRA; MORAES, 2005), utilizando gradiente 98-90-98 (A), sob vazão de 1,3mL min<sup>-1</sup>. O volume injetado foi de 10 µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda 260nm. Foi utilizada, como diluente, uma mistura de água ultrapura e acetonitrila, na proporção 50:50, previamente filtrada e homogeneizada.

#### Preparação da solução padrão

Foram pesados, analiticamente, 25mg de ACZ padrão de referência e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 25mL. Foram adicionados 15mL de HCL 0,01M e deixados em banho de ultrassom por 5 minutos, até completa solubilização do ativo. Em seguida, foi completado o volume do balão com diluente e homogeneizado. A concentração final foi 1mg mL<sup>-1</sup> de ACZ.

#### Preparação da solução amostra

Foram tomadas 20mL da solução padrão, que foram transferidos para balão volumétrico de 50mL, cujo volume foi completado com diluente, obtendo-se concentração final de 400µg mL<sup>-1</sup> de ACZ. Após homogeneização, a solução foi filtrada em membrana Millex de 0,45µm de porosidade e 13mm de diâmetro, descartando-se os primeiros 2mL do filtrado.

### Validação do método analítico CLAE

O método foi validado considerando-se os parâmetros estabelecidos pelo guia Q2(R1) da ICH (1996). A *performance* do sistema foi verificada através do desvio padrão relativa (DPR) das áreas obtidas após várias determinações (n=6) de uma solução padrão do fármaco, calculando-se a reprodutibilidade das injeções, o fator de separação (seletividade  $\alpha$ ), o fator de cauda ou simetria do pico (T), os pratos teóricos (eficiência da coluna) e tempo de retenção (TR).

A seletividade foi avaliada observando-se a interferência com os picos de impurezas/ fotoprodutos que aparece com tempo de retenção de  $\pm 0,96$ ; 1,8 e 5,5 minutos, quando utilizado metanol. Dentre os parâmetros cromatográficos avaliados, foram considerados resolução, tempo de retenção e fator de separação.

A precisão intradia foi avaliada como a repetibilidade do método, com a injeção de seis replicatas de cada um dos três padrões 10, 100 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e foi expressa como DPR. A precisão interdias foi analisada pela injeção das três concentrações durante três diferentes dias, sendo expressa como o DPR.

A exatidão foi determinada pela interpolação de replicatas (n=6), da área dos picos das concentrações 10, 100 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em cada caso, o erro sistemático do ensaio foi determinado baseado na porcentagem de inexatidão, tanto intradia como interdias, em três dias diferentes.

Para verificação da linearidade do método, foram preparadas soluções de ACZ (5 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) na fase móvel, empregada no sistema cromatográfico (Moreira; Moraes, 2005) a partir de uma solução padrão de fármaco em HCl 0,01M contendo 1mg mL<sup>-1</sup>. Antes da injeção no sistema cromatográfico, as soluções foram filtradas em membranas Millex 0,45 $\mu\text{m}$ .

O limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração quantificada da curva de calibração com precisão e exatidão aceitáveis, enquanto o limite de detecção (LD), como a menor concentração detectável da curva de calibração, estabelecendo-se com 0,5 vezes o LQ. As determinações foram baseadas na análise de 6 replicatas.

Para avaliação da estabilidade de curta duração, foram analisadas amostras mantidas por 24 horas no rack do autoinjeter, sob temperatura ambiente (25°C).

Fotodegradação forçada de ACZ

#### Irradiação em solução

A fotodegradação da ACZ foi testada em três meios aquosos: água, ácido clorídrico 0,01M e tampão fosfato pH 6,8, além de solvente orgânico (metanol). Assim, foram preparadas as soluções na concentração de  $400\mu\text{g mL}^{-1}$ , que foram filtradas por membrana Millex  $0,45\mu\text{m}$ . As amostras foram transferidas para cubetas de quartzo com 2,5mL de solução e para ampola de vidro com 10mL de solução (ambas hermeticamente fechadas). Além disso, utilizou-se um controle protegido da luz com papel alumínio.

As amostras assim preparadas foram expostas à luz em câmara de fotoestabilidade, durante dois ciclos de 60 horas (120 horas). O tempo de irradiação de 60 horas foi definido mediante a calibração da câmara de fotoestabilidade, utilizando o método actinométrico do quinino e luxímetro, para luz UV e visível respectivamente (ICH, 1996).

#### Irradiação em sólido

Uma amostra de ACZ (sólido) foi passada por tãmis de 0,24mm de abertura (malha 60), sendo o pó, assim classificado, distribuído em placas de vidro de 10cm de diâmetro e colocado em finas camadas (entre 1 e 2mm), a fim de aproveitar a maior incidência de radiação luminosa. Foi, também, utilizado um controle protegido da luz com papel alumínio, durante o ensaio.

As placas foram expostas à luz em câmara de fotoestabilidade durante 3 ciclos de 60 horas (180 horas). O tempo de irradiação de 60 horas foi definido mediante a calibração da câmara de fotoestabilidade.

Após irradiação, foram preparadas soluções de  $400\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando solução diluente e fase móvel acetato de amônia 0,05M pH 3,1: acetonitrila (90:10). A solução preparada foi filtrada em membrana Millex  $0,45\mu\text{m}$  e injetada no cromatógrafo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Desenvolvimento de método e validação

A fase móvel utilizada foi desenvolvida utilizando gradiente de eluição baseando-se no trabalho de Moreira e Moraes (2005). Foi melhorado o fluxo da bomba  $1,3 \text{ mL min}^{-1}$  e diminuída a concentração do acetato de amônia de 0,05M para 0,01M; assim quando utilizadas concentrações menores, se diminui o risco de danificação da coluna e estabiliza-se o método analítico rapidamente, tornando mais eficiente e rápida a análise.

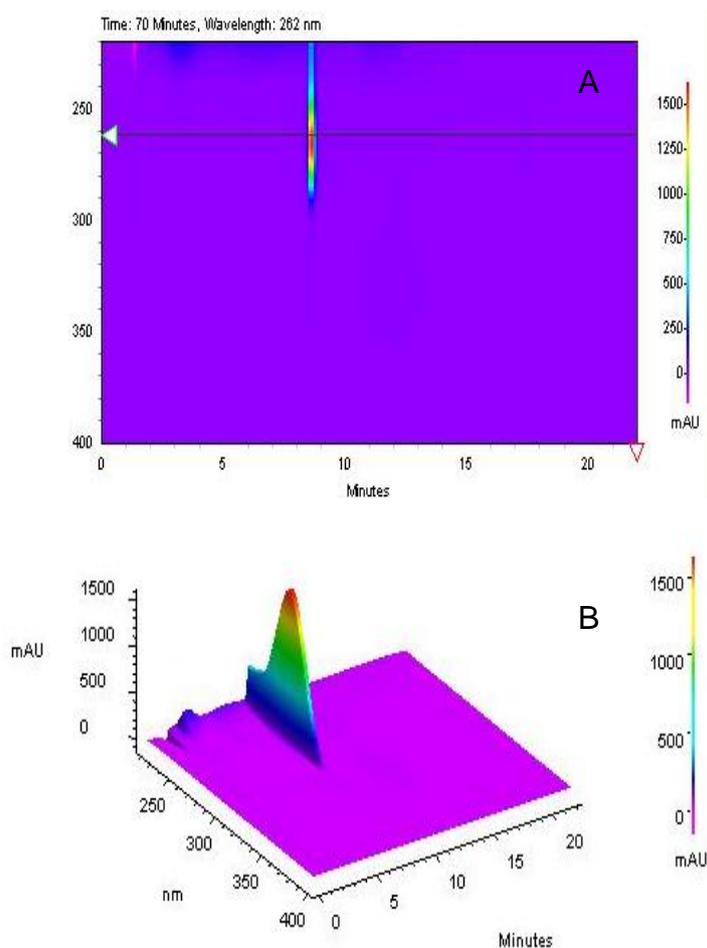
Após adequar satisfatoriamente o método para sua utilização nos estudos de fotoestabilidade, este foi validado para a quantificação de ACZ e para a identificação dos produtos de fotodegradação e impurezas. Os resultados da *performance* do sistema cromatográfico (n=6) são apresentados no QUADRO I, os quais se mostraram adequados e foram avaliados através dos parâmetros: fator de capacidade, número de pratos, fator de cauda e separação entre os picos. Os valores encontraram-se de acordo com o estabelecido pela farmacopeia americana (USP 32, 2009).

**QUADRO I.** Valores da *performance* do sistema utilizado durante o desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação de ACZ e suas impurezas, de acordo com a USP 32

Parâmetro	Critério de aceitação	Resultado
Tempo de retenção	$\pm 8,5$ minutos	8,58
Fator de cauda	Entre 0,8 a 1,5	1,09
Fator de separação com a Imp-3	Mínimo 2,0	2,3
Pratos teóricos	Mínimo: 5.000 pratos/coluna	15.525
Desvio Padrão Relativo (DPR*)	$\text{DPR} \leq 2,0\%$	1,67

\* DPR: desvio padrão relativo

A seletividade do método foi analisada de acordo com a não interferência de três pequenas impurezas que foram separadas. O fator de separação com relação ao pico principal da ACZ foi maior do que dois. Tais impurezas aparecem em quantidades desprezíveis e não sofreram modificação quando a ACZ foi irradiada em meio aquoso. No entanto, quando o fármaco foi irradiado em metanol, houve modificação no perfil das impurezas. Estas foram denominadas Imp-1 ( $TR \pm 0,97\text{min}$ ), Imp-2 ( $TR \pm 1,8\text{min}$ ) e Imp-3 ( $TR \pm 5,5\text{min}$ ). As mesmas, também, foram observadas na varredura do espectro 3D (FIGURA 1).



**FIGURA 1.** Espectros CLAE da ACZ após 60 horas de irradiação utilizando-se metanol. A - espectro nos comprimentos de onda 200 a 400nm e B - cromatograma 3D mostrando o pico principal ACZ e impurezas. Concentração de  $400\mu\text{g mL}^{-1}$  em HCL 0,01M.

**TABELA 1.** Resultados analíticos da precisão e exatidão intradia (repetibilidade) e interdia (intermediária) do método validado para ACZ

Amostra ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Intradia			Interdia		
	Precisão Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	DPR	Exatidão %	Precisão Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	DPR	Exatidão %
10	10,13	0,24	100,31	10,27	0,96	100,10
100	100,04	0,04	100,24	100,08	1,73	100,54
400	400,21	0,06	100,45	400,02	1,69	100,06

De acordo com os valores mostrados na TABELA 1, o método apresentou-se preciso nos dois níveis analisados. A precisão intradia (repetibilidade) apresentou valores de DPR menores do que 1%. Na precisão interdia (intermediária), os resultados em dias diferentes de DPR foram menores a 2%.

Na exatidão, os resultados da concentração mínima  $10\mu\text{g mL}^{-1}$ , da concentração média  $100\mu\text{g mL}^{-1}$ , e para a concentração máxima  $400\mu\text{g mL}^{-1}$  estão descritos na TABELA 1, os quais foram adequados com valores iguais a 100% de recuperação da amostra, demonstrando que o método desenvolvido é exato.

Na linearidade, o coeficiente de correlação obtido foi de  $r^2=0,9987$ . Os valores de  $b$  (inclinação) e  $a$  (intercepto) estão indicados na TABELA 2. A partir da linearidade, foram obtidos os limites de detecção (LD), estabelecidos como  $1\mu\text{g mL}^{-1}$ , e o limite de quantificação (LQ), que foi de  $5\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**TABELA 2.** Resultados da linearidade, obtidos a partir das curvas de calibração da ACZ nas condições do método. Valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

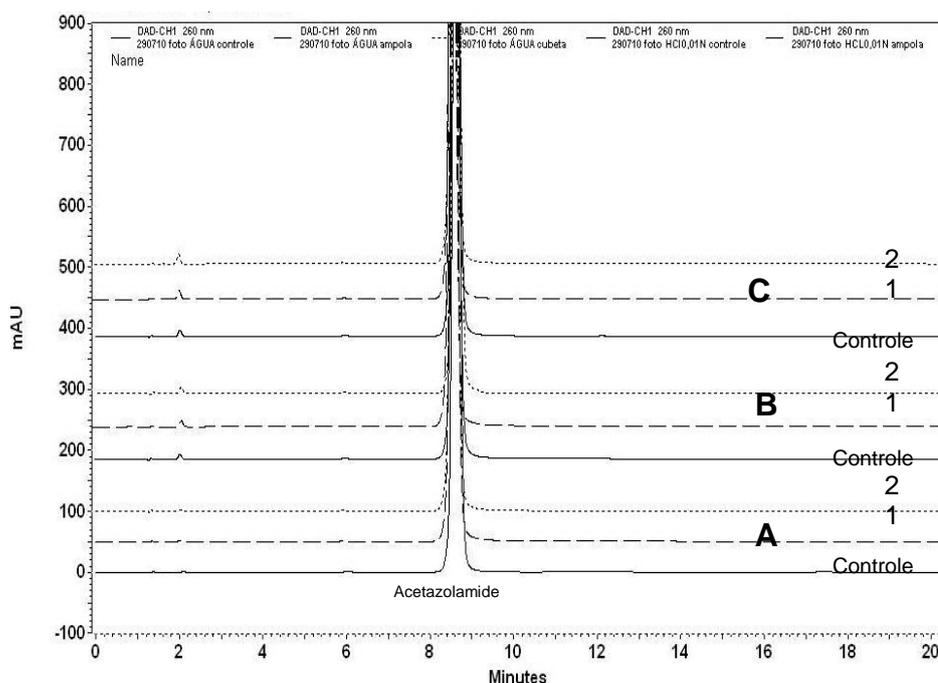
Parâmetros	ACZ
Intervalo de linearidade ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	10,0 – 400,0
Equação da reta ( $y=ax+b$ )	$y=77124x+10575$
Inclinação: b (DPR)	12534,5 (0,27)
Intercepto: a (DPR)	78744,6 (0,02)
Coeficiente de correlação linear ( $r^2$ )	0,9987
LD (DPR)	1,0 (5,60)
LQ (DPR)	5,0 (0,71)

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; DPR: desvio padrão relativo.

A estabilidade de curta duração foi estabelecida pelo armazenamento da solução amostra no rack do autoinjeter por 24 horas. Os resultados da estabilidade mostraram perda de menos de 0,5% da amostra inicial, após análise comparativa com uma amostra recém preparada.

#### Aplicação do método CLAE para os estudos de fotoestabilidade

Os três meios testados (água, HCL 0,01M e tampão fosfato pH 6,8) mostraram boa resolução de pico para ACZ, com tempo de retenção de  $\pm 8,5$  min, como apresentado na FIGURA 2. Por outro lado, esses meios aquosos indicaram boa estabilidade da ACZ frente à radiação luminosa sob as condições propostas.



**FIGURA 2.** Cromatogramas da ACZ após exposição à irradiação luminosa durante 120 horas. A - água, B - HCL 0,01M e C - tampão fosfato pH 6,8, utilizando (1) ampola de vidro 20mL e (2) cubeta de quartzo. Concentração  $400\mu\text{g mL}^{-1}$ .

O tempo de exposição é importante na degradação de uma substância e, segundo o guia Q1B, o mínimo estabelecido para considerar uma degradação forçada deve ser de  $200 \text{ watt/h/m}^2$  de luz ultravioleta e 1,2 milhões/lux/hora de luz visível. Neste estudo, as fontes de luz ultravioleta e luz visível foram calibradas utilizando método actinométrico do quinino e luxímetro, respectivamente, estabelecendo-se o mínimo de 60 horas de irradiação.

Entretanto, para a ACZ, este tempo de irradiação não foi suficiente, para promover a degradação do fármaco e, então, a exposição foi estendida para 120 horas, uma condição bastante drástica de irradiação. No entanto, mesmo após este tempo prolongado de exposição à luz, o fármaco se manteve estável (TABELA 3).

Embora o fármaco apresente elevado potencial para ser fotossensível, a fotodegradação da ACZ foi quase desprezível, quando em meio aquoso, e produtos de fotodegradação não foram detectáveis ou quantificáveis. Em comparação com os estudos de fotoestabilidade descritos na literatura, os resultados deste trabalho

confirmam os dados obtidos por Srinivasu e colaboradores (2010), que reportaram que a ACZ não mostrou degradação frente à luz, durante o período de 10 dias, embora naquela pesquisa não fossem especificadas as condições do teste.

**TABELA 3.** Resultados das porcentagens de recuperação de ACZ após fotodegradação em solução aquosa (120 horas), em metanol (60 horas) e no estado sólido (180 horas)

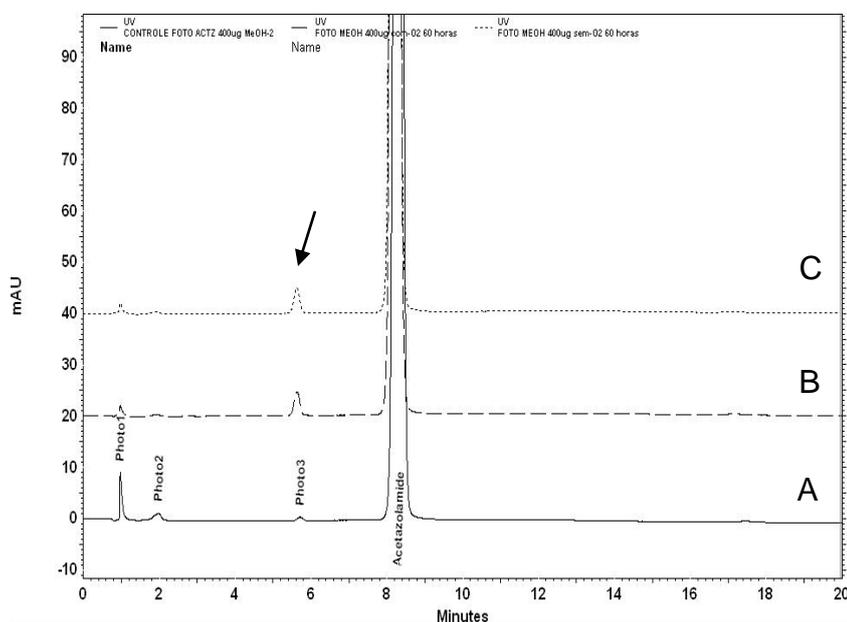
Parâmetro	Média±DPR
Cubeta de quartzo	
Em água	98,00±0,87
Em HCL 0,01M	96,79±0,65
Em tampão fosfato pH 6,8	96,06±0,34
Em Metanol	93,82±0,29
Ampola de vidro	
Em água	99,01±1,29
Em HCL 0,01M	98,21±1,03
Em tampão fosfato pH 6,8	99,49±1,76
Em metanol	93,05±0,71
Fotodegradação em sólido (partículas <240µm)	98,83±1,27

DPR: desvio padrão relativo

É importante acrescentar que não existe um parâmetro específico sobre o limite de quanto um fármaco pode ser degradado após um estudo de fotoestabilidade. Assim, foi considerado o parâmetro estabelecido no guia Q1A(R2) Stability Testing of new drug substances and products, para testes de estabilidade (ICH, 2003). Desta maneira, considerou-se que a ação da luz é significativa quando a degradação resultar em perda maior do que 5% da potência ou do valor da concentração inicial do fármaco.

De acordo como os resultados obtidos, os três meios aquosos tiveram comportamento semelhante na perda de ACZ, que foi menor do que 5% (TABELA 3). O fato da ACZ ter se mostrado fotoestável nos meios aquosos poderia ser respaldado na baixa capacidade que tem estes meios de formar ou atuar como substrato do oxigênio singlete, principal agente que promove reações frente à radiação luminosa.

Por outro lado, com relação aos recipientes utilizados, a amostra irradiada em ampola de vidro se apresentou ligeiramente mais estável, conseguindo-se recuperar até 99,4%, para as cubetas de quartzo, a recuperação foi de  $\pm 98,0\%$ . A diferença da degradação de ambos os recipientes, possivelmente estaria fundamentada pela presença de ar (oxigênio) e nos diferentes comprimentos de onda que cada tipo de recipiente absorve, embora a quantidade degradada não seja significativa em ambos os casos.



**FIGURA 3.** Cromatogramas da ACZ e suas impurezas após irradiação luminosa, durante 60 horas. A - controle ACZ 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , B - ampola de vidro 20mL, C - cubeta de quartzo. Concentração 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol.

Porém, quando o fármaco foi exposto à luz em metanol, a ACZ mostrou-se menos fotoestável, obtendo-se recuperação de  $\pm 93\%$  da concentração inicial do

fármaco, com conseqüente aumento das impurezas (FIGURA 3). As impurezas, denominadas, Imp-1 (TR±0,97min) e Imp-2 (TR± 1,8min), sofreram diminuição da sua concentração.

Para a Imp-3 (TR±5,5min), houve incremento de 0,08% para 0,657% (TABELA 4), e, neste caso, é possível afirmar que a mesma esteja diretamente ligada à fotodegradação do fármaco em meio orgânico. Os meios orgânicos em presença de oxigênio desencadeiam reações radicalares neste caso com o radical metoxi do metanol. Nestas reações ocorre formação do oxigênio singleto, principal agente da fotodegradação de uma molécula, quando em meio orgânico.

**TABELA 4.** Resultados da quantificação das três impurezas da ACZ, após fotodegradação em metanol, solução 400µg mL<sup>-1</sup>

Picos	TR (min)	Média das porcentagens ± DPR, relativas à concentração inicial da ACZ	
		0 horas	60 horas
Imp-1	0,97	0,987±0,03	0,336±0,07
Imp-2	1,8	0,292±0,06	0,068±0,08
Imp-3	5,5	0,082±0,02	0,657±0,04

DPR: desvio padrão relativo

Nos estudos de fotoestabilidade, o uso do meio de reação ou solvente adequado é de fundamental importância. Meios aquosos apresentam um comportamento adequado para o desenvolvimento dos ensaios, uma vez que existe pouca ou nenhuma possibilidade de interação fármaco-solvente. Porém, este não é o caso dos meios orgânicos (polares ou apolares), os quais podem fornecer resultados pouco reais principalmente sobre o mecanismo de reação e de fragmentação da molécula (MOORE, 2004).

Os dados aqui relatados confirmam os resultados obtidos por Vargas e colaboradores (1998), que mostraram que a ACZ é fotossensível em comprimento de onda UV-B (300nm) e UV-A (337nm), sob condições aeróbias e anaeróbias, respectivamente, utilizando como solvente metanol. Os autores propuseram um mecanismo de fotossensitização da molécula, que envolve reação do oxigênio singleto e processos de foto-oxidação.

A formação do oxigênio singleto ocorre quando o oxigênio molecular (de mais baixa energia) recebe grande quantidade de energia e se converte em uma espécie eletronicamente excitada, apresentando dois elétrons emparelhados, que podem estar num mesmo orbital ou em orbitais diferentes. Trata-se de uma molécula extremamente reativa, que pode ser gerada indiretamente pela transferência de energia de uma molécula excitada por luz visível ou ultravioleta (COSA, 2004; MOORE, 2004).

Por outro lado, a utilização de alguns solventes orgânicos possibilita a formação de fotoprodutos que, em outras condições, não seriam observados. Como exemplo, pode ser citada a fotólise da cloroquina em presença de isopropanol (NORD; KARLESEN; TØNNESEN, 1991), que favoreceu a formação de produtos de fotodegradação, diferentemente do observado quando foi usada água.

Considerando os resultados aqui obtidos e, ao mesmo tempo, o trabalho de Vargas e colaboradores (1998), o uso do metanol provavelmente contribuiu para a formação de radicais metoxi, os quais são altamente reativos (ALSANTE *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, promoveu a formação de oxigênio singleto. Isto se deve à presença de energia, fornecida pela radiação luminosa, somado ao fato das moléculas se encontrarem em estado excitado, ocorrendo transferência eletrônica e reações de fotodegradação. Por outro lado, as amostras da ACZ no estado sólido não apresentaram fotodegradação após 120 horas de exposição.

Finalmente, os estudos aqui desenvolvidos mostraram claramente as condições sob as quais o fármaco em estudo é sensível à luz. Utilizando as fontes de luz da opção 2 do guia Q1B (ICH,1996), a ACZ é sensível quando analisada em metanol, na qual, foi observada formação de produto de fotodegradação. Entretanto, em meios aquosos, mostrou-se estável frente à radiação luminosa.

#### 4. CONCLUSÕES

O método CLAE, desenvolvido e validado para avaliação da ACZ, mostrou-se adequado para a quantificação do fármaco, obtendo-se ótima linearidade, precisão, exatidão e seletividade.

Segundo as condições do guia Q1B, a fotoestabilidade da ACZ se manteve, quando submetida à radiação luminosa utilizando meios aquosos e no estado sólido. No entanto, a fotoestabilidade da ACZ foi afetada na presença de metanol e três impurezas foram quantificadas.

#### REFERÊNCIAS

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

CAMPÍNS-FALCÓ, P.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; SEVILLANO-CABEZA, A. Application of column-switching techniques to the determination of medium polarity drugs: determination of acetazolamide in urine. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**. v. 654, p. 85-90, 1994.

COSA, G. Photodegradation and photosensitization in pharmaceutical products: Assessing drug phototoxicity. **Pure and Applied Chemistry**. v. 76, n. 2, p. 263-275. IUPAC. 2004.

GUCHELAAR, H.J., CHANDI, L., SCHOUTEN, O., VAN DEN BRAND, W.A. A high performance liquid chromatographic method for the screening of 17 diuretics in human urine. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. v. 363, p.700-705, 1999.

HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; CAMPÍNS-FALCÓ, P.; SEVILLANO-CABEZA, A. Determination of acetazolamide in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the presence of xanthenes. **Journal of Chromatography**. v.582, p.181-187, 1992.

ICHIKAWA, N.; NAORA, K.; HIRANO, H.; IWAMOTO, K. Quantitation of acetazolamide in rat plasma, brain tissue and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.17, p. 1415-1421, 1998.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Stability Q1A - Q1F. **Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products**. 1996. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf). Acesso em: 15 set. 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Stability Q1A - Q1F. **Q1A(R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products**. 2003. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf). Acesso em: 07 ago. 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and methodology**. 1996. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf). Acesso em: 02 jun. 2010.

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

MOORE, D.E. Photophysics and photochemical: aspects of drug stability. In: TØNNESEN, H.H., ed. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004a. cap.2, p.10-40.

MOREIRA, V.; MORAES, R.L.M. Liquid Chromatographic Screening Test for Some Diuretics of Doping Interest in Human Urine. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v.28, p. 2753-2768, 2005.

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

PIECHOCKI, J.; THOMA, K. **Pharmaceutical photostability and stabilization technology**. Nova Iorque: Informa healthcare, 2007. p. 298-300.

SRINIVASU, P.; SUBBARAO, D.V.; VEGESNA, R.V.K.; BABU K.S. A validated stability-indicating LC method for acetazolamide in the presence of degradation products and its process-related impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 52, p.142-148, 2010.

UNITED States Pharmacopeia: 32; The National Formulary: 27. Rockville: United States pharmacopeial Convention, 2009. v.2, p.1417-1419.

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

VALENCIA, C.U., TOBÓN, E. A., FIGUEREDO, F., HENAO, D. P. Fototoxicidade de medicamentos sulfas y su reactividade frente al oxígeno molecular singulete. **Revista de la Sociedad Química del Perú**. v.74, n. 4, p.311-322, 2008.

WISTRAND, P.J. The use of carbonic anhydrase inhibitors in ophthalmology and Medicine. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 429, p.609-619, 1984.

ZARGHI, A.; SHAFATI, A. Rapid determination of acetazolamide in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 28, p.169-172, 2002.

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