

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ISABELA PIANNA VERONEZ BISSA

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO EM FORMAS FARMACÊUTICAS  
SÓLIDAS DE USO ORAL PARA OS FÁRMACOS DESLORATADINA  
E ETINILESTRADIOL**

**Alfenas/MG**

**2013**

ISABELA PIANNA VERONEZ BISSA

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO EM FORMAS FARMACÊUTICAS  
SÓLIDAS DE USO ORAL PARA OS FÁRMACOS DESLORATADINA  
E ETINILESTRADIOL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Controle Físico-Químico e Microbiológico de Fármacos, Cosméticos e Toxicantes.

Orientador: Prof. Dr. Marcello G. Trevisan

Co-orientadora: Profa. Dra. Jerusa S. Garcia

**Alfenas/MG**

**2013**

Bissa, Isabela Pianna Veronez

Estudos de pré-formulação em formas farmacêuticas sólidas de uso oral para os fármacos desloratadina e etinilestradiol / Isabela Pianna Veronez Bissa. - 2013.

157 f. -

Orientador: Marcello Garcia Trevisan

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Preparações Farmacêuticas. 2. Excipientes Farmacêuticos. 3. Antagonistas dos Receptores Histamínicos. 4. Etinilestradiol. I. Trevisan, Marcello Garcia. II. Título.

CDD: 615.1

ISABELA PIANNA VERONEZ BISSA

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO EM FORMAS FARMACÊUTICAS  
SÓLIDAS DE USO ORAL PARA OS FÁRMACOS DESLORATADINA  
E ETINILESTRADIOL**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Controle Físico-Químico e Microbiológico de Fármacos, Cosméticos e Toxicantes.

Aprovada em 29 de abril de 2013.

Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcello Garcia Trevisan  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof<sup>o</sup>. Dr. Marco Antônio Schiavon  
Instituição: UFSJ

Assinatura:

Prof<sup>o</sup>. Dr. Antonio Carlos Doriguetto  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

*Dedico este trabalho ao meu amor Rodrigo, que  
sempre acreditou em mim, que me incentivou a ir a  
busca dos meus sonhos e que suportou a  
ausência e a saudade.  
Tu és parte desta conquista!  
Te amo!*

*“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo  
impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas  
realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando  
porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu”.*

(Luiz Fernando Veríssimo)

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao realizar esta caminhada, seria impossível concluí-la sem pessoas que realmente acreditaram em mim e que, de várias formas, contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade.*

*Primeiramente agradeço a Deus, pois sem Ele nada seria possível.*

*Ao meu amor Rodrigo por sua paciência e estímulos nos momentos difíceis que não foram poucos.*

*Aos meus pais, Luiza e Ruberli, pelo incentivo e aos demais familiares que me ajudaram muito quando precisei.*

*Ao Prof. Dr. Marcello G. Trevisan e à Profa. Dra. Jerusa S. Garcia pela orientação e empenho para sanar todas as dificuldades.*

*Aos demais professores, funcionários da Universidade e aos companheiros de trabalho do LACFar que, direta ou indiretamente, me ajudaram no decorrer desta jornada.*

*Agradeço à Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG pelas oportunidades concedidas para a realização deste trabalho.*

*À FAPEMIG e CNPQ pelo suporte financeiro.*

*À CAPES pela bolsa de estudos concedida.*

*Aos laboratórios farmacêuticos Aché e Eurofarma, pelas matérias-primas cedidas.*

*Ao Instituto de Química da Unicamp e ao Laboratório de Cristalografia da Unifal-MG pelas medidas realizadas.*

*Aos amigos pela amizade e contribuições durante todo o período de desenvolvimento do trabalho. Em especial a família Polichinelo, Letícia, Cibelle, Aninha e Josi, minhas companheiras de república, de conversas e risadas e que estiveram presentes em quase todos os momentos me dando força e incentivo para continuar.*

*Agradeço também a minha amiga Lailah pelo acolhimento, apoio e companheirismo sempre. Amiga de todas as horas!*

*Aos membros da comissão examinadora, que dedicaram tempo e atenção na correção de meu trabalho e, de quem aguardo críticas e sugestões.*

*A todos, muito obrigada!*

## RESUMO

A pré-formulação farmacêutica é uma importante etapa na pesquisa e desenvolvimento de novas formulações. A aplicação de técnicas termoanalíticas nessa etapa tem se ampliado, em particular a calorimetria exploratória diferencial (DSC), sendo descrita como uma técnica rápida e apropriada para o controle de qualidade e o desenvolvimento de novos medicamentos. Neste trabalho a análise térmica e outras técnicas complementares foram aplicadas em estudos de pré-formulação como a caracterização de fármacos, o estudo de compatibilidade fármaco-excipiente e o desenvolvimento e avaliação de dispersões sólidas. O anti-histamínico desloratadina (DL) foi completamente caracterizado utilizando seis diferentes técnicas analíticas. Estudos de compatibilidade fármaco-excipiente também foram conduzidos para esse fármaco e os excipientes estudados foram o fosfato de cálcio dibásico anidro, celulose microcristalina, amido de milho, talco farmacêutico, manitol, estearato de magnésio, polivinilpirrolidona K25 (PVP), ácido esteárico e lactose anidra. Os resultados de DSC sugeriram que os excipientes celulose microcristalina, estearato de magnésio, ácido esteárico e lactose anidra apresentam possíveis interações com o princípio ativo através do desaparecimento ou da alteração na entalpia de fusão do fármaco. Na análise por cromatografia líquida esses resultados foram confirmados pelo aparecimento de picos correspondentes a produtos de degradação nas amostras das misturas contendo esses excipientes. O hormônio etinilestradiol (EE) foi caracterizado e diferentes processos para desenvolvimento de uma dispersão sólida deste com excipientes farmacêuticos foram avaliados utilizando a técnica de DSC e PXRD. Os resultados evidenciaram que os processos envolvendo o uso geral de solventes combinados com excipientes como o PVP foram eficazes para garantir a dispersão sólida do princípio ativo EE, fator importante para aumentar a solubilidade e homogeneidade do fármaco em formulações farmacêuticas sólidas.

**Palavras-chave:** Caracterização de estado sólido. Estudo de compatibilidade. Dispersão sólida. Pré-formulação. Desloratadina. Etinilestradiol.

## ABSTRACT

Pre-formulation is an important stage in the research and development of new pharmaceutical formulations. The application of thermoanalytical techniques has been extended, in particular the differential scanning calorimetry (DSC), which is described as fast and suitable for quality control and development of new drugs. The aim of this study was to apply the thermal analysis and complementary techniques in pre-formulation studies as characterization of drugs, the compatibility study of drug-excipient and development and evaluation of solid dispersions. Desloratadine (DL), an antihistamine which has been widely used to treat allergic symptoms and stand out from other drugs in this therapeutic class by not showing sedative effects was fully characterized using six different techniques. Compatibility studies drug-excipient was also conducted. The excipients studied were dibasic calcium phosphate anhydrous, microcrystalline cellulose, corn starch, talc pharmaceutical, mannitol, magnesium stearate, polyvinylpyrrolidone K25 (PVP), stearic acid and anhydrous lactose. The DSC results suggested that the excipients microcrystalline cellulose, magnesium stearate, stearic acid and anhydrous lactose have possible interactions with the active ingredient through the disappearance or the change in enthalpy of fusion of the drug. In liquid chromatography analysis these results were confirmed by the appearance of peaks corresponding to the degradation products in the samples containing mixtures of these excipients. Ethinyl estradiol (EE) is an estrogenic component in oral contraceptives. It is present small dosages, difficult of low solubility and content uniformity. In this study, several processes to development of a solid dispersion with pharmaceutical excipients were evaluated using the technique of PXRD and DSC. The results showed that the process involving the use of solvents generally combined with excipients such as PVP have been effective in ensuring the dispersion of solid active ingredient EE, an important factor to increase the solubility and homogeneity of the drug in solid dosage formulations.

**Keywords:** Solid state Characterization. Compatibility studies. Solid dispersion. Pre-formulation. Desloratadine. Ethinyl estradiol.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> - Calorimetria Exploratória Diferencial
TG	<i>Termogravimetry</i> - Termogravimetria
DL	<i>Desloratadine</i> - Desloratadina
SNC	Sistema Nervoso Central
EE	<i>Ethinyl estradiol</i> - Etinilestradiol
PXRD	<i>Powder X-ray Diffraction</i> - Difração de raios X por pó
SEM	<i>Scanning Eletron Microscopy</i> - Microscopia Eletrônica de Varredura
FT-IR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> - Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IPEC	<i>International Pharmaceutical Excipients Council</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i> - Conferência Internacional de Harmonização
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
pH	Potencial Hidrogeniônico
LC	<i>Liquid cromatography</i> - Cromatografia Líquida
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
DTG	<i>Derivative Termogravimetry</i> - Termogravimetria Derivada
ICDD	<i>International Center for Diffraction Data</i>
NIR	<i>Near infrared</i> - Infravermelho próximo
MID	<i>Middle infrared</i> - Infravermelho médio
FAR	<i>Far infrared</i> - Infravermelho distante
IgE	Anticorpos específicos Imunoglobulina E
KBr	Brometo de potássio
CDSC	<i>Cyclic Differential Scanning Calorimetry</i> - Calorimetria Exploratória Diferencial Cíclica
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> - Farmacopeia Americana
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema de um calorímetro com compensação de potência.....	38
<b>Figura 2</b> - Esquema de um calorímetro com fluxo de calor (A); Foto de um disco termoelétrico (B).....	39
<b>Figura 3</b> - Esquema de uma termobalança (A); Foto do equipamento (B). ....	43
<b>Figura 4</b> - Modelo simplificado das condições de equilíbrio dos dois estados, ativo e inativo, do receptor H1 da histamina. ....	54
<b>Figura 5</b> - Estrutura química da desloratadina.....	55
<b>Figura 6</b> - Curvas DSC e TG da desloratadina.....	64
<b>Figura 7</b> - Curvas TG/DTG da desloratadina.....	65
<b>Figura 8</b> - DSC cíclico da desloratadina.....	66
<b>Figura 9</b> - Difratoograma de raios X da desloratadina antes (linha preta) e após (linha vermelha) o DSC cíclico.....	68
<b>Figura 10</b> - Fotomicrografias de SEM da desloratadina antes do DSC cíclico.....	68
<b>Figura 11</b> - Fotomicrografias de SEM da desloratadina após o DSC cíclico.....	69
<b>Figura 12</b> - Espectro de infravermelho médio da DL antes do CDSC (A) e após o CDSC (B). ....	70
<b>Figura 13</b> - Região de impressão digital do espectro da DL.....	71
<b>Figura 14</b> - Espectro Raman da DL antes do CDSC (A) e após o CDSC (B).....	72
<b>Figura 15</b> - Curvas DSC de todos os excipientes usados no estudo de compatibilidade. ....	73
<b>Figura 16</b> - Curvas DSC da desloratadina e das misturas binárias fármaco-excipiente. ....	76
<b>Figura 17</b> - Curvas DSC da DL, celulose microcristalina e mistura binária. ....	78
<b>Figura 18</b> - Curvas DSC da DL, lactose anidra e mistura binária. ....	79
<b>Figura 19</b> - Curvas DSC da DL, estearato de magnésio e mistura binária. ....	81
<b>Figura 20</b> - Curvas DSC da DL, ácido esteárico e mistura binária.....	82
<b>Figura 21</b> - Estrutura química do produto de degradação N-formil-desloratadina. ...	83
<b>Figura 22</b> - Reação de Maillard entre o grupo amina do fármaco e um açúcar redutor com formação do produto de degradação N-formil-desloratadina (Fonte: Adaptado de WIRTH <i>et al</i> , 1998).....	84

<b>Figura 23</b> - Imagens obtidas da matéria-prima DL antes de iniciar o experimento (A) e após armazenamento em frascos fechados (B) e abertos (C) sob condições forçadas durante 3 meses.....	85
<b>Figura 24</b> - Imagens obtidas do excipiente fosfato de cálcio bibásico (FCB) e da mistura binária.....	85
<b>Figura 25</b> - Imagens obtidas do excipiente celulose microcristalina (CLM) e da mistura binária.....	85
<b>Figura 26</b> - Imagens obtidas do excipiente amido de milho (AMD) e da mistura binária. ....	86
<b>Figura 27</b> - Imagens obtidas do excipiente talco farmacêutico (TAL) e da mistura binária. ....	86
<b>Figura 28</b> - Imagens obtidas do excipiente manitol (MAN) e da mistura binária.....	86
<b>Figura 29</b> - Imagens obtidas do excipiente estearato de magnésio (EST) e da mistura binária.....	86
<b>Figura 30</b> - Imagens obtidas do excipiente polivinilpirrolidona (PVP) e da mistura binária. ....	87
<b>Figura 31</b> - Imagens obtidas do excipiente ácido esteárico (ACE) e da mistura binária. ....	87
<b>Figura 32</b> - Imagens obtidas do excipiente lactose anidra (LAC) e da mistura binária. ....	87
<b>Figura 33</b> - Curvas DSC das substâncias utilizadas no estudo após armazenamento durante 3 meses sob condições forçadas (calor seco – frasco fechado). ....	89
<b>Figura 34</b> - Curvas DSC das misturas binárias preparadas para o estudo e armazenadas durante 3 meses sob condições forçadas (calor seco – frasco fechado). ....	91
<b>Figura 35</b> - Curvas DSC das misturas binárias preparadas para o estudo e armazenadas durante 6 meses sob condições forçadas (calor seco – frasco fechado). ....	91
<b>Figura 36</b> - Curvas DSC das substâncias utilizadas no estudo após armazenamento durante 3 meses sob condições forçadas (calor úmido – frasco aberto) .....	92
<b>Figura 37</b> - Curvas DSC das misturas binárias preparadas para o estudo e armazenadas durante 3 meses sob condições forçadas (calor úmido – frasco aberto).....	93

<b>Figura 38</b> - Curvas DSC das misturas binárias preparadas para o estudo e armazenadas durante 6 meses sob condições forçadas (calor úmido – frasco aberto).....	93
<b>Figura 39</b> - Cromatograma da desloratadina analisada por LC utilizando coluna C18, eluição gradiente, fase móvel A (aquosa) e B (acetonitrila), vazão de 1 mL.min <sup>-1</sup> em 267 nm. ....	94
<b>Figura 40</b> – Curva de calibração obtida por HPLC para a DL no comprimento de onda de 267 nm. ....	95
<b>Figura 41</b> – Cromatograma da DL no tempo inicial e após 3 e 6 meses sob condições forçadas de temperatura e umidade (calor seco: 40°C e calor úmido: 40°C e 75% UR).....	97
<b>Figura 42</b> - Cromatograma da DL no tempo inicial e das misturas binárias de DL com cada um dos excipientes estudados após 3 meses a 40°C (calor seco).....	99
<b>Figura 43</b> - Estrutura química do núcleo ciclopentano-fenantreno. ....	105
<b>Figura 44</b> - Estrutura química do etinilestradiol. ....	108
<b>Figura 45</b> - Curvas DSC e TG do etinilestradiol.....	117
<b>Figura 46</b> - Ampliação da curva DSC do etinilestradiol na região entre 50°C e 190°C a fim de demonstrar o segundo evento térmico ocorrido em 143,2°C.....	118
<b>Figura 47</b> - Curvas TG/DTG do etinilestradiol.....	119
<b>Figura 48</b> - Difratoograma de raios X do Etinilestradiol. ....	119
<b>Figura 49</b> - Fotomicrografias de SEM do etinilestradiol obtida no aumento de 10.000x. ....	120
<b>Figura 50</b> - Espectro de infravermelho obtido para o etinilestradiol.....	121
<b>Figura 51</b> - Curvas DSC para as amostras dos ensaios EE-Solvente.....	122
<b>Figura 52</b> - Difratoogramas das amostras dos ensaios EE-Solvente. ....	123
<b>Figura 53</b> - Curvas DSC das substâncias puras e misturas físicas fármaco-excipientes. (AMD = Amido pré-gelatinizado, CLM = Celulose microcristalina, LAC = Lactose anidra, PVP = Polivinilpirrolidona).....	124
<b>Figura 54</b> - Difratoogramas das substâncias puras e misturas físicas fármaco-excipientes. (AMD = Amido pré-gelatinizado, CLM = Celulose microcristalina, LAC = Lactose anidra, PVP = Polivinilpirrolidona).....	126
<b>Figura 55</b> - Curvas DSC do EE e dos materiais contendo amido.....	128
<b>Figura 56</b> - Difratoogramas do EE, amido e dos materiais contendo amido.....	129
<b>Figura 57</b> - Curvas DSC dos materiais contendo celulose microcristalina. ....	130

<b>Figura 58</b> - Difractogramas do EE, celulose microcristalina e dos materiais contendo celulose microcristalina. ....	131
<b>Figura 59</b> - Curvas DSC do EE e dos materiais contendo lactose anidra. ....	132
<b>Figura 60</b> - Difractogramas do EE, lactose anidra e dos materiais contendo lactose anidra. ....	133
<b>Figura 61</b> - Curvas DSC d EE e dos materiais contendo PVP.....	134
<b>Figura 62</b> - Difractogramas do EE, PVP e dos materiais contendo PVP.....	135
<b>Figura 63</b> - Curvas DSC do fármaco, excipiente, mistura física e dispersões sólidas. ....	137
<b>Figura 64</b> - Curvas TG do fármaco, excipiente, mistura física e dispersões sólidas. ....	137
<b>Figura 65</b> - Difractogramas do EE, PVP, mistura física e dispersões sólidas. ....	138
<b>Figura 66</b> - Espectros de FT-IR do EE, PVP, Mistura física e dispersões sólidas. .	139
<b>Figura 67</b> - Curvas DSC para as DS preparadas com o solvente Etanol (A) e Acetona (B) após armazenamento sob condições forçadas durante 90 dias.....	140
<b>Figura 68</b> - Difractogramas para as DS preparadas com o solvente Etanol (A) e Acetona (B) após armazenamento sob condições forçadas durante 90 dias.....	140
<b>Figura 69</b> - Espectros de infravermelho obtidos para as DS preparadas com o solvente Etanol (A) e Acetona (B) após armazenamento sob condições forçadas durante 90 dias.....	141

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Aspectos relacionados à estabilidade.....	24
<b>Tabela 2</b> - Tipos e principais objetivos e finalidade dos estudos de estabilidade. ....	27
<b>Tabela 3</b> - Transformações envolvendo processos endotérmicos e exotérmicos.....	37
<b>Tabela 4</b> – Fatores instrumentais e características da amostra que podem influenciar na curva TG.....	42
<b>Tabela 5</b> - Excipientes utilizados nos estudos de compatibilidade.....	57
<b>Tabela 6</b> - Programa gradiente para análise da DL .....	63
<b>Tabela 7</b> - Entalpia e $T_{\text{onset}}$ para desloratadina isolada. ....	74
<b>Tabela 8</b> - Dados térmicos obtidos por DSC do evento de fusão da DL nas diferentes misturas físicas ( $n=3$ ). ....	75
<b>Tabela 9</b> - Análise de variância para o efeito das misturas binárias sobre o valor médio de entalpia. ....	76
<b>Tabela 10</b> - Média dos valores de entalpia para a DL isolada e as misturas binárias. ....	77
<b>Tabela 11</b> - Dados térmicos obtidos por DSC do evento de fusão da DL para o fármaco isolado e nas diferentes misturas físicas após armazenamento em câmara de estabilidade durante 3 e 6 meses.....	88
<b>Tabela 12</b> - Resultados obtidos na construção da curva de calibração. ....	96
<b>Tabela 13</b> - Dados obtidos por LC para DL após 3 e 6 meses a 40 °C e 75 % UR. ....	97
<b>Tabela 14</b> - Dados obtidos por LC do pico cromatográfico da DL para o fármaco isolado e nas diferentes misturas binárias após armazenamento em câmara de estabilidade durante 3 meses.....	98
<b>Tabela 15</b> - Dados obtidos por LC do pico cromatográfico da DL para o fármaco isolado e nas diferentes misturas binárias após armazenamento em câmara de estabilidade durante 6 meses.....	100
<b>Tabela 16</b> - Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS).....	109
<b>Tabela 17</b> - Dados térmicos obtidos por DSC para o evento de fusão do EE para o fármaco isolado e para as diferentes misturas físicas.....	125
<b>Tabela 18</b> - Dados térmicos obtidos por DSC para o evento de fusão do EE nos materiais preparados no estudo. ....	127

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>19</b>
<b>3 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Estabilidade de Fármacos e Medicamentos .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Estudos de Compatibilidade Fármaco-Excipiente.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Caracterização Físico-Química de Fármacos .....</b>	<b>32</b>
3.3.1 Polimorfismo de fármacos.....	33
<b>4 TÉCNICAS ANALÍTICAS EM ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Análise Térmica Aplicada a Formulações Farmacêuticas .....</b>	<b>35</b>
4.1.1 Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC .....	37
4.1.2 Termogravimetria - TG .....	41
<b>4.2 Técnicas Complementares.....</b>	<b>44</b>
4.2.1 Difractometria de raios X por pó - PXRD.....	44
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura - SEM.....	45
4.2.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho – FT-IR.....	46
4.2.4 Espectroscopia Raman .....	48
4.2.5 Cromatografia Líquida - LC .....	50
<b>5 APLICAÇÃO 1: DESLORATADINA .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1 Histamina e Doenças Alérgicas.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2 Agentes Anti-Histamínicos .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3 Desloratadina .....</b>	<b>55</b>
<b>5.4 Parte Experimental.....</b>	<b>56</b>
5.4.1 Materiais e Equipamentos .....	56
5.4.2 Métodos.....	58
<b>5.5 Resultados e Discussão.....</b>	<b>63</b>
5.5.1 Caracterização da Desloratadina .....	63

5.5.2 Estudo de compatibilidade entre a desloratadina e excipientes farmacêuticos .....	72
5.5.3 Estudo de estabilidade acelerada.....	82
5.5.4 Avaliação da compatibilidade e estabilidade da DL por Cromatografia Líquida.....	94
<b>5.6 Conclusões.....</b>	<b>102</b>
<b>6 APLICAÇÃO 2: ETINILESTRADIOL.....</b>	<b>104</b>
<b>6.1 Hormônios Estrógenos .....</b>	<b>104</b>
<b>6.2 Anticoncepcionais Orais .....</b>	<b>106</b>
<b>6.3 Etinilestradiol .....</b>	<b>107</b>
<b>6.4 Dispersões Sólidas .....</b>	<b>109</b>
<b>6.5 Parte Experimental.....</b>	<b>112</b>
6.5.1 Materiais e Equipamentos .....	112
6.5.2 Métodos .....	113
<b>6.6 Resultados e Discussão.....</b>	<b>116</b>
6.6.1 Caracterização do Etinilestradiol .....	116
6.6.2 Desenvolvimento de dispersões sólidas de Etinilestradiol .....	121
6.6.3 Caracterização e estudo de estabilidade de dispersões sólidas de Etinilestradiol e PVP .....	136
<b>6.7 Conclusões .....</b>	<b>141</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>143</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o comércio mundial de produtos farmacêuticos apresentou crescimento que atraiu a atenção de autoridades reguladoras e da indústria farmacêutica de diversos países, isso porque há uma preocupação relacionada aos aspectos técnicos e científicos do registro de medicamentos, para que esses atendam aos parâmetros exigidos de segurança, eficácia e qualidade (SHAH; AGNIHOTRI, 2011).

O medicamento é um produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É um produto que tem um alto valor agregado, tanto do ponto de vista de desenvolvimento tecnológico como de conhecimento aplicado. Para que um medicamento chegue ao mercado são necessários que se apresentem às agências regulatórias estatais os dados de segurança e eficácia do mesmo (BRASIL, 1973).

A pré-formulação farmacêutica é uma importante etapa na pesquisa e desenvolvimento de novas formulações, compreendendo etapas de caracterização físico-química do fármaco de interesse e ensaios analíticos de compatibilidade e/ou estabilidade de novos produtos (SHAH; AGNIHOTRI, 2011; GIBSON, 2004). Nessa etapa o excipiente é objeto de preocupação, uma vez que incompatibilidades entre os componentes de uma formulação podem levar a diminuição da potência do fármaco, formação de complexos ou interação ácido/base. Além disso, os estudos de estabilidade de formulações farmacêuticas são necessários por ser uma exigência das autoridades sanitárias para a aprovação do registro de uma nova formulação (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011; OMS, 2012).

O estudo de estabilidade de formulações farmacêuticas compreende a avaliação da qualidade, segurança e eficácia exigidas para o registro sanitário de produtos farmacêuticos. A determinação deste parâmetro fundamenta-se não apenas no cumprimento de exigências legais, mas, também, na preocupação com a saúde pública, uma vez que a instabilidade pode estar relacionada à perda do efeito terapêutico ou à exposição do consumidor aos efeitos tóxicos de produtos de degradação.

Outro fator que deve ser considerado durante a etapa de pré-formulação é a solubilidade do fármaco em água. Apesar do avanço nos estudos de outras vias

para administração de medicamentos, a via oral continua sendo a preferencial. Portanto, a grande maioria das novas moléculas tem por finalidade serem incorporadas em formas farmacêuticas sólidas orais que lhes permitam uma dissolução e absorção reprodutíveis e adequadas à obtenção das concentrações plasmáticas necessárias para a obtenção do efeito terapêutico pretendido (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007). No entanto, muitas destas moléculas são pouco solúveis em água, apresentando uma fraca absorção após administração oral. Sendo assim, um dos maiores desafios com que a indústria farmacêutica atualmente se depara, consiste em desenvolver estratégias para melhorar a solubilidade destes fármacos em água, melhorando assim a sua biodisponibilidade (VIPAGUNTA et al, 2006). Uma alternativa ainda não muito comum nos produtos comerciais, mas que tem sido bastante estudada refere-se ao desenvolvimento de dispersões sólidas do fármaco de interesse, a qual consiste em dispersar uma ou mais substâncias ativas em uma matriz hidrofílica, com o intuito de aumentar a área superficial, resultando numa maior taxa de dissolução e conseqüentemente melhor biodisponibilidade (BIKIARIS et al, 2005).

O desenvolvimento de dispersões sólidas como uma ferramenta para melhorar a dissolução e garantir a biodisponibilidade adequada de determinado fármaco constitui uma etapa importante no planejamento de novas formulações uma vez que problemas de solubilidade e dissolução podem acarretar em efeito terapêutico abaixo do esperado ou toxicidade relacionada. Dessa forma, a realização destes estudos é de grande importância no que se refere à segurança de medicamentos (VIPAGUNTA et al, 2006; BIKIARIS et al, 2005).

Nos últimos anos, a aplicação de técnicas termoanalíticas na fase de pré-formulação tem se ampliado, em particular a calorimetria exploratória diferencial (DSC), sendo descrita como uma técnica rápida e apropriada para o controle de qualidade e o desenvolvimento de novos medicamentos. Entretanto, a associação da DSC com outras técnicas possui vantagens como o fornecimento de resultados mais apurados, a partir da interpretação dos fenômenos térmicos observados (JÚLIO et al, 2012). A termogravimetria (TG) juntamente com a DSC pode ser utilizada, por exemplo, na compreensão dos mecanismos físico-químicos relativos aos processos de decomposição térmica ou no estudo e desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, entre outros. Diversas vantagens destes métodos têm sido apontadas, principalmente em virtude da pequena quantidade de amostra utilizada,

a rapidez para obtenção de resultados e a possibilidade de obter diferentes informações sobre as propriedades físico-químicas da amostra (JÚLIO et al, 2012).

A desloratadina (DL) é um potente e seletivo antagonista dos receptores H1 da histamina, o qual tem sido amplamente utilizado no tratamento de sintomas alérgicos. Uma vez que este fármaco não atravessa a barreira hematoencefálica, o mesmo não apresenta os efeitos adversos de sonolência e sedação, muito comum nos medicamentos dessa classe terapêutica. Além disso, a desloratadina melhora efetivamente os sintomas nasais e não nasais da rinite alérgica e não está associada a efeitos cardiovasculares ou efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) (ANTHES et al, 2002). Diferentes relatos na literatura apontam a formação de produtos de degradação a partir desse fármaco o que pode comprometer a efetividade e segurança do produto final (KHAPRA; DHARMADHIKARI, 2005; ZHENG; RUSTUM, 2010). Considerando o fim da patente do medicamento e a entrada dos medicamentos genéricos contendo este princípio ativo no mercado, faz-se necessário um estudo mais aprofundado acerca da compatibilidade deste com excipientes farmacêuticos comumente utilizados em formulações a fim de garantir maior qualidade aos produtos disponíveis à população.

O etinilestradiol (EE) é o componente estrogênico mais amplamente utilizado em anticoncepcionais orais e na terapia de reposição hormonal (GUGUTA et al, 2008). É comercializado em pequenas dosagens, isolado ou em associação com outras substâncias (MARTINDALE, 2007) e por isso, apresenta dificuldade em obter uniformidade de conteúdo quando misturado com excipientes. A escolha do hormônio etinilestradiol como objeto de estudo consiste no fato de ser um dos anticoncepcionais mais utilizados no Brasil e que em 2009 apresentou falhas nos ensaios de dissolução o que culminou com a retirada de inúmeras unidades do medicamento do mercado.

O etinilestradiol apresenta a formação de diversos pseudopolimorfos, o que pode alterar a solubilidade do fármaco e, conseqüentemente, sua absorção pelo organismo (GUGUTA et al, 2008), de modo que a condução de estudos que contemplem a avaliação desses polimorfos e o desenvolvimento de novas tecnologias para melhorar a solubilidade do mesmo seja essencial para o sucesso das formulações farmacêuticas contendo este princípio ativo.

Com o desenvolvimento deste trabalho pretende-se contribuir com estudos de pré-formulação envolvendo o desenvolvimento farmacotécnico e o controle de

qualidade para os fármacos apresentados. Este trabalho encontra-se dividido em tópicos de acordo com os objetivos propostos (apresentados no item 2).

Os itens 3 e 4 apresentam a revisão de literatura e o referencial teórico sobre os estudos de pré-formulação (caracterização, estudo de estabilidade e compatibilidade fármaco-excipiente) e as técnicas analíticas mais comumente empregadas, com destaque importante para as técnicas de análise térmica.

O item 5 compreende a primeira aplicação deste trabalho, a qual envolve os estudos de caracterização do anti-histamínico DL e sua compatibilidade com diferentes excipientes farmacêuticos. Neste item foram descritos os aspectos farmacológicos do fármaco, da histamina e dos anti-histamínicos em geral. São apresentados os materiais e métodos empregados, os resultados e as conclusões obtidas com a pesquisa.

O item 6 contém a segunda aplicação deste trabalho a qual abrange estudos sobre o desenvolvimento e caracterização de dispersão sólida do fármaco EE. Fez-se uma discussão sobre os métodos contraceptivos e o uso desse medicamento. São apresentados os materiais e métodos utilizados, além dos resultados e conclusões obtidos.

Este trabalho encontra-se em conformidade com o manual de normalização vigente para elaboração de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses da UNIFAL-MG (disponível no endereço eletrônico <<http://www.unifal-mg.edu.br/biblioteca/?q=download>>).

## **2 OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo geral***

Dentro do campo das Ciências Farmacêuticas, as etapas prévias no desenvolvimento de um medicamento visam avaliar as características físicas, químicas e biológicas de todas as substâncias ativas e adjuvantes farmacêuticos utilizados na sua preparação e, com isso, prevenir ou reduzir possíveis reações que venham ocorrer com os componentes de uma formulação, minimizando as incompatibilidades que podem alterar as características de dissolução, estabilidade e biodisponibilidade do produto final.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo principal a realização de estudos de pré-formulação em formas farmacêuticas sólidas de uso oral contendo os fármacos desloratadina e etinilestradiol. Para os estudos foram empregadas diferentes técnicas analíticas, em especial as técnicas de análise térmica como a termogravimetria e a calorimetria exploratória diferencial, entre outras como, a difratometria de raios X por pó (PXRD), a microscopia eletrônica de varredura (SEM) e as técnicas vibracionais como a espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR), a espectroscopia Raman e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

### ***2.2 Objetivos específicos***

Os objetivos específicos desta pesquisa encontram-se divididos em dois grupos de acordo com as aplicações propostas no trabalho. Em relação aos estudos de pré-formulação desenvolvidos para o fármaco DL podemos relacionar como objetivos específicos:

- Caracterizar o fármaco DL utilizando as técnicas TG, DSC, PXRD, SEM e técnicas espectroscópicas (FT-IR, Raman) a fim de conhecer as propriedades físico-químicas do fármaco em estudo.

- Caracterizar cada excipiente separadamente e as misturas binárias fármaco-excipiente 1:1 (m/m) utilizando a técnica de DSC com o intuito de identificar possíveis interações físicas e/ou químicas entre o fármaco e os excipientes.
- Submeter amostras de misturas binárias 1:1 (m/m) do fármaco com cada excipiente às condições de armazenamento recomendadas pelos guias para realização de estudo de estabilidade e avaliá-las utilizando a técnica de DSC.
- Avaliar as interações fármaco-excipiente observadas previamente no DSC utilizando um método indicativo de estabilidade por HPLC a fim de verificar a eficiência e praticidade da técnica de análise térmica nesse tipo de estudo e a formação de produtos de degradação decorrente do armazenamento das amostras sob condições recomendadas.

Em relação aos estudos de pré-formulação desenvolvidos para o fármaco EE podemos relacionar como objetivos específicos:

- Caracterizar o fármaco etinilestradiol utilizando as técnicas TG, DSC, PXRD, SEM e FT-IR a fim de conhecer as propriedades físico-químicas do fármaco.
- Desenvolver, pelo método de evaporação do solvente, uma dispersão sólida amorfa com o princípio ativo EE, combinando diferentes solventes e excipientes, a fim de melhorar as propriedades de dissolução do fármaco e evitar problemas com o medicamento que chega ao mercado.
- Avaliar as características físico-químicas das dispersões sólidas obtidas e das misturas físicas fármaco-excipiente utilizando técnicas de DSC, TG, FT-IR e PXRD a fim de comprovar a eficiência do processo no desenvolvimento da dispersão sólida amorfa.
- Submeter as dispersões sólidas amorfas preparadas a condições de temperatura e umidade forçadas a fim de verificar a estabilidade das mesmas e evidenciar qualquer alteração em sua estrutura.

### 3 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

As preparações farmacêuticas são dotadas de máxima atividade, dosadas com precisão e apresentadas sob uma forma que facilite sua conservação e administração. Dentre as formas disponíveis no mercado, os comprimidos são os mais utilizados (PRISTA et al, 2003).

Independente de como são produzidos, os medicamentos na forma de comprimidos apresentam em sua constituição basicamente dois tipos de substâncias químicas, os fármacos e os excipientes. O termo fármaco é designado para todas as substâncias dotadas de ação farmacológica ou que apresente interesse na medicina. Os excipientes funcionam como um veículo para as substâncias ativas ou suas associações, possibilitando a preparação da forma farmacêutica, modificação das propriedades organolépticas e favorecendo uma melhor estabilidade e biodisponibilidade do produto final (PRISTA et al, 2003; ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007).

No século 21, as funções e a funcionalidade dos excipientes, devem ser interpretadas de acordo com as novas tendências do mercado farmacêutico. O tradicional conceito de excipiente, como sendo simples adjuvante e veículo, química e farmacologicamente inerte, já não pode ser utilizado. Excipientes, anteriormente vistos como meras substâncias capazes de facilitar a administração e proteger o fármaco, são considerados, nos dias atuais, como constituintes essenciais, que garantem o desempenho do medicamento e otimizam a obtenção do efeito terapêutico (FERREIRA, 2011).

Criada em 1991 com o objetivo de responder às preocupações da indústria farmacêutica relacionadas com a padronização internacional dos excipientes, a introdução de novos adjuvantes no mercado e as avaliações de segurança dos mesmos, a *International Pharmaceutical Excipients Council* (IPEC) conceitua excipientes farmacêuticos como sendo substâncias incluídas em um sistema de liberação de fármacos com o objetivo de auxiliar durante o processo de manufatura e/ou proteger ou aumentar a estabilidade, biodisponibilidade e/ou aceitabilidade pelo paciente, ou aumentar a segurança e efeito terapêutico da droga durante o estoque e uso (IPEC, 2012).

Embora pequenas variações possam ocorrer no processo produtivo de um medicamento, as formas farmacêuticas sólidas para administração oral contêm normalmente diferentes excipientes incluindo-se diluentes, aglutinante, desintegrante e lubrificante. Outros componentes opcionais são os corantes e, em comprimidos mastigáveis, aromas e edulcorantes. Todos esses componentes de uma formulação que não apresentem atividade farmacológica são denominados de excipientes (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Geralmente, os excipientes representam a maior parte da forma farmacêutica (em relação ao volume da forma), quando comparados com a concentração do ativo. Sua reatividade, apesar de baixa, pode ser potencializada por fatores físico-químicos do meio, desencadeando reações que podem levar à desestabilização da forma e/ou degradação do fármaco (FERREIRA, 2011).

Atualmente, mais de mil substâncias estão disponíveis e são usadas pela indústria farmacêutica como excipientes. Tais substâncias podem apresentar estruturas moleculares simples, com diferentes funcionalidades ou, até mesmo, moléculas polimérica complexas de elevado peso molecular (IPEC, 2012).

Durante a produção de formas farmacêuticas sólidas, as propriedades dos excipientes, assim como a dos ativos, podem se refletir em parâmetros como compressibilidade, fluidez, dureza e friabilidade. Ainda podem ser influenciadas a uniformidade de conteúdo, a velocidade de desagregação, a estabilidade do ativo, as características de dissolução e biodisponibilidade (FERREIRA, 2011; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Em relação à segurança dos excipientes farmacêuticos, diversos autores apontam os excipientes como responsáveis por inúmeras reações adversas ligadas a medicamentos decorrentes da toxicidade intrínseca (PIFFERI; RESTANI, 2003). Além disso, podem ocorrer reações adversas distintas devido às características específicas de pacientes (PIFFERI; RESTANI, 2003). Dessa forma, é de extrema importância levar em consideração, na escolha dos excipientes, aquele que garantirá melhor desempenho da formulação (estabilidade e eficácia), melhores características de manufatura e, ao mesmo tempo, que apresente custo adequado (FATHIMA et al, 2011).

Os diluentes são adjuvantes que participam em maior proporção dentro de uma formulação, sendo classicamente definidos como materiais inertes adicionados à mistura com o objetivo de aumentar o volume até obter a quantidade necessária

de um comprimido que seja de fácil manipulação (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007; AULTON, 2005). A escolha do diluente é fundamental para a estabilidade dos fármacos (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Diferentes substâncias são empregadas como diluentes. Dentre elas, destacam-se o uso da lactose, amido, celulose microcristalina e o uso de alguns sais inorgânicos com destaque para o fosfato de cálcio.

Os aglutinantes são adicionados na forma de pó ou em solução, a fim de promover o aumento da resistência à fratura e diminuir a friabilidade dos comprimidos (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006). Os aglutinantes tradicionais como açúcares ou biopolímeros naturais, têm sido substituídos por polímeros sintéticos, os quais oferecem melhor qualidade farmacotécnica e microbiológica. Os mais comuns usados na indústria farmacêutica são polivinilpirrolidona (PVP) e aqueles derivados da celulose (metilcelulose, carboximetilcelulose sódica, etc.) (AULTON, 2005).

Os desintegrantes são excipientes adicionados à maioria das formulações com o objetivo de promover e acelerar a desintegração de comprimidos quando este entra em contato com a água, para com isso promover a rápida dissolução do fármaco (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007; FATHIMA, 2011; AULTON, 2005). O amido e derivados são os desintegrantes mais comuns e mais baratos, sendo normalmente utilizado em concentrações da ordem de 5 a 20% do peso do comprimido (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Os lubrificantes e deslizantes são duas classes de materiais normalmente apresentadas em paralelo, pois apresentam funções que se sobrepõem. Os lubrificantes são incorporados para promover a redução da fricção entre as partículas e as partes metálicas dos equipamentos durante a obtenção do comprimido, tendo em vista que o elevado atrito pode ser responsável pela baixa qualidade do comprimido (FATHIMA, 2011; AULTON, 2005). Os deslizantes têm a finalidade de melhorar as propriedades de fluxo dos pós (AULTON, 2005). Os lubrificantes mais usados têm sido o ácido esteárico e seus sais, particularmente os estearatos de cálcio e magnésio, seguidos pelo talco. Materiais usados como deslizantes ou promotores do escoamento são o talco em concentrações de 5%, o amido de milho, entre 5 a 10% e o dióxido de silício coloidal em concentrações da ordem dos 0,25 a 3% (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

A incorporação de aromatizantes às formulações promove um sabor mais agradável ao comprimido, sendo misturados aos granulados sob a forma de

soluções alcoólicas (AULTON, 2005). Os corantes são adicionados às formulações com o intuito de auxiliar na identificação dos comprimidos e também aumentar a adesão terapêutica uma vez que melhora o aspecto da formulação final (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007).

### **3.1 Estabilidade de Fármacos e Medicamentos**

Uma das mais importantes etapas do estudo de pré-formulação é a avaliação da estabilidade intrínseca do fármaco. É essencial que estes estudos iniciais sejam conduzidos com amostras do fármaco de pureza conhecida, uma vez que a presença de impurezas pode levar a conclusões errôneas em tais avaliações. Os estudos de estabilidade conduzidos na fase de pré-formulação incluem estabilidade do estado sólido do fármaco, estabilidade da solução e estabilidade na presença de excipientes (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007).

A definição de estabilidade se refere à extensão em que um produto retém, dentro dos limites especificados e dentro do período de armazenagem e de uso, as mesmas propriedades e características que possuía na ocasião em que foi fabricado, e ela pode ser estudada sob cinco aspectos: químico, físico, microbiológico, terapêutico e toxicológico conforme apresentado na Tabela 1 (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007; ICH, 2003a; OMS, 1996).

**Tabela 1** - Aspectos relacionados à estabilidade

<b>Aspectos</b>	<b>Condição a manter dentro dos limites especificados durante o prazo de validade do produto farmacêutico</b>
Química	Integridade química e a potência (doseamento e produtos de degradação) indicadas na embalagem
Física	Propriedades físicas originais (aparência, palatabilidade, uniformidade, dissolução, dispersibilidade), entre outras
Microbiológica	Esterilidade ou resistência ao crescimento microbiológico e a eficácia dos agentes antimicrobianos, quando presentes
Terapêutica	O efeito terapêutico deve permanecer inalterado
Toxicológica	Não deve ocorrer aumento da toxicidade

Fonte: ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR (2007).

A estabilidade pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado àquele que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de degradação estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (SILVA et al, 2009).

Tendo em vista o aumento do comércio mundial de produtos farmacêuticos, ações estão sendo realizadas no sentido de padronizar regulamentos técnicos relacionados aos critérios de segurança, eficácia e qualidade dos produtos farmacêuticos (SHAH; AGNIHOTRI, 2011). Tais critérios são uma preocupação econômico-social constante dos órgãos sanitários de todos os países os quais são os responsáveis pela definição desses parâmetros de qualidade dos medicamentos, bem como pela fiscalização do seu cumprimento (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

Em 1990, foi criada a “Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano” conhecida como ICH, cujo comitê formado por autoridades reguladoras e representantes da indústria farmacêutica da Europa, Japão e Estados Unidos se reúne a cada dois anos para discutir aspectos técnicos e científicos do registro de medicamentos, com o objetivo de promover o uso mais econômico de recursos humanos, animais e materiais, e a eliminação de atrasos desnecessários no desenvolvimento e na disponibilidade global de novos medicamentos, garantindo o registro de medicamentos seguros, eficazes e de alta qualidade (ICH, 2011).

No que diz respeito à qualidade, o ICH elaborou diretrizes para realização de estudos de estabilidade e fotoestabilidade para novos fármacos e medicamentos. Este item estabelece diretrizes para realização de testes de estabilidade durante o desenvolvimento de uma formulação, os quais fornecem indicações sobre o comportamento do produto em determinado intervalo de tempo, desde a fabricação até o término da validade (ICH, 2003a). A realização de testes de estabilidade durante o desenvolvimento de uma nova formulação é importante para estabelecer condições de armazenamento, tipo de embalagem e prazo de validade adequados, além de fornecer informações sobre as possíveis interações entre o fármaco e outros componentes da formulação. Um estudo de estabilidade mal elaborado pode

levar a problemas na formulação que comprometam a segurança, eficácia e qualidade desejada (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007).

No âmbito do MERCOSUL, Mercado Comum do Sul, os esforços para harmonizar os procedimentos para registro de medicamentos entre os países membros, Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, resultou na elaboração, em 1996, do regulamento técnico *Estabilidad de Productos Farmacéuticos*. Este regulamento, MERCOSUL/GMC/RES nº 53/96, tem por objetivo estabelecer diretrizes para determinação do prazo de validade de produtos farmacêuticos destinados à comercialização no MERCOSUL (MERCOSUL, 1996).

No Brasil, a recomendação para o desenvolvimento de estudos de estabilidade encontra-se descrita na Resolução - RE nº 1, de 29 de julho de 2005, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a qual compõe um Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Este guia, assim como as recomendações feitas pelo guia do ICH, possui como principal aplicabilidade fornecer as bases e diretrizes para o planejamento correto de protocolos de estudos de estabilidade e a determinação do prazo de validade do produto farmacêutico (BRASIL, 2005).

Antes da aprovação para a comercialização de um novo medicamento, a estabilidade do fármaco e da forma farmacêutica na qual está veiculado deve ser assegurada levando em consideração a formulação, a influência dos adjuvantes farmacêuticos, o material de acondicionamento, as condições de processamento e fabricação (p.ex. aquecimento), os componentes da embalagem, as condições de armazenamento e de transporte (temperatura, luz e umidade), e a validade prevista do produto na farmácia e durante o uso pelo paciente (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007; ICH, 2003a; BRASIL, 2005).

Os tipos e principais objetivos e finalidades dos estudos de estabilidade estabelecidos nas diferentes diretrizes para a realização desses estudos estão apresentados na Tabela 2.

O termo condição de armazenamento forçada apresentado na Tabela 2 corresponde às condições elevadas de temperatura, umidade, luz e/ou outros fatores capazes de afetar a estabilidade de produtos farmacêuticos pelo aumento na velocidade de degradação química ou física (LEITE, 2006). As condições normais de armazenamento correspondem às condições ambientais nas quais o produto será exposto, como temperatura e umidade relativa, durante a comercialização do

produto por todo seu prazo de validade (BRASIL, 2005; LEITE, 2006). Estas condições encontram-se bem estabelecidas e harmonizadas nas diretrizes para realização de estudos de estabilidade.

**Tabela 2** - Tipos e principais objetivos e finalidade dos estudos de estabilidade

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

Fonte: LEITE, E.G. (2006).

Além desses estudos apresentados e como parte integrante do “*stress testing*”, pode-se destacar a realização do estudo de fotoestabilidade que tem por finalidade demonstrar que uma exposição à luz não resulta em alterações significativas no produto. São recomendados testes nas substâncias ativas, no produto exposto, no produto envasado em sua embalagem primária e no produto em sua embalagem final. As condições para a realização deste teste estão descritas no

guia Q1B do ICH – Testes de Fotoestabilidade de fármacos em novos produtos (ICH, 2003b).

As razões para a determinação da estabilidade de produtos farmacêuticos fundamentam-se, entre outras, na preocupação com a saúde pública, pois a perda da estabilidade de um medicamento pode estar diretamente relacionada com a perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação tóxicos (SHAH; AGNIHOTRI, 2011).

A temperatura é o mais importante dentre os fatores ambientais envolvidos na degradação de produtos farmacêuticos, uma vez que, na maioria dos casos, a velocidade de degradação química aumenta com o aumento da temperatura e não existe um acondicionamento capaz de protegê-los dos efeitos do calor (HUYNH-BA, 2009). A influência da temperatura pode ser reduzida pela correta seleção da forma de armazenamento.

A umidade é outro fator ambiental que exerce grande influência na estabilidade de produtos farmacêuticos por meio de reações de degradação química que são catalisadas pelas moléculas de água. A água pode participar do processo de degradação química por si só, como um reagente, induzindo a hidrólise, hidratação, isomerização ou outras reações químicas bimoleculares, ou também, pode ser adsorvida na superfície do produto e formar uma camada de hidratação na qual a substância é dissolvida e degradada (YOSHIOKA; STELLA, 2002). A hidrólise é uma das reações de degradação mais comumente observada em produtos farmacêuticos, pois muitos fármacos possuem em sua estrutura grupos funcionais como ésteres, amidas secundárias, lactonas e lactamas que são suscetíveis à hidrólise. A influência deste fator sobre a estabilidade de formulações, no entanto, pode ser reduzida pela utilização de embalagens impermeáveis ou pela adição de sachês com dessecante ao recipiente de acondicionamento (LEITE, 2006).

A luz e o oxigênio são também fatores ambientais importantes na estabilidade de produtos farmacêuticos. A luz em determinados comprimentos de onda pode fornecer a energia de ativação necessária para desencadear reações de degradação tais como oxidação e redução, rearranjo de anéis, polimerização, rupturas de ligações, isomerizações e racemizações (LEITE, 2006). O oxigênio promove além das reações de oxidação de fármacos, algumas reações de fotodegradação que envolvem mecanismos fotooxidativos (YOSHIOKA; STELLA, 2002). A oxidação é uma

via de degradação química bem estabelecida, uma vez que o oxigênio que participa da maioria das reações de oxidação é abundante no ambiente onde os produtos farmacêuticos são processados e armazenados a longo prazo.

Durante o processo de fabricação, o produto farmacêutico entra em contato com diversos equipamentos, matérias-primas e com fatores ambientais que podem afetar a sua estabilidade. Para garantir a estabilidade do produto final, é essencial que todos esses fatores sejam avaliados durante o desenvolvimento do produto e monitorados durante sua produção. Por exemplo, o tempo de processamento de uma substância deve ser determinada na fase de desenvolvimento do produto e monitorado durante a produção a fim de se evitar um aumento na velocidade de degradação decorrente de fatores associados ao processo produtivo (AULTON, 2005). O pH (potencial hidrogeniônico) é um fator capaz de acelerar ou diminuir a velocidade de reações, pois as principais reações envolvidas na degradação de fármacos são a hidrólise e a oxidação e ambas podem ser catalisadas por ácidos e/ou bases (YOSHIOKA; STELLA, 2002). O tamanho e a morfologia das partículas dos componentes da formulação podem interferir na estabilidade química de produtos farmacêuticos, pois quanto menor a área superficial da partícula, maior a reatividade do produto. Este fator também exerce influência na estabilidade físico-química de diversos medicamentos, especialmente de emulsões e suspensões, promovendo alteração da aparência do produto, na uniformidade de dose e na biodisponibilidade (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

As embalagens utilizadas para o acondicionamento de produtos farmacêuticos possuem importante papel na manutenção da estabilidade uma vez que os componentes da embalagem podem interagir com o produto final. Durante o desenvolvimento de um produto é essencial a escolha de um recipiente de acondicionamento compatível com a substância ativa e/ou excipientes e adequado à forma farmacêutica (WATERMAN; MACDONALD, 2010). Sempre que necessário, o material de embalagem deve proteger o produto de fatores ambientais como umidade, ar e luz, a fim de manter suas características iniciais (YOSHIOKA; STELLA, 2002; WATERMAN; MACDONALD, 2010). Associado às características de embalagem, as condições de transporte devem ser as mesmas requeridas para o acondicionamento do produto farmacêutico definido com base nos resultados dos estudos de estabilidade. Entretanto, segundo a Organização Mundial de Saúde,

flutuações de temperatura e umidade durante o transporte podem ocorrer em virtude das diferenças entre as medidas destes fatores durante o dia e a noite, ou entre o interior e exterior dos containers utilizados para o transporte, por exemplo (OMS, 1996). O ICH preconiza que os dados dos estudos de estabilidade acelerada e intermediário devem ser utilizados para avaliar o efeito de pequenas variações da temperatura e umidade passíveis de ocorrerem durante o transporte, na potência e qualidade dos produtos farmacêuticos (ICH, 2003a).

### ***3.2 Estudos de Compatibilidade Fármaco-Excipiente***

Dentro dos estudos de pré-formulação, o estudo de compatibilidade fármaco-excipiente é de grande importância para a indústria farmacêutica, pois o sucesso de uma formulação estável, eficaz terapeuticamente e de qualidade depende da forma criteriosa da seleção dos excipientes utilizados na formulação (AHMAD et al, 2010; CUNHA-FILHO; MARTINEZ-PACHECO; LANDIN, 2007). Os excipientes e a sua concentração em uma formulação são selecionados com base não só na sua funcionalidade, mas também levando em consideração a sua compatibilidade com o fármaco (NARANG; RAO; RAGHAVAN, 2009). Estes estudos devem incidir nas propriedades físico-químicas do composto passíveis de afetar o desempenho adequado da forma farmacêutica (AHMAD et al, 2010).

O estudo de compatibilidade fármaco-excipiente representa uma etapa fundamental nos estudos de pré-formulação para o desenvolvimento de todas as formas farmacêuticas disponíveis no mercado (AHMAD et al, 2010; TITA et al, 2011a). Esses estudos são realizados para acelerar o desenvolvimento de formulações (CUNHA-FILHO; MARTINEZ-PACHECO; LANDIN, 2007) e, principalmente, para prever o potencial de incompatibilidade do fármaco na formulação farmacêutica final (NARANG; RAO; RAGHAVAN, 2009). Isso porque, potenciais interações físicas e químicas entre fármacos e excipientes em formulações farmacêuticas sólidas de uso oral podem afetar a natureza química, a estabilidade e a biodisponibilidade dos medicamentos e, conseqüentemente, a sua eficácia terapêutica e segurança (TITA et al, 2011a).

Diante do exposto, esses estudos de compatibilidade devem ser cuidadosamente planejados e executados a fim de evitar perdas em termos econômicos associados a atrasos decorrentes de problemas de estabilidade durante o estágio final do desenvolvimento do produto farmacêutico (NARANG; RAO; RAGHAVAN, 2009).

Diferentes grupos de pesquisa em todo o mundo têm desenvolvido estudos que visam avaliar a estabilidade de formulações farmacêuticas, bem como a compatibilidade do fármaco com diferentes excipientes comumente utilizados pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de formulações sólidas.

Um estudo para investigar as possíveis interações entre o anti-hipertensivo trandolapril e três excipientes naturais comumente utilizados (lactose, celulose microcristalina e amido pré-gelatinizado) foi realizado por Roumeli, E. e colaboradores (2012). O estudo foi conduzido utilizando técnicas termoanalíticas (TG e DSC) juntamente com técnicas complementares (PXR, SEM e FT-IR) as quais evidenciaram a compatibilidade entre esses componentes (ROUMELI et al, 2012).

Júlio, T.A. e colaboradores (2012) realizaram estudos de compatibilidade entre o fármaco citrato de sildenafil e cinco diferentes excipientes farmacêuticos empregando com sucesso técnicas como DSC, microscopia *hot-stage* e cromatografia líquida (LC) com detector de ultravioleta. A combinação de ambas as técnicas analíticas (DSC e LC) com o uso de uma câmara de estabilidade mostrou-se extremamente útil na detecção de incompatibilidades e proporcionou abordagens mais robustas e precisas para estudos de pré-formulação. Além disso, a técnica microscopia empregada foi capaz de diferenciar fenômenos de degradação e solubilização do fármaco, apoiando a interpretação dos resultados obtidos no DSC onde os eventos térmicos se sobrepuseram ou desapareceram. Todos os excipientes testados (dióxido de silício coloidal, croscarmelose sódica, lactose, manitol e sacarose) apresentaram potencial incompatibilidade quando analisadas por DSC e LC após o teste de estabilidade acelerada, uma vez que houve alteração do sinal no DSC e redução do teor do fármaco avaliado por LC.

Em outro estudo, Aigner, Z. e colaboradores (2010) realizaram estudos de compatibilidade entre aceclofenaco e excipientes utilizando as técnicas DSC e FT-IR. Foram testados cinco excipientes normalmente utilizados na fabricação de comprimidos de liberação retardada, como Carbopol 940, hidroxipropilmetilcelulose, celulose microcristalina, estearato de magnésio e Aerosil 200. Uma interação foi

observada apenas entre o fármaco e o estearato de magnésio devido à formação de um sal de magnésio de aceclofenaco.

Tita, B. e colaboradores (2011) utilizaram TG e DSC para avaliar a compatibilidade entre cetoprofeno e vários excipientes como amido de milho, celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, lactose (monohidratada e anidra), PVP, estearato de magnésio e talco. As misturas do fármaco com PVP e com estearato de magnésio apresentaram diferenças nos valores de temperatura e entalpia de fusão. Tais interações foram confirmadas pelo emprego das técnicas complementares como FT-IR e PXRD.

Em outro trabalho, este mesmo grupo de pesquisa avaliou a compatibilidade fármaco/excipiente do antiinflamatório ibuprofeno. Nove excipientes foram testados e o estudo evidenciou a incompatibilidade térmica do ibuprofeno com PVP e estearato de magnésio a qual foi confirmada pelo emprego das técnicas FT-IR e PXRD (TITA et al, 2011b).

Stulzer e colaboradores (2008) também realizaram este tipo de estudo, avaliando a compatibilidade fármaco/excipiente para o anti-hipertensivo captopril. De acordo com os resultados, uma possível incompatibilidade entre o captopril e estearato de magnésio foi observada pela técnica de DSC.

### **3.3 Caracterização Físico-Química de Fármacos**

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica implica em vários passos objetivando-se a criação de um sistema físico que contenha a substância ativa e os excipientes adequados a fim de garantir os requisitos necessários de qualidade que assegurem a sua eficácia e segurança terapêutica (RIVERA et al, 2000; RODRIGUES et al, 2005).

A caracterização completa de um fármaco e de sua estrutura cristalina tem se tornado uma área de intensa atividade de pesquisa na indústria farmacêutica. Isto ocorre devido às exigências dos órgãos reguladores no processo de aquisição de patentes e registros, além do atendimento aos regulamentos do FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) para a aprovação de novos produtos para o mercado mundial.

Muito embora novas formas farmacêuticas continuem a ser desenvolvidas em todo o mundo, muitos fármacos ainda são administrados em formas farmacêuticas sólidas (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007), devido à conveniência, confiabilidade à dose veiculada, proteção ao fármaco e melhor aceitação pelo paciente (DE CASTRO et al, 2006). O conhecimento das características físico-químicas do fármaco e seu padrão de liberação da forma farmacêutica exercem grande influência na quantidade e velocidade de absorção do fármaco pelo organismo. Paralelamente, permite indicar os tipos de excipientes compatíveis, prever a inclusão de aditivos específicos e selecionar embalagens adequadas, os quais são decisivos para a integridade do fármaco no produto final (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2007; AULTON, 2005).

As propriedades físico-químicas dos princípios ativos constituem, sem dúvida, um elemento essencial no desenvolvimento de formulações farmacêuticas destinadas à administração por via oral (YOSHIDA et al, 2011), uma vez que aspectos como a biodisponibilidade, solubilidade e condições de administração estão intimamente relacionados a essas propriedades (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; YOSHIDA et al, 2011).

Importantes propriedades físico-químicas de diferentes fármacos foram estudadas e reveladas por inúmeros autores, dentre elas, a estabilidade térmica, a presença de polimorfismo, a determinação do ponto de fusão, transição vítrea, calor específico e a presença de degradação sob condições específicas (RODRIGUES et al, 2005; YOSHIDA et al, 2011; NERY et al, 2008). Estas propriedades poderão modificar o comportamento da molécula quanto ao meio biológico, podendo afetar diretamente a distribuição e biodisponibilidade e, portanto, sua eficácia terapêutica, o que justifica a realização desses ensaios de caracterização de fármacos durante a fase de pré-formulação farmacêutica.

### **3.3.1 Polimorfismo de fármacos**

Um dos grandes problemas da indústria farmacêutica, no atual contexto de inovação e competitividade é o polimorfismo. O problema se concentra no que diz respeito ao estado físico do princípio ativo, já que têm sido amplamente

demonstrado que muitos fármacos apresentam diferentes propriedades físicas e químicas por se apresentar em diferentes formas cristalinas (BRITTAİN, 2012).

Como já foi conceituado anteriormente, o polimorfismo é a capacidade de uma molécula apresentar mais de uma forma ou estrutura cristalina, de modo que essas variações, decorrentes das diferentes interações intermoleculares e intramoleculares como ligações de van der Waals e ligações de hidrogênio, possam promover alterações nas propriedades físico-químicas (HILKIFER, 2006; DESIRAJU, 2008). Formas polimórficas podem apresentar diferenças em propriedades como ponto de fusão e sublimação, condutividade, volume, densidade, viscosidade, dureza do cristal, forma do cristal, cor, índice de refração, solubilidade, higroscopicidade, reações no estado sólido, estabilidade e perfil de dissolução as quais são essenciais para que um princípio ativo atinja níveis terapêuticos no organismo (HILKIFER, 2006).

O termo polimorfismo tem sido utilizado por diferentes autores de forma mais ampla, incluindo também substâncias no estado amorfo e os solvatos (HILKIFER, 2006). Os solvatos são variações do cristal, em que a estrutura química de uma substância difere da composição elementar através da inclusão de uma ou mais moléculas de solvente, que ocupam posições definidas na estrutura, não ligado a rede cristalina, mas ocupando espaços de cavidades e/ou falhas, no interior do cristal (HILKIFER, 2006; BRITTAİN, 2012). Os compostos amorfos são formas sólidas que não possuem uma cadeia molecular ordenada longa, ou seja, são sólidos com arranjos desordenados das moléculas sem distinção da rede cristalina, conseqüentemente possuem cristalinidade zero (BRITTAİN, 2012).

Não são muitos os métodos capazes de caracterizar uma determinada estrutura, permitindo sua descrição precisa em termos das distâncias e ângulos de ligação que definem sua conformação. Os métodos analíticos como a microscopia eletrônica, a difração de raios X, a ressonância magnética nuclear de alta resolução, a espectroscopia no infravermelho e Raman e a análise térmica são os recursos técnicos comumente utilizados na identificação e caracterização de sólidos farmacêuticos e suas diferentes formas cristalinas e amorfas.

## 4 TÉCNICAS ANALÍTICAS EM ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Ao iniciar o desenvolvimento de um novo medicamento, é necessário que seja feita a caracterização adequada tanto do fármaco quanto dos excipientes a serem utilizados na formulação (GIRON, 1998). Essa caracterização, conforme descrita anteriormente, abrange a utilização de métodos analíticos para determinar suas propriedades físicas e químicas, por exemplo, análise térmica por DSC para determinar o ponto de fusão e difração de raios X para determinar a estrutura cristalina (TITA et al, 2011a). É importante observar que as características do fármaco podem se alterar na presença de determinados excipientes, o que deve ser considerado durante os testes de estabilidade e compatibilidade (AULTON, 2005).

As técnicas termoanalíticas têm sido utilizadas para produtos farmacêuticos em estudos de pré-formulações, sendo possível extrair informações sobre potenciais de incompatibilidades físicas ou químicas entre um ingrediente ativo e os chamados excipientes (JULIO et al, 2012). Dentre estas técnicas, DSC e TG têm sido amplamente explorados como um meio de prever compatibilidade fármaco-excipiente, já que constituem métodos simples, rápidos, sensíveis, que necessitam de pequena quantidade de amostra, fator este desejável pelas indústrias farmacêuticas (JULIO et al, 2012; TITA et al, 2011a).

Outras técnicas, como FT-IR, Raman, PXRD e SEM também são bastante utilizadas e comumente empregadas em associação com o DSC como uma forma de complementar os resultados obtidos e melhorar a interpretação destes (AULTON, 2005). Tais técnicas permitem a identificação de interações entre os componentes estudados pela simples observação do aparecimento, desaparecimento ou modificação dos sinais característicos do composto (TITA et al, 2011a).

### ***4.1 Análise Térmica Aplicada a Formulações Farmacêuticas***

Aquecer uma amostra e observar o seu comportamento é uma maneira simples de se estudar um material; isso porque as propriedades termodinâmicas

como capacidade calorífica, entalpias e entropia são características individuais de cada substância (HAINES, 2002).

As técnicas termoanalíticas começaram a ser inventadas e estudadas desde o século passado quando os primeiros trabalhos foram resultado do esforço isolado de alguns grupos de pesquisadores que empregavam a instrumentação rudimentar idealizada e construída em seus próprios laboratórios (IONASHIRO, 2005).

Nos dias atuais a instrumentação termoanalítica atingiu elevado grau de sofisticação, popularizou-se em função de uma aplicação prática crescente e vem sendo encarada como importante ferramenta de trabalho em todos os setores que se dedicam à pesquisa, ao desenvolvimento de novos produtos e ao controle de qualidade da produção (HAINES, 2002; IONASHIRO, 2005), uma vez que a técnica pode ser aplicada na caracterização de matérias-primas e produtos acabados, na determinação do grau de pureza e na realização de ensaios de estabilidade e cinética de decomposição (RODRIGUES et al, 2005).

Em um sistema de termoanálise, a amostra é colocada em um ambiente no qual é possível se observar, direta ou indiretamente, uma modificação em função da temperatura e do tempo. As mudanças na amostra são monitoradas por um transdutor apropriado, que produz um sinal elétrico análogo à mudança física ou química. Este sinal é amplificado de modo eletrônico e aplicado ao dispositivo de leitura em um registrador (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002). Dessa forma, a análise térmica pode ser caracterizada e definida como uma série de técnicas que medem as propriedades físicas de uma substância e/ou seus produtos de reação em função da temperatura ou do tempo durante o qual a substância é submetida a um programa controlado de temperatura (IONASHIRO, 2005; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

O fundamento da aplicação da análise térmica em estudos de estabilidade de formulações farmacêuticas está no fato de que a análise de um sólido puro e em determinada forma cristalina (um fármaco ou um excipiente, por exemplo) fornece curvas termoanalíticas características das quais podem ser extraídas informações do tipo: temperatura de fusão, entalpia de mudança de fase e temperatura de decomposição (CHIU; PRENNER, 2011). Em uma mistura de sólidos, como no caso de uma formulação farmacêutica onde o fármaco está associado a um ou mais excipientes, pode ocorrer interações entre as substâncias que levam a alterações nas propriedades físicas do fármaco (transição entre estruturas polimórficas e maior

estabilidade da molécula) que são reveladas por alterações nas curvas termoanalíticas (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002). O estudo dessas interações é importante, pois elas podem alterar a qualidade, segurança e eficácia do produto final.

#### 4.1.1 Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC

Quando diferentes substâncias são aquecidas, várias transformações físicas ou químicas envolvendo a absorção (processo endotérmico) ou a liberação de calor (processo exotérmico) podem ocorrer (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002; CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999). Alguns desses processos estão listados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Transformações envolvendo processos endotérmicos e exotérmicos

Processo Endotérmico	Processo Exotérmico
Fusão	Cristalização
Vaporização	Condensação
Sublimação	Solidificação
Dessorção	Adsorção
Decomposição	Solvatação
Redução	Decomposição
Degradação	Oxidação
Transição vítrea	Degradação

Fonte: CLAS; DALTON; HANCOCK (1999).

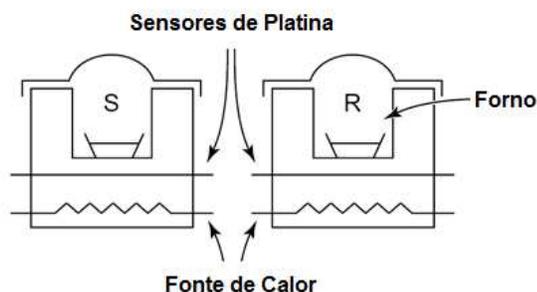
A técnica de DSC pode ser usada para detectar tais transformações e investigar as propriedades térmicas de uma variedade de materiais, sendo empregada para a caracterização de materiais orgânicos, inorgânicos, biológicos, poliméricos, fármacos, aditivos alimentares, entre outros (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002; CHIU; PRENNER, 2011). Pode ser utilizado também para estimar a pureza da amostra pelo estudo da fusão da mesma (MATHKAR et al, 2009). A técnica DSC permite a determinação qualitativa e quantitativa de transições de fase, tais como a temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão, temperatura e tempo de

cristalização, calor específico, pureza da amostra, estabilidade térmica, cinética de reação e outros (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

A DSC pode ser definida como uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e ao material de referência, em função da temperatura enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO, 2005; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002). O equipamento de DSC consiste basicamente de um forno de aquecimento com atmosfera controlada para a amostra e para a substância de referência, um registrador que pode medir o fluxo de calor ou a diferença entre a potência fornecida aos aquecedores da amostra e da referência e um computador para registro e análise dos resultados obtidos (CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999). Dois tipos de equipamento estão disponíveis para a obtenção dos dados: calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência e calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor (IONASHIRO, 2005; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002; CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999).

*a) DSC com compensação de potência:*

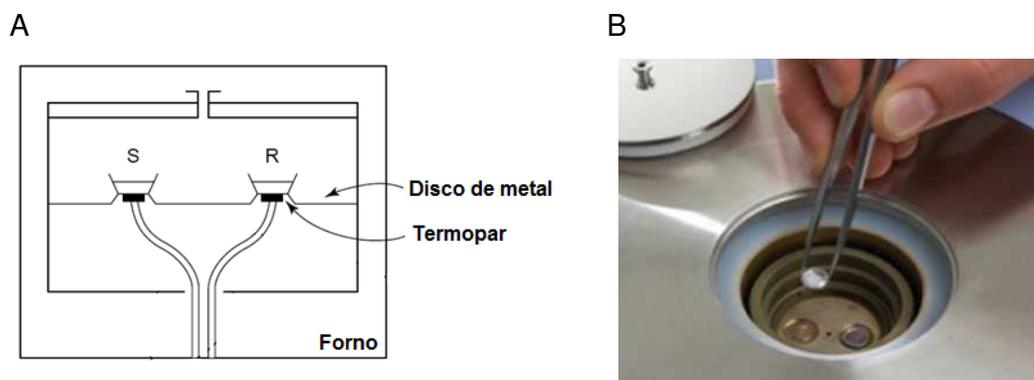
Arranjo no qual referência e amostra são mantidas na mesma temperatura, através de aquecedores elétricos individuais. A potência dissipada pelos aquecedores é relacionada com a energia envolvida nos processos endotérmicos ou exotérmicos (BERNAL et al, 2002). O equipamento de DSC com compensação de potência, apresentado na Figura 1, possui dois fornos individuais, um para amostra (S), outro para referência (R), onde há o fornecimento de energia suficiente para a manutenção da mesma temperatura entre a amostra e a referência (CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999).



**Figura 1** - Esquema de um calorímetro com compensação de potência.

b) DSC com fluxo de calor:

O arranjo mais simples é aquele no qual a amostra e referência, contidas em seus respectivos suportes de amostra, são colocadas sobre um disco de metal, responsável pela troca de calor entre o forno e a amostra (BERNAL et al, 2002). A amostra e referência são aquecidas por uma única fonte, e a temperatura de ambas é medida por termopares em contato com cada uma delas individualmente (CRAIG; READING, 2006). O DSC com fluxo de calor, apresentado na Figura 2, é constituído por um forno único e o fluxo de calor na amostra e no material de referência é fornecido através do disco termoeletrico aquecido de forma constante (CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999).



**Figura 2** - Esquema de um calorímetro com fluxo de calor (A); Foto de um disco termoeletrico (B)

O sucesso das análises por DSC depende da preparação cuidadosa das amostras e de seleção adequada das condições experimentais. Em geral, as amostras são analisadas em pequenos cadinhos produzidos com materiais altamente condutores de calor, como platina, alumínio, cobre e ouro e são utilizados em combinação com um cadinho de referência de configuração idêntica preenchido com material inerte (por exemplo, alumina ou ar). Cadinhos herméticos são utilizados quando é importante impedir a perda da amostra ou de seus produtos de reação induzida pelo calor. Os cadinhos semi-fechados são usados para prevenção de fenômenos indesejáveis de ruptura a temperaturas elevadas (CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999).

Desde 1969, quando Jacobson e Rieir demonstraram que a estabilidade de penicilinas em comprimidos poderia ser prevista utilizando técnicas de análise térmica, muitas tentativas têm sido feitas para aplicar a técnica de DSC como a base na determinação de compatibilidade em uma formulação farmacêutica (FORD; WILLSON, 1999).

A DSC é considerada uma técnica rápida para a obtenção de informações confiáveis sobre a compatibilidade entre os componentes de uma formulação química por meio das variações nos picos de temperaturas endotérmicos e/ou exotérmicos ou valores de entalpia, onde o fármaco e os sistemas binários (fármaco-excipientes) são aquecidos e os seus eventos térmicos são monitorados em função do tempo ou da temperatura, enquanto a temperatura é programada em uma atmosfera específica (JULIO et al, 2012; TITA et al, 2011a; CRAIG; READING, 2006). Consequentemente, a temperatura e a energia associada com os eventos, como a fusão, oxidação e reações de redução, transição vítrea, ebulição, sublimação, decomposição, cristalização podem ser avaliados comparando os dados obtidos para as misturas binárias com os dados dos componentes individuais (FORD; WILLSON, 1999).

Existem inúmeros benefícios relacionados com a técnica, dentre eles podemos citar a pequena quantidade de amostra e o tempo requeridos para análise (aproximadamente de 1 a 5 mg), a facilidade no preparo da amostra (muitas amostras podem ser colocadas diretamente no cadinho porta-amostra sem a necessidade de preparo), além de a técnica poder ser aplicada para sólidos e líquidos em uma ampla faixa de temperatura (-120°C até 600°C) (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

Apesar das inúmeras vantagens, a DSC apresenta limitações de forma que a interpretação dos dados obtidos por meio da técnica deve ser criteriosa e técnicas complementares, tais como espectroscopia no infravermelho, microscopia ou difratometria de raios X podem ser úteis para evitar conclusões enganosas (CUNHA-FILHO; MATINEZ-PACHECO; LANDIN, 2007). Dentre as desvantagens da técnica podem ser descritas: a redução da sensibilidade quando a linha de base está em inclinação ou curvatura; a necessidade de elevar razões de aquecimento para aumentar a sensibilidade, o que reduz a resolução; algumas transições observadas são complexas e apresentam dificuldade para interpretação (por exemplo, temperatura de transição vítrea, fusão e cristalização); a extrapolação dos resultados

obtidos em altas temperaturas não reproduz a real situação do fármaco na formulação; as mudanças de atmosfera inerte (nitrogênio - N<sub>2</sub>) para atmosfera não inerte (ar) podem criar picos exotérmicos adicionais (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

O registro gráfico obtido na técnica DSC, em ambas as técnicas de fluxo de calor e de compensação de potência, são expressas em temperatura (°C) ou tempo (min) no eixo da abcissa e em fluxo de calor (mW.mg<sup>-1</sup>) no eixo da ordenada. O fluxo de calor é dividido pela massa, de forma que a curva passa a não ser afetada pela quantidade de massa que compõe o cadinho, isto porque quanto maior a massa existente no cadinho, maior é a quantidade de calor liberada ou absorvida na reação. Transições de primeira ordem (endotérmicas ou exotérmicas) são caracterizadas como picos, mesmo que eles possam sobrepor um ao outro. A área do pico é diretamente proporcional a entalpia (J.g<sup>-1</sup>) envolvida no processo. Transições de segunda ordem, como a transição vítrea, são caracterizadas como uma alteração na linearidade da curva, geralmente chamados de “degraus”. Isto ocorre porque não há variação na entalpia como em reações de fusão ou cristalização, mas somente uma mudança na capacidade calorífica do material (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002; BERNAL et al, 2002).

#### **4.1.2 Termogravimetria - TG**

A termogravimetria ou análise termogravimétrica baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação), determinada em uma termobalança, em função da temperatura ou do tempo (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002). Em outras palavras, pode ser definida como um processo contínuo que mede a variação de massa (perda ou ganho) de uma substância ou material como uma função da temperatura ou do tempo (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

Como em outras técnicas experimentais, existe na TG alguns fatores que afetam a natureza, precisão e exatidão nos resultados experimentais. A TG provavelmente tem um grande número de variáveis devido à natureza dinâmica da variação de temperatura na amostra. Basicamente, os fatores que podem influenciar

a curva de variação de massa da amostra são classificados em duas categorias conforme descritos na Tabela 4: os fatores relacionados ao equipamento e os fatores relacionados às características da amostra (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

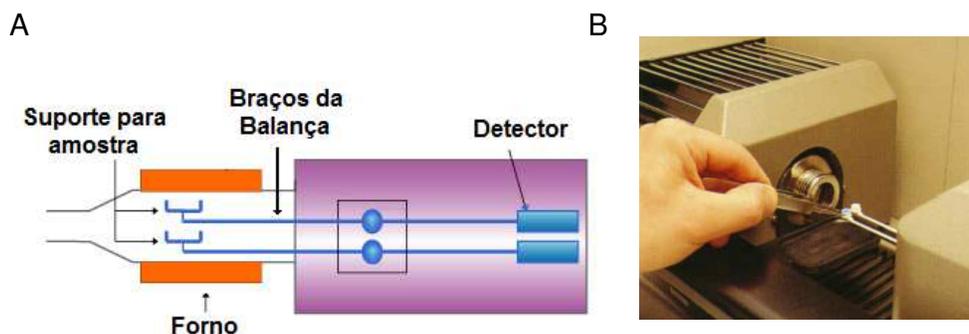
**Tabela 4** – Fatores instrumentais e características da amostra que podem influenciar na curva TG

<b>FATORES INSTRUMENTAIS</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atmosfera do forno;</li> <li>• Composição do conteúdo da amostra;</li> </ul> <p>Geometria do forno e do amostrador;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Razão de aquecimento (a extensão de decomposição é maior em razões de aquecimento baixo do que em alto);</li> <li>• Registro (velocidades maiores para obter o registro, a separação é maior e melhor);</li> <li>• Sensibilidade do mecanismo de registro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calor de reação;</li> <li>• Condutividade térmica;</li> <li>• Fase cristalina da amostra;</li> <li>• Natureza da amostra;</li> <li>• Quantidade de amostra (em pequenas quantidades observam-se maiores números de efeitos, além de se verificar intermediários formados);</li> <li>• Solubilidade do gás desprendido da amostra;</li> <li>• Tamanho da partícula (os tamanhos pequenos são melhores para alcançar o equilíbrio a uma dada temperatura do que cristais maiores, ocasionando uma melhor extensão da decomposição com amostras pequenas).</li> </ul>

Fonte: MOTHÉ; AZEVEDO (2002).

O equipamento utilizado na análise termogravimétrica é basicamente constituído por uma termobalança, termopares e um sistema de fluxo de gás. A Figura 3 apresenta um esquema detalhado e uma foto de um equipamento de TG com forno horizontal.

O termo “termobalança” é usado para definir um sistema capaz de medir a massa de uma amostra durante uma programação de temperatura. A termobalança é uma combinação adequada de uma microbalança eletrônica com um forno, um programador de temperatura e um computador o qual permite que os dados referentes à perda ou ganho de massa, ao tempo e à temperatura sejam coletados durante a análise (BROWN, 2004).



**Figura 3** - Esquema de uma termobalança (A); Foto do equipamento (B).

A técnica de TG, assim como outras técnicas termoanalíticas, tem sido bastante utilizada por diferentes autores em estudos que visam obter dados sobre a estabilidade térmica de fármacos, a determinação de parâmetros cinéticos, a caracterização de formas polimórficas e a compatibilidade fármaco-excipiente, demonstrando sempre a simplicidade, velocidade e baixos custos operacionais da técnica o que justifica seu emprego no controle de qualidade da indústria farmacêutica (AL-NAHARY et al, 2012; BARONSKY et al, 2009; TOMASSETTI et al, 2005).

#### 4.1.2.1 Termogravimetria derivada - DTG

A termogravimetria derivada (DTG) é a primeira derivada da curva termogravimétrica, ou seja, a derivada da variação de massa em relação ao tempo ou temperatura. A curva DTG apresenta as informações de uma forma mais visualmente acessível, mostrando com mais clareza os pontos inicial e final do processo, sendo a área diretamente proporcional à variação de massa, levando à pronta determinação da temperatura do pico e indicando a temperatura inicial e final do processo (IONASHIRO, 2005).

As curvas DTG podem ser utilizadas com diferentes finalidades. Durante a reação de perda de massa, o pico de DTG que é exatamente proporcional à derivada das curvas de TG, por esta razão, a área sob as curvas fornece a variação

de massa precisa, podendo ser utilizado em uma análise quantitativa por meio da medição da altura do pico. Também pode ser utilizado na separação de reações sobrepostas uma vez que com a curva DTG a visualização do ponto ambíguo se torna mais fácil (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

Além disso, o uso da DTG apresenta vantagens, tais como: as curvas podem ser obtidas em conjunto com as medidas de TG; as medidas de DTG indicam exatamente as temperaturas do início, a máxima taxa e o final da variação; o método de DTG pode ser usado para investigar materiais que fundem durante o aquecimento, por exemplo, compostos orgânicos (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

## **4.2 Técnicas Complementares**

Diante do exposto, verifica-se que as técnicas termoanalíticas são de grande valia nos estudos de pré-formulação, porém os resultados obtidos devem ser avaliados com cautela para que a interpretação seja feita de forma correta (JULIO et al, 2012). Diferentes técnicas analíticas também têm sido amplamente utilizadas a fim de obter informações de fármacos no estado sólido, dentre elas, pode-se destacar: PXRD, SEM, FT-IR, espectroscopia Raman e LC (ICH, 2003c).

### 4.2.1 Difractometria de raios X por pó - PXRD

Os raios X são radiações eletromagnéticas de mesma natureza que a luz visível, porém, situados entre os raios gama e raios ultravioleta no espectro eletromagnético (KAHAN, 2012). O método de difração de raios X consiste em um método simples e direto que não exige tratamento prévio da amostra. Sua principal aplicação refere-se à identificação de compostos cristalinos (KAHAN, 2012). Além disso, a difratometria de raios X por pó é utilizada para a detecção e quantificação de transformações polimórficas e determinação do estado cristalino de substâncias.

É a mais robusta técnica para diferenciação de duas formas polimórficas de uma mesma substância (HILKIFER, 2006). Os ângulos de difração característicos e

as intensidades dos picos são os resultados diretos das diferentes estruturas cristalinas, sendo, na maioria das vezes, específicos e únicos de cada substância cristalina, da mesma forma que o padrão difratométrico por ela gerado (equivalente a uma impressão digital) (KAHAN, 2012).

Uma das vantagens descritas para a técnica consiste na possibilidade de estabelecer o grau de cristalinidade de fármacos no decorrer do tempo e em função do estresse aplicado ao mesmo, permitindo a quantificação de diferentes formas polimórficas em misturas com várias formas ou o acompanhamento das transformações de uma forma polimórfica em outra ou em formas amorfas, isso porque há uma relação linear entre a intensidade dos picos de identificação da forma cristalina e sua concentração (GIRON, 2001).

Diferentes autores utilizaram esta técnica em seus estudos. Maurin e colaboradores (2007) descreveram sua utilização como um método rápido e confiável para a triagem rápida de comprimidos e a identificação de medicamentos falsificados. Por meio da técnica é possível detectar falsificações e imitações, além de prever corretamente a presença ou ausência da substância ativa e/ou excipientes específicos (MAURIN et al, 2007). Outros autores utilizam a difratometria de raios X juntamente com outras técnicas para avaliar matérias-primas farmacêuticas com a finalidade de identificar diferentes formas polimórficas, uma vez que a forma cristalina do produto pode influenciar no efeito terapêutico da forma farmacêutica desenvolvida (ALENCAR et al, 2006; KAUFFMAN; BATYKEFER; TUSCHEL, 2008; NÉMET et al, 2009).

#### 4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura - SEM

A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica muito versátil e usada rotineiramente para a análise e caracterização microestrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de muito fácil interpretação. Além disso, a elevada profundidade do foco (imagem com aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise

microestrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica (MALISKA, 2012).

O microscópio eletrônico de varredura é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). O princípio do funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura baseia-se na geração de um feixe de elétrons focado a partir, por exemplo, de um filamento de tungstênio, os quais passam por lentes condensadoras que reduzem seu diâmetro e por uma lente objetiva que o focaliza sobre a amostra. O sinal de imagem que é detectado resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra e é utilizado para a formação da imagem (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A aplicação da SEM é requisito obrigatório em ensaios de controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos a fim de garantir a qualidade e pureza destes, maximizar a eficácia e minimizar os efeitos secundários adversos (SERRANO; SILVA; SILVA, 2010). Os estudos realizados com o auxílio desta técnica permitem a verificação de transformações polimórficas de fármacos, a caracterização e a avaliação da qualidade de medicamentos por meio da identificação e detecção de componentes individuais presentes em uma mistura (SERRANO; SILVA; SILVA, 2010; DESAI; DHARWADKAR, 2008).

#### 4.2.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho – FT-IR

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho tem sido amplamente utilizada na identificação de substâncias. O baixo custo dos equipamentos aliado à simplicidade e rapidez para aquisição dos espectros tornam esta técnica de importância incontestável (KALINKOVA, 1999).

O espectrômetro de infravermelho simples consiste em um emissor de laser e uma fonte de luz no infravermelho, o interferômetro que separa os raios por faixa de comprimento de onda, um jogo de espelhos que conduz a luz até a amostra, e por fim um detector e um mecanismo computadorizado de registro e tratamento dos sinais (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Intrumentalmente o que difere o espectrômetro de infravermelho convencional de um equipamento com transformada

de Fourier é o interferômetro e como ele trata o sinal recebido. A transformada de Fourier é uma função matemática que converte o domínio do tempo para o domínio da frequência (BERTHOMIEU; HIENERWADE, 2009).

A região espectral que corresponde à radiação infravermelha compreende a parte do espectro eletromagnético com números de onda no intervalo de aproximadamente 15.000 a  $10\text{ cm}^{-1}$ . Do ponto de vista da aplicação e dos instrumentos empregados, o espectro infravermelho é dividido em infravermelho próximo (NIR) com número de onda entre 15.000 e  $4.000\text{ cm}^{-1}$ , infravermelho médio (MID) entre 4.000 e  $400\text{ cm}^{-1}$  e infravermelho distante (FAR) entre 400 e  $10\text{ cm}^{-1}$  (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

O infravermelho médio é a região do espectro onde se encontra o maior número de aplicações para a análise qualitativa de compostos orgânicos. Vários grupos funcionais absorvem na região do NIR, entretanto apresentam absorções menos intensas quando comparadas as absorções no MID. Já a região do FAR tem uso limitado devido às limitações instrumentais, pois são poucas as fontes para este tipo de radiação (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Dentro do campo das ciências farmacêuticas, o ponto de maior aplicação da espectroscopia no infravermelho está ligado ao controle de qualidade de fármacos, especialmente em ensaios de identificação de matérias-primas, já que esta metodologia fornece evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular, o que permite identificar moléculas com uma boa margem de segurança, uma vez que o resultado é único para cada substância (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; USP 32).

A região intermediária do espectro, que compreende a faixa de 1.300 a  $900\text{ cm}^{-1}$  é usualmente conhecida como a região de “impressão digital”. O espectro nela observado é, com frequência, complexo, com as bandas se originando de modos de vibração acoplados. A absorção nessa região intermediária é provavelmente diferente para diferentes espécies moleculares, sendo importante para a determinação da estrutura quando examinada com referência a outras regiões (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Diversos autores sugerem o emprego da espectroscopia na resolução de problemas de cristalinidade, identidade, qualidade de matérias primas, detecção da degradação de fármacos, determinação de homogeneidade, validação de misturas

de pós, análise de produtos parenterais, polimorfismos e interação fármaco-excipiente (KALINKOVA, 1999; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; VAN EERDENBRUGHA; TAYLOR, 2011; LILTORP et al, 2011; VERMA; GARG, 2005).

A combinação da espectroscopia na região do infravermelho com a difratometria de raios X é utilizada com grande êxito para comprovar as interações entre fármacos, excipientes e sistemas binários fármaco-excipiente (TITA et al, 2011a). As alterações observadas nos espectros de infravermelho como o surgimento de novas bandas, ampliação ou alterações na intensidade ou posição das bandas, observadas em relação ao espectro original devem ser associadas com as alterações nos difratogramas obtidos em condições semelhantes (KALINKOVA, 1999).

#### 4.2.4 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é outra técnica bastante importante para complementar os resultados obtidos nos estudos de pré-formulação. Trata-se de uma técnica que usa uma fonte monocromática de luz a qual, ao atingir a amostra, interage com os compostos químicos presentes, de tal forma que a luz é espalhada em diferentes frequências, dependendo tanto dos elementos químicos quanto de suas ligações nas moléculas (FARIA, 2012).

A irradiação de uma molécula com uma luz monocromática resulta sempre em dois tipos de dispersão de luz, elástica e inelástica. No espalhamento elástico, não ocorre nenhuma mudança na frequência de fótons ou qualquer mudança no seu comprimento de onda e energia. Por outro lado, tem-se o espalhamento inelástico que é acompanhado por uma mudança na frequência de fótons devido à excitação ou desativação de vibrações moleculares em que o fóton pode tanto perder certa quantidade de energia como ganhar energia (DAS; AGRAWAL, 2011).

O interessante da técnica é que a diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada corresponde à energia com que átomos presentes na área estudada estão vibrando e essa frequência de vibração permite descobrir como os átomos estão ligados, ter informação sobre a geometria molecular, sobre como as

espécies químicas presentes interagem entre si e com o ambiente (FARIA, 2012; BRITTAİN, 2006).

O espectro Raman contém informações similares às de um espectro de absorção no infravermelho, apesar da natureza dos fenômenos físicos ser diferente (espalhamento no caso da espectroscopia Raman e absorção no caso da espectroscopia no infravermelho). Assim como na espectroscopia na região do infravermelho, cada espécie química fornece um espectro que é como sua impressão digital, permitindo sua identificação inequívoca ou, por exemplo, a detecção de alterações químicas decorrentes de sua interação com outras substâncias ou com a luz (FARIA, 2012; BRITTAİN, 2006).

Existem inúmeras vantagens para a utilização da espectroscopia Raman. Trata-se de uma técnica rápida e não destrutiva, permitindo a direta identificação e caracterização das amostras, sendo desnecessária a preparação da amostra, o que permite realizar medidas diretamente sobre o material ou até mesmo em material acondicionado em sacos plásticos ou vidros, facilitando a análise (BRITTAİN, 2006; VANKEIRSBILCK et al, 2002). Além disso, uma vez que as intensidades das bandas causadas por vibrações de hidroxila são fracas em espectros de Raman, uma amostra rica em água pode ser diretamente analisada (BRITTAİN, 2006). A técnica também tem sido bastante difundida para a avaliação do polimorfismo de fármacos e tem se mostrado promissora por se tratar de uma técnica complementar aos resultados obtidos pela espectroscopia no infravermelho (GOMES; SERCHELI, 2012).

Observa-se na literatura a grande versatilidade da espectroscopia Raman em relação às aplicações na área de farmácia, como a sua extrema valia na determinação qualitativa, semi-quantitativa e quantitativa de fármacos em diversas formas farmacêuticas, na caracterização das suas formas cristalinas (BRITTAİN, 2006; NUMATA; TANAKA, 2011; DE VEIJ et al, 2007), entre outras aplicações como as medições em tempo real durante o monitoramento de processos industriais farmacêuticos uma vez que esta técnica permite resultados rápidos sem a necessidade de preparo da amostra (DE BEERA et al, 2011). Verifica-se também a existência de algumas técnicas que podem ser associadas à espectroscopia Raman, a fim de melhorar a eficiência do sistema, contornando eventuais dificuldades.

#### 4.2.5 Cromatografia Líquida - LC

A cromatografia líquida é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. Essa técnica emprega pequenas colunas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões e tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. São as forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases e são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças determina a resolução e, portanto a separação das substâncias individuais (CIOLA, 1998).

A cromatografia líquida apresenta vantagens e limitações quando comparadas a outras técnicas de separação. Dentre as vantagens podemos listar: menor tempo de análise requerido, alta resolução, utilizada em análises quantitativas, apresenta boa sensibilidade, versatilidade e possibilidade de automação. Porém, há algumas limitações em seu uso como o alto custo da instrumentação e operação, a necessidade de experiência no seu manuseio e a falta de um detector universal sensível (DONG, 2005).

Para estudo de estabilidade de fármacos, a cromatografia líquida de fase reversa, em geral, é considerada o método mais eficiente para identificar a maioria dos produtos de degradação de fármacos e as interações fármaco-excipiente. A cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrometria de massa também é uma importante técnica a ser utilizada na identificação de produtos de degradação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Outra técnica que tem apresentado crescente uso no meio científico é a cromatografia líquida de ultra *performance* (UPLC), a qual apresenta redução significativa do tempo empregado na separação e no consumo de solvente, sem comprometer a separação global (RAO, et al, 2010).

Observa-se na literatura o uso crescente da LC e seus avanços tecnológicos como técnica de separação para avaliar qualitativa e quantitativamente os produtos

de degradação de fármacos ainda na fase de pré-formulação farmacêutica. Diferentes trabalhos foram publicados demonstrando métodos de separação em estudos de estabilidade para o fármaco desloratadina (QI; WANG, GENG, 2005; ALAM RAZIB et al, 2006; EL-ENANY, EL-SHERBINY, BELAL, 2007; EL-SHERBINY et al, 2007; RAO et al, 2010). Da mesma forma, é possível encontrar inúmeros trabalhos publicados recentemente envolvendo estudo de pré-formulação para uma diversidade de fármacos, dentre eles o citrato de sildenafil (JULIO et al, 2012) e valsartana (PATRO et al, 2010; KRISHNAIAH et al, 2010).

## **5 APLICAÇÃO 1: DESLORATADINA**

Neste tópico será descrita a primeira aplicação deste trabalho, a qual envolve os estudos de caracterização do anti-histamínico DL, sua compatibilidade com diferentes excipientes farmacêuticos e os estudos de estabilidade acelerada. Foram descritos os aspectos farmacológicos do fármaco, da histamina e dos anti-histamínicos em geral, além dos materiais e métodos empregados, bem como os resultados e as conclusões obtidas com a pesquisa.

### ***5.1 Histamina e Doenças Alérgicas***

A histamina é sintetizada a partir do aminoácido L-histidina pela ação da enzima L-histidina descarboxilase (SIMONS; SIMONS, 2011), uma enzima produzida por células inflamatórias, neurônios do sistema nervoso central e células parietais da mucosa do estômago (HOYTE; KATIAL, 2011). Embora a maior parte destas células produza a histamina, elas não são capazes de armazená-la (HOYTE; KATIAL, 2011), porém contribuem significativamente para a excreção diária desse mediador e seus metabólitos (GOODMAN; GILMAN, 2010). Os mastócitos e basófilos constituem os locais predominantes de síntese e armazenamento da histamina, a qual geralmente é liberada durante a fase imediata da reação alérgica quando as células sofrem degranulação (HOYTE; KATIAL, 2011; GOODMAN; GILMAN, 2010) devido a vários estímulos tais como alérgenos, produtos químicos, toxinas microbianas, venenos de insetos e serpentes e estresse (frio, queimadura, infecção) (ROCHA JUNIOR, 1998).

Como a histamina é um dos mediadores pré-formados e armazenados nos mastócitos, a sua liberação em decorrência da interação de antígeno com anticorpos imunoglobulinas E (IgE) sobre a superfície dos mastócitos desempenha papel central na hipersensibilidade imediata e nas respostas alérgicas. As ações da histamina no músculo liso brônquico e nos vasos sanguíneos são responsáveis, em parte, pelos sintomas da resposta alérgica. Além disso, determinados fármacos clinicamente úteis podem atuar diretamente sobre os mastócitos para liberar

histamina, explicando, assim, alguns de seus efeitos indesejáveis. A histamina também desempenha importante papel na regulação da secreção de ácido gástrico, e, também, teve reconhecida a sua função como modulador da liberação de neurotransmissores (GOODMAN; GILMAN, 2010).

A histamina exerce seus efeitos através de quatro diferentes subtipos de receptores (H1, H2, H3, H4) (SIMONS; SIMONS, 2011; MOTALA, 2009), todos pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G e que diferem quanto à localização, mensageiros secundários e propriedades de ligação com a histamina (LEURS; CHURCH; TAGLIALATELA, 2002). Apesar de cada um destes receptores predominarem em diferentes tipos de células em todo o corpo, eles exercem efeitos biológicos diferentes (HOYTE; KATIAL, 2011).

A histamina liberada atua como um mediador para um dos sintomas imediatos das doenças alérgicas. A estimulação dos receptores histamínicos H1 nos nervos sensoriais é exclusivamente responsável pelos espirros e pelo prurido. A ação da histamina sobre os receptores H1 dos vasos sanguíneos está diretamente relacionada com a vasodilatação e no aumento da permeabilidade vascular que induzem a rinorreia e obstrução nasal (SMUDA; BRYCE, 2011).

O bloqueio da ação da histamina na resposta à provocação de alérgenos é a estratégia mais apropriada porque interrompe as etapas principais em uma fase precoce do desenvolvimento da doença e alivia muitos de seus sintomas. Por essa razão, o desenvolvimento de anti-histamínicos específicos e eficazes, de ação rápida, tem sido primordial para o tratamento de pacientes com rinite alérgica (GOODMAN; GILMAN, 2010; ROCHA JUNIOR, 1998).

## ***5.2 Agentes Anti-Histamínicos***

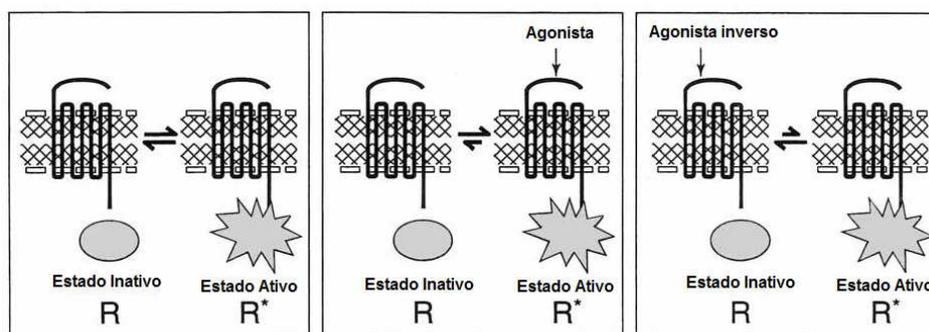
Os anti-histamínicos H1 estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo e, embora tenham eficácia semelhante no tratamento de pacientes com conjuntivite alérgica, urticária e outras doenças alérgicas, diferem de forma importante quanto à sua estrutura química, farmacologia clínica e potencial tóxico (SIMONS, 2002).

Mais de 40 anti-histamínicos orais estão disponíveis à população e podem ser classificados como medicamentos de primeira geração e segunda geração, dependendo de suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e seus perfis de efeitos colaterais (MOTALA, 2009).

Os anti-histamínicos H1 de segunda geração, que se caracterizam como compostos com elevada potência, essencialmente livres do efeito sedativo sobre o SNC nas doses recomendadas para o tratamento de doenças alérgicas, apresentam efeito de longa duração e também efeitos antiinflamatório que podem contribuir para o benefício terapêutico (MOTALA, 2009; SMUDA; BRYCE, 2011).

Ao contrário destes, a primeira geração dos anti-histamínicos compreende fármacos altamente lipofílicos e de baixo peso molecular e por isso, atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, levando a efeitos adversos no SNC, especialmente sedação, o que pode prejudicar o desempenho das atividades diárias (HOYTE; KATIAL, 2011; MOTALA, 2009). Em geral, os anti-histamínicos de primeira geração, por exemplo, a dexclorfeniramina e a hidroxizina, são rapidamente absorvidos e metabolizados pelo organismo (ROCHA JUNIOR, 1998).

O mecanismo de ação dos anti-histamínicos H1 baseia-se em sua atuação como agonista inverso. O receptor H1 encontra-se em equilíbrio no estado ativo e inativo quando nem a histamina nem o anti-histamínico estão presentes. A histamina, quando presente, se liga preferencialmente à forma ativada do receptor com a finalidade de estabilizá-lo e, com isso, desloca o equilíbrio para o estado ativado estimulando a célula (FIGURA 4). Os anti-histamínicos estabilizam a forma inativa e deslocam o equilíbrio no sentido oposto. Assim, o nível de estimulação da célula ou tecido depende do equilíbrio entre a histamina e o anti-histamínico no organismo (MOTALA, 2009).

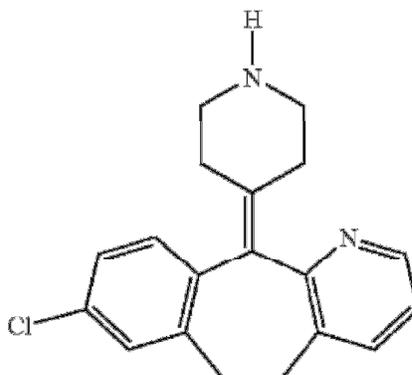


**Figura 4** - Modelo simplificado das condições de equilíbrio dos dois estados, ativo e inativo, do receptor H1 da histamina.

### 5.3 Desloratadina

A desloratadina é um anti-histamínico tricíclico de segunda geração, o qual atua seletivamente e de forma prolongada sobre os receptores H1 da histamina, e vem sendo bastante utilizado no tratamento de sintomas alérgicos, uma vez que não apresenta sintomas sedativos, nem efeitos sobre os sistemas cardiovascular e SNC (ANTHES et al, 2002). Além da atividade anti-histamínica, a desloratadina apresentou atividade antiinflamatória em vários estudos. Esses estudos demonstram que a desloratadina inibe a grande cascata de eventos que inicia e propaga a inflamação alérgica (SCHERING-PLOUGH, 2004a).

A desloratadina é um composto de nome químico 8-cloro-6,11-dihidro-11-(4-piperidinilidene)-5H-benzo-[5,6]ciclohepta-[1,2-b]-piridina, sua fórmula empírica é  $C_{19}H_{19}ClN_2$  e sua massa molar é igual a  $310,82 \text{ g.mol}^{-1}$ . Apresenta-se como um sólido cristalino, de cor branca, com faixa de fusão de  $150^\circ\text{C}$  a  $151^\circ\text{C}$ , sendo fracamente solúvel em água, mas solúvel em etanol e propilenoglicol (MERCK INDEX, 2006). Sua fórmula estrutural é mostrada na Figura 5 onde é possível observar a presença dos grupos piridina (pKa 4,2) e piperazina (pKa 9,7), característicos dessa classe de medicamentos.



**Figura 5** - Estrutura química da desloratadina.

Nos Estados Unidos, o medicamento referência, cujo princípio ativo é a desloratadina é o Clarinex®, o qual foi desenvolvido pelo Laboratório Schering-Plough, detentor da patente do fármaco. No Brasil, esse medicamento é

comercializado com o nome Desalex® (também fabricado pela Schering-Plough), e sua patente teve vencimento durante o ano de 2012.

A desloratadina é rapidamente absorvida no tubo digestivo, após a ingestão oral. Concentrações plasmáticas de desloratadina podem ser detectadas dentro de 30 minutos após a sua administração. As concentrações plasmáticas máximas são atingidas em 3 horas e sua meia-vida de eliminação é de 27 horas. Sua ligação a proteínas plasmáticas é elevada e varia de 82 a 87%, não se alterando em indivíduos com função renal comprometida (SHERING-PLOUGH, 2004a; SHERING-PLOUGH, 2004b).

## **5.4 Parte Experimental**

### 5.4.1 Materiais e Equipamentos

Os materiais e equipamentos utilizados durante a realização deste trabalho encontram-se disponíveis no Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos (LACFar) e Laboratório de Cristalografia, ambos pertencentes ao Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas e Laboratório de Quimiometria em Química Analítica, ambos pertencentes ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas-SP (IQ-UNICAMP).

#### **a) Materiais**

A desloratadina (DL) foi cedida por Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A (fabricante Dr. Reddys-India).

O estudo de compatibilidade e estabilidade acelerada foi realizado entre o fármaco e nove excipientes comumente utilizados pela indústria farmacêutica na fabricação de formas farmacêuticas sólidas de uso oral. Todos os excipientes selecionados apresentam grau farmacêutico e encontram-se descritos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Excipientes utilizados nos estudos de compatibilidade

<b>Excipientes</b>	<b>Categoria</b>
Fosfato de cálcio dibásico anidro	Diluyente
Celulose microcristalina	Diluyente
Amido de milho	Aglutinante/Diluyente
Talco farmacêutico	Diluyente
Manitol	Diluyente
Estearato de magnésio	Lubrificante
Polivinilpirrolidona K25 (PVP)	Desintegrante
Ácido esteárico	Lubrificante
Lactose anidra	Diluyente

Fonte: ROWE; SHESKEY; OWEN (2006).

Para as análises por LC, foram utilizados acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich), dodecilsulfato de sódio (Sigma-Aldrich), ácido cítrico anidro (Synth), ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich), citrato de sódio (Synth) e sulfato de sódio anidro (Sigma-Aldrich). Todos os reagentes utilizados apresentam grau P.A. e pureza maior que 99%. Utilizou-se também água Milli-Q (resistividade 18,2  $\Omega$  cm) obtida de um sistema de purificação de água Millipore (Millipore Corporation, USA).

#### **b) Equipamentos**

Foram utilizados durante a realização dos experimentos um agitador vortex MA162 (Marconi), uma balança analítica AY220 (Shimadzu) e uma câmara de estabilidade com temperatura ajustada para  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , utilizando uma solução saturada de NaCl para manutenção da umidade relativa em  $75\% \pm 5\%$  e monitorada por um termohigrômetro calibrado (Incoterm).

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento com fluxo de calor modelo DSC-7020 EXSTAR (SII NanoTechnology Inc.) e as curvas TG/DTG foram obtidas em uma termobalança Q600 (TA Instruments).

Os difratogramas foram obtidos em difratômetro de raios X Ultima IV – Rigaku; os espectros de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier foram realizados em espectrômetro eletrônico IR Prestige-

21 (Shimadzu); as fotomicrografias foram obtidas empregando microscópio eletrônico de varredura JEOL® mod. JSM-6340F; os espectros de Raman foram obtidos no equipamento RamanStation 400F (PerkinElmer) equipado com laser de excitação a 785 nm.

As análises por LC foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo LC-20AT equipado com detector de arranjo de diodos (PDA), amostrador automático SIL-20A e forno de coluna CTO-10ASVP (Shimadzu, Kyoto, Japan). Utilizou-se uma coluna C18 marca Waters Corporation, USA de 150 mm x 4,6 mm diâmetro interno e partículas de 5 µm. O software LC Solutions versão 1.21 SP1 (Shimadzu) foi utilizado para aquisição e processamento dos dados.

## 5.4.2 Métodos

### 5.4.2.1 Caracterização da Desloratadina

O fármaco desloratadina foi caracterizado empregando seis técnicas distintas. Dentre as técnicas analíticas foram utilizadas: DSC, TG, PXRD, FT-IR, espectroscopia Raman e SEM.

Para complementar a caracterização físico-química e avaliar a estabilidade térmica da DL em estudo, o fármaco foi submetido ao DSC cíclico (CDSC), o que implica submeter a amostra a um ciclo de aquecimento seguido do resfriamento até a temperatura de partida e, em seguida faz-se um segundo aquecimento à mesma taxa. Uma comparação direta pode ser realizada entre os dados obtidos em cada etapa do CDSC a fim de determinar a natureza das transições (THASS, 2012). Usando o CDSC, os eventos térmicos reversíveis e irreversíveis do fármaco em estudo podem ser identificados mais facilmente. Para esse experimento uma amostra contendo cerca de 3 mg de DL foi aquecida numa razão de 10 °C.min<sup>-1</sup> sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>) e mantida em isoterma por 3 minutos a 180°C. A mesma amostra foi então resfriada na razão de 10 °C.min<sup>-1</sup> até a temperatura de partida (25°C). A amostra após esse ciclo foi recolhida do cadinho e analisada por PXRD, FT-IR, espectroscopia Raman e SEM.

#### a) Calorimetria Exploratória Diferencial

Para obtenção das curvas DSC, uma amostra do fármaco (aproximadamente 3,0 mg) foi cuidadosamente pesada, acondicionada em cadinho de alumínio aberto e aquecida no intervalo de temperatura de 25 a 350°C a uma razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>). A célula de DSC foi previamente limpa e calibrada com índio metálico (pureza de 99,99%; temperatura de fusão igual a 156,4°C; entalpia de fusão igual a 28,7 J.g<sup>-1</sup>).

As curvas obtidas receberam tratamento utilizando o *software* EXSTAR visando caracterizar os eventos térmicos característicos das amostras.

#### b) Termogravimetria

As curvas TG/DTG foram obtidas utilizando aproximadamente 10 mg de amostra acondicionada em cadinho de alumínio e aquecida de 30 °C a 600 °C sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>. A calibração do sistema de análise termogravimétrica foi realizada usando padrão de oxalato de cálcio monoidratado.

As curvas obtidas foram tratadas empregando *software* EXSTAR, a fim de identificar a etapa de decomposição térmica da amostra.

#### c) Difratometria de raios X

Os ensaios de difratometria de raios X por pó foram realizados utilizando um difratômetro Ultima IV – Rigaku com fonte de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ) e utilizando silício (Si) policristalino como padrão. As medições foram realizadas no modo *step scan* de 5 a 55 °2 $\theta$  utilizando uma voltagem de 40 Kv, corrente de 30 mA, passo 0,02° e 0,5 segundo/passos.

#### d) Espectroscopia na região do Infravermelho

O espectro de absorção da desloratadina na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) foi registrado no intervalo de 4.000 a 400 cm<sup>-1</sup>,

com resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$ , utilizando pastilhas preparadas em prensa hidráulica com 100 mg de brometo de potássio (KBr) e contendo 1% do conteúdo da amostra. Os dados foram tratados com o *software* Shimadzu IRSolution 1.30.

#### **e) Espectroscopia Raman**

O espectro Raman foi obtido a temperatura ambiente utilizando um equipamento RamanStation 400F equipado com laser de excitação em 785 nm. Cada espectro foi obtido a partir de uma média de quatro leituras, com resolução espectral de  $1\text{ cm}^{-1}$  no intervalo de 2.000 a  $200\text{ cm}^{-1}$ .

#### **f) Microscopia Eletrônica de Varredura**

A morfologia do fármaco foi analisada usando microscópio eletrônico de varredura JEOL mod. JSM-6340F. As amostras foram fixadas em um suporte metálico (*stub*) com auxílio de uma fita dupla-face de cobre e submetidas à metalização com ouro sob vácuo, a fim de torná-las eletricamente condutivas. A visualização foi realizada em aumentos de 500 e 10.000 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 kV.

#### *5.4.2.2 Estudos de Compatibilidade entre a Desloratadina e Excipientes Farmacêuticos*

Para realização do estudo de compatibilidade entre o fármaco desloratadina e os nove excipientes selecionados foram preparadas misturas binárias na proporção 1:1 (m/m) fármaco-excipiente com o intuito de intensificar as prováveis reações de estado sólido. As misturas físicas na proporção 1:1 (m/m) foram obtidas a partir da mistura de quantidades rigorosamente iguais em valores de massa das duas substâncias em um recipiente de polietileno de 3 cm x 2 cm de diâmetro, seguido de homogeneização durante 1 (um) minuto em vortex utilizando duas esferas de aço inoxidável. Esta proporção foi escolhida a fim de maximizar a probabilidade de

interação entre os componentes. Após o preparo as amostras do fármaco, dos excipientes e das misturas binárias foram imediatamente analisadas.

Os estudos de compatibilidade entre fármacos e excipientes foram realizados através de análises das curvas DSC do fármaco, dos excipientes e da mistura das duas substâncias. As curvas DSC foram obtidas conforme procedimento descrito na alínea (a) do item 5.4.2.1, porém numa faixa de temperatura de 25 a 180 °C, temperatura suficiente para se observar o evento endotérmico de fusão do fármaco.

#### *5.4.2.3 Estudo de Estabilidade Acelerada*

As mesmas amostras de fármaco, excipientes e misturas binárias preparadas e utilizadas para avaliação da compatibilidade fármaco-excipiente foram incubadas na câmara de estabilidade nas condições recomendadas pelo guia Q1A do ICH ( $40 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $75 \pm 5\%$  UR). As misturas foram divididas em dois grupos: (i) Calor seco usando recipientes de polietileno selados; (ii) Calor úmido usando recipientes de polietileno abertos, com ambos acondicionados na mesma câmara de estabilidade. Estas amostras foram analisadas após 3 e 6 meses de armazenamento, tal como recomendado pelo ICH para testes de estabilidade acelerada de novas substâncias e produtos.

#### *5.4.2.4 Avaliação da compatibilidade e estabilidade da DL por Cromatografia Líquida*

A cromatografia foi realizada como técnica comparativa, a fim de confirmar e complementar os dados obtidos a partir da análise térmica. Para essa etapa foram realizados ensaios cromatográficos para avaliação da compatibilidade entre o fármaco e os excipientes e da formação de produtos de degradação decorrente do armazenamento das amostras sob condições forçadas.

A análise por HPLC foi conduzida segundo método indicativo de estabilidade descrito por Zheng, J e Rustum, A.M. (2010). As condições cromatográficas do método encontram-se descritas a seguir.

Uma mistura contendo 30% de acetonitrila, 70% de água milli-Q e 0,05% de ácido cítrico foi utilizada como diluente no preparo de todas as amostras e do padrão de DL. Uma solução estoque de DL foi preparada a temperatura ambiente pela solubilização de 50 mg do fármaco em 50 mL de diluente ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Uma solução de trabalho do fármaco foi preparada pela adição de 2 mL da solução estoque de DL em um balão volumétrico de 10 mL, o volume foi completado com solução diluente e filtrado através de membrana  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  para *vial*. Essa solução final contém aproximadamente  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  de DL.

Foram preparadas diferentes soluções as quais foram utilizadas posteriormente no preparo da fase móvel. São elas:

- Solução de citrato de sódio 0,1 M: Em um balão volumétrico de 1.000 mL adicionou-se 29,4 g de citrato de sódio. O volume foi completado com água milli-Q após total dissolução do sal.
- Solução de ácido cítrico 0,1 M: Em um balão volumétrico de 1.000 mL foram adicionados 19,2 g de ácido cítrico anidro. O volume foi completado com água milli-Q após total dissolução do ácido.
- Tampão citrato de sódio 0,1 M: Em um béquer de 500 mL foram adicionados 300 mL da solução de citrato de sódio 0,1 M. Utilizou-se quantidade suficiente da solução de ácido cítrico 0,1 M para ajustar o pH da solução para 5,9.

A fase móvel utilizada no método é constituída de duas fases A e B: A Fase A (aquosa) foi preparada pela mistura de 85% de água milli-Q com 15% de solução tampão de citrato de sódio 0,1 M (pH 5,9). A essa mistura foi adicionado sob agitação vigorosa o dodecilsulfato de sódio na proporção 1,73 g para cada 2.000 mL de fase móvel preparada. A Fase B constitui-se apenas de acetonitrila, selecionada como modificador orgânico.

O gradiente estabelecido para a fase móvel encontra-se descrito na Tabela 6. O fluxo da fase móvel foi de  $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ , o volume de injeção de  $10 \text{ }\mu\text{L}$  com detecção em comprimento de onda de 267 nm.

As modificações em relação ao método indicativo de estabilidade desenvolvido e validado por Zheng, J e Rustum, A.M. (2010) são o tamanho de partícula da coluna de  $5 \text{ }\mu\text{m}$  e o aumento no tempo de corrida em 7 min a fim de estabilizar a coluna antes da próxima injeção de amostra.

**Tabela 6** - Programa gradiente para análise da DL

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Solução A (%)</b>	<b>Solução B (%)</b>
0	67	33
0 - 20	67 → 58	33 → 42
20 - 22	58 → 67	42 → 33
22 - 27	67	33

Fonte: Adaptado de ZHENG; RUSTUM (2010).

Para construção da curva de calibração foram utilizadas soluções do fármaco nas concentrações 0,05; 0,15; 0,2; 0,25; 0,35 mg.mL<sup>-1</sup>. As leituras foram feitas em triplicata para cada concentração.

## **5.5 Resultados e Discussão**

### 5.5.1 Caracterização da Desloratadina

A aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização de fármacos, aliada a outras técnicas, vem se tornando importante instrumento nos estudos de pré-formulação e controle de qualidade na indústria farmacêutica. A caracterização da DL foi estudada usando DSC e TG. FT-IR, PXRD, espectroscopia Raman e SEM foram empregadas como técnicas complementares para caracterização da molécula.

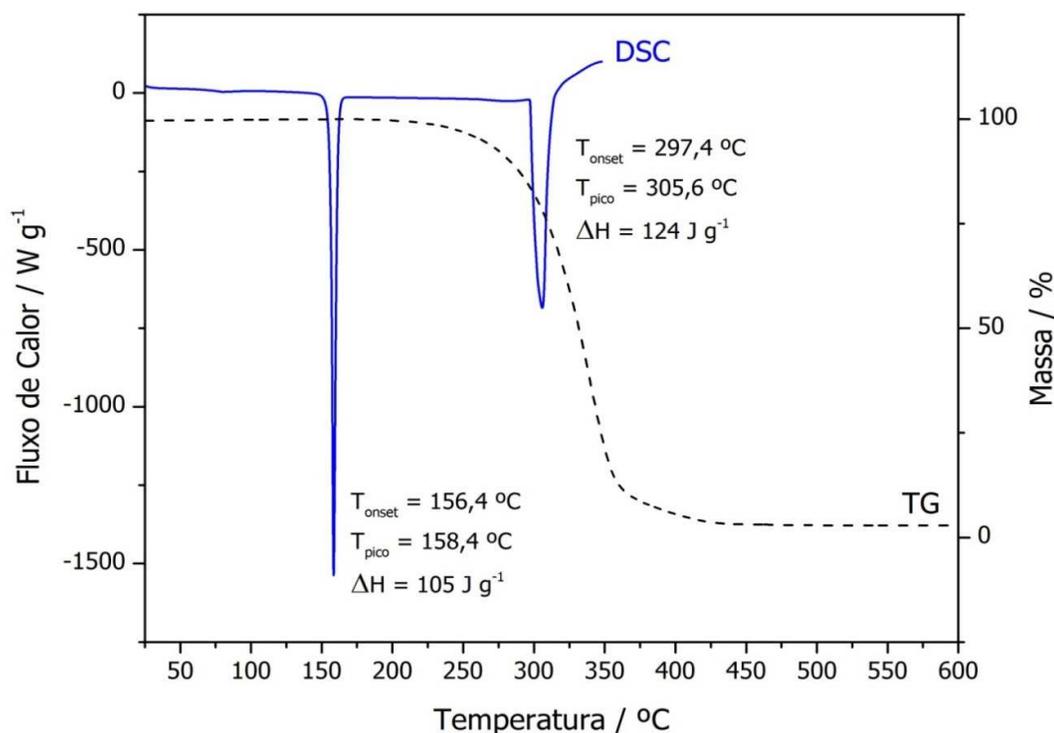
#### *5.5.1.1 Avaliação do comportamento térmico da DL*

As curvas TG/DTG e DSC obtidas para o fármaco estão apresentadas nas Figuras 6 e 7. A curva DSC da desloratadina (FIGURA 6) apresentou dois eventos endotérmicos distintos: um pico endotérmico bem definido e característico de fusão em 158,4°C ( $T_{\text{onset}} = 156,4^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H_{\text{fusão}} = 105 \text{ J.g}^{-1}$ ), temperatura na qual não se observa qualquer evento relacionado à perda de massa pela avaliação da curva TG;

e um segundo pico endotérmico em 305,6°C ( $T_{\text{onset}} = 297,4^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H_{\text{fusão}} = 124 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ) o qual coincide com a perda de massa observada na curva TG e, portanto, pode ser atribuído a um evento de decomposição.

O resultado da análise termogravimétrica revelou que a decomposição térmica da DL em atmosfera de nitrogênio inicia-se com um evento endotérmico em 178,4°C. A faixa de temperatura de decomposição varia de 178,4 a 451,9°C com perda de massa total de 97,1%.

As curvas TG/DTG da DL (FIGURA 7) apresentaram duas perdas de massa consecutivas e cineticamente diferentes. A primeira perda de massa, mais acentuada, ocorreu na faixa de 178,4°C a 384,1°C com variação de massa de 92,4% e pico DTG em 340,8°C; e a segunda, mais lenta, ocorreu na faixa de 384,1°C a 451,9°C com perda de 4,7% de massa e pico DTG em 404,3°C. Ao final da análise ainda houve detecção de resíduos do fármaco no cadinho porta-amostra.



**Figura 6** - Curvas DSC e TG da desloratadina.

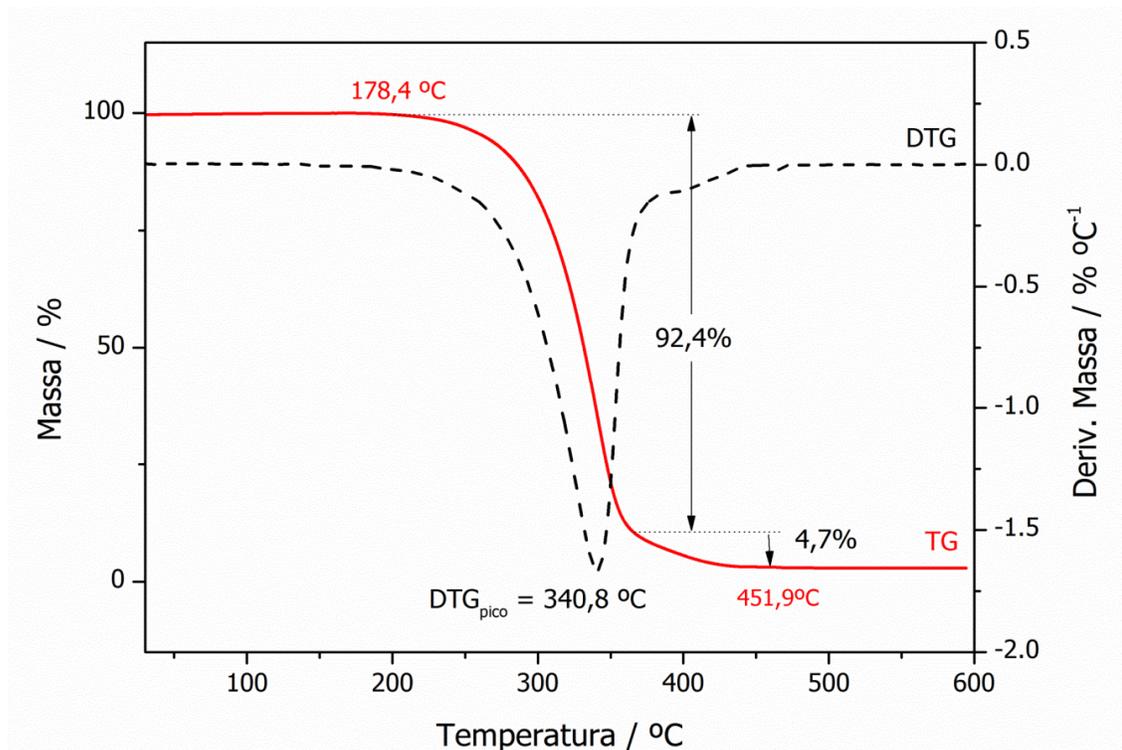


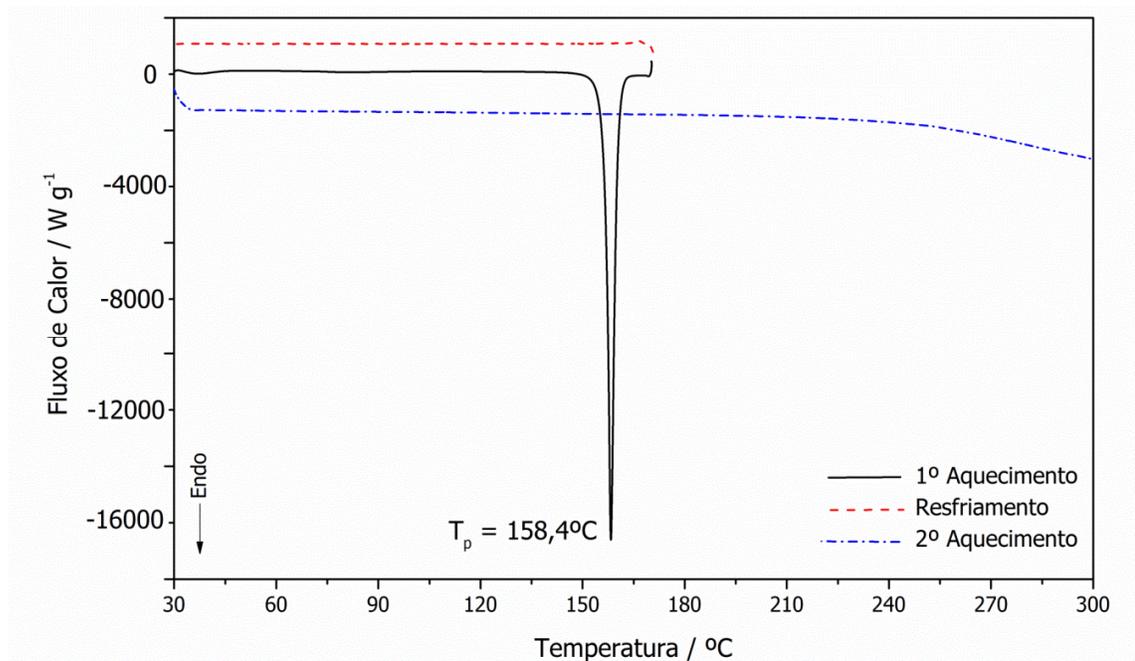
Figura 7 - Curvas TG/DTG da desloratadina.

A Figura 8 apresenta as curvas DSC obtidas para o fármaco quando o mesmo foi estudado utilizando o CDSC. Esse ciclo de aquecimento, resfriamento e aquecimento foi desenvolvido com o intuito de avaliar a estabilidade térmica da DL e verificar a natureza do fármaco após a fusão.

Após o aquecimento da amostra até 180°C, foi possível observar corretamente o evento endotérmico característico de fusão ( $T_{\text{onset}} = 156,4^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{\text{pico}} = 158,4^{\circ}\text{C}$ ). A mesma amostra foi então resfriada (curva vermelha da Figura 8) e, na curva DSC de resfriamento esperava-se o aparecimento de um evento exotérmico referente à recristalização do fármaco na mesma temperatura do evento de fusão ocorrido anteriormente, porém o mesmo não foi observado. Após resfriamento, a mesma amostra foi novamente aquecida até 300°C a fim de verificar se houve deslocamento ou desaparecimento do evento de fusão. Nenhum evento térmico foi observado (curva azul da Figura 8), o que pode ser um indicativo de amorfização do fármaco.

É importante ressaltar que sólidos amorfos têm propriedades muito diferentes das observadas nas respectivas formas cristalinas de uma substância. Como exemplo, pode-se descrever a ausência do sinal do ponto de fusão no DSC uma vez

que apresentam estrutura desordenada e moléculas mais livres, ou seja, não existe retículo cristalino. A estrutura amorfa pode ocorrer em diferentes substâncias quando o processo de solidificação for rápido, de tal forma que as moléculas não tiveram oportunidade de alinhar-se de forma correta para formar um cristal, o que pode explicar a ausência dos eventos de recristalização e posterior fusão da DL quando submetida ao CDSC.



**Figura 8** – DSC cíclico da desloratadina.

Além disso, pode-se observar na Figura 8 que houve uma diferença na linha de base para cada curva obtida no CDSC. Essa alteração pode ser explicada pela diferença na capacidade calorífica ou condutância térmica do fármaco quando o mesmo assume o estado cristalino ou amorfo.

### 5.5.1.2 Caracterização Estrutural da DL empregando PXRD e SEM

Após o resfriamento total da amostra submetida ao programa do CDSC a mesma foi então recolhida do cadinho e analisada por difração de raios X por pó, a

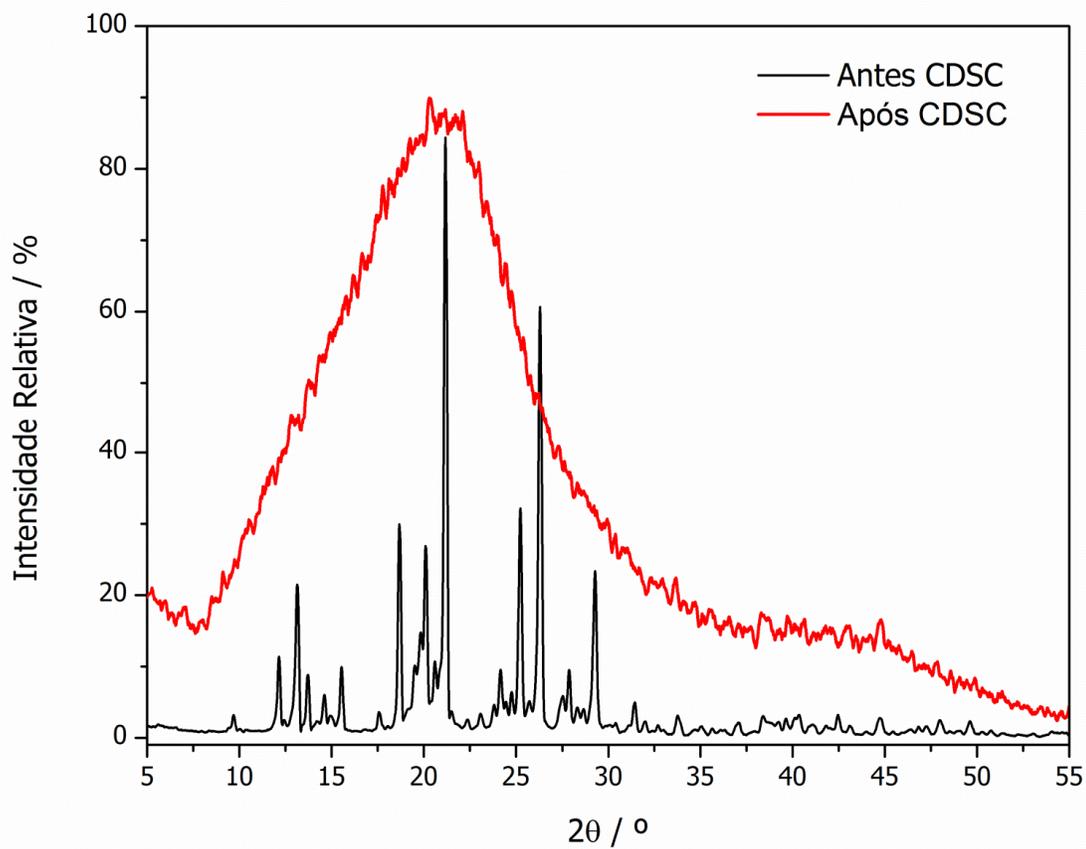
fim de investigar a natureza do fármaco após o aquecimento, uma vez que essa técnica é uma poderosa ferramenta para a identificação de sólidos cristalinos e para determinação do grau de cristalinidade (STEPHENSON; FORBES; REUTZEL-EDENS, 2001).

Antes da avaliação térmica, a amostra apresentou picos difratométricos intensos em 12,14; 13,14; 18,68; 20,08; 21,16; 26,3 e 29,24 °2 $\theta$ , característicos da cristalinidade da Forma I (MURPANI et al, 2007), no entanto, após submeter o fármaco ao DSC cíclico, o mesmo não apresentou picos difratométricos detectáveis, caracterizando-se como amorfo (FIGURA 9). Desta forma, confirma-se que o processo de aquecimento controlado e fusão da amostra foram eficientes para promover a amorfização do fármaco.

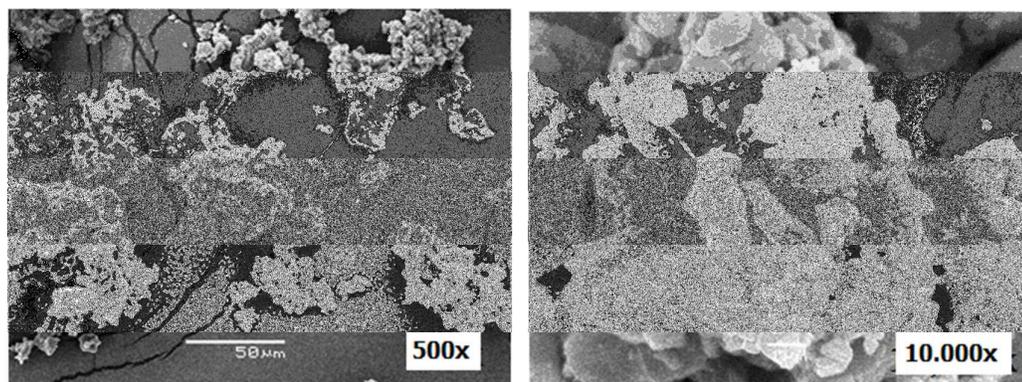
Conforme descrito anteriormente, sabe-se que o polimorfismo é um importante fator inerente à formulação e pode afetar a estabilidade da mesma, uma vez que trata-se da existência de formas cristalinas distintas para uma mesma substância química (HILKIFER, 2006). Toth Z. G. e colaboradores (2004) registraram patente onde descreveram o processo de obtenção das formas polimórficas I e II da DL, as quais são obtidas com o uso de diferentes solventes orgânicos durante o processo de síntese do fármaco. Da mesma forma, Murpani D. e colaboradores (2007) patentearam um novo processo de obtenção das forma I e II desse fármaco. A forma amorfa da DL foi descoberta e patenteada por Sundaram V. e colaboradores no ano de 2005. Somente em 2007, Kumar B. V. S. e colaboradores descreveram e patentearam as formas III e IV deste fármaco e seu processo de obtenção.

As micrografias obtidas para as amostras, tanto antes como após a realização do CDSC, com uma ampliação de 500x e 10.000x, estão apresentadas nas Figuras 10 e 11.

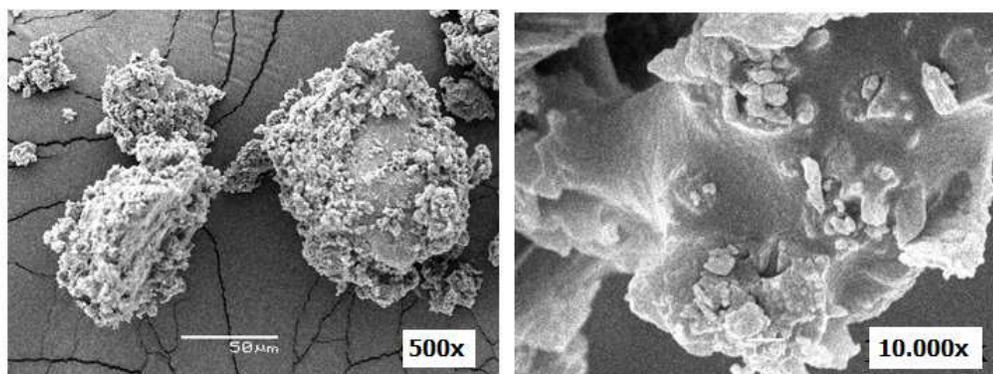
A análise morfológica do fármaco confirmou o resultado obtido pela difratometria de raios X de que o aquecimento foi eficiente na amorfização do mesmo. Conforme descrito na Farmacopéia Americana (USP 32) e apresentado na Figura 10, antes do CDSC as partículas do fármaco apresentaram-se como cristais irregulares na forma de flocos agregados (USP 32). Em contraste, uma massa fundida com partículas aglomeradas foi observada na amostra após a realização do DSC cíclico (FIGURA 11).



**Figura 9** - Difratoograma de raios X da desloratadina antes (linha preta) e após (linha vermelha) o DSC cíclico.



**Figura 10** - Fotomicrografias de SEM da desloratadina antes do DSC cíclico.

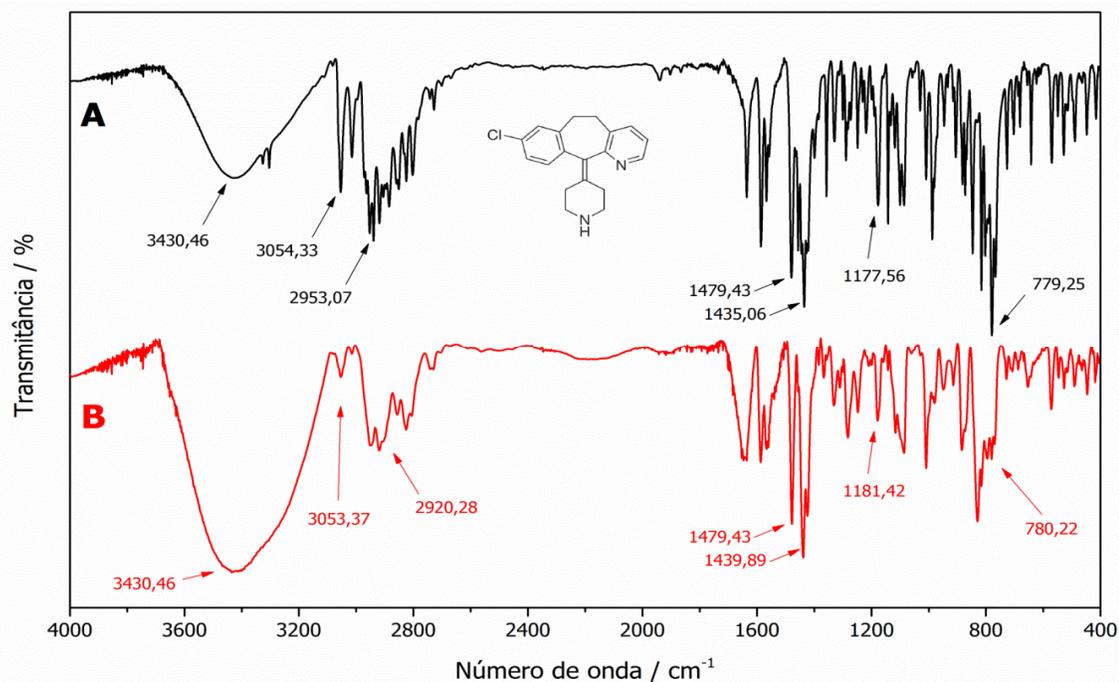


**Figura 11** - Fotomicrografias de SEM da desloratadina após o DSC cíclico.

### 5.5.1.3 Análise Espectroscópica da DL

Com o objetivo de verificar se não houve degradação do fármaco após o aquecimento também foram coletados dados de espectroscopia no infravermelho das amostras antes e após CDSC. Esta técnica fornece uma identificação única da molécula estudada, onde uma molécula em particular fornecerá uma série de bandas características, associadas com os seus modos de vibração. Os espectros de absorção da DL na região do infravermelho médio registrados no intervalo de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  estão representados na Figura 12.

O espectro de absorção da DL na região do infravermelho médio antes da realização do CDSC (FIGURA 12A) apresenta bandas de média intensidade de absorção em 3.430, 3.054 e 2.953  $\text{cm}^{-1}$ , que são atribuídas às vibrações de estiramento da ligação N-H, estiramento das ligações C-H do anel aromático e estiramento de ligações C-H, respectivamente. As bandas em 1.479 e 1.435  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas às vibrações de C-C dentro do anel aromático. As bandas em 1.177 e 779  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às vibrações C-N de amins e C-Cl respectivamente. Os dados espectrais observados são concordantes com outros autores (DEVANE MAHESH; SHAIKH SAJID, 2011).

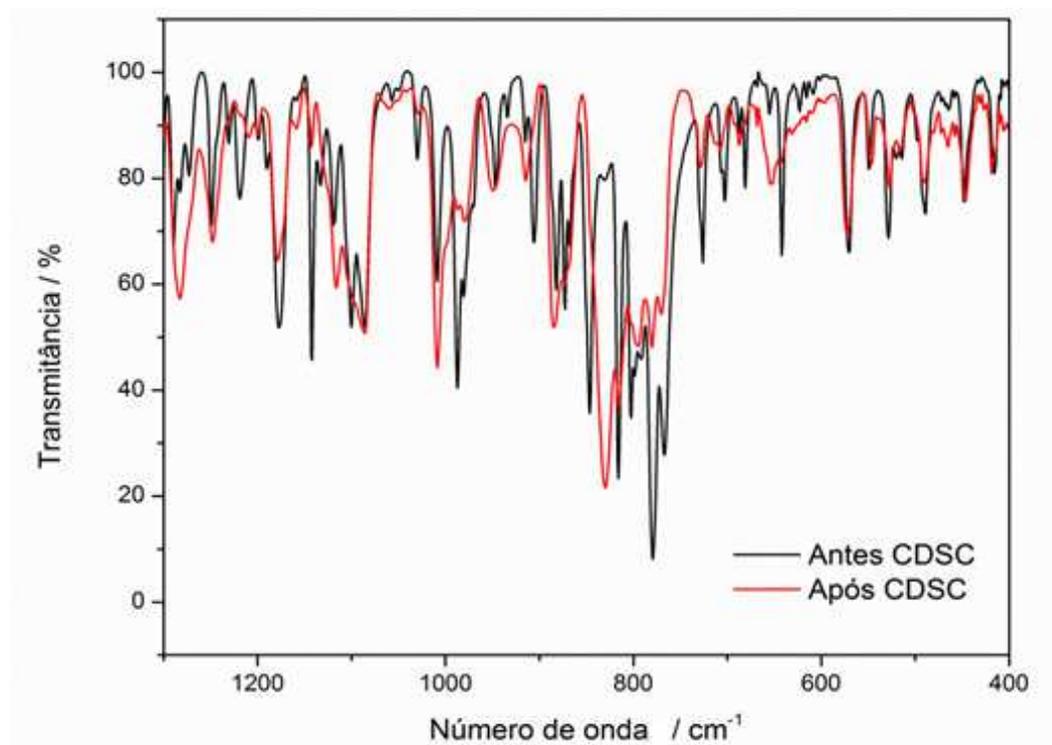


**Figura 12** - Espectros infravermelho médio da DL antes do CDSC (A) e após o CDSC (B).

O espectro obtido depois de submeter o fármaco ao programa do CDSC (FIGURA 12B) mostrou as mesmas bandas de absorção, demonstrando que a DL não se decompõem no intervalo de temperatura selecionado para o trabalho, sendo termicamente estável o que permite que os estudos de compatibilidade fármaco-excipientes sejam conduzidos utilizando a técnica de DSC.

Além das bandas características dos grupos funcionais existe ainda a região de “impressão digital” que compreende as bandas de baixa intensidade situadas usualmente na região entre 900 e 1.400  $\text{cm}^{-1}$ . Desta forma, se comparados os espectros obtidos nesse intervalo para duas substâncias idênticas entre si, realizados nas mesmas condições (tipo de amostra, concentração), eles deverão ser idênticos.

Dessa forma, avaliando-se a região de impressão digital do espectro da DL conforme representado na Figura 13 é possível confirmar a sobreposição das bandas características do fármaco, apesar da diminuição da intensidade e alargamento de algumas delas, o que se deve à ausência de um padrão de cristalização, arranjos atômicos aleatórios e ausência de simetria nos sólidos amorfos.

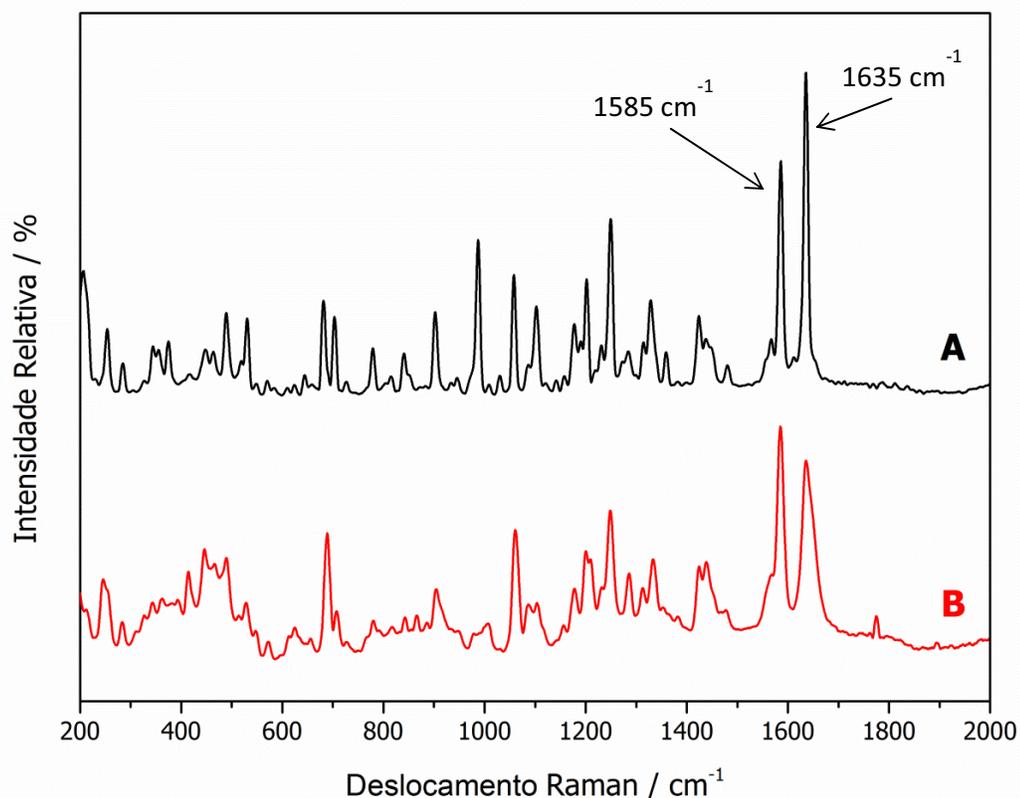


**Figura 13** - Região de impressão digital do espectro da DL

A espectroscopia Raman tem sido amplamente utilizada em análises farmacêuticas devido a sua versatilidade em relação aos métodos clássicos, como a sua extrema valia na determinação qualitativa, semi-quantitativa e quantitativa de fármacos em diversas formas farmacêuticas, na caracterização das suas formas cristalinas, entre outras aplicações. Nesse estudo, a espectroscopia Raman também foi empregada na caracterização da DL com o intuito de complementar os dados obtidos por FT-IR.

Os espectros de Raman do fármaco foram registrados em condições ambiente e obtidos para amostra antes e após ser submetida ao CDSC. Os mesmos encontram-se apresentados na Figura 14.

Os espectros apresentaram bandas fortes em  $1.635$  e  $1.585$   $\text{cm}^{-1}$  correspondendo a estiramento C=N e estiramento C=C de anéis aromáticos, respectivamente, e uma banda em  $689$   $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento C-Cl.

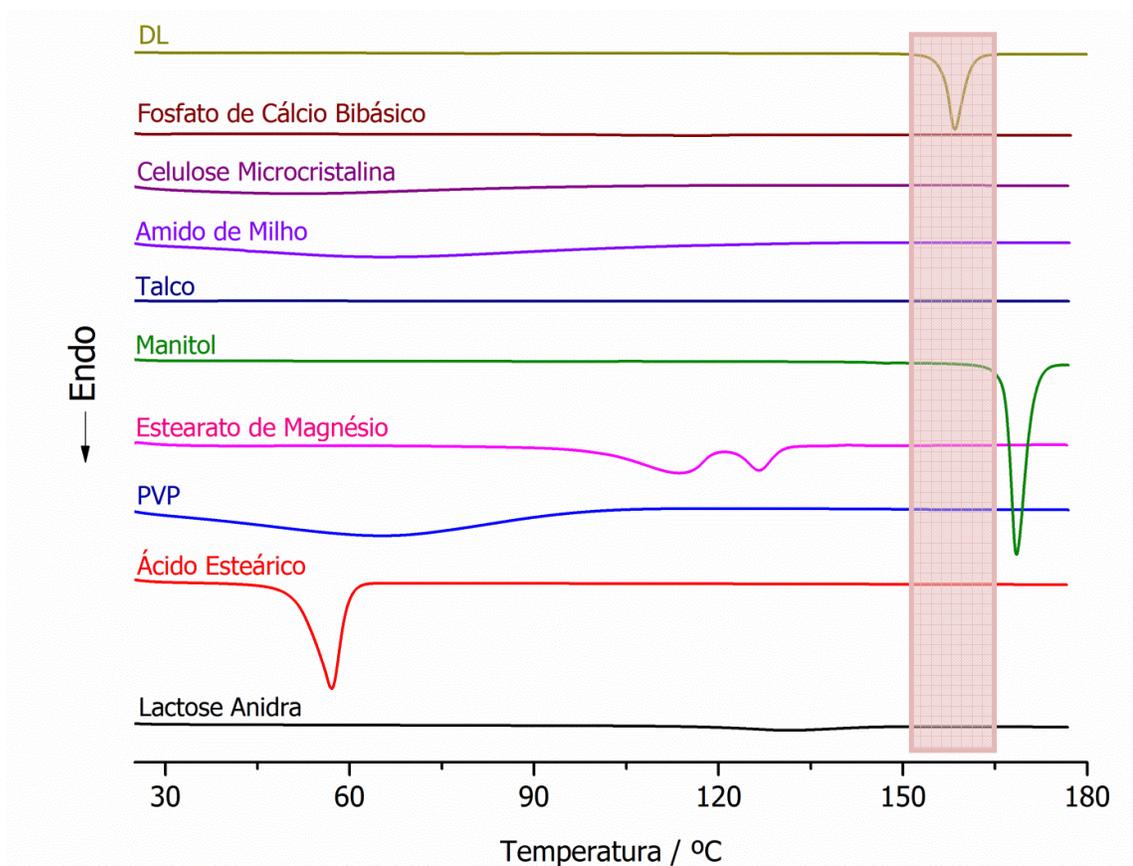


**Figura 14** - Espectro Raman da desloratadina antes do CDSC (A) e após o CDSC (B).

### 5.5.2 Estudo de compatibilidade entre a desloratadina e excipientes farmacêuticos

A avaliação da compatibilidade entre fármaco e excipientes farmacêuticos tem sido largamente estudado por vários autores. As técnicas de análise térmica, em especial o DSC têm sido proposto para utilização nesse tipo de estudo por ser um método rápido para avaliar as interações físico-químicas entre os componentes de formulações e, portanto, para auxiliar na seleção de excipientes com compatibilidade adequada (JULIO et al, 2012; TITA et al, 2011a; AIGNER et al, 2010).

As curvas DSC obtidas para DL e os excipientes testados estão apresentadas na Figura 15. Cada curva mostra um comportamento único, dependendo das características de cada excipiente. A região em destaque evidencia a faixa de temperatura que compreende o evento de fusão do fármaco em estudo.



**Figura 15** - Curvas DSC de todos os excipientes usados no estudo de compatibilidade.

Nenhum dos excipientes evidenciou qualquer evento térmico perto do pico de fusão da DL, portanto, foi possível investigar a possibilidade de interações entre os componentes das misturas binárias de fármaco-excipiente comparando os perfis térmicos obtidos para as misturas com o perfil térmico de cada componente individual (JULIO et al, 2012; AIGNER et al, 2010; STULZER et al, 2008; BERNARDI et al, 2009).

As possíveis interações entre os componentes são deduzidas a partir das curvas DSC examinando a aparência da curva, deslocamento ou o desaparecimento dos eventos térmicos, especialmente o evento de fusão, e/ou variações nos valores de entalpia esperados. Uma interação pode ser evidenciada quando houver uma diminuição ou, no caso de sobreposição, um aumento na entalpia de fusão, o que é um processo mais complexo de ser avaliado (TITA et al, 2011a).

Dessa forma, para o estudo de compatibilidade entre o fármaco desloratadina e os nove excipientes farmacêuticos selecionados foram realizadas análises do

fármaco e de cada mistura binária 1:1 (m/m) em triplicata com posterior avaliação da alteração ou não dos valores de entalpia e da temperatura inicial ( $T_{onset}$ ) para o evento de fusão nas misturas quando comparados com os valores obtidos para a DL isolada.

A Tabela 7 resume os valores de entalpia e de  $T_{onset}$  obtidos para a DL a partir da análise das curvas DSC.

**Tabela 7 - Entalpia e  $T_{onset}$  para desloratadina isolada**

<b>Replicata</b>	<b><math>T_{onset}</math> (°C)</b>	<b>Entalpia (J.g<sup>-1</sup>)</b>
1	156,2	105,2
2	156,6	104,8
3	156,3	105,1
Média	156,4	105,0
Desvio padrão	0,2	0,2
C.V. (%)	0,13	0,19

Pode-se observar na Tabela 7 que o valor médio da entalpia para o evento endotérmico de fusão da desloratadina foi de 105,0 J.g<sup>-1</sup>. Como em cada mistura binária 1:1 (m/m) a massa do fármaco encontra-se reduzida à metade, o valor esperado para a entalpia nas misturas também se reduz à metade, sendo, portanto esperado um valor de aproximadamente 52,5 J.g<sup>-1</sup>.

Os valores médios de temperatura e entalpia dos eventos térmicos e seus respectivos desvios padrão obtidos pelas curvas de DSC de cada mistura física estão apresentados na Tabela 8.

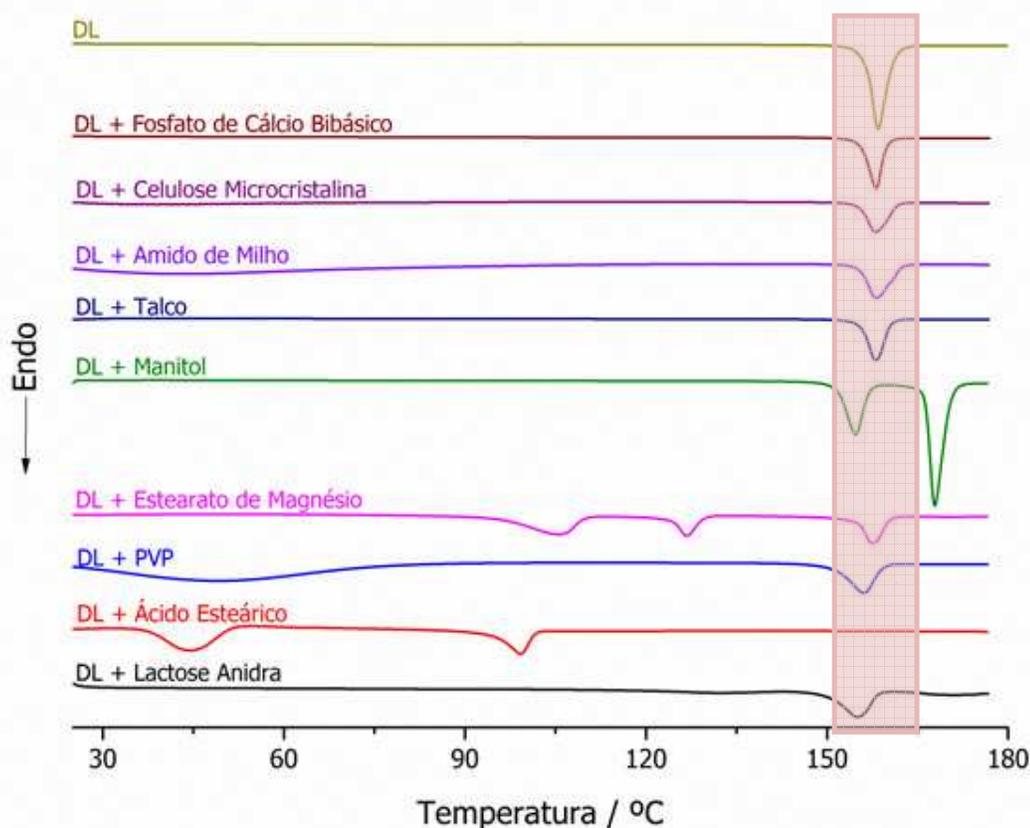
Com base nos dados apresentados nas Tabelas 7 e 8, pode-se verificar que o os parâmetros referentes ao evento térmico de fusão da DL ( $T_{onset}$  e  $\Delta H_{fusão}$ ), permaneceram praticamente constante nas misturas binárias com a maioria dos excipientes testados. Em termos práticos, as curvas térmicas das misturas binárias podem ser consideradas como superposições das curvas individuais do fármaco e dos excipientes.

**Tabela 8** - Dados térmicos obtidos por DSC do evento de fusão da DL nas diferentes misturas físicas ( $n=3$ )

<b>Amostras</b>	<b>T<sub>onset</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>endset</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>pico</sub> (°C)</b>	<b>ΔH<sub>fusão</sub> (J.g<sup>-1</sup>)</b>
DL + Fosfato de cálcio bibásico	155,6±0,1	160,3±0,4	158,5±0,5	51±3
DL + Celulose Microcristalina	155,4±0,1	162,0±0,5	158,2±0,1	44±5
DL + Amido de Milho	155,5±0,1	162,6±0,3	158,5±0,4	50±2
DL + Talco	155,7±0,1	161,1±0,6	158,2±0,1	47,5±0,7
DL + Manitol	151,9±0,2	157,2±0,3	154,6±0,2	56±4
DL + Estearato de Magnésio	155,10±0,01	161,0±0,7	157,8±0,1	37±3
DL + PVP	151,2±0,3	159,8±0,5	156,3±0,1	56±7
DL + Ácido Esteárico	94,6±0,4	101,3±0,2	99,1±0,2	39±2
DL + Lactose Anidra	150,1±0,1	158,1±0,5	155,10±0,01	42±1

De acordo com a Tabela 8, pode-se verificar que nas misturas contendo manitol e PVP houve um pequeno deslocamento no evento de fusão da DL (em torno de 151°C), valor um pouco menor que a temperatura de início da fusão da DL isolada. Essa redução na temperatura de fusão pode representar uma interação física entre os componentes da mistura sem caracterizar uma incompatibilidade, uma vez que os valores de entalpia permaneceram próximos ao esperado para as misturas físicas.

No entanto, para as misturas contendo os excipientes celulose microcristalina, estearato de magnésio, ácido esteárico e lactose anidra, observam-se algumas alterações mais intensas em relação à entalpia ou a temperatura de fusão do fármaco, conforme apresentado na Figura 16.



**Figura 16** - Curvas DSC da desloratadina e das misturas binárias fármaco-excipiente.

Com o intuito de certificar que os valores de entalpia (área do pico) encontrados para os eventos térmicos nas misturas binárias são estatisticamente iguais ou diferentes ao encontrado para a DL isolada, os mesmos foram comparados por meio da Análise de Variância. O teste de Análise de Variância foi efetuado utilizando o *software* Sisvar. O resultado encontra-se apresentado na Tabela 9.

**Tabela 9** - Análise de variância para o efeito das misturas binárias sobre o valor médio de entalpia

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Fc	p-valor
Amostra	9	133,46	12,27	<0,0001
Erro	20	10,88		
Total corrigido	29			

Coefficiente de Variação (%) = 6,91.

Com 1% de significância, pode-se verificar na Tabela 9 que a mistura binária apresenta efeito significativo ( $p < 0,0001$ ), ou seja, a composição da mistura binária influencia no valor da entalpia.

Para comparar os valores médios de entalpia e identificar aqueles que são diferentes entre si foi realizado o teste de comparação de médias Scott-Knott. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Média dos valores de entalpia para a DL isolada e as misturas binárias

<b>Amostra</b>	<b>Médias das entalpias</b>
DL + Manitol	56,7 <i>a</i>
DL + PVP	55,7 <i>a</i>
Desloratadina	52,5 <i>a</i>
DL+Fosfato de cálcio bibásico	50,8 <i>a</i>
DL + Amido de milho	50,4 <i>a</i>
DL + Talco	47,5 <i>a</i>
DL + Celulose microcristalina	44,6 <i>b</i>
DL + Lactose Anidra	42,5 <i>b</i>
DL + Ácido Esteárico	39,0 <i>b</i>
DL + Estearato de Magnésio	37,7 <i>b</i>

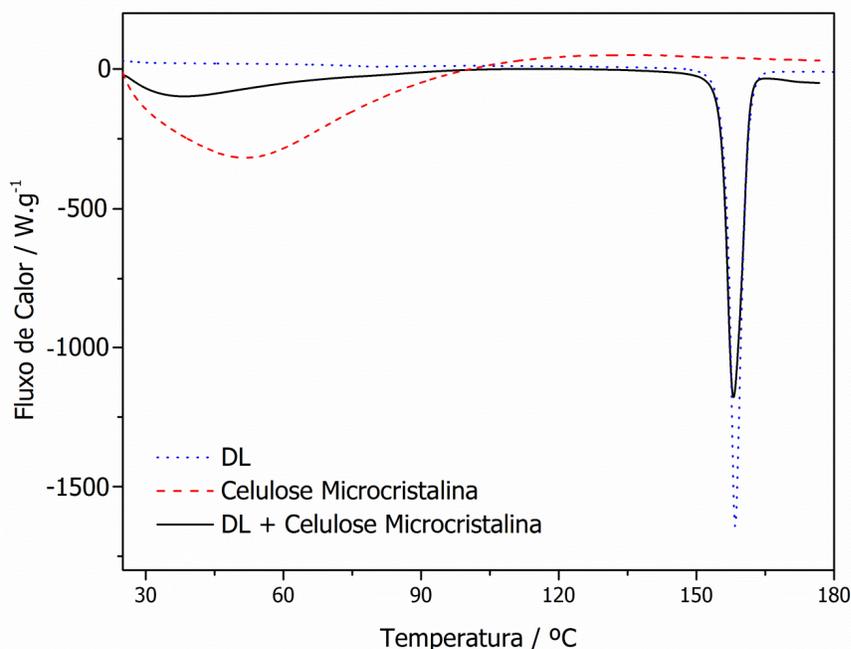
Nota: Médias seguidas de mesma letra não indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 1%.

Sabendo-se que quando o valor de entalpia do evento endotérmico de fusão da mistura binária for igual ao da DL isolada tem-se um indicativo de que não há interação entre os componentes, podem-se afirmar com base nos resultados apresentados na Tabela 10 que as misturas binárias de DL com manitol, PVP, fosfato de cálcio bibásico, amido de milho e talco apresentaram valores de entalpia próximos ao valor esperado de  $52,5 \text{ J.g}^{-1}$  para o fármaco isolado e tais valores são estatisticamente iguais entre si o que indica que a DL não apresenta interação com esses excipientes.

Por outro lado, as misturas contendo celulose microcristalina, lactose anidra, ácido esteárico e estearato de magnésio apresentaram médias de entalpia inferiores ao esperado para as misturas ( $52,5 \text{ J.g}^{-1}$ ), indicando uma possível incompatibilidade química entre o fármaco e cada um desses excipientes, o que pode acarretar a inativação total ou perda parcial da atividade farmacológica da DL.

A celulose microcristalina é um adjuvante multiuso, que apresenta boas propriedades de fluxo e excelentes características de compressão direta, sendo um dos poucos diluentes que, além de produzir compactos coesos, age também como agente desintegrante (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Algumas interações entre este excipiente e diferentes fármacos, tais como o mononitrato de isossorbida e o maleato de enalapril, estão detalhados na literatura (VERMA; GARG, 2004; COTTON; WU; VADAS, 1987).

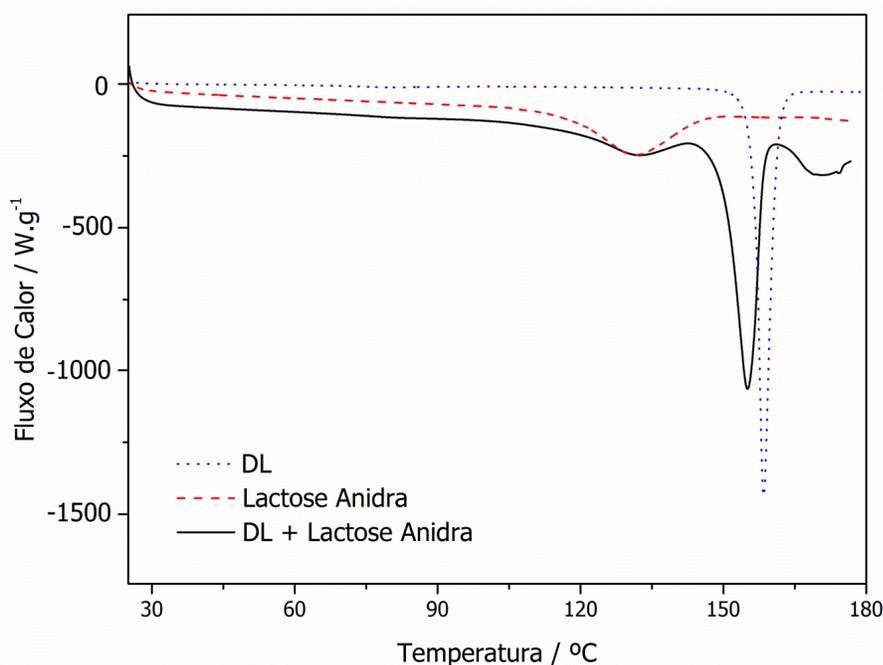
Observa-se na Figura 17 que a curva DSC da celulose microcristalina mostrou um evento endotérmico alargado entre 30 e 100°C, referente à desidratação, mantendo-se termodinamicamente estável a partir desta temperatura. Segundo Vermal e Garg (2004) a celulose microcristalina é termicamente estável no intervalo de 25 a 300°C (VERMA; GARG, 2004). A curva DSC da mistura binária DL-Celulose microcristalina 1:1 (m/m) apresentou evento endotérmico em 158,2°C, referente à fusão da DL. A sobreposição das curvas da DL, celulose microcristalina e mistura binária evidencia apenas a diminuição no valor da entalpia de fusão o que sugere interação física entre os componentes da mistura, mas não indica incompatibilidade química entre as espécies.



**Figura 17** - Curvas DSC da DL, celulose microcristalina e mistura binária.

A lactose é o diluente mais empregado na indústria farmacêutica, visto que, além do baixo custo e das suas propriedades redutoras, tem poder aglutinante originando comprimidos de bom aspecto. Entretanto, esse excipiente é um açúcar redutor com o potencial para interagir com aminas primárias e secundárias, quando armazenado em condições de umidade elevada durante períodos prolongados (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006). A lactose anidra é empregada como um diluente para comprimidos e cápsulas, e várias incompatibilidades (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006; VERMA; GARG, 2005; MONAJJEMZADEH et al, 2009) e compatibilidades (VERMA; GARG, 2004) com outros fármacos são relatados na literatura.

A sobreposição das curvas DSC da DL, lactose anidra e da mistura binária fármaco-excipiente 1:1 (m/m) permite identificar que o evento térmico correspondente à fusão da DL foi deslocado para temperatura mais baixa, com uma redução significativa no valor de entalpia, sugerindo algum tipo de interação sólido-sólido entre o fármaco e o excipiente (Figura 18).



**Figura 18** - Curvas DSC da DL, lactose anidra e mistura binária.

A patente US 2010/0129310A1 de Metha e colaboradores (2010) relata a instabilidade de formulações contendo o fármaco DL e o excipiente lactose devido a

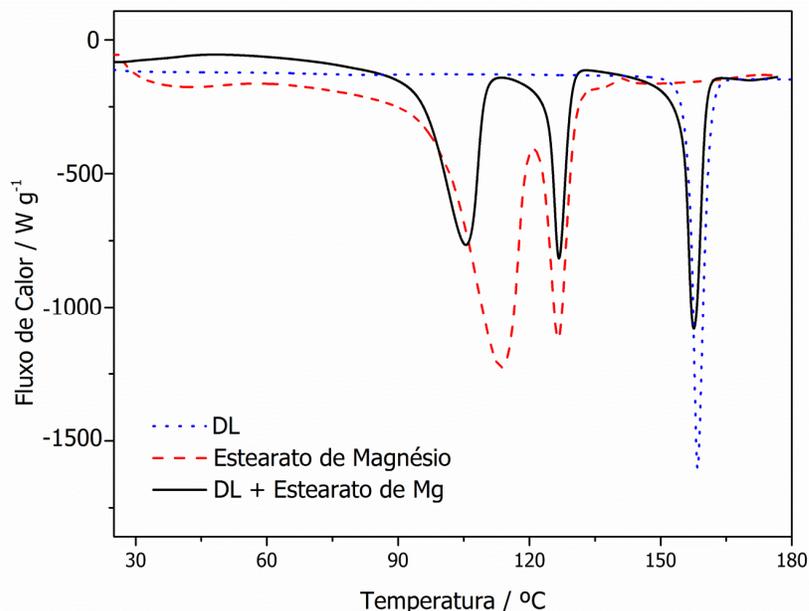
possibilidade de ocorrência da reação de Maillard entre estes (METHA et al, 2010). Da mesma forma, um estudo realizado por Wirth e colaboradores (1998) constatou que formulações de cloridrato de fluoxetina contendo a lactose como diluente são inerentemente menos estáveis do que formulações que utilizam o amido como diluente (WIRTH et al, 1998). Outro estudo, conduzido por Santos e colaboradores (2008) também descreveu essa incompatibilidade da lactose com o fármaco metformina decorrente da reação dos grupamentos hidroxila do açúcar com o grupo amina do fármaco resultando na reação de Maillard (SANTOS et al, 2008).

O estearato de magnésio não é uma substância simples constituindo frequentemente, de uma mistura de ácidos graxos e sais de ácidos graxos, e consiste principalmente de proporções variáveis de estearato de magnésio e palmitato de magnésio. Amostras comerciais compreendem uma mistura de ácidos alifáticos de cadeia longa com teor de água variável (SOUSA E SILVA; SOUSA LOBO, 2010), podendo conter até 50% de impurezas em ácido graxos livres e sais de ácidos graxos (USP 32). A falta de homogeneidade, acoplada à variação de conteúdo de umidade, resultam em problemas para padronizar uma especificação para este excipiente.

O estearato de magnésio é utilizado como lubrificante para melhorar as propriedades de fluxo das misturas e reduzir a perda durante a compressão (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006; STULZER et al, 2008). Várias interações entre estearato de magnésio e diferentes fármacos, tais como o cetoprofeno, o captopril, ibuproxan e glipizida, estão detalhados na literatura (TITA et al, 2011a; STULZER et al, 2008; VERMA; GARG, 2005; MURA et al, 1998). O estearato de magnésio não deve ser incluído em formulações farmacêuticas contendo aspirina, aqueles contendo certas vitaminas ou sais alcalinos (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Conforme apresentado na Figura 19, a curva DSC do estearato de magnésio mostrou dois eventos térmicos: um evento endotérmico de desidratação do material entre 100 e 120°C, seguido de um segundo evento endotérmico entre 120 e 130°C referente à fusão do estearato de magnésio. A curva DSC da mistura binária DL-Estearato de magnésio 1:1 (m/m) mostrou três eventos endotérmicos com o primeiro ocorrendo entre 80 e 110°C, o segundo ocorrendo entre 110 e 130°C e um terceiro evento térmico que ocorre entre 155 e 160°C. O primeiro evento é atribuído a uma perda de água a partir do estado hidratado do estearato de magnésio, o segundo evento indica a fusão do material (BERNARDI et al, 2009; SOUSA E SILVA; SOUSA

LOBO, 2010) e o terceiro evento térmico corresponde ao ponto de fusão da DL ( $T_{\text{onset}} = 155,1^{\circ}\text{C}$ ;  $\Delta H = 37,7 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ).



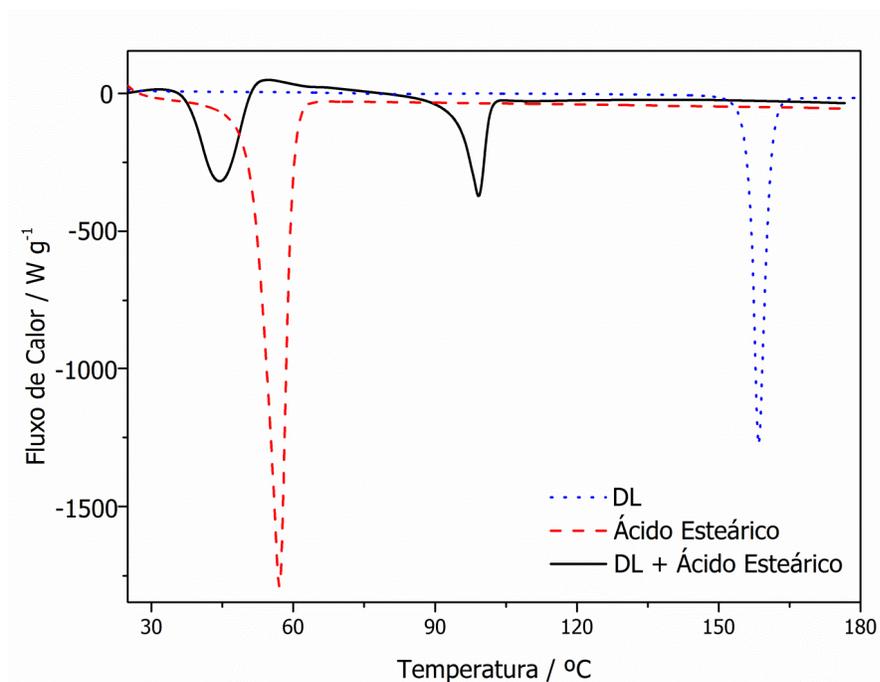
**Figura 19** - Curvas DSC da DL, estearato de magnésio e mistura binária.

Neste estudo, o evento endotérmico de fusão da DL sobrepõe ao da mistura, indicando que não há interação entre as espécies. Portanto, uma pequena redução na entalpia de fusão do fármaco pode ser observada e explicada pela solubilização parcial da DL no excipiente, uma vez que este funde a cerca de 130°C, antes do ponto de fusão do fármaco. Uma situação semelhante foi observada por Stulzer e colaboradores (2008) quando avaliaram formulações de comprimidos de captopril e observaram que o PVP não interage com o fármaco, e sim solubiliza-o mascarando o resultado da análise por DSC (STULZER et al, 2008). É importante ressaltar que os lubrificantes estão geralmente presentes em formulações farmacêuticas em concentrações de apenas 0,5 a 2% p/p, o que torna aceitável essa interação física entre fármaco e excipiente.

O ácido esteárico, assim como o estearato de magnésio, é comumente utilizado como lubrificante em formulações farmacêuticas, a fim de melhorar as propriedades de fluxo das misturas e reduzir a perda durante a compressão (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006; STULZER et al, 2008). Esse ácido é fabricado a partir de

gorduras e óleos derivados de fontes comestíveis e compõe uma mistura de ácido esteárico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ) e ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) (USP 33).

A curva DSC do ácido esteárico mostrou um único evento endotérmico característico de fusão entre 52 e 60°C, mantendo-se estável termicamente na faixa de temperatura de trabalho (FIGURA 20). A curva DSC da mistura DL-Ácido esteárico apresentou as alterações mais evidentes: o evento endotérmico referente ao ponto de fusão da DL não foi observado e os sinais do ácido esteárico foram alterados indicando interação entre os componentes da formulação. O aparecimento de um novo pico na temperatura entre 94 e 101°C ( $T_{\text{pico}} = 99,1^\circ\text{C}$ ;  $\Delta H = 39,0 \text{ J.g}^{-1}$ ) evidencia uma possível reação química entre a DL e esse excipiente.



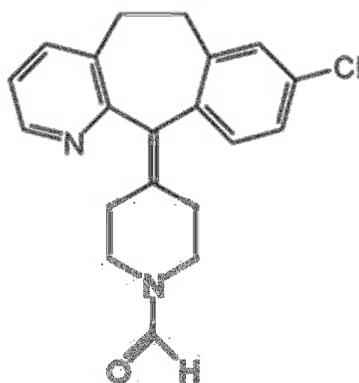
**Figura 20** - Curvas DSC da DL, ácido esteárico e mistura binária

### 5.5.3 Estudo de estabilidade acelerada

As misturas binárias preparadas pela mistura do fármaco com cada um dos nove excipientes selecionados foram armazenadas sobre as condições recomendadas pelo ICH para estudo de estabilidade acelerada ( $75\% \pm 5\%$  UR e temperatura igual a  $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) e estavam divididas em dois grupos: calor seco

utilizando frascos fechados e calor úmido utilizando frascos abertos, ambos submetidos às mesmas condições.

Após 3 (três) e 6 (seis) meses de armazenamento as amostras foram retiradas da câmara de estabilidade e analisadas por DSC. Primeiramente, em uma análise visual de todas as amostras armazenadas verificou-se uma alteração na coloração da DL, a qual assumiu uma coloração rósea, estando ela isolada ou compondo uma mistura binária. Tal mudança de coloração deve-se a formação do produto de degradação conhecido por N-formil-desloratadina (KHAPRA; DHARMADHIKARI, 2005), apresentado na Figura 21.



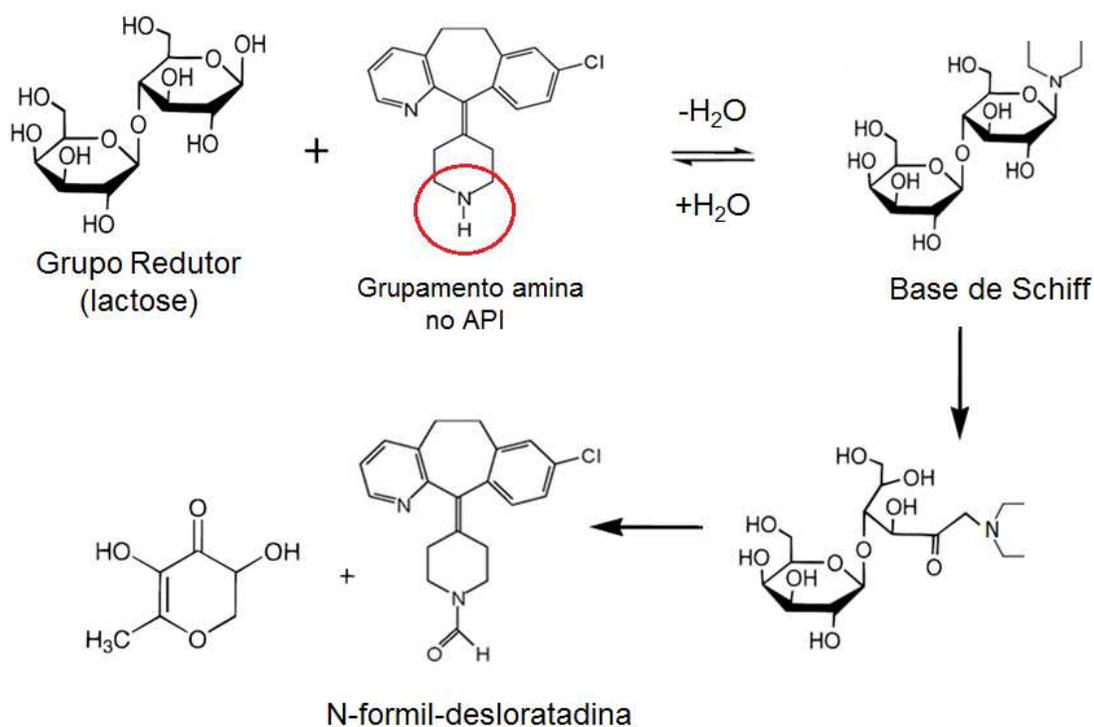
**Figura 21** - Estrutura química do produto de degradação N-formil-desloratadina.

Da mesma forma como foi descrito por Wirth e colaboradores (1998) para o fármaco cloridrato de fluoxetina e segundo a patente WO 2005/065047, a DL é uma amina secundária e por isso está suscetível a ocorrência da reação de Maillard, uma reação não enzimática que envolve a condensação de um grupamento amino com um grupo redutor. Essa reação é favorecida quando na presença de condições forçadas de temperatura e umidade e sua formação não ultrapassa 0,2% após 3 meses de exposição (KHAPRA; DHARMADHIKARI, 2005; WIRTH et al, 1998).

O N-formil-desloratadina tem sido reportado como o principal produto de degradação deste fármaco decorrente deste tipo de reação e sua formação geralmente deve-se a reação do fármaco com excipientes de caráter ácido como ácido esteárico, povidona, crospovidona, lactose anidra ou hidratada e benzoato de sódio (KHAPRA; DHARMADHIKARI, 2005).

Diante do exposto, os compostos N-formil devem ser utilizados como marcadores para o estudo deste tipo de interação fármaco-excipiente, uma vez que eles podem ser facilmente sintetizados sob condições relevantes, o que deve ser considerado durante a seleção de excipientes e protocolos de estudos de estabilidade.

As etapas da reação de Maillard para formação do produto de degradação da DL pode ser descrito conforme ilustrado na Figura 22 para a reação do grupo amino presente na estrutura do fármaco com um composto contendo um grupo redutor.



**Figura 22** - Reação de Maillard entre o grupo amina do fármaco e um açúcar redutor com formação do produto de degradação N-formil-desloratadina (Fonte: Adaptado de WIRTH *et al*, 1998)

A Figura 23 apresenta as fotos obtidas do fármaco no tempo inicial e após o armazenamento durante 3 meses na câmara de estabilidade sob condições forçadas de temperatura e umidade. É possível verificar a mudança de coloração do fármaco, principalmente quando o mesmo é exposto à umidade elevada (amostras em frascos abertos).



**Figura 23** - Imagens obtidas da matéria-prima DL antes de iniciar o experimento (A) e após armazenamento em frascos fechados (B) e abertos (C) sob condições forçadas durante 3 meses

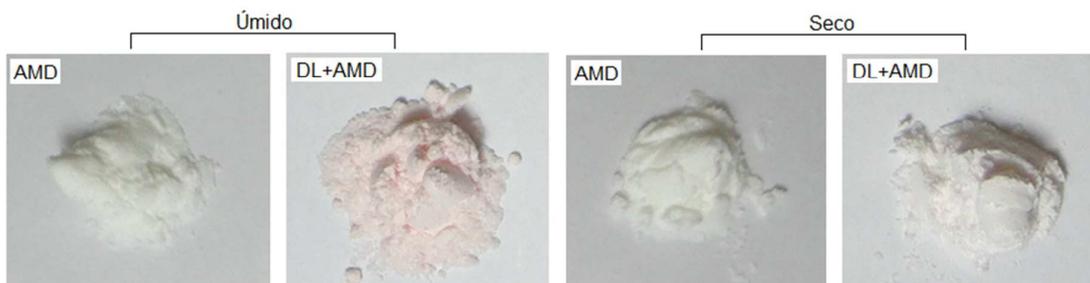
Para cada excipiente e mistura binária relacionada também foram registradas imagens da amostra após 3 meses de armazenamento sob condições forçadas de temperatura e umidade relativa. As Figuras de 24 a 32 apresentam as imagens obtidas para as condições de calor seco e calor úmido. Na Figura 30, devido a elevada higroscopicidade do PVP, as amostras do excipiente isolado e da mistura assumiram um aspecto semi-sólido.



**Figura 24** - Imagens obtidas do excipiente fosfato de cálcio bibásico (FCB) e da mistura binária.



**Figura 25** - Imagens obtidas do excipiente celulose microcristalina (CLM) e da mistura binária.



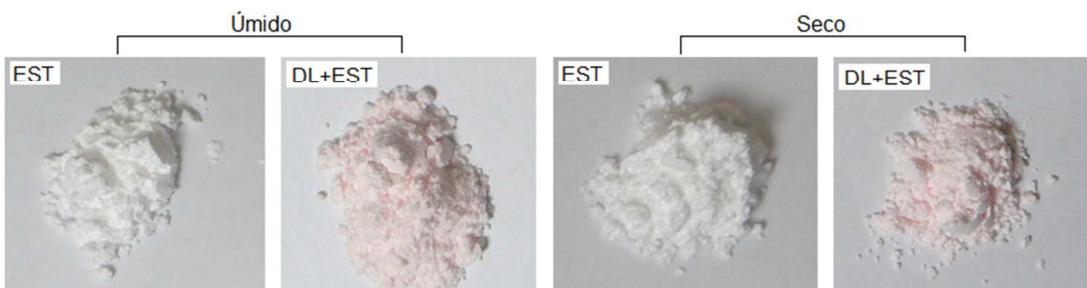
**Figura 26** - Imagens obtidas do excipiente amido de milho (AMD) e da mistura binária.



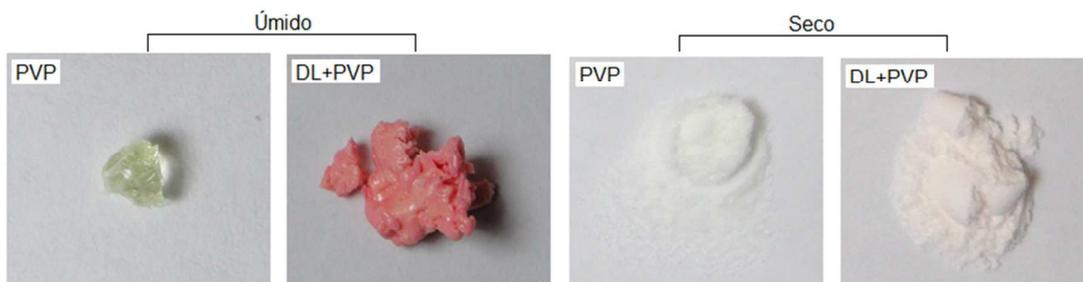
**Figura 27** - Imagens obtidas do excipiente talco farmacêutico (TAL) e da mistura binária.



**Figura 28** - Imagens obtidas do excipiente manitol (MAN) e da mistura binária.



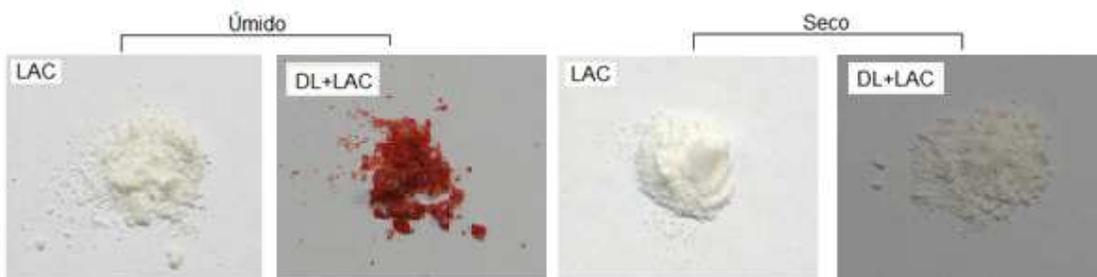
**Figura 29** - Imagens obtidas do excipiente estearato de magnésio (EST) e da mistura binária.



**Figura 30** - Imagens obtidas do excipiente polivinilpirrolidona (PVP) e da mistura binária.



**Figura 31** - Imagens obtidas do excipiente ácido esteárico (ACE) e da mistura binária.



**Figura 32** - Imagens obtidas do excipiente lactose anidra (LAC) e da mistura binária.

Os dados térmicos obtidos para as amostras no tempo inicial foram utilizados como valores de referência e parâmetro para avaliação dos resultados obtidos para as amostras armazenadas na câmara de estabilidade pelo período de 3 e 6 meses.

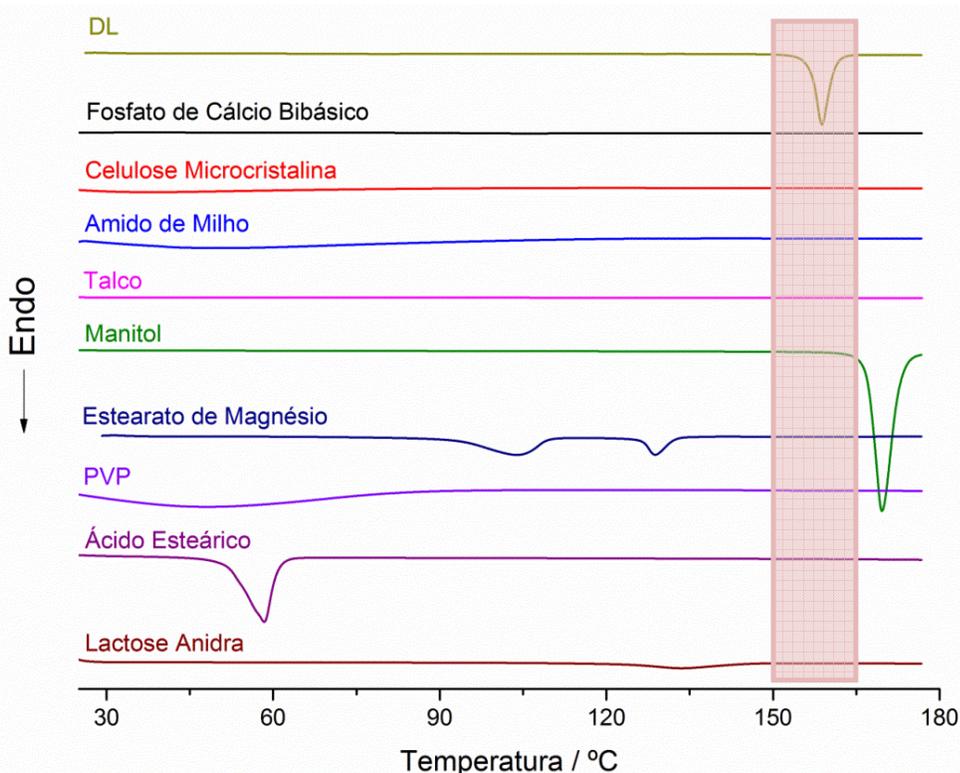
Na análise por DSC das amostras dos excipientes isolados armazenados na câmara de estabilidade em frascos fechados (calor seco) durante 3 e 6 meses, nenhuma alteração foi evidenciada e nenhum evento térmico na temperatura de fusão da DL foi constatado. Os valores de entalpia e de temperatura inicial de fusão obtidos para o fármaco isolado e para cada mistura binária estão descritos na Tabela 11.

**Tabela 11** - Dados térmicos obtidos por DSC do evento de fusão da DL para o fármaco isolado e nas diferentes misturas físicas após armazenamento em câmara de estabilidade durante 3 e 6 meses

Amostra	3 Meses				6 Meses			
	40°C		40°C e 75% UR		40°C		40°C e 75% UR	
	T <sub>onset</sub> (°C)	ΔH <sub>fusão</sub> (J.g <sup>-1</sup> )	T <sub>onset</sub> (°C)	ΔH <sub>fusão</sub> (J.g <sup>-1</sup> )	T <sub>onset</sub> (°C)	ΔH <sub>fusão</sub> (J.g <sup>-1</sup> )	T <sub>onset</sub> (°C)	ΔH <sub>fusão</sub> (J.g <sup>-1</sup> )
Desloratadina	156,7	103,0	156,4	99,3	155,6	107,0	152,6	96,5
DL + Fosfato de Cálcio Bibásico	156,3	52,6	156,7	49,6	154,9	52,1	151,4	41,0
DL + Celulose Microcristalina	155,5	46,3	154,9	43,8	154,3	44,1	151,8	38,1
DL + Amido de Milho	155,6	50,1	155,2	45,6	154,3	47,5	151,1	38,2
DL + Talco Farmacêutico	155,9	49,0	155,3	49,9	154,6	48,3	151,5	42,1
DL + Manitol	151,9	52,1	151,6	47,3	151,1	50,6	147,3	35,1
DL + Estearato de Magnésio	155,2	30,6	154,5	30,2	154,5	39,5	147,4	36,8
DL + PVP	152,2	47,2	139,0	40,2	150,8	41,4	140,0	40,5
DL + Ácido Esteárico*	95,9	33,6	95,3	70,7	96,0	47,1	94,9	74,9
DL + Lactose Anidra	149,8	46,6	140,5	35,9	150,4	43,2	140,5	34,9

\* Os valores de temperatura e entalpia de fusão apresentados não correspondem ao evento de fusão da DL, uma vez que o mesmo não foi detectado nessa amostra. Os mesmos são referentes ao novo evento exotérmico observado na curva DSC da mistura em questão.

As curvas DSC das substâncias utilizadas no estudo após o armazenamento durante 3 meses sob condições forçadas encontram-se apresentadas na Figura 33. As curvas DSC obtidas para o tempo de 6 meses apresentaram o mesmo perfil térmico e, portanto, não foram apresentadas.



**Figura 33** - Curvas DSC das substâncias utilizadas no estudo após armazenamento durante 3 meses sob condições forçadas (calor seco – frasco fechado).

Com base nos dados apresentados na Tabela 11, verifica-se uma redução significativa nos valores de entalpia encontrados para as amostras armazenadas sob calor úmido durante 3 meses quando comparados aos valores encontrados para as amostras armazenadas sob calor úmido por 6 meses, o que permite constatar que quanto maior o tempo de exposição do fármaco às condições forçadas de temperatura e umidade, maior a degradação do fármaco e formação de produtos de degradação.

As curvas DSC da desloratadina isolada e das misturas binárias armazenadas nos frascos fechados após armazenamento por 3 e 6 meses estão apresentadas nas Figuras 34 e 35 respectivamente.

Na análise das curvas de DSC e dos dados da Tabela 11 obtidos para as misturas binárias armazenadas em frascos fechados (calor seco) durante 3 e 6 meses pode-se observar que o perfil térmico da DL permaneceu praticamente constante nas misturas binárias com a maioria dos excipientes testados.

As alterações anteriormente verificadas nas misturas contendo os excipientes celulose microcristalina e lactose anidra foram também evidenciadas nas amostras após o armazenamento de 3 e 6 meses em frascos fechados, uma vez que os valores de entalpia apresentaram-se diferentes do valor esperado (metade da entalpia encontrada para o fármaco isolado).

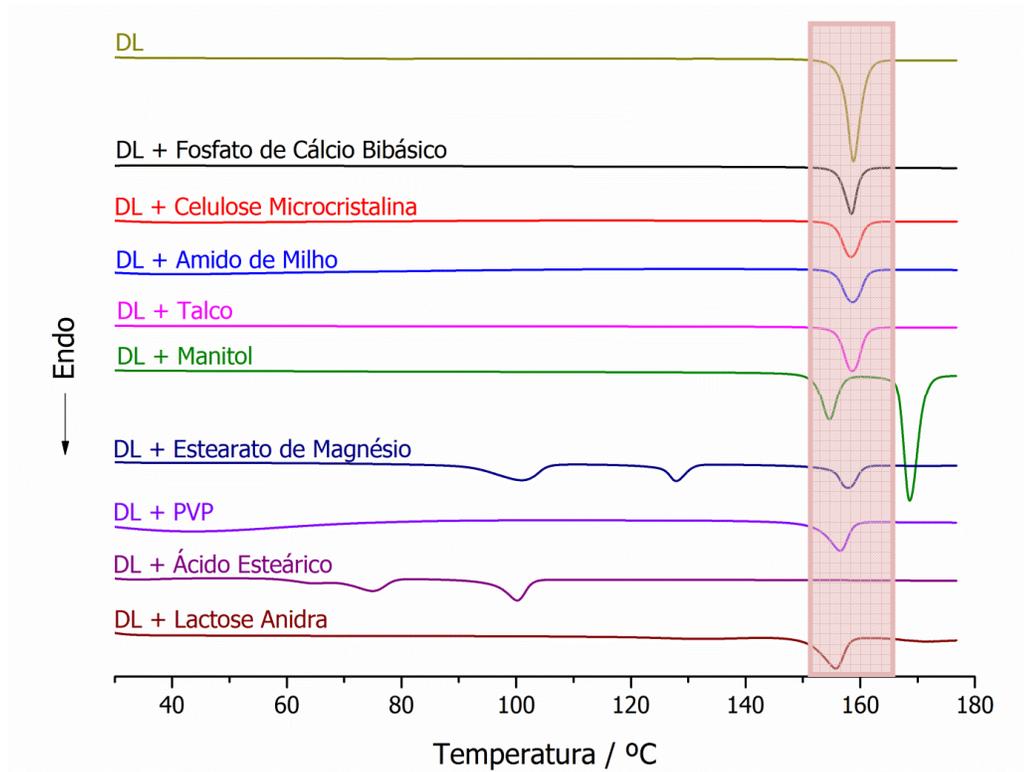
As misturas contendo os excipientes estearato de magnésio e ácido esteárico apresentaram alterações mais intensas em relação aos valores de entalpia de fusão, confirmando a incompatibilidade química (formação de produtos de degradação) ou física (solubilização do fármaco no excipiente antes da fusão) observada no tempo inicial da análise.

Da mesma forma, os excipientes isolados armazenados na câmara de estabilidade em frascos abertos (calor úmido) não mostraram qualquer alteração significativa nos parâmetros iniciais térmicos conforme representado na Figura 36, com exceção para o excipiente PVP, que devido a sua elevada higroscopicidade houve a formação de um material semi-sólido o qual não foi possível analisar pelo DSC.

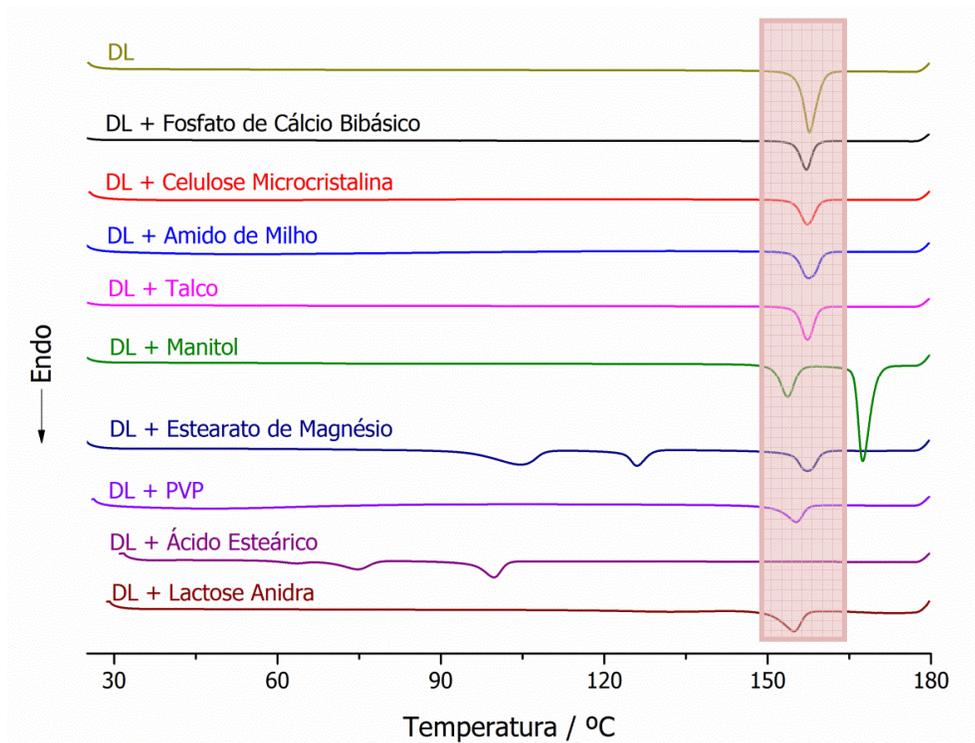
O mesmo perfil térmico obtido para as amostras dos excipientes isolados armazenados pelo período de 3 meses sob calor úmido foram obtidos para as mesmas amostras após 6 meses de armazenamento sob as mesmas condições.

Além disso, a análise do fármaco isolado mostrou uma diminuição da entalpia de fusão de 5,4%, o que pode ser decorrente da formação do produto de degradação N-formil-desloratadina devido à exposição das amostras à condição forçada de umidade relativa conforme explicado anteriormente.

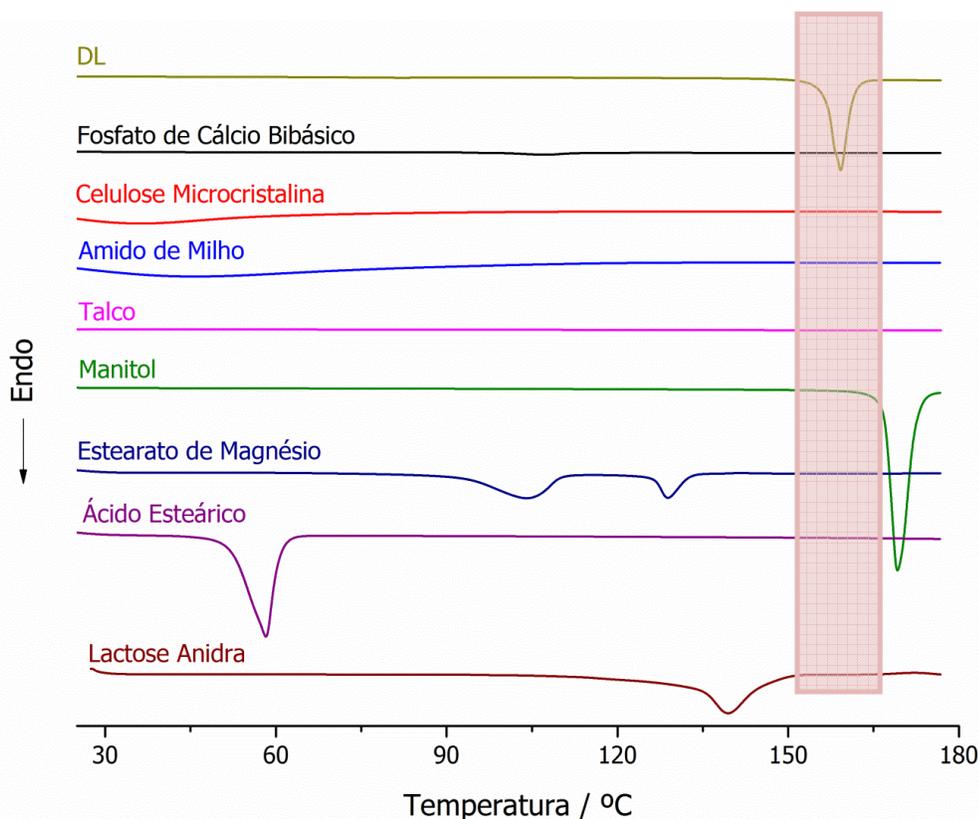
Na análise das misturas binárias submetidas ao calor úmido (Figuras 37 e 38), além das incompatibilidades encontradas no tempo inicial, também houve interação entre a DL e o PVP, observada pela diminuição significativa na entalpia de fusão e alteração na temperatura inicial de fusão da DL superior a 10°C, o que não havia sido observado na análise de tempo inicial. Essa interação pode ser explicada pelo ganho de umidade do material decorrente da elevada higroscopicidade do excipiente.



**Figura 34** - Curvas DSC das misturas binárias preparadas para o estudo e armazenadas durante 3 meses sob condições forçadas (calor seco – frasco fechado).



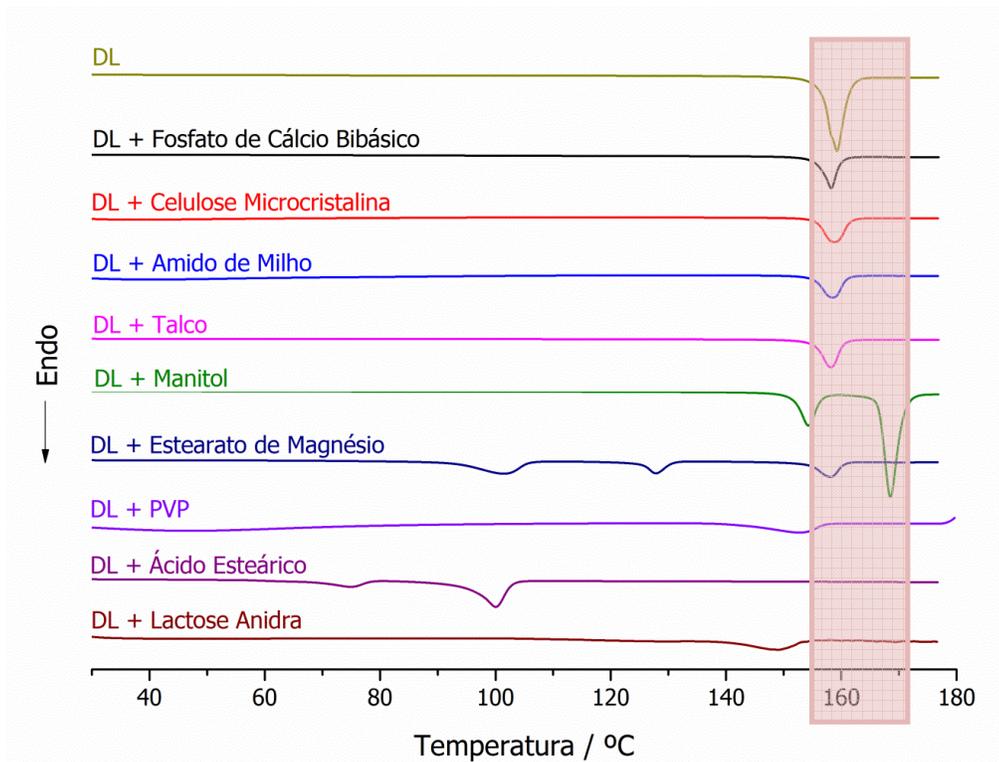
**Figura 35** - Curvas DSC das misturas binárias preparadas para o estudo e armazenadas durante 6 meses sob condições forçadas (calor seco – frasco fechado).



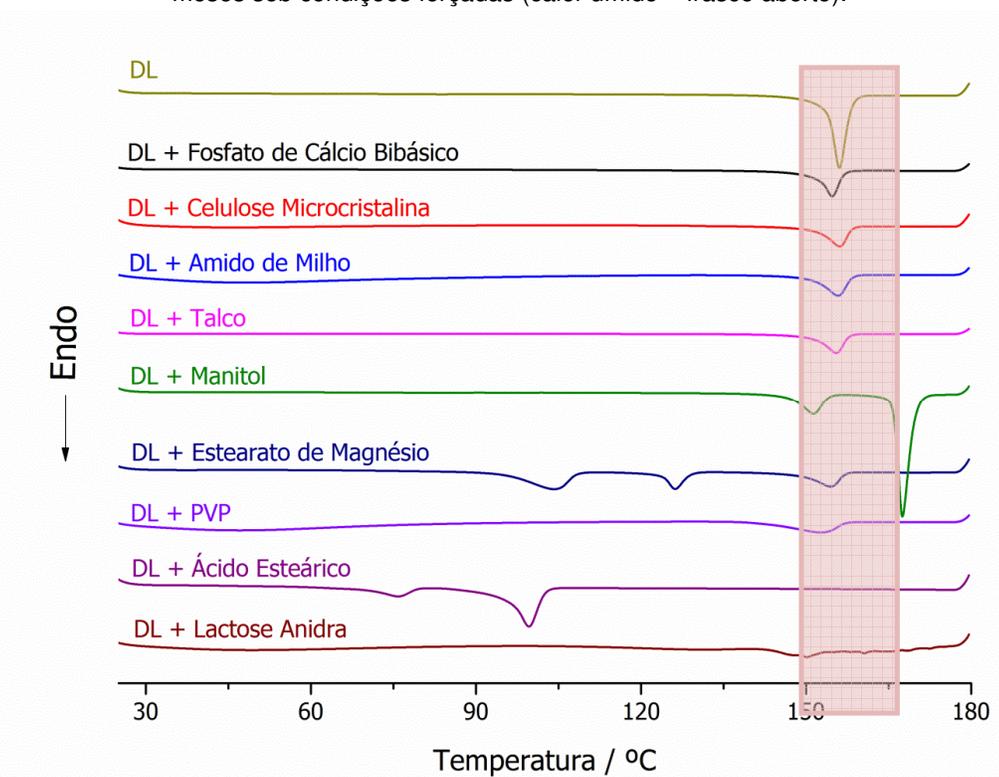
**Figura 36** - Curvas DSC das substâncias utilizadas no estudo após armazenamento durante 3 meses sob condições forçadas (calor úmido – frasco aberto)

Além disso, pode-se observar na Tabela 11 que a temperatura inicial de fusão da DL na mistura binária contendo lactose anidra também apresentou alteração superior a 10°C enquanto seu valor de entalpia apresentou redução significativa, o que confirma a interação encontrada no tempo inicial e reafirma a potencial incompatibilidade desse açúcar redutor com aminas primárias e secundárias diante de condições forçadas de temperatura e umidade.

Para as demais misturas binárias contendo os excipientes fosfato de cálcio bibásico, amido de milho, talco e manitol foi possível observar uma diminuição na entalpia de fusão quando as amostras foram armazenadas sob as condições forçadas de temperatura e umidade pelo período prolongado de 6 meses. Essa alteração é decorrente da degradação intensa da DL que ocorre nessas condições, mas não representa uma interação entre fármaco e excipientes.



**Figura 37** - Curvas DSC das misturas binárias preparadas para o estudo e armazenadas durante 3 meses sob condições forçadas (calor úmido – frasco aberto).

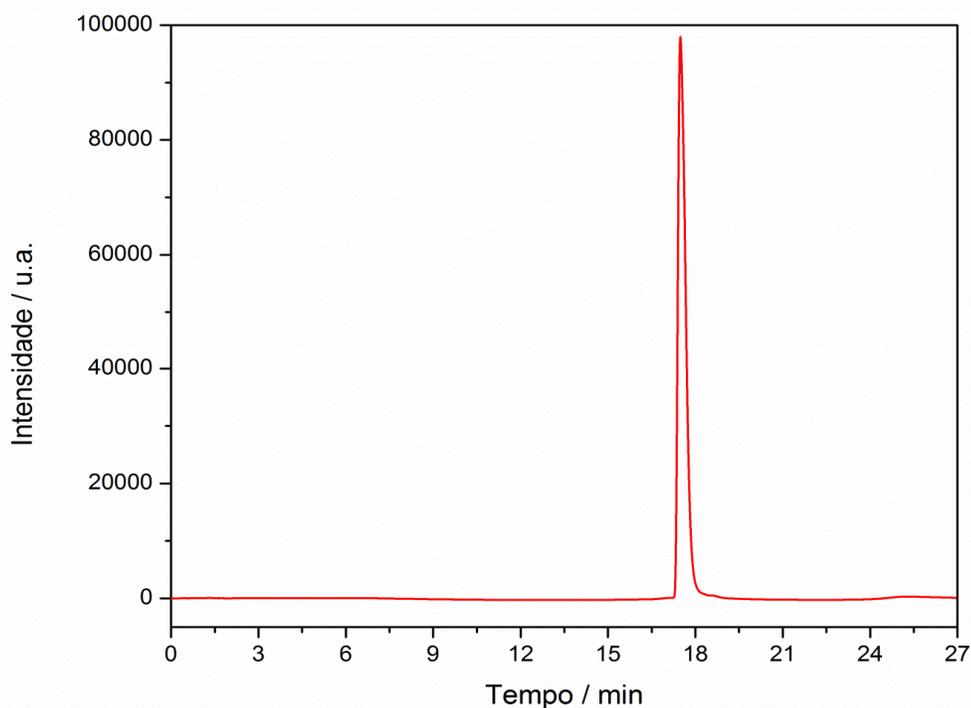


**Figura 38** - Curvas DSC das misturas binárias preparadas para o estudo e armazenadas durante 6 meses sob condições forçadas (calor úmido – frasco aberto).

#### 5.5.4 Avaliação da compatibilidade e estabilidade da DL por Cromatografia Líquida

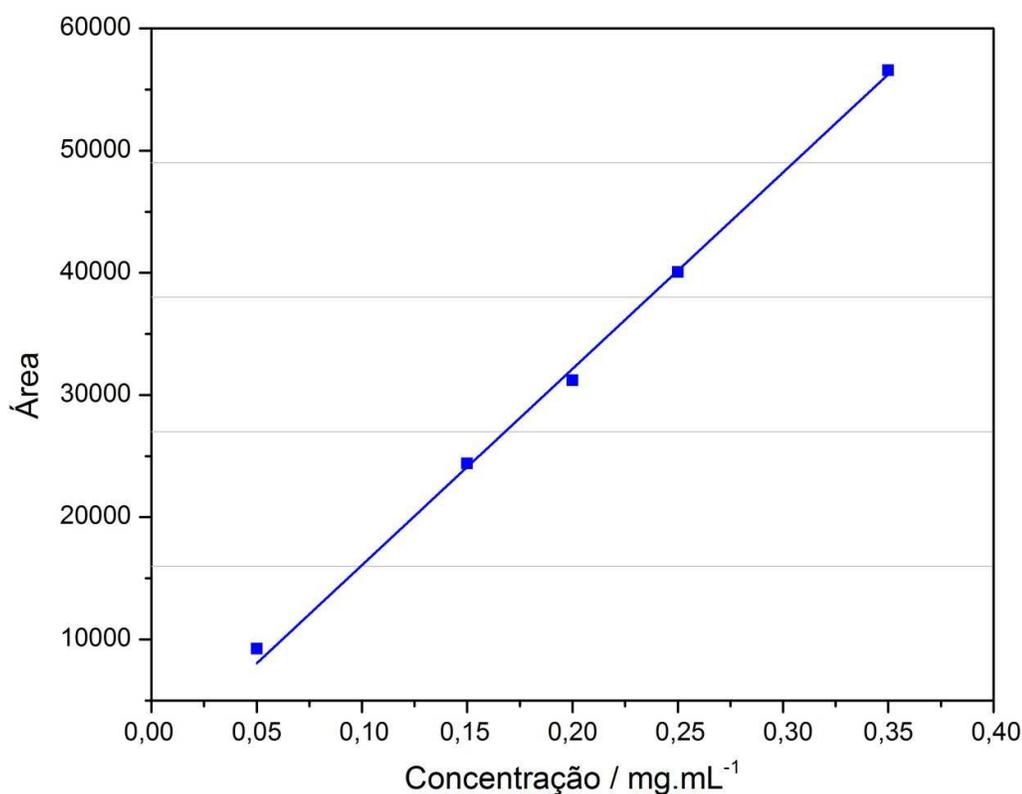
A análise cromatográfica foi desenvolvida neste trabalho com o intuito de determinar o perfil cromatográfico do fármaco isolado, analisar sua estabilidade intrínseca por meio da observação de possíveis produtos de degradação e observar sua estabilidade na presença de excipiente, em cada mistura binária.

O método analítico indicativo de estabilidade para o fármaco desloratadina ainda não se encontra preconizado na farmacopeia, apesar da literatura descrever algumas técnicas para determinação de desloratadina e seus produtos de degradação utilizando métodos cromatográficos com detecção no UV ou acoplado a espectrometria de massas (LC-MS/MS) e ainda, cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). Dessa forma, utilizou-se o método desenvolvido e validado por Zheng e Rustum (2010), onde praticamente todos os parâmetros propostos foram reproduzidos. A fase móvel composta por fase aquosa (A) e acetonitrila (B) eluída por gradiente de 33% de B a 42% de B durante 27 minutos mostrou ser adequada, apresentando pico bem resolvido no tempo de retenção de 17,5 minutos, como demonstrado na Figura 39.



**Figura 39** - Cromatograma da desloratadina analisada por LC utilizando coluna C18, eluição gradiente, fase móvel A (aquosa) e B (acetonitrila), fluxo de  $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  em 267 nm.

Inicialmente, procedeu-se a construção da curva de calibração considerando a concentração da amostra (eixo x) e a resposta do sistema – área (eixo y), onde x corresponde à concentração de DL e y corresponde à área média do pico da DL obtido no cromatograma nas cinco concentrações determinadas das amostras: 0,05; 0,15; 0,2; 0,25 e 0,35 g/mL. Cada concentração foi analisada em triplicata. Foram calculados os desvios padrão e o coeficiente de correlação (R). Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 40 e Tabela 12.



**Figura 40** – Curva de calibração obtida por HPLC para a DL no comprimento de onda de 267 nm.

Os resultados obtidos nesta etapa com a técnica de HPLC são comparáveis e em boa concordância com os resultados obtidos pela técnica de DSC. Porém, este método requer um longo período de tempo para armazenamento das amostras sob condições controladas de temperatura e umidade, apesar de ser capaz de oferecer indicações qualitativas e quantitativas sobre a via de degradação do fármaco.

**Tabela 12** - Resultados obtidos na construção da curva de calibração ( $n=3$ )

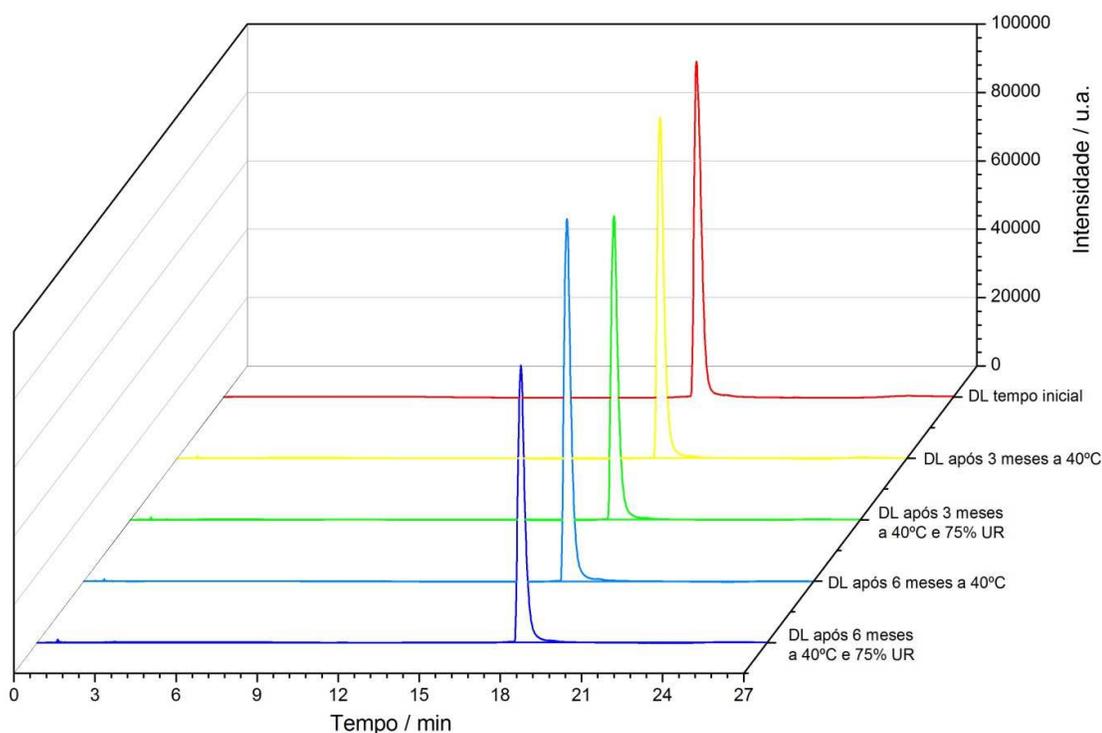
<b>Concentração do Padrão (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Área Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Coefficiente de Correlação (R)</b>
<b>0,05</b>	9.231,80	± 372,113	
<b>0,15</b>	24.392,59	± 101,527	
<b>0,20</b>	31.196,13	± 54,283	0,9991
<b>0,25</b>	40.053,19	± 218,903	
<b>0,35</b>	56.566,45	± 101,342	

Os cromatogramas da DL em condições iniciais e após o estudo de estabilidade estão apresentados na Figura 41. Não foi observada qualquer alteração no perfil cromatográfico para cada amostra de DL testada, e não foi possível detectar qualquer pico referente à formação de produtos de degradação.

Na análise quantitativa, verificou-se uma redução significativa da concentração de DL nas amostras armazenadas durante 3 e 6 meses a 40°C e 75% UR (TABELA 13), o que pode ser explicado pelo ganho de umidade da amostra exposta a condições forçadas. É importante lembrar que essa instabilidade significativa foi também constatada pela técnica de DSC, quando na observação da diminuição da entalpia de fusão do fármaco. Dessa forma, pode-se afirmar que a umidade elevada é um fator importante para promover a degradação da DL.

A partir da avaliação dos cromatogramas obtidos para os excipientes pode-se verificar que os sinais correspondentes a cada um dos excipientes testados não foram detectados, isso porque os excipientes muitas vezes são insolúveis na fase móvel ou não apresentam qualquer interação com a fase estacionária, sendo eluídos facilmente no início da corrida cromatográfica. As amostras de excipientes armazenadas durante 3 e 6 meses sob condições específicas também foram avaliadas e não apresentaram qualquer alteração ou pico cromatográfico que pudesse influenciar no estudo de compatibilidade por LC, dessa forma os cromatogramas referentes a essas amostras não foram apresentados.

Da mesma forma, foram realizadas corridas cromatográficas de todas as misturas binárias armazenadas após o período de 3 e 6 meses sob as condições forçadas de temperatura e umidade preconizados pelo ICH para os testes de estabilidade acelerada. Os resultados dessas amostras foram correlacionados com os resultados dos ensaios cromatográficas do fármaco isolado.



**Figura 41** – Cromatograma da DL no tempo inicial e após 3 e 6 meses sob condições forçadas de temperatura e umidade (calor seco: 40°C e calor úmido: 40°C e 75% UR).

**Tabela 13** - Dados obtidos por LC para DL após 3 e 6 meses sob condições específicas de temperatura e umidade

Amostra	Área	Concentração observada <sup>1</sup> (mg.mL <sup>-1</sup> )	% de degradação <sup>2</sup>
DL (tempo inicial)	31.572,27	0,195	-
DL (após 3 meses a 40°C)	30.866,13	0,191	2,24%
DL (após 3 meses a 40°C e 75% UR)	28.271,69	0,175	10,45%
DL (após 6 meses a 40°C)	31.018,42	0,192	1,75%
DL (após 6 meses a 40°C e 75% UR)	25.855,08	0,159	18,11%

<sup>1</sup> Concentração observada = (Área do cromatograma – 755,12) / 157665

<sup>2</sup> % de degradação = 100 - (Concentração Final x 100) / Concentração Inicial.

As misturas de DL com os excipientes fosfato de cálcio dibásico, amido de milho, talco, manitol e PVP não apresentaram qualquer alteração no perfil

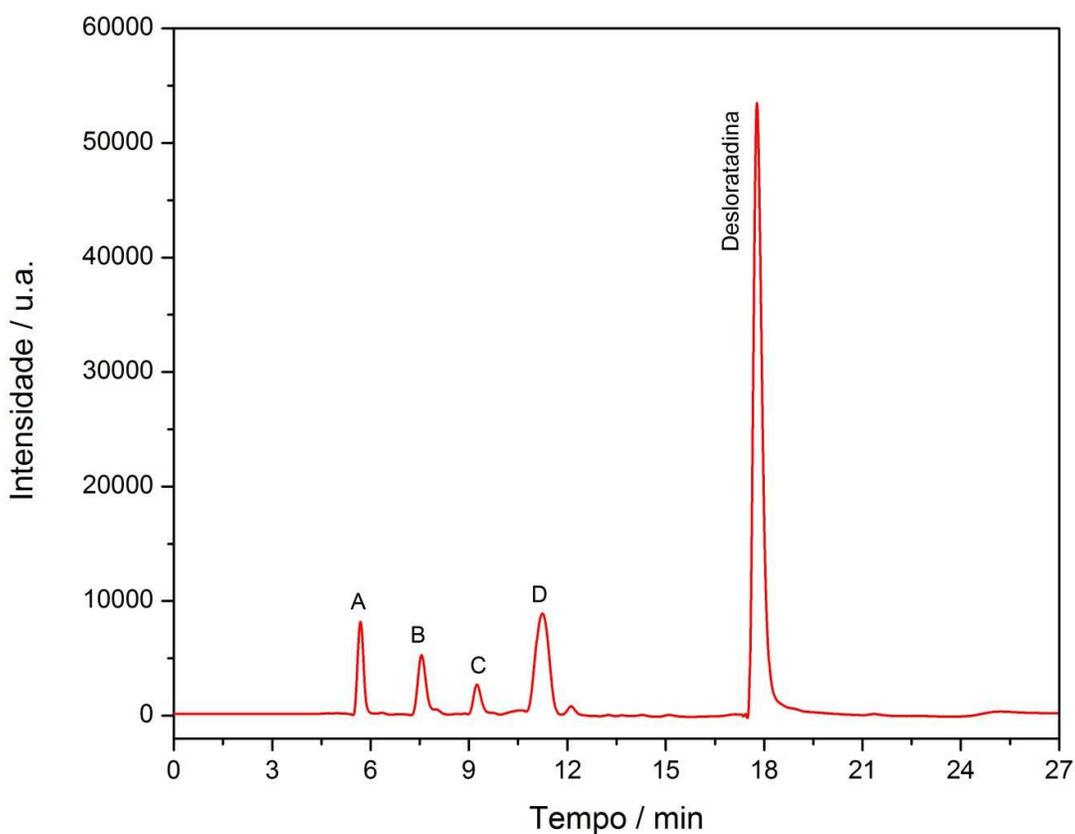
cromatográfico, quando comparado ao fármaco isolado, o que mostra a estabilidade e compatibilidade da DL com esses excipientes. A perda por degradação do fármaco nessas misturas foi pouco significativa, variando em torno de 0,5%, conforme descrito na Tabela 14.

Nas amostras armazenadas por 3 meses a 40°C verificou-se maior perda do fármaco por degradação nas misturas binárias de DL com os excipientes celulose microcristalina (8,45%), ácido esteárico (30,45%) e lactose anidra (12,24%). Degradação mais acentuada do fármaco foi observada quando estas mesmas misturas binárias foram armazenadas a 40°C e 75% UR (TABELA 14). Dessa forma, pode-se afirmar que as misturas binárias armazenadas pelo período de 3 meses a 40°C (calor seco) apresentaram resultados condizentes com os resultados encontrados com a técnica de DSC.

**Tabela 14** - Dados obtidos por LC do pico cromatográfico da DL para o fármaco isolado e nas diferentes misturas binárias após armazenamento em câmara de estabilidade durante 3 meses

Amostra	3 meses			
	40°C		40°C e 75% UR	
	Área	% degradação	Área	% degradação
DL	31566,13	0,02	28271,69	10,45
DL + Fosfato de cálcio bibásico	31367,35	0,65	31225,27	1,10
DL + Celulose microcristalina	28903,18	8,45	27912,29	11,59
DL + Amido de milho	31211,88	1,14	31537,96	0,11
DL + Talco	31509,97	0,20	30127,25	4,58
DL + Manitol	31481,84	0,29	31299,66	0,86
DL + Estearato de Magnésio	31901,03	0,00	31460,93	0,35
DL + PVP	29930,56	5,20	29898,77	5,30
DL + Ácido Esteárico	24177,68	23,42	9242,46	70,73
DL + Lactose Anidra	27706,77	12,24	21593,83	31,61

Na análise da mistura binária de DL com lactose anidra armazenada durante 3 meses a 40°C e 75% UR (calor úmido), além da diminuição do teor do fármaco, verificou-se no cromatograma a formação de produtos de degradação, devido a incompatibilidade química descrita anteriormente para esses componentes (FIGURA 42). É importante lembrar que a lactose anidra é um açúcar redutor com potencial de ocorrência da reação de Maillard quando exposta a amins primárias e secundárias sob condições de temperatura e umidade elevadas. Essa incompatibilidade já se encontra descrita na literatura e a mesma também foi identificada pela técnica de DSC.



**Figura 42** - Cromatograma obtido da mistura binária de DL com Lactose anidra após 3 meses na câmara de estabilidade a 40°C e 75% UR (calor úmido).

No cromatograma apresentado na Figura 42 é possível observar, além do pico referente à DL eluído no tempo de 17,5 min, outros picos cromatográficos (identificados pelas letras A, B, C e D), provavelmente referentes aos produtos de

degradação do fármaco. Zheng e Rustum (2010) conseguiram com o método indicativo de estabilidade desenvolvido, separar e identificar seis diferentes produtos de degradação e três impurezas de síntese para a DL. Comparando o cromatograma obtido com os resultados publicados por Zeng e Rustum (2010), o pico cromatográfico identificado pela letra D pode ser correspondente ao produto de degradação N-formil desloratadina, o qual foi discutido anteriormente e constitui o principal produto da reação de Maillard.

Nas amostras armazenadas por 6 meses a 40°C e 40°C/75%UR a perda do fármaco por degradação apresentou-se mais acentuado. Verificou-se também uma perda acentuada na mistura binária de DL com PVP (8,94% e 11,42%), conforme apresentado na Tabela 15. Vale ressaltar que essa mistura binária, quando analisada por DSC, apresentou interação fármaco-excipiente a qual acarretou em uma leve diminuição na temperatura inicial de fusão da DL.

**Tabela 15** - Dados obtidos por LC do pico cromatográfico da DL para o fármaco isolado e nas diferentes misturas binárias após armazenamento em câmara de estabilidade durante 6 meses

Amostra	6 meses			
	40°C		40°C e 75% UR	
	Área	% degradação	Área	% degradação
DL	31018,42	1,75	25855,08	18,11
DL + Fosfato de cálcio bibásico	31574,57	0,00	31303,80	0,85
DL + Celulose microcristalina	27845,08	11,81	26815,34	15,07
DL + Amido de milho	31150,65	1,34	28384,91	10,10
DL + Talco	32414,74	0,00	27468,14	13,00
DL + Manitol	30579,91	3,14	29756,03	5,75
DL + Estearato de Magnésio	30901,50	2,12	31334,98	0,75
DL + PVP	28749,10	8,94	27967,11	11,42
DL + Ácido Esteárico	21957,92	30,45	7936,01	74,86
DL + Lactose Anidra	26431,17	16,28	18286,69	42,08

O PVP, um excipiente polimérico, é descrito na literatura por ser incompatível com vários fármacos devido à sua associação com impurezas de peróxido. Os peróxidos são substâncias reativas presentes em vários excipientes e podem iniciar um processo de oxidação de fármacos sensíveis por meio de reação direta ou formação de radicais que atuam iniciando reações em cadeia, induzindo desta forma, a formação de produtos de degradação. A formação de peróxidos neste excipiente em formas farmacêuticas sólidas é relativamente lenta, no entanto, as condições e tempo de armazenamento devem ser cuidadosamente avaliados uma vez que levam à variação nos níveis de peróxido no produto final (WATERMAN et al, 2004).

Os resultados de LC para o estudo de estabilidade e compatibilidade fármaco-excipiente demonstram uma pequena perda por degradação para a combinação DL-estearato de magnésio (perda máxima de 2,12%). Este resultado demonstra que não há incompatibilidades química entre esses componentes e, permite complementar as conclusões obtidas pela técnica de DSC, quando verificou-se a sobreposição dos eventos endotérmicos, porém com leve diminuição na entalpia de fusão do fármaco.

Na análise dos dados obtidos para a mistura binária de DL com ácido esteárico, verificou-se que o pico cromatográfico da DL eluído em 17,5 minutos foi detectado, porém com uma redução significativa na intensidade confirmando a potencial incompatibilidade entre esses componentes. Além disso, nenhum pico referente ao produto de degradação formado foi detectado o que requer uma análise mais aprofundada com técnicas mais sensíveis e seletivas, como a Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry* – MS) combinada com Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography* - LC-MS). Esta técnica tem ganhado popularidade e está entre as técnicas preferidas para a elucidação estrutural de produtos de degradação em fármacos, no desenvolvimento farmacêutico (REYNOLDS et al, 2002).

A cromatografia líquida acoplada à detecção por massa (LC-MS) tem sido utilizada na identificação de produtos de degradação em estudos de estabilidade de fármaco. Nesta técnica, os compostos são separados através de seus tempos de retenção e a identificação é feita pelo íon molecular e pelo perfil de fragmentação da molécula analisada. As estruturas dos compostos de degradação formados são propostas tendo como base a molécula inicial e o ganho (oxidação ou dimerização) ou perda de substituintes (hidrólise).

## **5.6 Conclusões**

Alguns pontos discutidos nesta aplicação merecem ser referidos como observações conclusivas. A calorimetria exploratória diferencial constitui um valioso instrumento de investigação para identificação de interações entre componentes de uma formulação farmacêutica e na caracterização de transformações polimórficas de fármacos. Com esta técnica recolhe-se uma grande riqueza de informação, em relação à estabilidade térmica da substância em estudo, tipo de transformação que ocorre a uma dada temperatura por aquecimento ou resfriamento e mecanismo que preside a cada uma das transformações observadas.

A caracterização da DL foi realizada por meio das técnicas de DSC, TG, FT-IR, PXRD, Raman e SEM, as quais demonstraram as propriedades físico-químicas do fármaco, incluindo sua cristalinidade.

As curvas DSC e TG/DTG da DL mostraram evento endotérmico de fusão em 158,4°C e estabilidade térmica até 206 °C. Os dados espectrais observados para o fármaco no espectro FT-IR foram concordantes com outros autores. O padrão cristalográfico é compatível com o descrito na literatura.

Nos estudos de compatibilidade fármaco-excipiente, as modificações encontradas nas curvas DSC sugeriram uma possível interação da DL com celulose microcristalina, lactose anidra, estearato de magnésio e ácido esteárico. No entanto, quando as mesmas misturas binárias foram analisadas por LC utilizando o método indicativo de estabilidade desenvolvido por Zheng e Rustum (2010), não foi constatada qualquer interação entre a DL e o estearato de magnésio, confirmando a hipótese de solubilização parcial do fármaco no excipiente quando o mesmo ultrapassa sua temperatura de fusão a qual é inferior a temperatura de fusão da DL.

Pode-se concluir também que quanto maior a exposição da amostra às condições forçadas de temperatura e umidade relativa, maior o percentual de degradação do fármaco, principalmente quando o mesmo encontra-se associado a um excipiente.

Além disso, verifica-se que apenas a avaliação das alterações visuais ocorridas nas amostras submetidas a condições forçadas de temperatura e umidade pode ser suficiente para confirmar a aplicabilidade da técnica de DSC como um método rápido e apropriado para a determinação de interação e/ou compatibilidade

entre fármaco e excipientes e seleção de excipientes mais adequados em estudos de pré-formulação.

As técnicas de análise térmica são importantes ferramentas no controle de qualidade de formulações farmacêuticas, uma vez que fornecem informações sobre a estabilidade térmica e a decomposição do fármaco isolado e em associação com excipientes. Porém, sabe-se que em estudos de compatibilidade fármaco-excipiente, faz-se necessário uma avaliação cuidadosa de qualquer evento térmico significativo observado nos resultados obtidos por DSC a fim de evitar interpretações errôneas e estabelecer corretamente a compatibilidade entre o fármaco e o excipiente. Sempre que possível outra técnica deve ser combinada, tal como a determinação do ensaio através de um método indicativo de estabilidade utilizando a LC.

Os resultados deste estudo demonstram que a realização do teste de compatibilidade fármaco-excipiente é essencial para o desenvolvimento de uma formulação estável a fim de criar subsídios para a tomada de decisão sobre qual processo produtivo utilizar, por exemplo, o uso da granulação por via seca ou úmida, bem como definir o melhor grau de umidade final em uma formulação. Também é importante lembrar que a ineficácia clínica de muitos medicamentos pode estar relacionada com problemas relacionados aos componentes da formulação, processos empregados e características físico-químicas dos fármacos, fazendo necessário o desenvolvimento de estudos mais profundos acerca desses aspectos.

## **6 APLICAÇÃO 2: ETINILESTRADIOL**

Neste tópico será descrita a segunda aplicação deste trabalho, a qual envolve os estudos de caracterização do hormônio EE, o desenvolvimento de dispersões sólidas contendo este fármaco e a avaliação da estabilidade das dispersões desenvolvidas. Foram descritos os aspectos farmacológicos dos anticoncepcionais orais em geral e do fármaco, além de aspectos relevantes das dispersões sólidas. Este item contém materiais e métodos empregados, bem como os resultados e as conclusões obtidas.

### ***6.1 Hormônios Estrógenos***

Hormônios são mensageiros químicos que respondem pela comunicação entre diferentes tipos de células, e são identificados por meio de receptores os quais compreendem estruturas protéicas especializadas em reconhecimento molecular. Depois da aproximação e interação hormônio-receptor ocorre uma série de reações bioquímicas, levando a respostas biológicas específicas (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

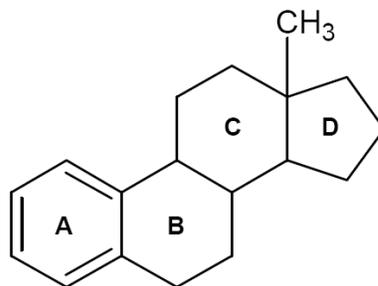
Os hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol e podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos ou estrógenos, hormônios sexuais masculinos ou andrógenos e hormônios da gravidez ou progestógenos (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006). Os hormônios estrógenos são importantes interferentes endócrinos. Em mamíferos, os estrógenos são sintetizados principalmente nos ovários, mas também em outros tecidos como testículos, cérebro, hipotálamo, tecido adiposo e placenta (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

Na puberdade, os hormônios sexuais estrogênicos são responsáveis pela maturação dos órgãos reprodutores e pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias, bem como por uma fase de crescimento acelerado, seguida de fechamento das epífises dos ossos longos. A partir deste momento, os esteroides

sexuais estão envolvidos na regulação das alterações cíclicas expressas no ciclo menstrual e são importantes durante a gravidez (RANG; DALE; RITTER, 2004).

Dentre os hormônios sexuais, os estrógenos vêm recebendo maior atenção por serem compostos extremamente ativos biologicamente e estarem relacionados à etiologia de vários tipos de cânceres (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006). Os estrógenos naturais  $17\beta$ -estradiol, estriol, estrona e o sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol, desenvolvido para uso médico em terapias de reposição além dos métodos contraceptivos, são os que despertam maior preocupação em relação a sua ação no homem uma vez que possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores e, portanto, resultam em respostas máximas no organismo, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos desencadeados pela exposição a esses agentes (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Esses hormônios são constituídos por uma cadeia carbônica contendo dezoito átomos, distribuídos em três anéis hexagonais (A, B e C) e um pentagonal (D) os quais constituem o núcleo ciclopentano-fenantreno (FIGURA 43). A diferença na posição dos substituintes hidroxílicos nesse núcleo é o que diferencia as moléculas estrogênicas.



**Figura 43** - Estrutura química do núcleo ciclopentano-fenantreno.

A solubilidade dos estrógenos em água é baixa. Estudos mostram que a solubilidade aproximada dos estrógenos naturais é menor que a dos estrógenos sintéticos, e ambas variam entre valores de 3 a  $19 \text{ mg.L}^{-1}$  (SHAREEF et al, 2006). O coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) dos estrógenos varia entre 2,8 e 4,6, sendo que a hidrofobicidade é particularmente alta para os estrógenos sintéticos (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

## **6.2 Anticoncepcionais Orais**

Desde a sua introdução na década de 1960, a terapia hormonal com o uso de contraceptivos orais, um dos métodos de controle da natalidade mais prescrito nos Estados Unidos, tem sido usada por aproximadamente 80% das mulheres em algum momento da vida para bloquear a ovulação, a implantação, e, portanto, a gravidez. A simplicidade dos esquemas disponíveis, a baixa frequência de efeitos colaterais e a segurança relativa em comparação com a gravidez resultaram em uso generalizado do método (SHUFELT; MERZ, 2009).

Ao longo dos anos, os contraceptivos orais passaram por importantes evoluções, incluindo alterações na dose e tipo de hormônios utilizados. As doses dos hormônios nos contraceptivos orais têm diminuído consideravelmente, variando de 20 a 35 µg de etinilestradiol nos contraceptivos de última geração (SHUFELT; MERZ, 2009). Além disso, a introdução e o uso crescente dos contraceptivos orais combinados têm contribuído para a garantia da mesma eficiência e segurança presente nos demais contraceptivos disponíveis no mercado, com a vantagem da redução dos efeitos adversos (BACHMANN et al, 2004).

As duas classes de contraceptivos orais amplamente utilizados são as associações de estrógeno/progestogênio e a contracepção com progestina apenas (ARMSTRONG; BARBIERI, 2009). O desenvolvimento inicial de contraceptivos orais combinados foi baseado no conhecimento de que a ovulação é suprimida durante a gravidez e que a progesterona é responsável por este efeito (RIVERA; YACOBSON; GRIMES, 1999).

A inibição da ovulação é considerada o mecanismo primário da contracepção com associações de estrógeno/progestogênio e reflete uma redução acentuada da secreção de estradiol do ovário e da ausência de produção de progesterona (RIVERA; YACOBSON; GRIMES, 1999). A administração de contraceptivos orais combinados suprime a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) por meio do bloqueio do hipotálamo, e a inibição da secreção dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) devido sua ação sobre a adeno-hipófise. Conseqüentemente ocorre a inibição do desenvolvimento folicular e da formação do corpo lúteo (ARMSTRONG; BARBIERI, 2009; RIVERA; YACOBSON; GRIMES, 1999).

O uso de estrogênio ou progestina isolados é capaz de inibir a liberação de FSH e LH suficiente para impedir a ovulação. No entanto, a administração combinada de ambos os compostos aumenta acentuadamente o efeito anti-gonadotrófico e a inibição da ovulação (RIVERA; YACOBSON; GRIMES, 1999). A co-administração de estrógeno e progestogênio também pode inibir a gravidez através de mecanismos secundários, incluindo alterações no peristaltismo das tubas, na receptividade endometrial e na secreção de muco cervical (ARMSTRONG; BARBIERI, 2009).

O efeito dos contraceptivos orais combinados sobre a secreção de FSH e LH é rápida, reduzindo os níveis desses hormônios circulantes já no primeiro dia de administração. No entanto, pelo menos sete dias de utilização diária ininterrupta é necessário para suprimir o desenvolvimento folicular (RIVERA; YACOBSON; GRIMES, 1999).

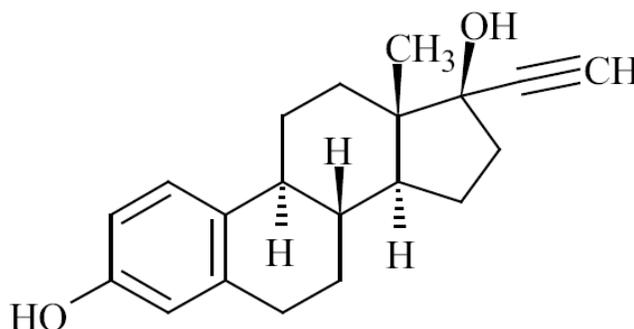
### **6.3 Etinilestradiol**

O etinilestradiol é o componente estrogênico mais amplamente utilizado em contraceptivos orais de baixas doses e é pelo menos 20 vezes mais potente em doses orais que o hormônio natural (GUGUTA et al, 2008). Este fármaco é comumente usado em quase todas as formulações modernas de pílulas anticoncepcionais orais, seja isoladamente ou em associação com um progestogênio (GOODMAN; GILMAN, 2010).

O etinilestradiol foi o primeiro hormônio sintético ativo derivado do hormônio natural estradiol (NAGPAL; MEAYS, 2009). Sintetizado em 1938 por Hans Inhoffen e Hohlweg Walter da empresa Schering, o uso deste pode ser como método contraceptivo, na terapia de reposição hormonal na menopausa e no tratamento de algumas disfunções hormonais, tais como, endometriose, dismenorria grave e na síndrome do ovário policístico (RANG; DALE; RITTER, 2004; RIVERA; YACOBSON; GRIMES, 1999). São utilizadas doses muito diferentes de estrogênio para diferentes condições; assim, por exemplo, o etinilestradiol é administrado numa dose de 10-20 mcg/dia como terapia de reposição hormonal após a menopausa, de 20-50 mcg/dia

na forma de anticoncepcional oral combinado, e de 1-3 mg/dia para o câncer de mama (RANG; DALE; RITTER, 2004).

O etinilestradiol é quimicamente conhecido por (17 $\alpha$ )-19-Norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ino-3,17-diol, apresenta fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub> e peso molecular igual a 296,40 g.mol<sup>-1</sup>. A faixa de fusão é de 180°C a 186°C, porém o fármaco apresenta uma forma polimorfa com faixa de fusão de 142°C a 146°C (USP 32). Sua estrutura química é mostrada na Figura 44.



**Figura 44** - Estrutura química do etinilestradiol.

A matéria-prima apresenta-se como um pó cristalino, branco ou levemente amarelado e inodoro, sendo praticamente insolúvel em água (4,8 a 11,3 mg.L<sup>-1</sup> a 27°C) (NAGPAL; MEAYS, 2009), mas solúvel em acetona, clorofórmio, dioxana, etanol, éter etílico e em soluções alcalinas diluídas (MERCK INDEX, 2006).

A absorção do etinilestradiol pelo trato gastrointestinal é rápida e geralmente completa (GOODMAN; GILMAN, 2010); entretanto, após a sua absorção não são rapidamente metabolizados pelo fígado. A substituição do grupamento etinil na posição 17 da cadeia carbônica inibe o metabolismo da primeira circulação (GOODMAN; GILMAN, 2010). Os estrogênios são também, em sua maioria, rapidamente absorvidos pela pele e pelas mucosas (RANG; DALE; RITTER, 2004). A meia-vida biológica do etinilestradiol é de aproximadamente 33  $\pm$  13 horas (NAGPAL; MEAYS, 2009).

## 6.4 Dispersões Sólidas

O número de ingredientes farmacêuticos candidatos a novos fármacos que apresenta baixa solubilidade em água tem crescido ao longo dos últimos anos e está se tornando um problema persistente e cada vez mais prevalente no desenvolvimento farmacotécnico (VAN DEN MOOTER, 2011; BAIRD; TAYLOR, 2012). Diante disso, as novas e avançadas estratégias de formulação tem sido alvo de interesse da indústria farmacêutica a fim de melhorar a taxa de dissolução e/ou a solubilidade aparente de fármacos fracamente solúveis (YU et al, 2011; BAIRD; TAYLOR, 2012).

Em 1995, Amidon e colaboradores elaboraram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) para classificar os fármacos baseados nas suas propriedades de solubilidade em meio aquoso e permeabilidade intestinal. Baseado nestas características, as substâncias farmacêuticas foram divididas em quatro classes distintas, conforme relacionado na Tabela 16 (AMIDON et al, 1995).

**Tabela 16** - Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS)

<b>Classe</b>	<b>Solubilidade</b>	<b>Permeabilidade</b>
I – Anfifílico	Alta	Alta
II – Lipofílico	Baixa	Alta
III - Hidrofílico	Alta	Baixa
IV - Hidrofóbico	Baixa	Baixa

Fonte: AMIDON, *et al* (1995).

No sistema de classificação biofarmacêutica a solubilidade é uma função da dose e do volume do fluido gastrintestinal disponível. Um fármaco é considerado de baixa solubilidade quando a sua dose posológica mais alta não pode ser dissolvida em 250 mL de meio aquoso na faixa de pH de 1,0 a 7,0 (VAN DEN MOOTER, 2011). A permeabilidade, no entanto, é baseada na fração percentual absorvida conhecida das substâncias. Uma substância é considerada de alta permeabilidade quando a fração absorvida é maior que 90% (FERREIRA, 2011).

Embora existam várias abordagens disponíveis para melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água melhorando com isso a sua biodisponibilidade

oral, tais como a formação de sal, a redução de tamanho de partícula, a obtenção de um pró-fármaco e a complexação, o desenvolvimento de dispersões sólidas amorfas tem sido uma estratégia atraente e promissora para a indústria farmacêutica (VAN DEN MOOTER, 2011; BAIRD; TAYLOR, 2012; GHASTE et al, 2012).

As dispersões sólidas são caracterizadas pela mistura de um ou mais componentes farmacologicamente ativos (geralmente um fármaco hidrofóbico), em um carreador fisiologicamente compatível (geralmente uma matriz hidrofílica) com a finalidade de alterar as propriedades do estado sólido, aumentar a taxa de dissolução, promover a liberação sustentada, melhorar o coeficiente de solubilidade e a estabilidade dos fármacos, podendo promover também, dependendo do tipo de carreador, um sistema de liberação modificada (SHARMA; JAIN, 2011; NAIR; GONEN; HOAG, 2002; SETHIA; SQUILLANTE, 2004).

Esta definição inclui os diferentes tipos de dispersões sólidas, tais como sistemas eutéticos, precipitações de fármacos amorfos em uma matriz cristalina, precipitações de fármacos amorfos em uma matriz amorfa, soluções sólidas (o fármaco é dissolvido em uma matriz cristalina no estado sólido) e soluções vítreas (o fármaco é dissolvido em uma matriz amorfa) (VAN DEN MOOTER, 2011). As soluções vítreas de compostos pouco solúveis em água utilizando matrizes amorfas constituem um sistema de fase em que todas as moléculas do fármaco encontram-se intimamente misturadas com as moléculas da matriz carreadora selecionada, o que promove uma situação favorável no que diz respeito às propriedades de dissolução (VAN DEN MOOTER, 2011).

A liberação do fármaco em uma dispersão sólida pode ser significativamente melhorada em comparação com a dissolução da droga no seu estado puro, cristalino ou amorfo. O uso das dispersões sólidas favorece a formulação do medicamento porque, quando a mesma é exposta ao meio aquoso, a matriz hidrofílica se dissolve e libera o fármaco como finas partículas coloidais produzindo maior taxa de dissolução e conseqüentemente aumentando a biodisponibilidade oral (GUASTE et al, 2012).

Vários métodos de preparação de dispersões sólidas têm sido relatados na literatura. Todos os métodos lidam com o desafio de misturar uma matriz e um fármaco, de preferência em nível molecular, enquanto matriz e fármaco são geralmente pouco miscíveis.

Os primeiros trabalhos sobre desenvolvimento de dispersões sólidas foram publicados em 1961 e utilizavam o método de fusão no preparo dos materiais. No processo de fusão, o carreador é aquecido a uma temperatura ligeiramente superior a de seu ponto de fusão e o fármaco é incorporado ao carreador (VAN DEN MOOTER, 2011; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). O resfriamento da mistura pode ser processado de diferentes maneiras, devendo ocorrer sob agitação constante de forma a permitir a obtenção final de uma mistura homogênea do fármaco com o carreador.

O processo de obtenção é relativamente rápido e simples, no entanto, podem ser apontadas algumas desvantagens decorrentes do processo, tais como sublimação do fármaco, transformação polimórfica e/ou degradação térmica de fármacos termossensíveis. A utilização de temperaturas elevadas e o fato de vários fármacos serem suscetíveis à degradação decorrente do processo de fusão fazem com que a utilização desse método seja limitada. Uma adaptação comum consiste em suspender o fármaco e o carreador em um veículo previamente fundido, em vez de usar tanto fármaco como a matriz no estado fundido, reduzindo com isso a temperatura do processo (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

Outro método bastante utilizado no preparo de dispersões sólidas é a preparação por evaporação do solvente. Nesse método, o carreador e o fármaco são dissolvidos em um solvente geralmente orgânico, e o mesmo é evaporado a uma temperatura fixa e a pressão reduzida (VAN DEN MOOTER, 2011; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). Com a remoção do solvente ocorre a supersaturação do meio seguido de precipitação simultânea dos constituintes. Contudo, há possibilidade de formação de solvatos. Neste método, a decomposição térmica de fármacos ou carreadores pode ser evitada, uma vez que a evaporação de solvente orgânico ocorre em temperaturas mais baixas (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). A dificuldade desse método está em encontrar um solvente que dissolva tanto o fármaco como o carreador (VAN DEN MOOTER, 2011).

Diferentes autores realizaram estudos abrangendo o desenvolvimento e estudo de estabilidade de dispersões sólidas. Diferentes métodos de preparo e técnicas analíticas como DSC, PXRD, FT-IR e SEM foram empregados para avaliar as possíveis alterações que ocorrem quando na exposição das dispersões sólidas a condições forçadas de temperatura e umidade. Ensaio de solubilidade e dissolução

também foram desenvolvidos (ZHANG et al, 2011; DAHLBERG, 2010; SINHA et al, 2010).

Levando em consideração todos os aspectos apresentados, preparar uma dispersão sólida com fármaco é altamente relevante, uma vez que há significativa melhora na solubilidade e na taxa de dissolução de fármacos lipossolúveis, como é o caso do etinilestradiol. Aumentando-se a dissolução do fármaco, melhora-se também a absorção e eficácia, além de diminuir a concentração necessária do fármaco nas formulações farmacêuticas.

## **6.5 Parte Experimental**

### 6.5.1 Materiais e Equipamentos

Os materiais necessários para a realização do projeto de pesquisa proposto encontram-se disponíveis no Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos (LACFar) e Laboratório de Cristalografia, ambos pertencentes ao Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas e Laboratório de Quimiometria em Química Analítica, ambos pertencentes ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - SP (IQ-UNICAMP).

A amostra de etinilestradiol (EE) foi cedida pelo Laboratório Eurofarma (fabricante Zhejiang-China).

Celulose microcristalina, amido pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona K25 (PVP) e lactose anidra foram os excipientes grau farmacêutico selecionados para o estudo. Foram utilizados também os solventes etanol, acetona, clorofórmio e diclorometano (JTBaker – USA) todos de grau analítico e em conformidade com as agências regulatórias.

Para realização dos experimentos foram utilizados um agitador vortex MA162 (Marconi) e uma balança analítica AY220 (Shimadzu). As curvas DSC foram obtidas em um equipamento modelo DSC-7020 EXSTAR (SII NanoTechnology Inc.) e as curvas TG/DTG foram obtidas em uma termobalança TG/DTA-7300 EXSTAR (SII

NanoTechnology Inc.). Os difratogramas foram obtidos em difratômetro de raios X Ultima IV – Rigaku; os espectros de absorção na região do infravermelho médio com Transformada de Fourier (FT-IR) foram realizados em espectrômetro eletrônico IR Prestige-21 (Shimadzu); as fotomicrografias foram obtidas empregando microscópio eletrônico de varredura JEOL® mod. JSM-6340F.

## **6.5.2 Métodos**

### *6.5.2.1 Caracterização do Etinilestradiol*

O fármaco etinilestradiol foi caracterizado empregando cinco técnicas distintas: DSC, TG, PXRD, FT-IR e SEM.

#### **a) Calorimetria Exploratória Diferencial**

Para obtenção das curvas DSC, uma amostra do fármaco (aproximadamente 3,3 mg) foi cuidadosamente pesada, acondicionada em cadinho de alumínio aberto e aquecida no intervalo de temperatura de 25 a 350°C a uma razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>). A célula de DSC foi previamente limpa e calibrada com índio metálico (pureza de 99,99%; temperatura de fusão igual a 156,4°C; entalpia de fusão igual a 28,7 J.g<sup>-1</sup>). As curvas obtidas receberam tratamento utilizando o *software* EXSTAR visando caracterizar os eventos térmicos característicos das amostras.

#### **b) Termogravimetria**

Na caracterização térmica, as curvas TG/DTG foram obtidas utilizando aproximadamente 10mg de amostra acondicionada em cadinho de alumínio e aquecida de 30 a 600°C sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>. A calibração do sistema de Análise Termogravimétrica foi realizada usando padrão de oxalato de cálcio monoidratado

(ASTM 1582-93). As curvas obtidas foram tratadas empregando *software* EXSTAR, a fim de identificar a etapa de decomposição térmica da amostra.

### **c) Difratometria de raios X**

Ensaio de difratometria de raios X por pó foram realizados utilizando um difratômetro modelo Ultima IV - Rigaku com fonte de Cu K $\alpha$  ( $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$ ) e utilizando silício policristalino como padrão. As medições foram realizadas no modo *step scan* de  $5^\circ$  a  $55^\circ 2\theta$  utilizando voltagem de 40 Kv, corrente de 30 mA, passo  $0,02^\circ$  e 0,5 segundo/passos.

### **d) Espectroscopia na região do Infravermelho**

O espectro de absorção do etinilestradiol na região do infravermelho médio com transformada de Fourier foi registrado no intervalo de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $8 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando pastilhas preparadas em prensa hidráulica com 100 mg de brometo de potássio e contendo 1% do conteúdo da amostra. Os dados foram tratados com o *software* Shimadzu IRSolution 1.30.

### **e) Microscopia Eletrônica de Varredura**

A morfologia do fármaco foi analisada usando microscópio eletrônico de varredura JEOL mod. JSM-6340F. As amostras foram fixadas em um suporte metálico (*stub*) com auxílio de uma fita dupla-face de cobre e submetidas à metalização com ouro sob vácuo, a fim de torná-las eletricamente condutivas. A visualização foi realizada no aumento de 10.000 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 kV.

#### *6.5.2.2 Desenvolvimento de Dispersões Sólidas de Etinilestradiol*

Para o desenvolvimento de dispersões sólidas de etinilestradiol foram testados quatro diferentes excipientes e quatro solventes.

Soluções homogêneas individuais contendo o fármaco etinilestradiol e cada um dos solventes escolhidos, etanol, acetona, clorofórmio e diclorometano foram preparadas. Cada uma das soluções resultantes foi então misturada com cada solução de excipiente (amido, celulose microcristalina, lactose anidra e PVP), utilizando a proporção 1:4 (m/m) fármaco-excipiente, obtendo-se no final dos ensaios, 16 materiais (4x4). Os materiais foram submetidos à secagem em estufa a 50°C, por 12 horas. Cada material obtido foi tamizado em tamiz #80 *mesh* a fim de padronizar o tamanho de partícula obtida e eliminar qualquer influência relacionada ao tamanho de partícula.

Foram preparadas também misturas físicas (EE-excipiente controle) contendo apenas o fármaco e cada um dos excipientes na proporção 1:4 (m/m), as quais foram homogeneizadas em frascos de polipropileno durante 1 minuto em vortex utilizando duas esferas de aço inoxidável.

Para avaliação da influência do solvente sobre as transições polimórficas do EE, o fármaco foi solubilizado em quantidade suficiente dos solventes testados e a solução resultante foi submetida à secagem em estufa a 50°C, por 12 horas (EE-solvente controle).

#### *6.5.2.3 Caracterização e estudo de estabilidade das dispersões sólidas de Etinilestradiol-PVP*

A partir do estudo de desenvolvimento de dispersões sólidas de etinilestradiol verificou-se a eficiência da combinação EE/PVP no desenvolvimento de dispersão sólida amorfa. Portanto, tal dispersão foi então selecionada e estudada com maior profundidade em relação à caracterização e estabilidade.

Dessa forma, as dispersões sólidas de EE em PVP foram preparadas na proporção 1:4 (m/m). Da mesma forma como obtido na etapa anterior, as dispersões sólidas foram obtidas pelo método de evaporação do solvente. Os solventes selecionados foram apenas o etanol e a acetona. É importante ressaltar que clorofórmio e diclorometano, solventes bastantes utilizados no preparo de dispersões sólidas pelo método do solvente, pertencem à classe II segundo a classificação do ICH, sendo classificados como solventes tóxicos. Dessa forma, devem ser utilizados

com cautela no preparo das dispersões sólidas, reduzindo sua presença para concentrações residuais após a secagem da dispersão sólida, devendo ser inferior aos limites de detecção estabelecidos (ICH, 2009).

Para avaliar a influência do carreador, uma mistura física de EE com PVP na mesma proporção utilizada na obtenção das dispersões sólidas foi preparada.

As dispersões sólidas obtidas foram caracterizadas empregando as técnicas de DSC, TG, PXRD e FT-IR. Os procedimentos e condições utilizadas na realização desses ensaios são os mesmos descritos no item 6.5.2.1 referente à caracterização do fármaco etinilestradiol.

Para os ensaios de estabilidade as dispersões sólidas foram analisadas imediatamente após o preparo. As mesmas amostras foram expostas a três condições de estresse com diferentes combinações de temperatura e umidade relativa:

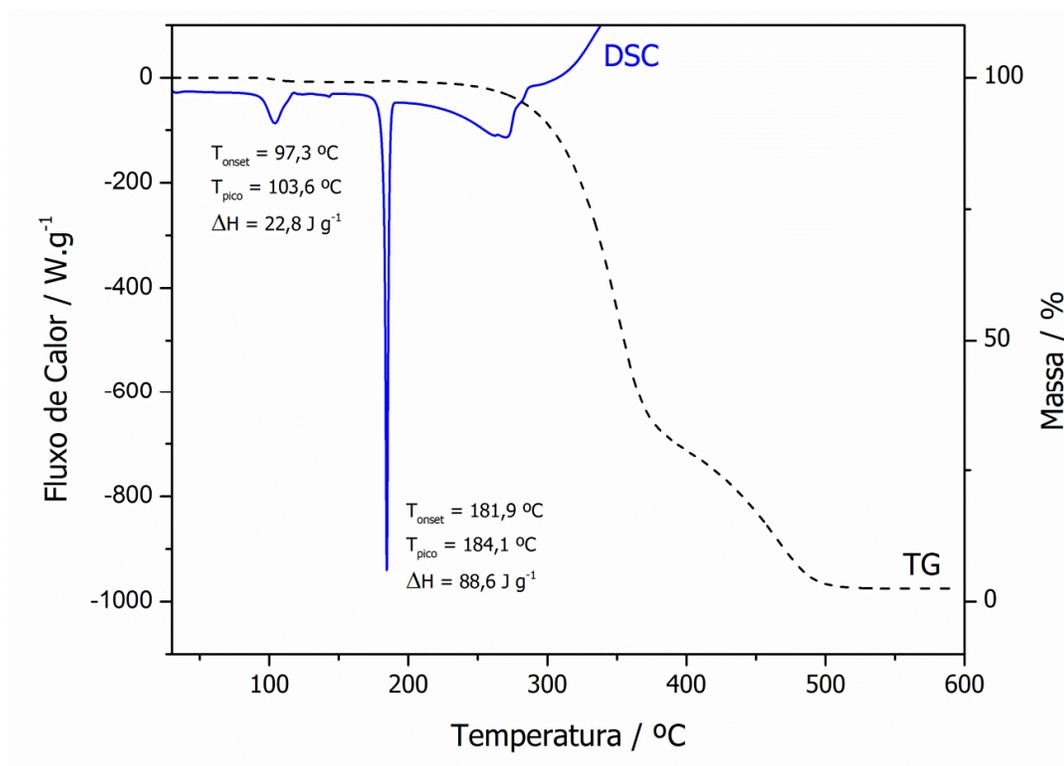
- ✓ 75% UR e 40°C: Condição criada pelo armazenamento de um recipiente hermético contendo uma quantidade apropriada de solução saturada de cloreto de sódio em uma estufa monitorada a 40°C.
- ✓ 90% UR e 25°C: Condição criada pelo armazenamento de um recipiente hermético contendo uma quantidade apropriada solução saturada de nitrato de potássio em uma sala com temperatura controlada de 25°C.
- ✓ 0% UR e 25°C: Condição criada pela utilização de um dessecador armazenado em uma sala com temperatura controlada de 25°C.

As amostras foram expostas a essas condições por diferentes períodos de tempo antes de serem submetidos à análise. A amostragem para análise foi feita nos seguintes tempos: Tempo inicial (logo após o preparo), após 15 dias, após 30 dias e após 90 dias de exposição às condições descritas.

## **6.6 Resultados e Discussão**

### 6.6.1 Caracterização do Etinilestradiol

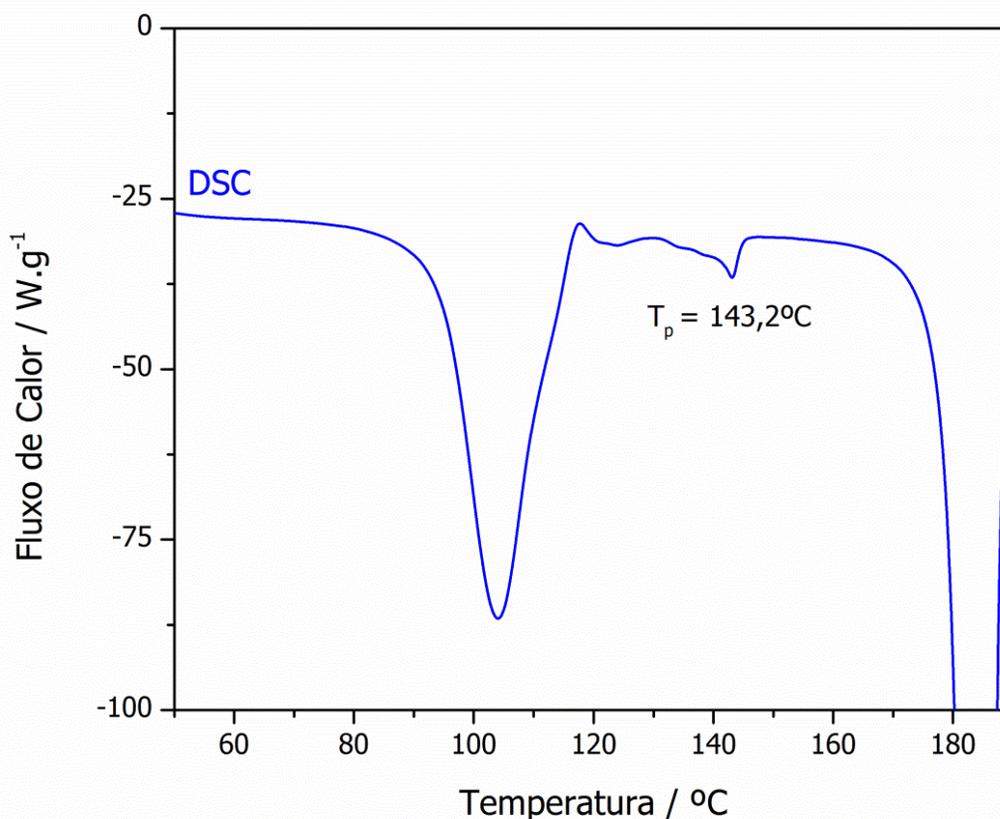
As Figuras 45 a 47 ilustram as curvas TG/DTG e DSC do etinilestradiol.



**Figura 45** - Curvas DSC e TG do etinilestradiol.

Na curva DSC (FIGURA 45) são observados três eventos bem definidos: um evento endotérmico em 103,6°C ( $T_{\text{onset}} = 97,3^\circ\text{C}$  e  $\Delta H_{\text{fusão}} = 22,8 \text{ J.g}^{-1}$ ) que pode ser atribuído à desidratação do fármaco, um pico endotérmico correspondente à fusão em 184,1°C ( $T_{\text{onset}} = 181,9^\circ\text{C}$  e  $\Delta H_{\text{fusão}} = 88,6 \text{ J.g}^{-1}$ ) conforme observação visual em aparelho convencional de ponto fusão e indicação na farmacopeia americana (USP32). O terceiro evento atribuído à decomposição do fármaco em atmosfera inerte se inicia após a temperatura de 206°C. Pode-se verificar pela análise da curva de TG que na faixa de temperatura de 115 a 206°C, que compreende o evento de fusão do fármaco, não há evento referente à perda de massa.

A curva DSC evidenciou outro evento endotérmico ( $T_{\text{pico}} = 143,2^\circ\text{C}$ ;  $T_{\text{onset}} = 140,3^\circ\text{C}$ ;  $\Delta H = 1,07 \text{ J.g}^{-1}$ ), numa faixa de temperatura em que as curvas TG/DTG não evidenciaram perda de massa (FIGURA 46). Esse evento está associado fusão de diferente espécie polimorfa que se encontra em pequena quantidade na amostra.



**Figura 46** - Ampliação da curva DSC do etinilestradiol na região entre 50°C e 190°C a fim de demonstrar o segundo evento térmico ocorrido em 143,2°C.

A partir da avaliação das curvas TG/DTG pode-se observar que o EE apresentou três eventos de perda de massa. O primeiro evento atribuído à liberação de água apresentou variação de massa de 0,8% e ocorreu entre 92 e 115°C. O fármaco apresentou estabilidade térmica até 206°C temperatura na qual se inicia a segunda perda de massa que ocorre entre 206 e 526°C e é decorrente da decomposição térmica em duas etapas distintas. A primeira etapa ocorreu entre 206,5 e 409,3°C ( $DTG_{pico} = 352,7^{\circ}C$ ) com perda de massa de aproximadamente 72,2%. A segunda etapa ocorreu entre 409,3 e 525,7°C ( $DTG_{pico} = 463,5^{\circ}C$ ) com perda de massa de 24,5%, conforme apresentado na Figura 47.

O difratograma de raios X do EE obtido pelo método por pó apresentou picos difratométricos de maior intensidade em 11; 13,18; 13,94; 15,76; 16,86; 17,24; 18,34; 19,66; 21,42 e 22,5  $^{\circ}2\theta$ , característicos da cristalinidade da mistura de duas diferentes formas polimórficas do fármaco, conforme apresentado na Figura 48. Por

meio da comparação dos difratogramas com uma base de dados pode-se verificar a presença da forma polimórfica hemihidrato na amostra utilizada.

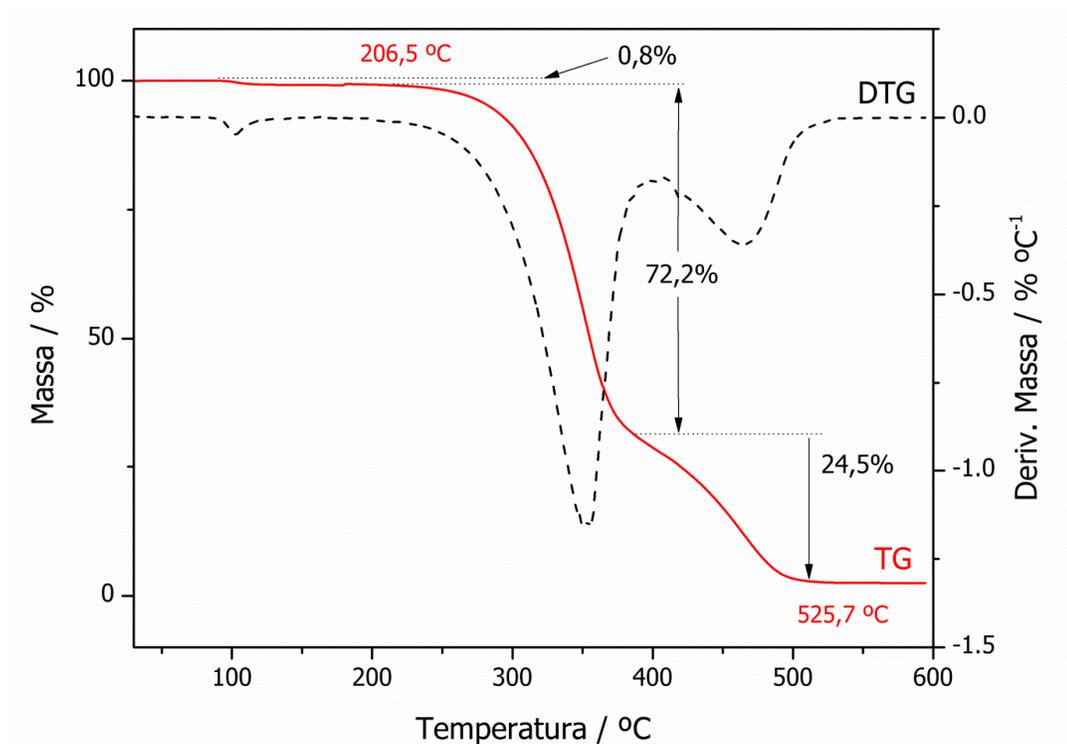


Figura 47 - Curvas TG/DTG do etinilestradiol.

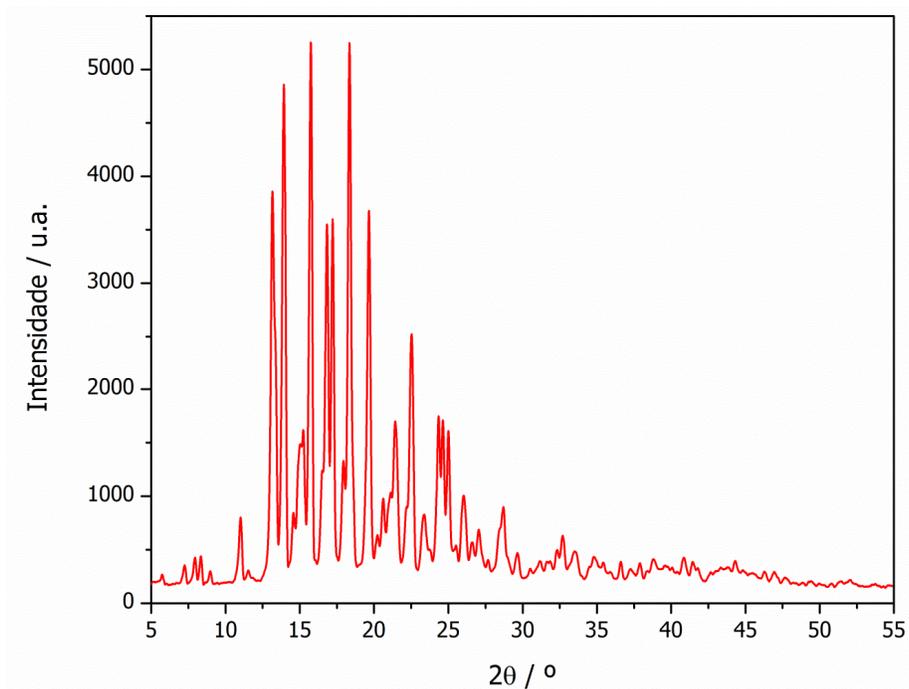
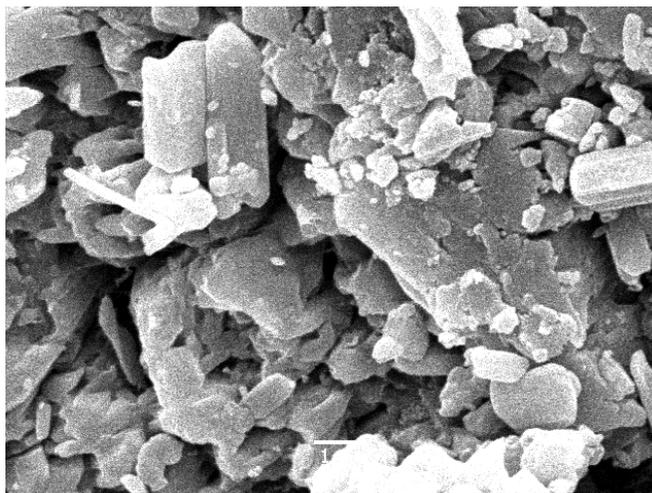


Figura 48 - Difratograma de raios X do Etinilestradiol.

Encontra-se descrito na literatura que o EE pode se apresentar sob diferentes formas pseudo polimórficas. Guguta e colaboradores (2008), após extensivos experimentos de cristalização apresentaram quatro estruturas cristalinas de solvatos do EE, contendo dioxano, nitrometano, etanol e dimetilformamida. Da mesma forma, as estruturas cristalinas do hemihidrato, metanolato e solvato de acetonitrila foram determinadas.

As moléculas do fármaco podem facilmente formar pontes de hidrogênio com as moléculas de solvente e entre as próprias moléculas de EE, formando com isso, solvatos estáveis. O fármaco EE possui a flexibilidade de formação de padrões distintamente diferentes de ligações de hidrogênio, por isso, permite a formação de uma série de pseudo polimorfos (GUGUTA et al, 2007).

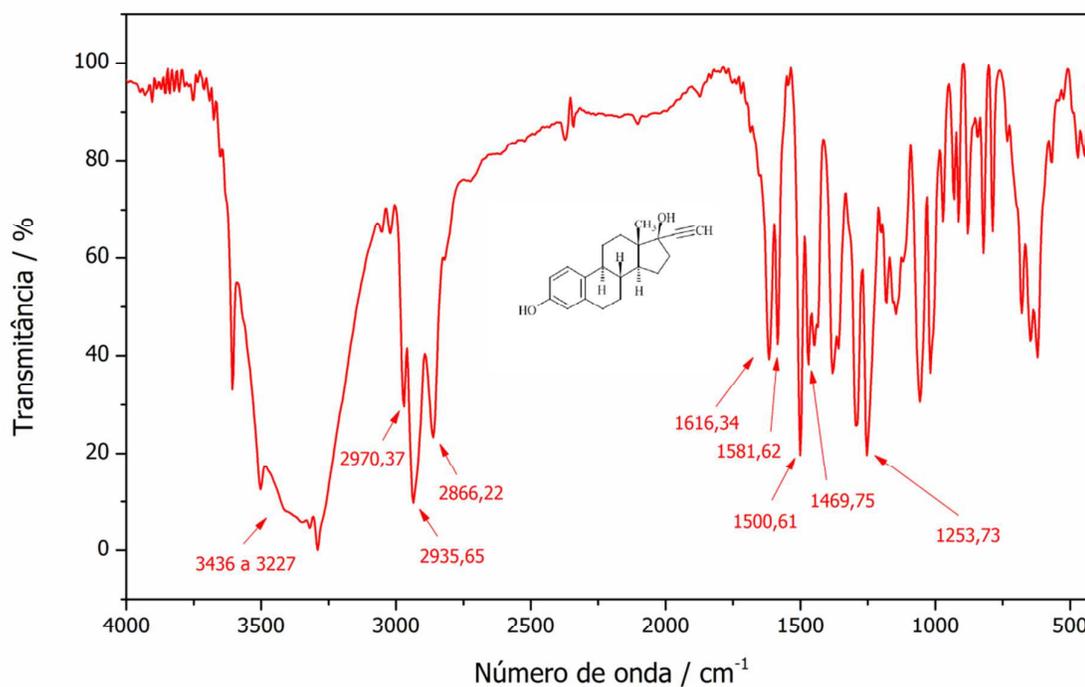
A micrografia eletrônica obtida para o etinilestradiol com uma ampliação de 10.000x, está apresentada na Figura 49. A análise morfológica do fármaco demonstrou cristais irregulares na forma de flocos agregados conforme descrito na Farmacopeia Americana (USP 32). É possível diferenciar também alguns cristais com formato prismático decorrente da mistura de formas polimórficas do EE.



**Figura 49** - Fotomicrografias de SEM do etinilestradiol obtida no aumento de 10.000x.

Para complementar a caracterização do etinilestradiol obteve-se o espectro de infravermelho o qual se encontra apresentado na Figura 50. Podem-se observar diversas bandas características atribuídas ao fármaco. Uma banda alargada na

região de 3.436 a 3.227  $\text{cm}^{-1}$  atribuída a deformação axial de hidroxila (O-H) em ligação de hidrogênio intermolecular; bandas de forte intensidade em 2.970, 2.935 e 2.866  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas a estiramento assimétrico  $\text{CH}_3$ , estiramento assimétrico  $\text{CH}_2$  e estiramento simétrico  $\text{CH}_2$ , respectivamente. Podem ser observadas também quatro bandas de média intensidade em 1.616, 1.581, 1.500 e 1.469  $\text{cm}^{-1}$  todas atribuídas a ligação C=C de anel aromático e uma banda em 1.253  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à deformação axial de ligação C-O de grupamento fenólico.



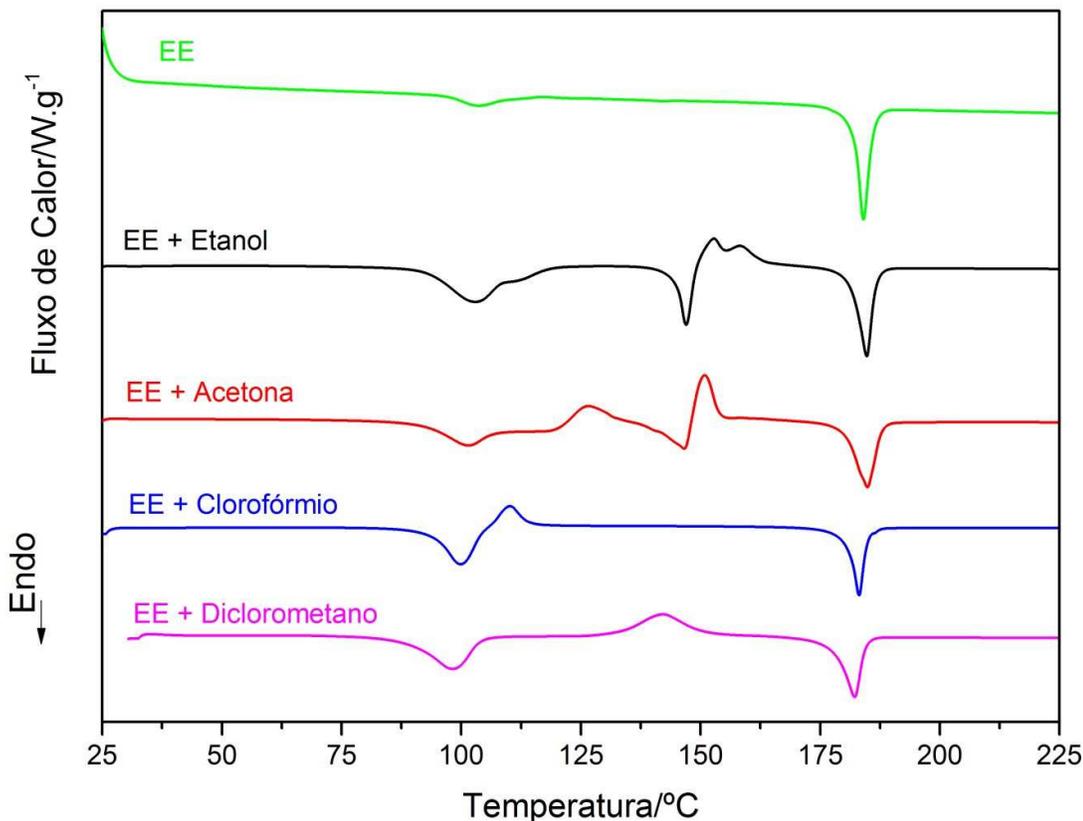
**Figura 50** - Espectro de infravermelho obtido para o etinilestradiol

## 6.6.2 Desenvolvimento de dispersões sólidas de Etinilestradiol

### 6.6.2.1 Ensaios Controle: avaliação da interação EE-Solvente

O efeito dos solventes sobre a mudança polimórfica do EE foi verificado em um ensaio onde o fármaco foi solubilizado nos solventes e as soluções foram secas

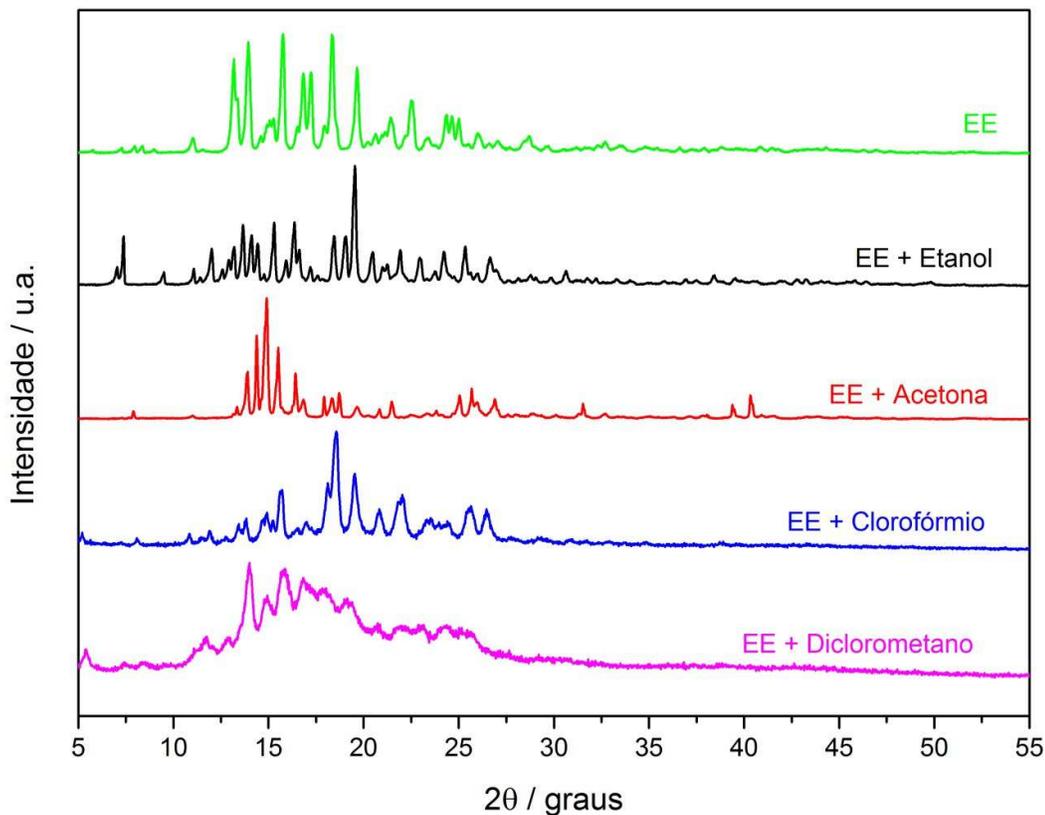
em estufa a 50°C, por 12 horas e consequente análise por DSC e PXR. Os resultados encontrados estão apresentados nas Figuras 51 e 52.



**Figura 51** - Curvas DSC para as amostras dos ensaios EE-Solvente

Verificou-se que para as soluções do fármaco com etanol e acetona houve a formação de uma segunda forma polimórfica a qual apresenta ponto de fusão próximo a 147°C e sofre recristalização quando aquecida (FIGURA 51). A forma recristalizada corresponde à mesma forma polimórfica inicialmente utilizada, apresentando, portanto, evento térmico de fusão em temperatura próximo a 185°C. Esses resultados foram confirmados por PXR conforme mostrado na Figura 52. Na análise dos difratogramas é possível observar alteração no padrão difratométrico decorrente da transição polimórfica do fármaco, quando no uso dos solventes etanol e acetona.

Para os solventes diclorometano e clorofórmio, as curvas DSC não apresentaram alteração em relação ao evento de fusão do EE, evidenciando que estes não contribuem para a alteração polimórfica de fármaco.



**Figura 52** - Difratomogramas das amostras dos ensaios EE-Solvente.

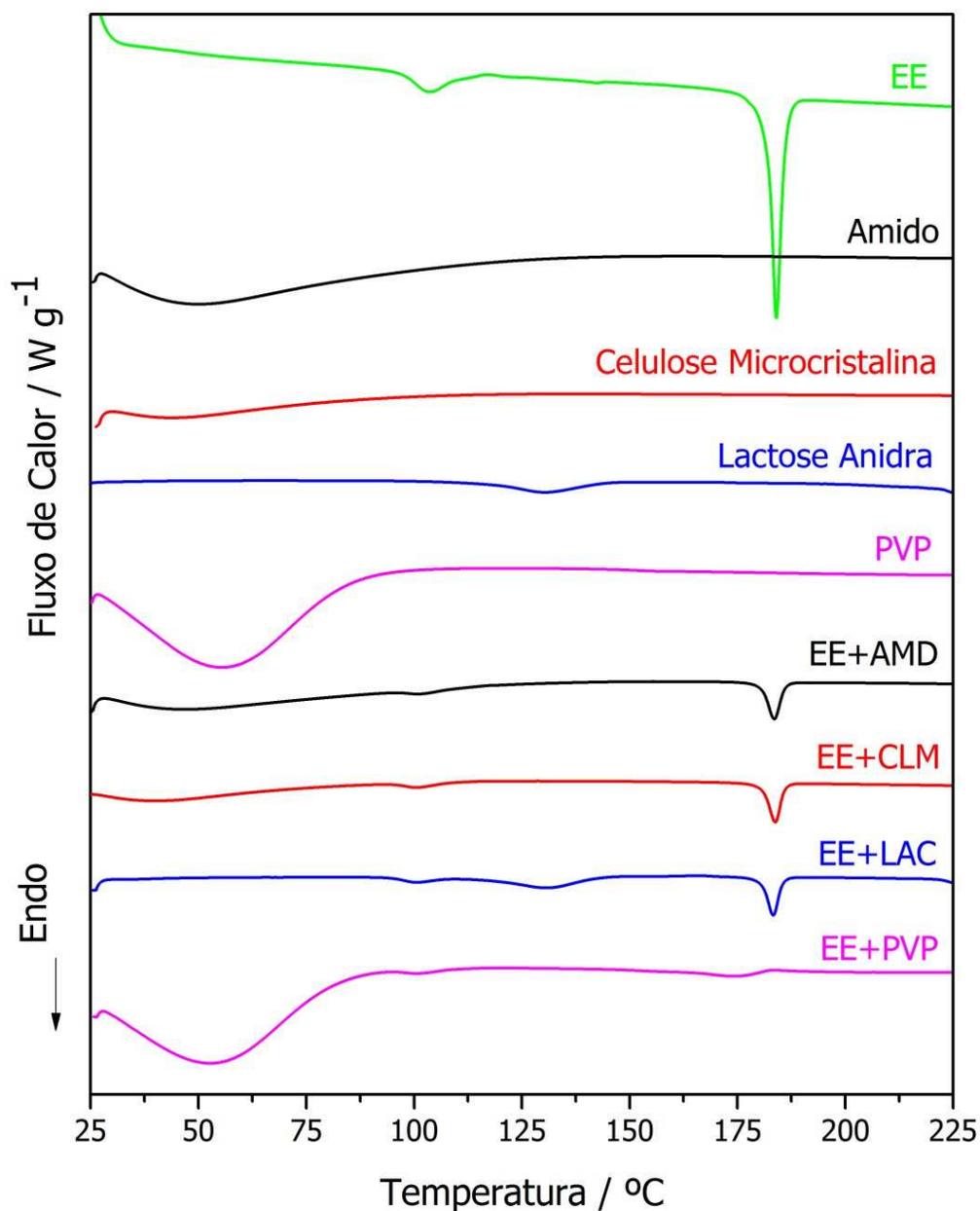
#### 6.6.2.2 Ensaios Controle: avaliação da interação EE-Excipiente

A contribuição do excipiente para a estabilidade polimórfica de EE foi avaliada preparando-se misturas físicas contendo cada um dos excipientes e o fármaco EE na proporção 1:4 (m/m) definida para o estudo, porém com ausência de solventes, totalizando 4 misturas, as quais foram analisadas por DSC e PXRD.

Nas curvas DSC dos excipientes isolados, nenhum evento térmico perto do pico de fusão do EE foi evidenciado conforme pode ser observado na Figura 53, mostrando que o evento é específico para o fármaco e pode ser utilizado em avaliações de interações entre os componentes das misturas.

Na análise das curvas DSC das misturas físicas pode-se observar que somente na curva de EE+PVP, o pico endotérmico referente ao evento de fusão do

EE diminuiu consideravelmente, evidenciando que pode existir uma interação química (decomposição do fármaco) ou física (solubilização do fármaco) entre esses componentes.



**Figura 53** - Curvas DSC das substâncias puras e misturas físicas fármaco-excipiente. (AMD = Amido pré-gelatinizado, CLM = Celulose microcristalina, LAC = Lactose anidra, PVP = Polivinilpirrolidona).

Os valores de entalpia e temperatura inicial de fusão para o EE e para cada uma das quatro misturas binárias encontram-se descritos na Tabela 17.

**Tabela 17** - Dados térmicos obtidos por DSC para o evento de fusão do EE para o fármaco isolado e para as diferentes misturas físicas

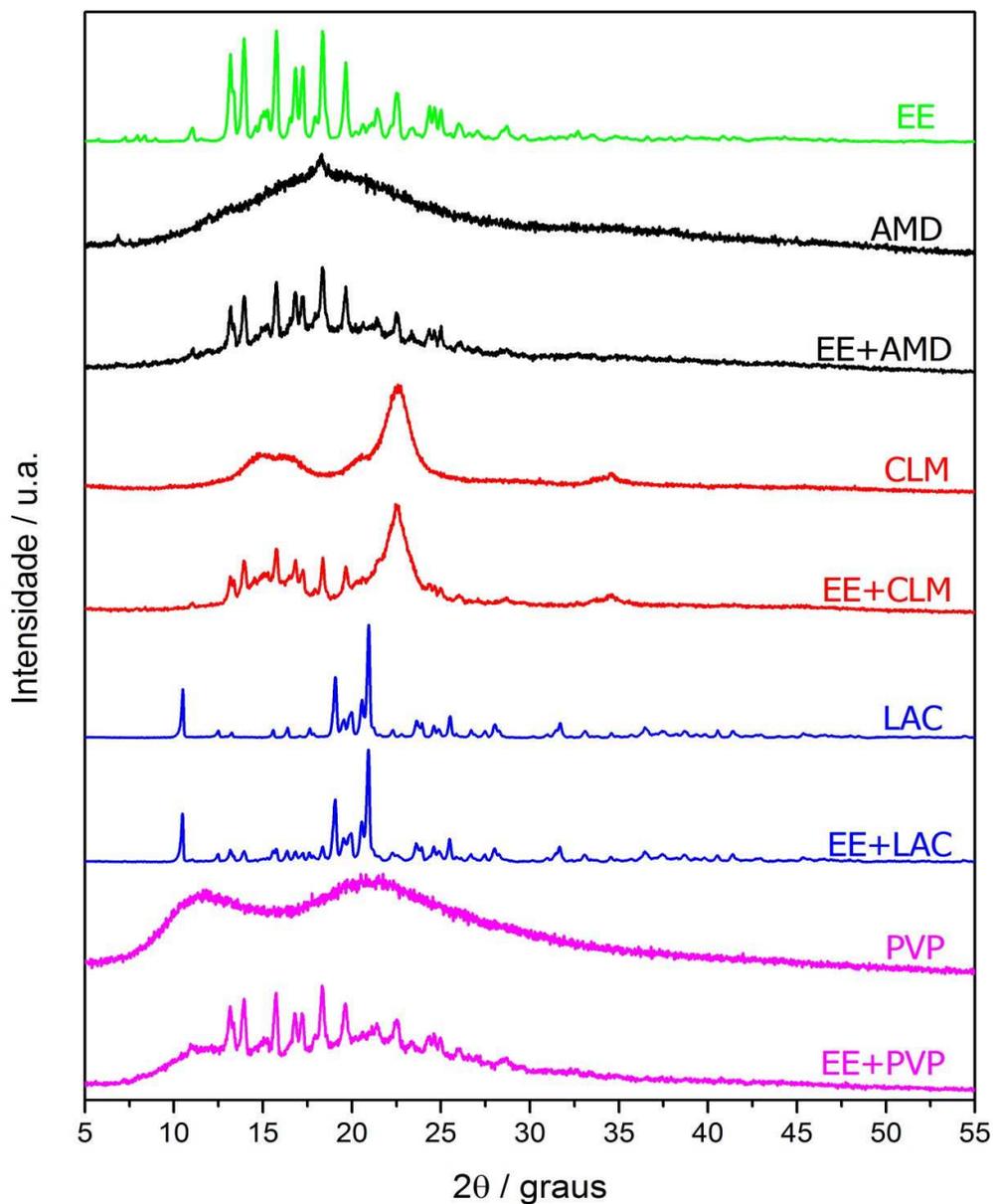
<b>Amostra</b>	<b>T<sub>onset</sub> (°C)</b>	<b>ΔH<sub>fusão</sub> (J.g<sup>-1</sup>)</b>
Etinilestradiol	181,9	88,6
EE + Amido	180,7	16,2
EE + Celulose microcristalina	180,9	15,1
EE + Lactose anidra	180,7	12,5
EE + PVP	168,1	8,65

Verifica-se nos dados apresentados na Tabela 17 que apenas a mistura física do fármaco com o PVP apresentou redução considerável na entalpia de fusão além de alteração na temperatura inicial de fusão maior que 10°C. Para as demais misturas a entalpia encontra-se próximo ao valor esperado de 17,7 J.g<sup>-1</sup>, correspondente a um quinto do valor encontrado para o fármaco isolado, uma vez a proporção do fármaco na mistura é de 1:4 (m/m).

O PVP é um polímero amorfo com temperatura de transição vítrea entre 110°C e 180°C (BLEY; FUSSNEGGER; BODMEIER, 2010). A redução no valor de entalpia do evento de fusão do fármaco na mistura contendo PVP poderá ser atribuída à sua solubilização parcial no excipiente quando este atinge a temperatura de transição vítrea e passa ao estado elástico.

O evento endotérmico que ainda permaneceu visível ( $\Delta H_{\text{fusão}} = 8,65 \text{ J.g}^{-1}$ ) corresponde a alguma quantidade do fármaco que não foi solubilizada pelo excipiente quando este passou para o estado elástico, permanecendo no estado cristalino.

O padrão de PXRD do EE que indica a cristalinidade do fármaco não se alterou em nenhuma das misturas físicas fármaco-excipiente (FIGURA 54).



**Figura 54** - Difrátogramas das substâncias puras e misturas físicas fármaco-excipiente. (AMD = Amido pré-gelatinizado, CLM = Celulose microcristalina, LAC = Lactose anidra, PVP = Polivinilpirrolidona).

### 6.6.2.3 Avaliação dos materiais EE-Excipiente-Solvente

Na caracterização térmica dos materiais obtidos foram monitoradas as modificações relacionadas à fusão do EE e ao aparecimento de algum evento

térmico não previsto para a substância, de forma a avaliar a eficiência dos excipientes e solventes sobre a transição polimórfica do EE e desenvolvimento das dispersões sólidas amorfas para este fármaco.

Para a maioria dos materiais analisados, as curvas DSC exibiram semelhança em relação ao evento de fusão característicos do fármaco, evidenciando que o processo não foi eficiente para a obtenção da dispersão sólida amorfa.

No entanto, os valores de entalpia mostraram-se bastante reduzidos conforme relacionado na Tabela 18, o que pode ser decorrente da amorfização parcial do fármaco nesses materiais.

**Tabela 18** - Dados térmicos obtidos por DSC para o evento de fusão do EE nos materiais preparados no estudo

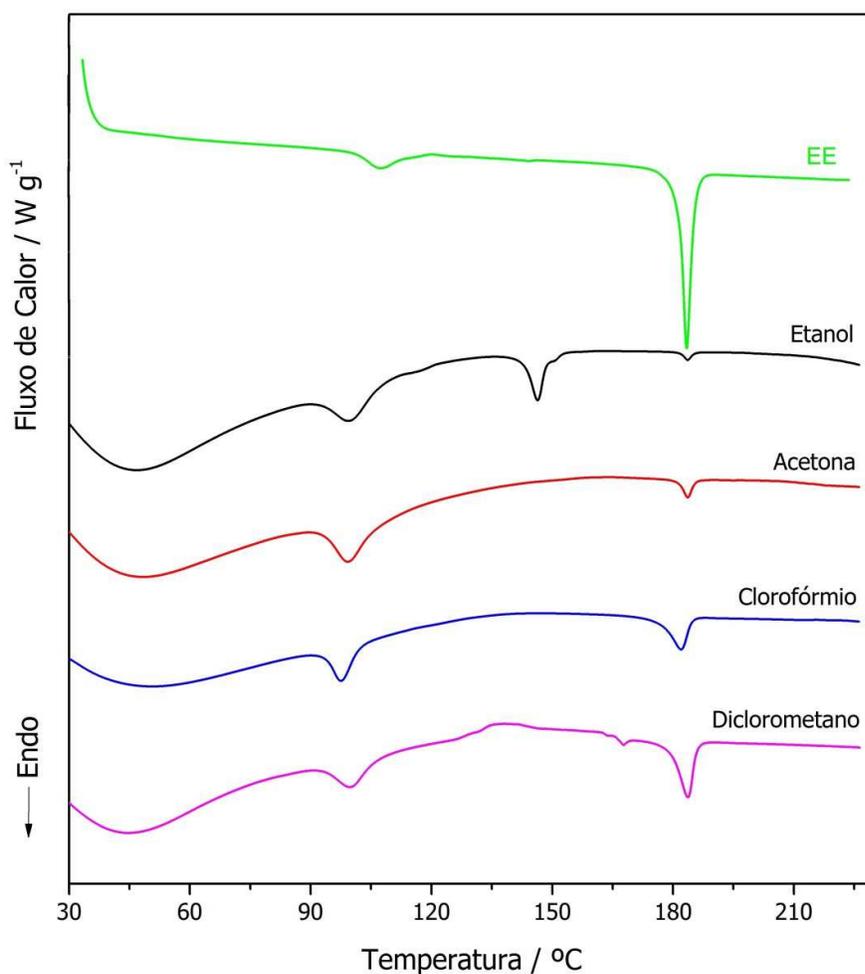
AMOSTRA		T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>pico</sub> (°C)	Entalpia (J.g <sup>-1</sup> )
EE+AMD	Etanol	181,9	183,6	0,71
	Acetona	181,5	183,5	1,76
	Clorofórmio	176,9	182,1	7,88
	Diclorometano	179,9	183,7	10,0
EE+CLM	Etanol	n.d.	n.d.	n.d.
	Acetona	n.d.	n.d.	n.d.
	Clorofórmio	179,9	183,2	10,5
	Diclorometano	180,7	183,8	3,93
EE+LAC	Etanol	n.d.	n.d.	n.d.
	Acetona	181,4	183,9	8,16
	Clorofórmio	179,3	182,4	4,18
	Diclorometano	179,1	182,8	15,6
EE+PVP	Etanol	n.d.	n.d.	n.d.
	Acetona	n.d.	n.d.	n.d.
	Clorofórmio	n.d.	n.d.	n.d.
	Diclorometano	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. não detectado.

Todas as amostras preparadas foram também caracterizadas por PXR. Os resultados obtidos confirmaram a possibilidade de utilização da combinação estratégica de excipientes e solventes para a obtenção de dispersões sólidas amorfas de EE.

### Combinação EE + Amido

O material resultante da mistura de EE/Amido/Etanol apresentou evento de fusão em torno de 147°C, característico de uma segunda forma polimórfica do EE. Na análise por raios X, esse material apresentou picos de difração diferentes dos picos apresentados pelo EE, confirmando a transição polimórfica do fármaco (Figuras 55 e 56).

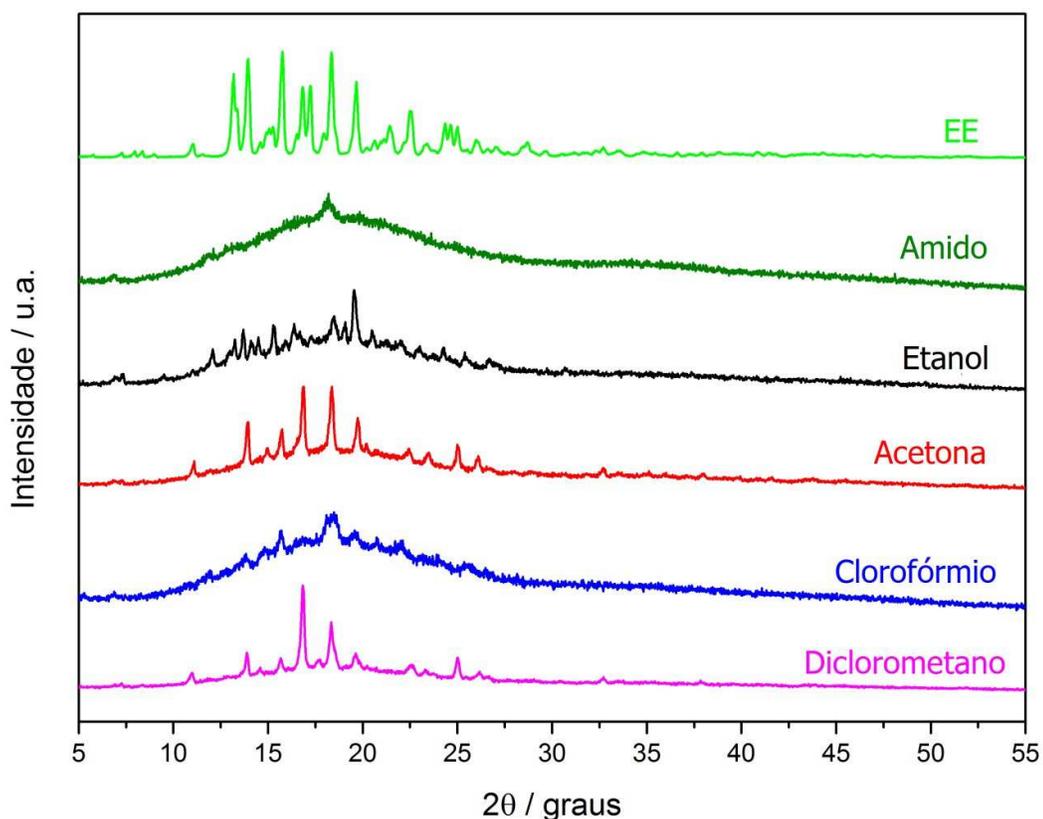


**Figura 55** - Curvas DSC do EE e ds materiais contendo amido.

Os picos de difração intensos do EE, por exemplo, 15,76; 18,34, 19,66 °2 $\theta$ , estavam presentes quando na análise por difratometria de raios X nos materiais envolvendo a combinação de EE/Amido/acetona, EE/Amido/clorofórmio,

EE/Amido/diclorometano. Estes materiais contendo amido também não apresentaram mudanças em relação ao ponto de fusão do EE.

Desta forma, a utilização da combinação EE/amido/solvente não foi eficaz para o desenvolvimento de uma dispersão sólida amorfa de EE.



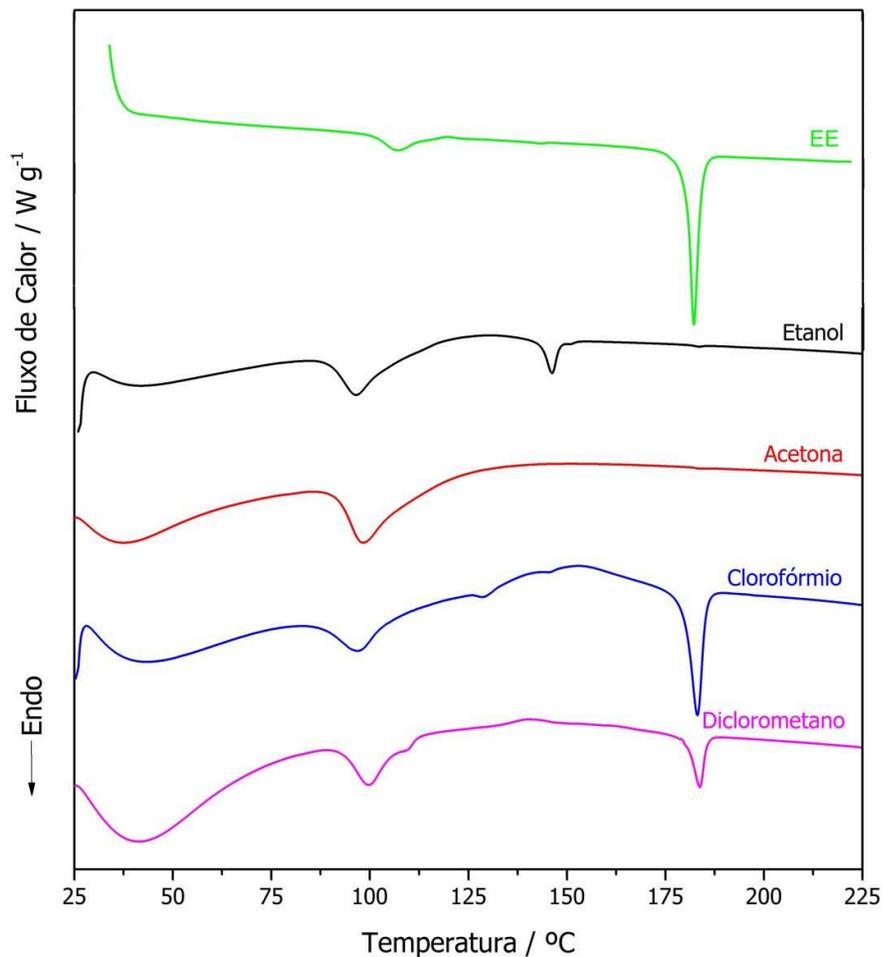
**Figura 56** - Difratomogramas do EE, amido e dos materiais contendo amido.

#### *Combinação EE + Celulose Microcristalina*

As curvas DSC e PXRD dos materiais contendo celulose microcristalina estão apresentadas na Figura 57 e 58.

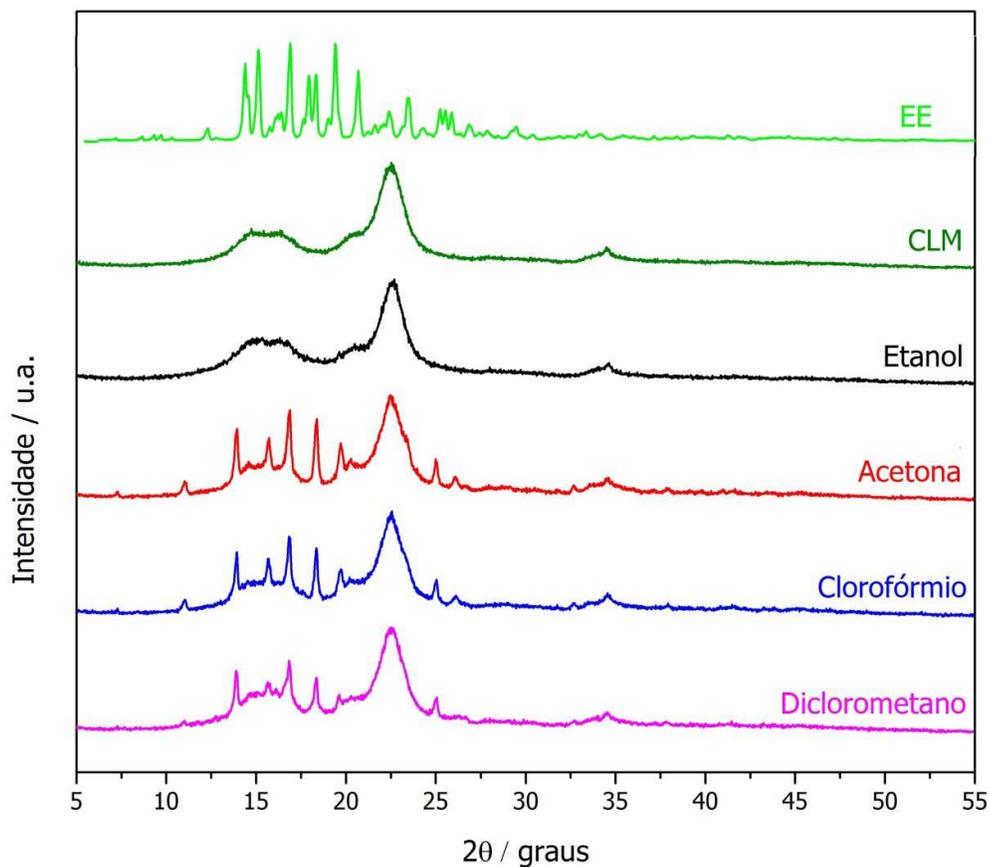
Os materiais resultantes da mistura EE/celulose microcristalina/clorofórmio e EE/Celulose microcristalina/diclorometano não apresentaram mudanças em relação ao ponto de fusão do EE e os padrões de PXRD dos respectivos materiais foram semelhantes ao padrão exibido pelo EE e misturas físicas destes componentes.

Para o material resultante da mistura EE/Celulose microcristalina/Acetona houve total desaparecimento do evento de fusão do fármaco, porém na análise por PXRD, o mesmo material apresentou picos difratométricos característicos do EE.



**Figura 57** - Curvas DSC dos materiais contendo celulose microcristalina.

No entanto, no padrão de PXRD do material EE/Celulose microcristalina/etanol nenhum pico de difração detectável foi observado, evidenciando a amorfização do fármaco. Dessa forma, a utilização deste excipiente combinado ao etanol foi eficiente para o desenvolvimento da dispersão sólida amorfa de EE.

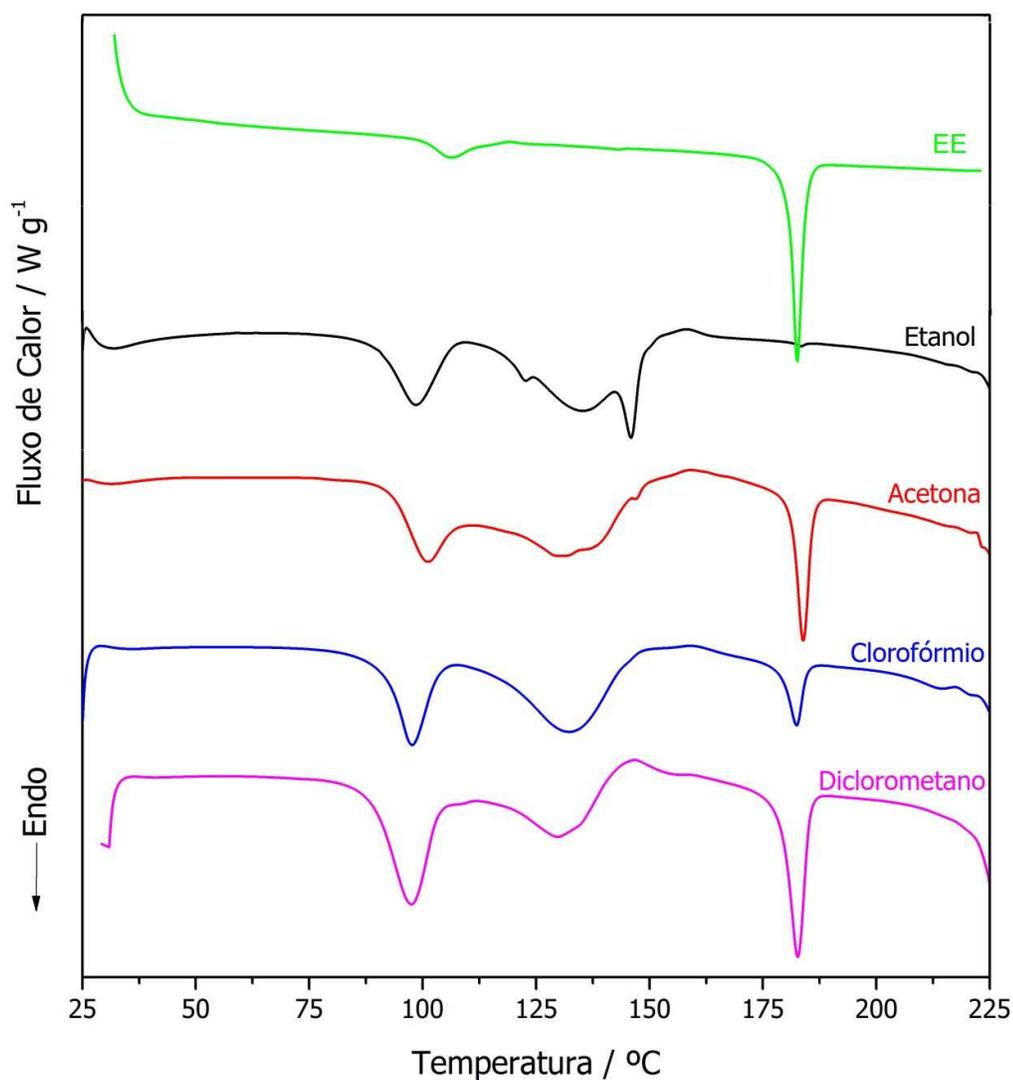


**Figura 58** - Difratomogramas do EE, celulose microcristalina e dos materiais contendo celulose microcristalina.

#### *Combinação EE + Lactose Anidra*

Os resultados obtidos pelas análises de DSC e PXRD para os materiais contendo lactose anidra estão apresentadas na Figura 59 e 60.

O material resultante da mistura EE/Lactose/etanol apresentou evento de fusão em torno de 147°C, característico de uma segunda forma polimórfica do EE. Na análise por raios X, esse material apresentou picos de difração diferentes dos picos apresentados pelo EE, confirmando a transição polimórfica do fármaco.

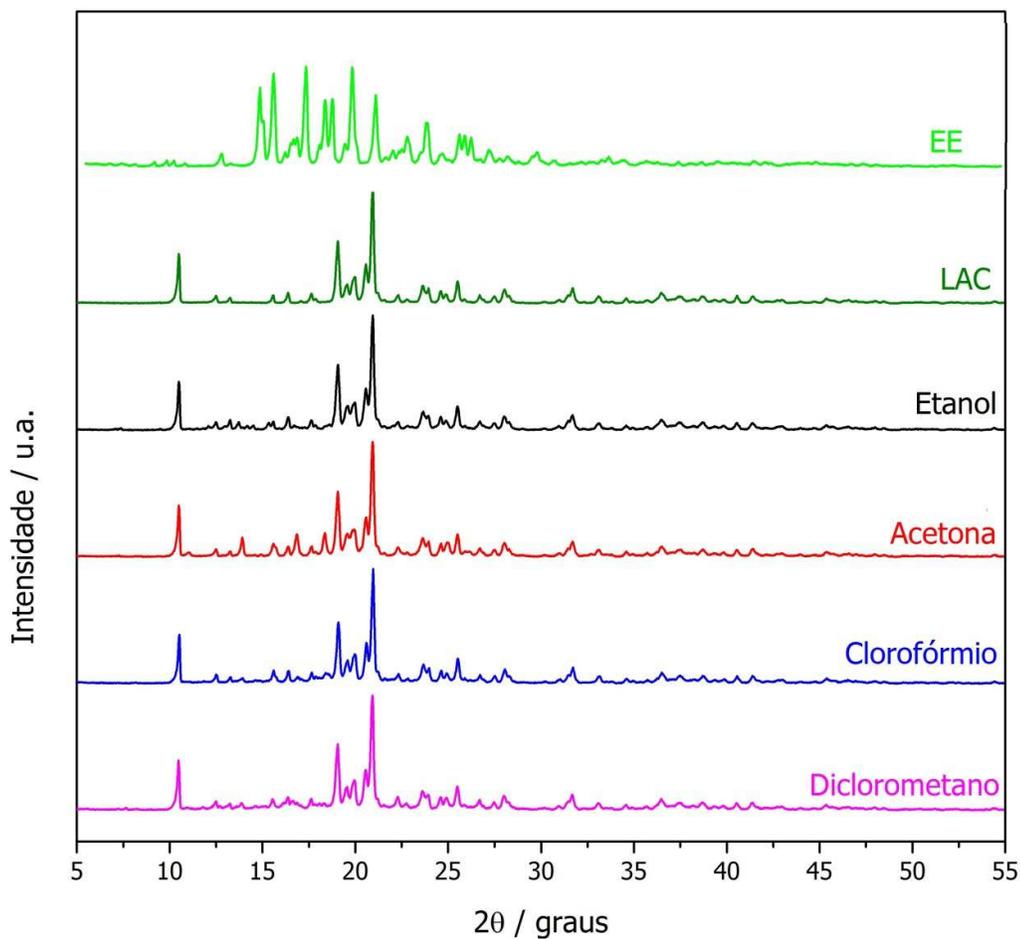


**Figura 59** - Curvas DSC do EE e dos materiais contendo lactose anidra.

O material resultante da mistura EE/Lactose/acetona não apresentou mudança em relação ao evento térmico de fusão do EE e o padrão de PXRD foi semelhante ao padrão exibido pelo EE e misturas físicas destes componentes, apresentando os picos de difração intensos do EE, dentre eles, 13,94; 16,86; 18,34  $^{\circ}2\theta$ .

Por outro lado, os materiais combinando EE/Lactose/clorofórmio e EE/Lactose/diclorometano não apresentaram mudanças em relação ao ponto de fusão do API e os padrões de PXRD apresentaram picos de difração diferentes dos picos apresentados pelo EE.

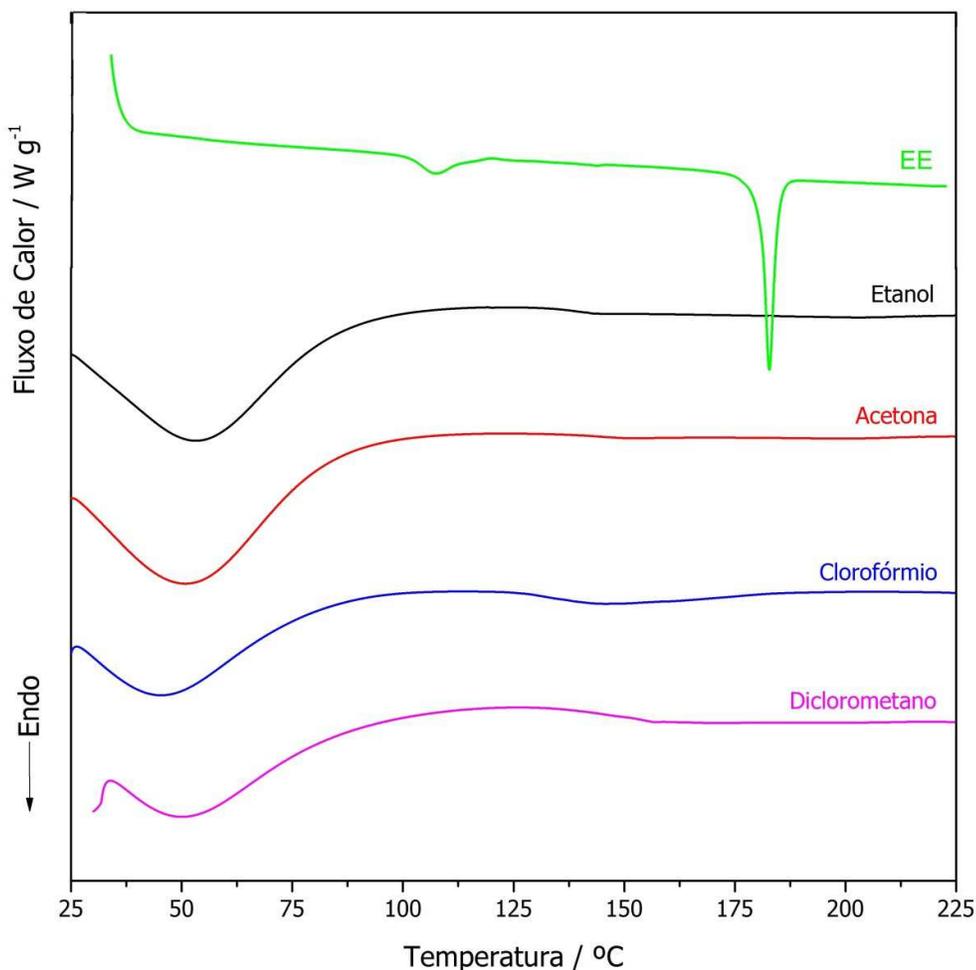
Dessa forma, pode-se afirmar que a utilização da combinação EE/Lactose/solvente não foi eficaz para o desenvolvimento de uma dispersão sólida amorfa de EE.



**Figura 60** - Difratogramas do EE, lactose anidra e dos materiais contendo lactose anidra.

#### *Combinação EE + PVP*

Para os materiais resultantes da mistura EE/PVP 1:4 (m/m) foi observado o desaparecimento do evento de fusão do fármaco, independente do solvente utilizado (FIGURA 61).

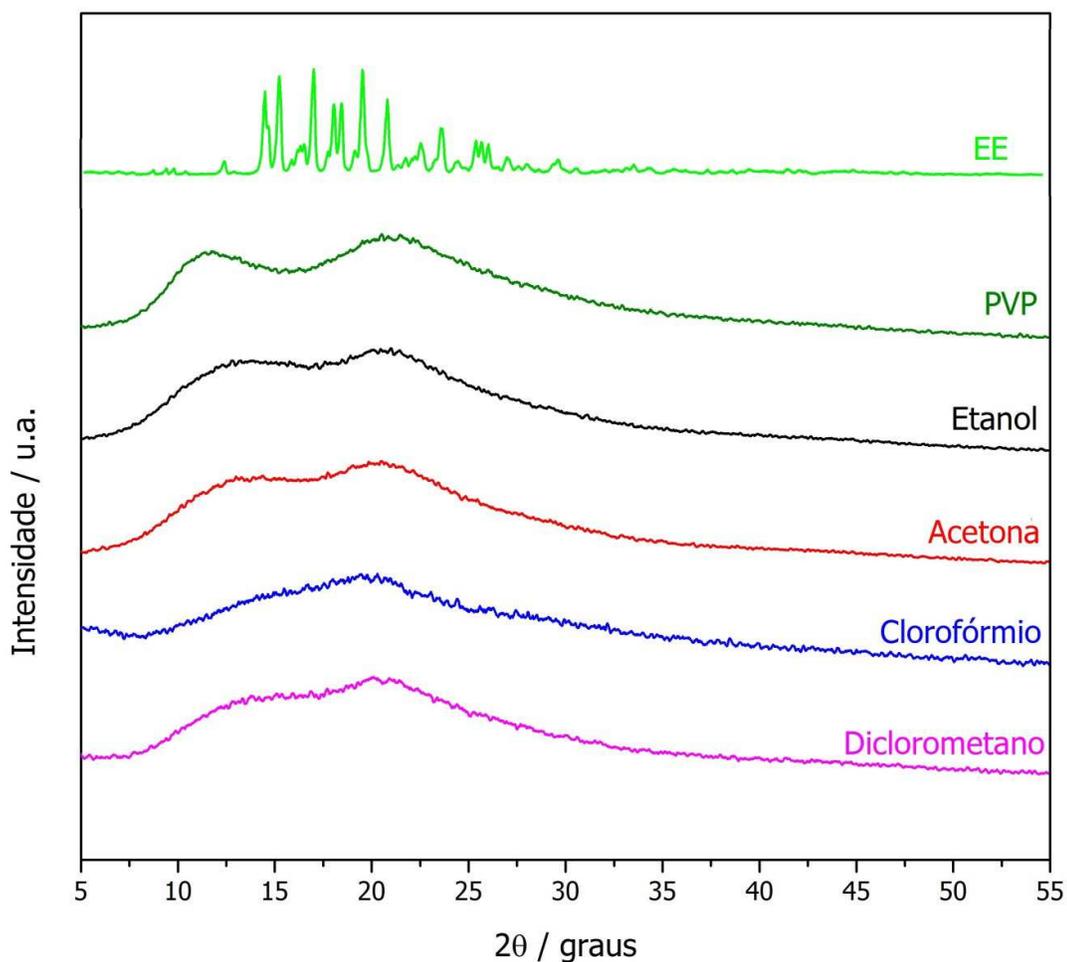


**Figura 61** - Curvas DSC d EE e dos materiais contendo PVP.

Além disso, nenhum pico de difração detectável foi observado para esses materiais confirmando que a mistura foi eficiente para a amorfização do fármaco e o desenvolvimento da dispersão sólida amorfa de EE (FIGURA 62).

O caráter amorfo é comum à maioria dos excipientes poliméricos utilizados na indústria farmacêutica, dentre eles o amido pré-gelatinizado, a celulose microcristalina e o PVP, selecionados para este estudo.

A presença de pequenas quantidades de material amorfo pode favorecer a interação entre os componentes de uma formulação e, portanto, influenciar na estabilidade física e química do produto final (KARABAS; ORKOULA; KONTOYANNIS, 2007). A interação intermolecular entre o EE e PVP possivelmente retarda ou inibe a recristalização do fármaco, favorecendo a amorfização deste.



**Figura 62** - Difractogramas do EE, PVP e dos materiais contendo PVP.

Diversos estudos têm mostrado que polímeros como o PVP, utilizados no preparo de dispersões sólidas, pode inibir a cristalização de fármacos, resultando na forma amorfa do fármaco (YU et al, 2011; ZHANG et al, 2011; ZHANG et al, 2008). O mecanismo de inibição da cristalização do fármaco pelo PVP é devido a interações específicas, especialmente ligações de hidrogênio entre o fármaco e o excipiente. A extensão da inibição depende da proporção fármaco-excipiente na mistura, com proporções mais elevadas resultando em maior inibição da cristalização (YU et al, 2011).

### 6.6.3 Caracterização e estudo de estabilidade de dispersões sólidas de Etinilestradiol e PVP

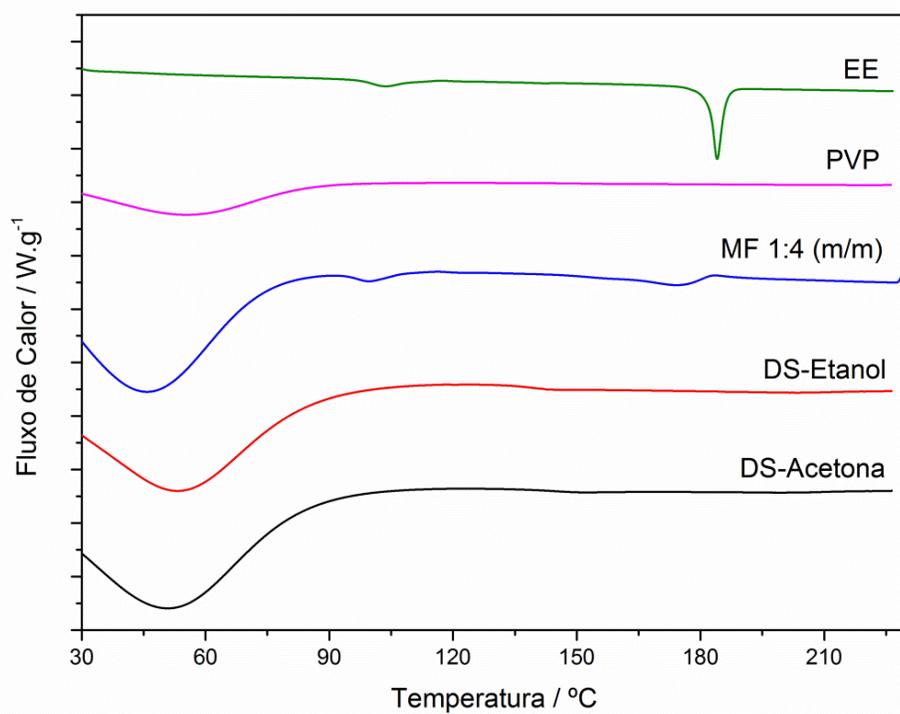
As dispersões sólidas de etinilestradiol e PVP preparadas com o uso dos solventes etanol e acetona foram obtidas pelo método do solvente e caracterizadas conforme descrito no item 6.5.2.3. O PVP é um pó fino higroscópico branco a esbranquiçado, inodoro ou quase sem odor. Pode ser usado para melhorar as características de solubilidade aquosa ou de dissolução de fármacos pouco solúveis, através da formação de dispersões sólidas com os mesmos. O PVP não possui ponto de fusão nem ponto de ebulição, apresenta uma temperatura de transição vítrea entre 110 e 180°C e é solúvel em ácidos, clorofórmio, etanol, cetonas, metanol e água.

O perfil térmico das amostras EE, PVP, mistura física 1:4 (m/m) e dispersões sólidas EE/PVP/Etanol e EE/PVP/Acetona estão apresentados nas Figuras 63 e 64. A curva DSC do fármaco foi discutida anteriormente no item 6.6.1. A análise calorimétrica do PVP permite constatar que este não possuiu uma estrutura cristalina, dado não apresentar nenhum pico endotérmico de fusão. O pico bastante largo que se observa entre 30 e 100°C em todas as curvas DSC das amostras contendo PVP, corresponde à remoção da umidade do excipiente.

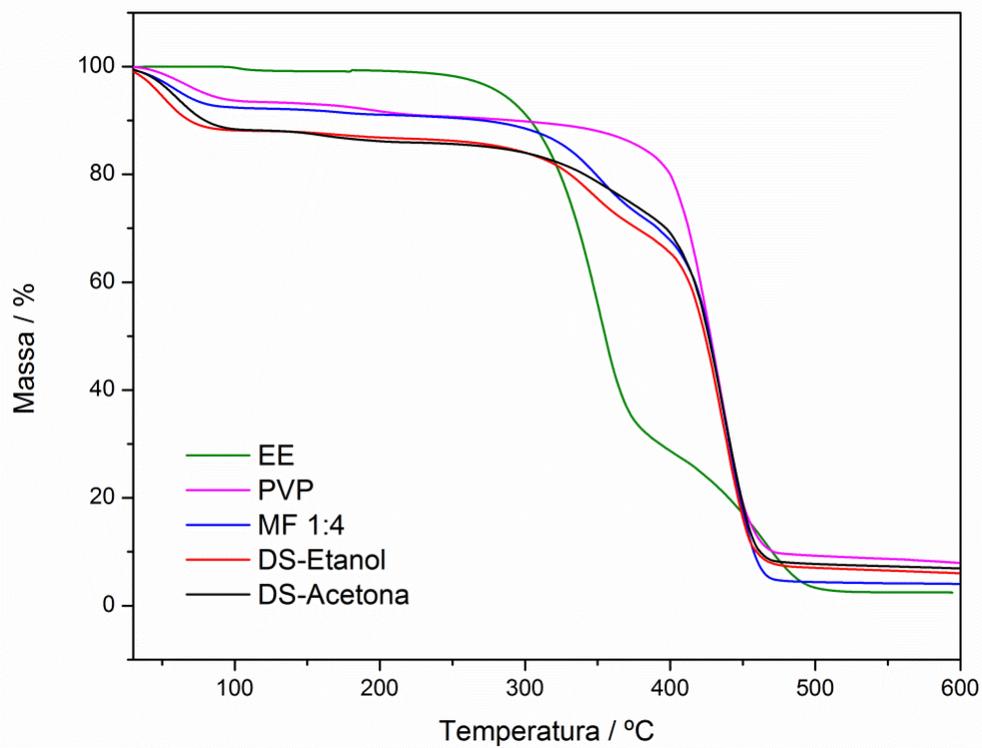
Na análise da curva DSC da mistura física verifica-se uma diminuição significativa na entalpia de fusão do EE para 8,65 J.g<sup>-1</sup>, bem menor do que os 17,7 J.g<sup>-1</sup> esperados (massa de fármaco na mistura é um quinto da massa total), o que pode ser explicado pela solubilização do fármaco no excipiente quando este passa para o estado elástico após a temperatura de transição vítrea.

As curvas DSC das dispersões sólidas também não apresentaram nenhum evento endotérmico, caracterizando a amorfização do fármaco e formação de uma estrutura amorfa entre o EE e o PVP.

Conforme descrito anteriormente, a curva TG do EE apresentou três estágios de perda de massa, referentes à desidratação em 103°C e a decomposição a partir de 206°C e que ocorre em duas etapas distintas. A curva TG do excipiente PVP apresentou duas etapas de perda de massa, correspondentes a desidratação e decomposição da amostra. As curvas TG das dispersões sólidas e da mistura física correspondem a simples sobreposição das curvas do EE e do PVP.

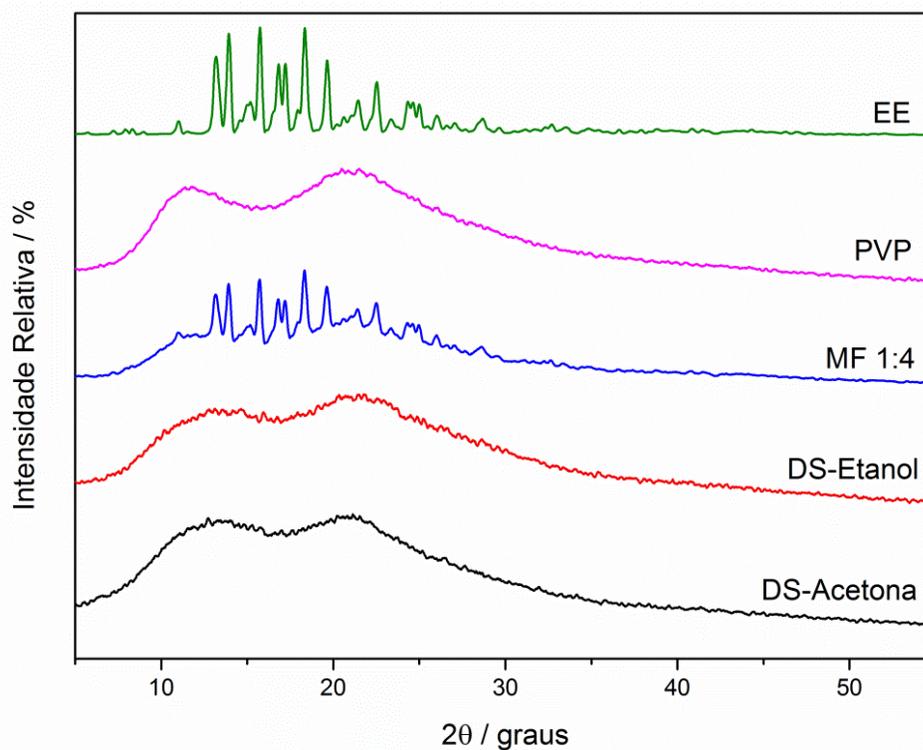


**Figura 63** - Curvas DSC do fármaco, excipiente, mistura física e dispersões sólidas.



**Figura 64** - Curvas TG do fármaco, excipiente, mistura física e dispersões sólidas.

Na análise por raios X, o EE apresentou picos difratométricos intensos em 11; 13,18; 13,94; 15,76; 16,86; 17,24; 18,34; 19,66; 21,42 e 22,5 °2θ. O excipiente PVP por apresentar caráter amorfo, não exibiu picos difratométricos detectáveis no padrão de raios X. Os mesmos picos característicos do EE foram observados na análise da mistura física. Porém, nas dispersões sólidas os picos difratométricos referentes à cristalinidade do fármaco não foram observados, confirmando a eficiência do processo na amorfização do EE e no desenvolvimento das dispersões sólidas amorfas. Os difratogramas do EE, PVP, mistura física e dispersões sólidas podem ser observados na Figura 65

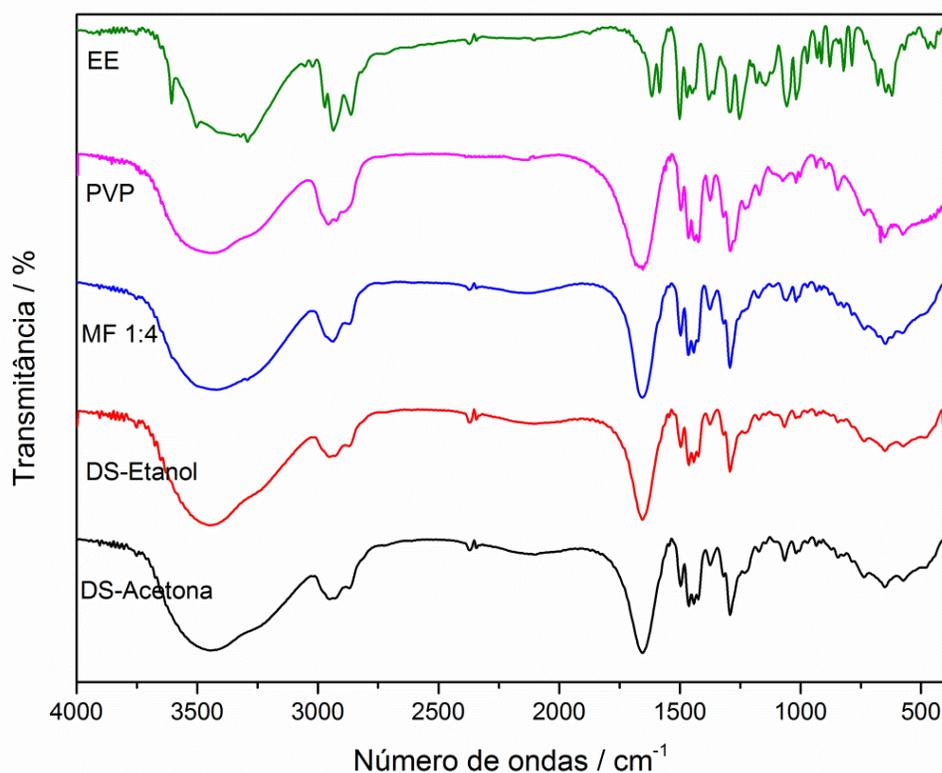


**Figura 65** - Difratogramas do EE, PVP, mistura física e dispersões sólidas.

Os espectros de infravermelho obtidos no estudo estão apresentados na Figura 66. As bandas de absorção características do PVP podem ser observadas em 3.431,42 e 1.653,98  $\text{cm}^{-1}$  e correspondem a vibração de hidroxila (-OH) e grupamento carbonila (C=O) do anel pirrolil.

No espectro da mistura física fármaco-excipiente, as bandas características de ambos EE e PVP estão evidentes e o espectro pode ser considerado como uma sobreposição dos espectros de cada componente.

Nos resultados de infravermelho das dispersões sólidas obtidas, podem-se observar diversas bandas características atribuídas ao fármaco. No entanto, os espectros mostraram-se inconclusivos quanto à diferenciação de bandas de absorção correspondente a ligações de hidrogênio intermolecular e outras interações fármaco e excipiente proveniente da formação da dispersão sólida.



**Figura 66** - Espectros de FT-IR do EE, PVP, Mistura física e dispersões sólidas.

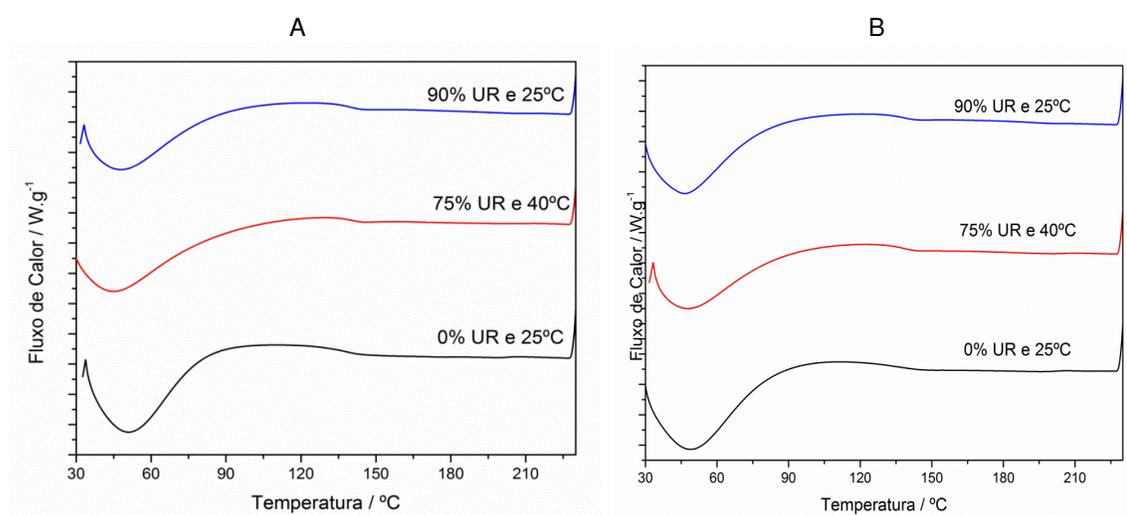
Após a obtenção das dispersões sólidas e caracterização das mesmas, as amostras foram submetidas a três diferentes condições de estresse conforme descrito anteriormente no item 6.5.2.3.

As dispersões sólidas EE/PVP/Etanol e EE/PVP/Acetona não apresentaram qualquer evidência de instabilidade após 15, 30 e 90 dias de armazenamento sob condições determinadas. Avaliando-se as curvas DSC das amostras armazenadas

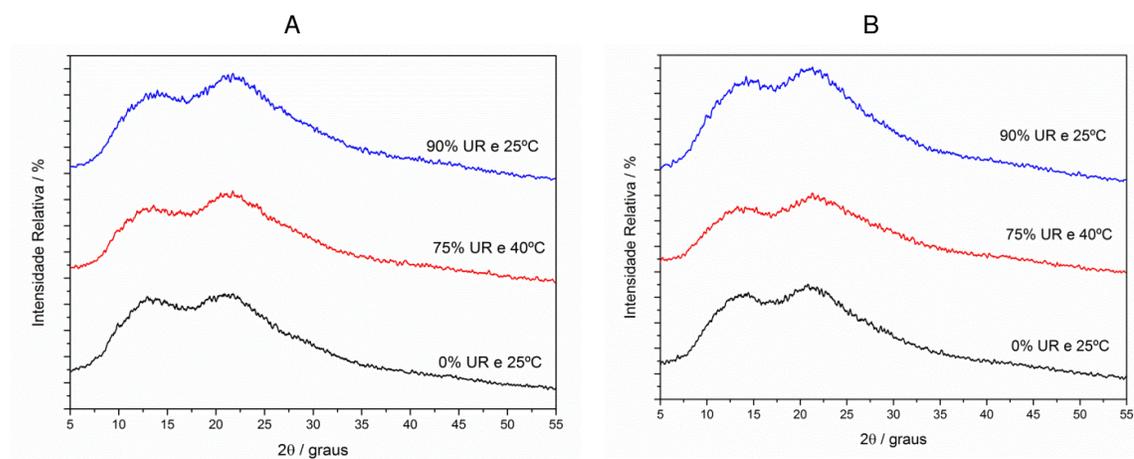
durante 90 dias sob as condições forçadas, verifica-se que não houve qualquer mudança no perfil térmico das mesmas (FIGURA 67).

Na análise dos difratogramas das mesmas amostras verifica-se que o caráter amorfo dos materiais obtidos manteve-se estável mesmo após o armazenamento sob as condições determinadas de temperatura e umidade (FIGURA 68).

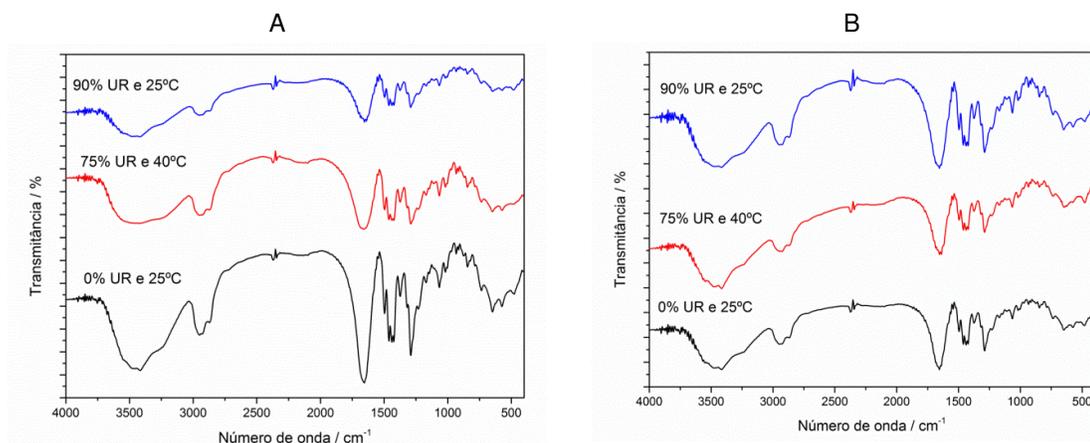
Nos resultados de infravermelho, não se verificou qualquer alteração no espectro em relação aos resultados obtidos no início do estudo, confirmando a estabilidade das dispersões sólidas obtidas (FIGURA 69).



**Figura 67** - Curvas DSC para as DS preparadas com o solvente Etanol (A) e Acetona (B) após armazenamento sob condições forçadas durante 90 dias.



**Figura 68** - Difratogramas para as DS preparadas com o solvente Etanol (A) e Acetona (B) após armazenamento sob condições forçadas durante 90 dias.



**Figura 69** - Espectros de infravermelho obtidos para as DS preparadas com o solvente Etanol (A) e Acetona (B) após armazenamento sob condições forçadas durante 90 dias.

## 6.7 Conclusões

O presente estudo dedicou-se ao desenvolvimento de uma dispersão sólida contendo o princípio ativo EE a fim de prevenir problemas referentes a dissolução do fármaco no organismo, como ocorreu em 2009 com o medicamento Nociclin (etinilestradiol e levonorgestrel). Nesta ocasião, mais de 160 milhões de cartelas de um medicamento anticoncepcional contendo levonorgestrel e etinilestradiol foram recolhidas por determinação da ANVISA, devido a falhas em ensaios de dissolução (ANVISA, 2009), portanto, formulações que possam garantir a estabilidade polimórfica do fármaco são importantes para a garantia da qualidade farmacêutica.

Em uma tentativa de melhorar as propriedades de estado sólido do fármaco EE, uma dispersão sólida com o excipiente PVP foi desenvolvida e suas propriedades físicas e estabilidade foram avaliadas.

As técnicas de análise térmica e técnicas complementares foram empregadas com sucesso na caracterização das dispersões sólidas e no acompanhamento dos estudos de estabilidade.

Com base nos resultados, pode-se concluir que as características dos excipientes e dos solventes avaliados podem afetar a estabilidade polimórfica do fármaco na formulação, portanto, a seleção correta destes é importante para garantir formulações polimorficamente estáveis. A tecnologia empregada neste estudo na

obtenção da dispersão sólida foi eficiente para a obtenção de dispersão sólida amorfa de EE. As dispersões sólidas mantiveram-se estáveis durante o período de armazenamento sob as condições de estresse. Tais condições não foram eficientes na recristalização do EE. A análise térmica combinada à técnica de difração de raios X mostrou-se como uma ferramenta poderosa para os estudos de pré-formulação, auxiliando na caracterização das possíveis transições polimórficas e no desenvolvimento das dispersões sólidas estáveis.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, M. Z. et al. Drug-excipient(s) interactions and compatibility study: A Review. **Journal of Pharmacy Research**, v.3(9), p.2092-2095, 2010.

AIGNER, Z. et al. Compatibility studies of aceclofenac with retard tablet excipients by means of thermal and FT-IR spectroscopic methods. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.104, p.265-271, 2010.

AL-NAHARY, T. T. et al. Thermal stability of anti-rheumatic pharmaceutical drugs parecoxib sodium and valdecoxib. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.16, p.177-182, 2012.

ALENCAR, J. S. et al. Caracterização e Propriedades Térmicas do Ritonavir para Qualificação de Fornecedores. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25(2), p.170-176, 2006.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12(3), p.413-420, 1995.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; p.775, 2007.

ANTHES, J. C. et al. Biochemical characterization of desloratadine, a potent antagonist of the human histamine H1 receptor. **European Journal Pharmacology**, v.449, p.229-237, 2002.

ANVISA. **Relação de Medicamentos em Processo de Recolhimento por Determinação da ANVISA**, 2009. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/inspecao/fiscalizacao/recolhimento/lista\\_recolhimento\\_2009.pdf](http://www.anvisa.gov.br/inspecao/fiscalizacao/recolhimento/lista_recolhimento_2009.pdf) Acesso 09 de fevereiro de 2012.

ALAM RAZIB, et al. Validation and application of a modified RP-HPLC method for the quantification of desloratadine in pharmaceutical dosage Forms, *Journal and Pharmaceutical Science*. v.5, p.1-4, 2006.

ARMSTRONG, E. J.; BARBIERI, R. L. Farmacologia da Reprodução. In David E. Golan, et.al. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**.

2. ed. 952p., 2009.

AULTON, Michael E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BACHMANN, G. et al. Efficacy and safety of a low-dose 24-day combined oral contraceptive containing 20 µg ethinylestradiol and 3 mg drospirenone. **Contraception**, v.70, p.191-198, 2004.

BAIRD, J.A.; TAYLOR, L.S. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.396-421, 2012.

BARONSKY, J. et al. The study of different solid forms of Emodepside. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, p.88-99, 2009.

BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**, v.25(5), p.849-855, 2002.

BERNARDI, L.S. et al. Characterization of venlafaxine hydrochloride and compatibility studies with pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.97, p.729-733, 2009.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADE, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis Research**, v.101, p.157-170, 2009.

BIKIARIS, D. et al. Physicochemical studies on solid dispersions of poorly water-soluble drugs: Evaluation of capabilities and limitations of thermal analysis techniques. **Thermochimica Acta**, v.439, p.58-67, 2005.

BLEY, H.; FUSSNEGGER, B.; BODMEIER, R. Characterization and stability of solid dispersions based on PEG/polymer blends. **International Journal of Pharmaceutics**, v.390, p.165-173, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 5991 de 1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 19 dez. 1973.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE n° 1 de 2005. Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da União**, 01 ago. 2005.

BRITTAIN, Harry G. (Ed.) **Spectroscopy of Pharmaceutical Solids: Drugs and the Pharmaceutical Sciences**. Center for Pharmaceutical Physics Milford, New Jersey, USA. Taylor and Francis Group, v.160, 2006.

BRITTAIN, Harry G. Polymorphism and Solvatomorphism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101(2), 2012.

BROWN, M. E. Introduction of thermal analysis: **Techniques and applications**. Second edition, Kluwer Academic Publishers, 2004.

CHIU, M. H.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.3(1), p.39–59, 2011.

CIOLA, R., **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. Ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1998

CLAS, S.D.; DALTON, C.R.; HANCOCK, B.C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.2(8), p.311-320, 1999.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da Unicamp, Campinas-SP, 2006.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.1671-1692, 2010.

COTTON, M.L.; WU, D.W.; VADAS, E.B. Drug-exipient interaction study of enalapril maleate using thermal analysis and scanning electron microscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.40, p.129-142, 1987.

CRAIG, D. Q. M.; READING, M. **Thermal Analysis of Pharmaceuticals**. 1.ed. 416 p.; 2006.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; MARTINEZ-PACHECO, R.; LANDIN, M. Compatibility of the antitumoral-lapachone with different solid dosage forms excipients. **Journal of Pharmaceutics and Biomedical Analysis**, v.45, p.590-598, 2007.

DAHLBERG, C. Polymer–drug interactions and wetting of solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, p.125–133, 2010.

DAS, R. S.; AGRAWAL, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. **Vibrational Spectroscopy**, v.57, p.163-176, 2011.

DE BEERA, T. et al. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.417, p.32-47, 2011.

DE CASTRO, W. V. et al. Dissolution Profile of Diclofenac Sodium Tablets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.32, p.1103-1109, 2006.

DE VEIJ, M. et al. Fastdetection and identification of counterfeit antimalarial tablets by Raman spectroscopy. **Journal Raman Spectroscopy**, v.38, p.181-187, 2007.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura**: Aplicações e Preparações de amostras. Porto Alegre, 2007. Disponível em <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>. Acesso em 09 de junho de 2012.

DESAI, S.R.; DHARWADKAR, S.R. Study of polymorphic transformation of ornidazole drug by differential scanning calorimetry and other complementary techniques. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, v.65(4) p.409-413, 2008.

DESIRAJU, Gautam R. Polymorphism: The Same and Not Quite the Same. **Crystal Growth & Design**, v.8(1), 2008.

DEVANE MAHESH, A.; SHAIKH SAJID, R. Formulation and evaluation of desloratadine orodispersible tablets by using  $\beta$ -cyclodextrin and superdisintegrants. **Journal of Pharmacy Research**, v.4(10), p.3327-3330, 2011.

DONG, M. W; AHUJA, S. **Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC**. Ed. Elsevier Inc., 2005.

EL-ENANY, N.; EL-SHERBINY, D.; BELAL, F. Spectrophotometric, spectrofluorometric and HPLC determination of desloratadine in dosage forms and human plasma. **Chemical and Pharmaceutical**. v.55, p.1662–1670, 2007.

EL-SHERBINY, D.T. et al. Simultaneous determination of loratadine and desloratadine in pharmaceutical preparations using liquid chromatography with a microemulsion as eluent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, p.1236–1242, 2007.

FARIA, D. L. A. **Entenda o que é espectroscopia Raman**. Química Viva. Disponível em [http://www.crq4.org.br/default.php?p=texto.php&c=quimica\\_viva](http://www.crq4.org.br/default.php?p=texto.php&c=quimica_viva). Acesso em 14 de fevereiro de 2012.

FATHIMA, F. et al. Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.01(06), p.66-71, 2011.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. Editora Pharmabooks. 4. ed. v.1, 2011.

FORD, J. L.; WILLSON, R. **Thermal analysis and calorimetry of Pharmaceuticals**. Cap.17. In: R.B. Kemp, editor..Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. Vol. 4, 1999.

GHASTE, R. P. et al. Solid Dispersions: An Overview. Disponível em <http://www.pharmainfo.net/reviews/solid-dispersions-overview>. Acesso em 12 de fevereiro de 2012.

GIBSON, M. (Ed).**Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form**.2004.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 1.**Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.1, 1998.

GIRON, D. Investigations of polymorphism and pseudo-polymorphism in pharmaceuticals by combined thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.64, p.37-60, 2001.

GOMES, J. A.; SERCHELI, M. S. **Espectroscopia Raman**: um novo método analítico para investigação forense em cruzamento de traços. Disponível em [http://www.leyas.es/files/files/RAMAN\\_portugues.pdf](http://www.leyas.es/files/files/RAMAN_portugues.pdf). Acesso em 14 de fevereiro de 2012.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Editora Artmed, 2010.

GUGUTA, C. et al. Structural diversity of ethinyl estradiol solvates. **Crystal Growth & Design**, v.8(3), p.823-831, 2008.

HAINES, P. J. **Principles of thermal analysis and calorimetry**. Royal Society of Chemistry, 2002.

HILKIFER, R. **Polymorphism**: In the Pharmaceutical Industry. Ed. John Wiley & Sons, 433p.; 2006.

HOYTE, F. C. L.; KATIAL, R. K. Antihistamine Therapy in Allergic Rhinitis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.31, p.509–543, 2011.

HUYNH-BA, K. **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development**: Regulations, Methodologies, and Best Practices. Pharmalytik Newark, Delaware, 2009.

IONASHIRO, M. **Giolito**: Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial. São Paulo: Giz, 2005.

International Conference on Harmonisation (ICH), **Stability testing of new drug substances and products (Q1A)**. Proceedings of the International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2003a.

International Conference on Harmonisation (ICH). **Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products (Q1B)**. Proceedings of the International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2003b.

International Conference on Harmonisation (ICH). **Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances (Q6A)**. Proceedings of the International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2003c.

International Conference on Harmonization (ICH). **Impurities: Guideline for Residual Solvents (Q3C)**. Proceedings of the International Conference on Harmonization. IFPMA, Geneva, 2009.

International Conference on Harmonisation (ICH) Official web site. Disponível em <http://www.ich.org>. Acesso em 23 de novembro de 2011.

IPEC – International Pharmaceutical Excipients Council. Disponível em <<http://ipecamericas.org/glossary>> Acesso em 16 de abril de 2012.

JULIO, T. A. et al. Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC–UV. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2012 (in press), DOI: 10.1007/s10973-012-2292-8.

KAHAN, H. **Difração de Raios X**. Disponível em [http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1\\_multipart\\_xF8FF\\_2\\_DIFRACAO.pdf](http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_2_DIFRACAO.pdf). Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

KAHN, H. **Microscopia eletrônica de varredura**. Disponível em <[http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1\\_multipart\\_xF8FF\\_4\\_MEV\\_PMI-2201.pdf](http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_4_MEV_PMI-2201.pdf)> Acesso em 24 de maio de 2012.

KALINKOVA, G. N. Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v.187, p.1-15, 1999.

KARABAS, I.; ORKOULA, M. G.; KONTOYANNIS, C. G. Analysis and polymorphs in tablets: The case of Risperidone. **Talanta**, v.71, p.1382-1386, 2007.

KAUFFMAN, J. F.; BATYKEFER, L. M.; TUSCHEL, D. D. Raman detected differential scanning calorimetry of polymorphic transformations in acetaminophen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.48(5), p.1310-1315, 2008.

KHAPRA, P.; DHARMADHIKARI, N. **Stable oral composition**. World Intellectual Property Organization. WO 2005/065047 A2, Jul. 21, 2005.

KRISHNAIAH, C. et al. Stability-indicating UPLC method for determination of Valsartan and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and

pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.53, p.483–489, 2010.

KUMAR, B.V.S. et al, **Novel Crystalline Forms of Desloratadine and Process for their Preparation**. United States Patent US 2007/0135472, 2007.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.2, 2001.

LEITE, E.G. **Estabilidade**: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos. 2006, 178p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, 2006.

LEURS, R.; CHURCH, M. K. TAGLIALATELA, M. H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. **Clinical and Experimental Allergy**, v.32(4), p.489-498, 2002.

LILTORP, K.; LARSEN, T. G.; WILLUMSEN, B.; HOLM, R. Solid state compatibility studies with tablet excipients using non thermal Methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, p.424-428, 2011.

MALISKA, A. M. **Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise**. Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em [http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV\\_Apostila.pdf](http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf). Acesso em 05 de março de 2012.

MARTINDALE: The complete Drug Reference, 35th edition, Pharmaceutical Press, 2007.

MATHKAR, S. et al. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, p.627-631, 2009.

MAURIN, J. K. et al. The usefulness of simple X-ray powder diffraction analysis for counterfeit control – The Viagra® example. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, p.1514-1518, 2007.

MERCOSUL. Resolução GMC 53, 1996. Aprova o regulamento técnico denominado “Estabilidad de Productos Farmacêuticos”. Disponível em

<[http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas\\_web/Resoluciones/ES/Res\\_053\\_096\\_.PDF](http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_053_096_.PDF)> Acesso em 13 de março de 2012.

METHA, P.R. et. al. **Stabilized Desloratadine Composition**.US 2010/0129310A1. 2010.

MONAJJEMZADEH, F. et al. Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.73, p.404-413, 2009.

MOTALA, C.H1 antihistamines in allergic disease. **Current Allergy & Clinical Immunology**, v.22(2), 2009.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**. I-editora, São Paulo-SP, 300p.; 2002.

MURA, P. et al. Compatibility study between ibuprofen and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, hot-stage microscopy and scanning electron microscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.18, p.151–163, 1998.

MURPANI, D. et al. **Process for the preparation of desloratadine**. United States Patent. US 2007/0244144 A1, Oct. 18, 2007.

NAIR, R.; GONEN, S.; HOAG, S. W. Influence of polyethylene glycol and povidone on the polymorphic transformation and solubility of carbamazepine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.40, p.11–22, 2002.

NAGPAL, N. K.; MEAYS, C. L. Water Quality Guidelines for Pharmaceutically-active-Compounds (PhACs): 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2). **Technical Appendix**, 2009.

NARANG, A. S.; RAO, V. M.; RAGHAVAN, K. S. **Excipients compatibility**. In: *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice*. Elsevier Inc. 2009.

NÉMET, Z. et al. Quantitative determination of famotidine polymorphs: X-ray powder diffractometric and Raman spectrometric study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49(2), p.338-346, 2009.

NERY, C. G. C. et al. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44(1), 2008.

NUMATA, Y.; TANAKA, H. Quantitative analysis of quercetin using Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v.126, p.751–755, 2011.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The Importance of Pharmacovigilance: Safety Monitoring of medicinal products**. World Health Organization, 2002. Disponível em <<http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/a75646.pdf>>. Acesso em 07 de janeiro de 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **International stability testing: Guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in convectional dosage forms**. Annex 5. WHO Technical Report Series, p.863, 1996.

PATRO, S.K. et al. Stability Indicating RP-HPLC Method for Determination of Valsartan in Pure and Pharmaceutical Formulation. **E-Journal of Chemistry**, v.7(1), p.246-252, 2007.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. **Tecnologia Farmacêutica**, 6.ed. Lisboa: Fundação CalousteGulbenkian, 776p, 2003.

PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. **IL Farmaco**, v.58, p.541-550, 2003.

QI, M.; WANG, P. GENG, Y. Determination of desloratadine in drug substance and pharmaceutical preparations by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38(2), p.355-359, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAO, D.D. et al. A validated stability-indicating UPLC method for desloratadine and its impurities in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.51, p.736–742, 2010.

REIS FILHO, R.W.; ARAÚJO, J.C.; VIEIRA, E.M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v.29(4), 2006.

REYNOLDS, D. W. et al. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, p. 48–54, 2002.

RIVERA, R.; YACOBSON, I.; GRIMES, D. The mechanism of action of hormonal contraceptives and intrauterine contraceptive devices. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.181(5), 1999.

RIVERA, A. B. et al. Physico-chemical and solid-state characterization of secnidazole. **IL Farmaco**, v.55, p.700-707, 2000.

ROCHA JUNIOR M. A. Histamina e anti-histamínicos. In: SILVA, P. Farmacologia. 5ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.521-532, 1998.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 5.ed. London: The Pharmaceutical Press, 2006.

RODRIGUES, P. O. et al. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.24(3), p.383-387, 2005.

ROUMELI, E. et al. Compatibility study between trandolapril and natural excipients used in solid dosage forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2012 (in press), DOI 10.1007/s10973-012-2476-2.

SANTOS, A.F.O. et al. Application of thermal analysis of binary mixtures with metformin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.93(2), 361-364, 2008.

SINHA, S. et al. Solid dispersion as an approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drug ritonavir. **Pharmaceutical Science Technology**, v.11(2), p.518-527, 2010.

SHARMA, A.; JAIN, C.P. Solid dispersion: A promising technique to enhance solubility of poorly water soluble drug. **International Journal of Drug Delivery**, v.3, p.149-170, 2011.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v.272, p.1–10, 2004.

STULZER, H. K. et al. Compatibility studies between captopril and pharmaceutical excipients used in tablets formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.91(1), p.323-328, 2008.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30(2), p. 129-135, 2009.

SHAH, A.K.; AGNIHOTRI, S.A. Recent advances and novel strategies in pre-clinical formulation development: An overview. **Journal of Controlled Release**, v.156, p.281-296, 2011.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43(4), 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Editora LTC, 490p.; 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ªed. São Paulo: Bookman, 2002.

SERRANO, R.; SILVA, G; SILVA, O. Application of Light and Scanning Electron Microscopy in the Identification of Herbal Medicines. **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**, p.182-190, 2010.

SMUDA, C.; BRYCE, P. J. New Developments in the Use of Histamine and Histamine Receptors. **Current Allergy and Asthma Reports**, v.11, p.94–100, 2011.

SIMONS, F.E.R. Comparative pharmacology of H1 antihistamine: clinical relevance. **The American Journal of Medicine**, v.113(9), p.38-46, 2002.

SOUSA E SILVA, J.P.; SOUSA LOBO, J.M. Compatibility studies between nebicapone, a novel COMT inhibitor, and excipients using stepwise isothermal high

sensitivity DSC method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.102, p.317-321, 2010.

Schering-Plough Research Institute. **CLARINEX® (Desloratadine) - Product Monograph**, 2004a.

Schering-Plough Research Institute. **DESALEX® (Desloratadine) - Product Monograph**, 2004b.

SHAREEF, A. et al. Aqueous solubilities of estrone, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, and bisphenol A. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.51, p.879-881, 2006.

SHUFELT, C. L.; MERZ, N. B. Contraceptive Hormone Use and Cardiovascular Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v.53(3), 2009.

SIMONS, F.E.R.; SIMONS, K.J. Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of Progress. **Journal Allergy and Clinical Immunology**, v.128(6), p.1139-1150, 2011.

STEPHENSON, G. A.; FORBES, R. A.; REUTZEL-EDENS, S. M. Characterization of the solid state: quantitative issues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.48, p.67-90, 2001.

SUNDARAM, V. et al. **Amorphous Form of Desloratadine and a Process for the Preparation Thereof**. WO/2005/084674, 2005.

THE MERCK INDEX, 14th edition, USA, 2006.

THASS – Thermal Analysis and Surface Solutions. **DSC as problem-solving tool: Better interpretation of TG using cyclic DSC**. Thermal Analysis & Surface Solutions. Applications note nº29. Disponível em <[http://www.thass.org/DOWN/applications/App\\_SIINT/An%2029.pdf](http://www.thass.org/DOWN/applications/App_SIINT/An%2029.pdf)> Acesso em 28 de março de 2012.

TITA, B. et al. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.56, p.221-227, 2011.

TITA, B. et al. Compatibility study between ibuprofen and excipients in their physical mixtures. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.105, p.517-527, 2011.

TOMASSETTI, M. et al. Thermal analysis study of the interactions between acetaminophen and excipients in solid dosage forms and in some binary mixtures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, p.949-955, 2005.

TOTH, Z.G. et al. **Processes for Preparation of Polymorphic Forms of Desloratadine**. United States Patent US2004/0242619 A1, 2004.

USP 32: United States Pharmacopeial Convention. 2009. **United States Pharmacopeia and the National Formulary (USP 32 - NF 27)**. Rockville (MD): The United States Pharmacopeia Convention.

VAN EERDENBRUGHA, B.; TAYLOR, I. S. Application of mid-IR spectroscopy for the characterization of pharmaceutical Systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.417, p.3-16, 2011.

VANKEIRSBILCK, T. et al. Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. **Trends Analytical Chemistry**, v.21(12), 2002.

VAN DEN MOOTER, G. The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.9(2), p.79-85, 2011.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v.12, p.23-24, 2007.

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

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

VIPPAGUNTA, S. R.; WANG, Z.; HORNUNG, S.; KRILL, S.L. Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.96(2), p.294-304, 2006.

WATERMAN K.C. et al. **Impurities in drug products**. Pfizer Inc. Groton, 2004

WATERMAN, K.C.; MACDONALD, B.C. Package Selection for Moisture Protection for Solid Oral Drug Products.2010.

WIRTH, D. D. et al. Maillard reaction of lactose and fluoxetine hydrochloride, a secondary amine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.87(1), p.31-39, 1998.

YU, M. et al. Investigation of structure and dissolution properties of a solid dispersion of lansoprazole in polyvinylpyrrolidone. **Journal of Molecular Structure**, v.1005, p.70-77, 2011.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V.S. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York: Kluwer Academic Q Plenum Publishers, 268p.; 2002.

YOSHIDA, M. I.et al. Thermal characterization of lovastatin in pharmaceutical Formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.106, p.657-664, 2011.

ZHANG, J. et al. The stability of solid dispersions of felodipine in polyvinylpyrrolidone characterized by nanothermal analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v.414, p.210-217, 2011.

ZHANG, X. et al. Physical characterization of lansoprazole/PVP solid dispersion prepared by fluid-bed coating technique. **Powder Technology**, v.182, p.480-485, 2008.

ZHENG, J.; RUSTUM, A. M. Rapid separation of desloratadine and related compounds in solid pharmaceutical formulation using gradient ion-pair chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, p.146-152, 2010.