UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE FORMA FARMACÊUTICA ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA PARA O TRATAMENTO DA FILARIOSE LINFÁTICA E ESTUDO DE ESTABILIDADE FORÇADA DOS FÁRMACOS

LARISSA ARAÚJO ROLIM

RECIFE
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LARISSA ARAÚJO ROLIM

OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE FORMA FARMACÊUTICA ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA PARA O TRATAMENTO DA FILARIOSE LINFÁTICA E ESTUDO DE ESTABILIDADE FORÇADA DOS FÁRMACOS

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profª. Drª. Maria do Carmo Alves de Lima

RECIFE
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convensional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na Publicação
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

R748o Rolim, Larissa Araújo.
Obtenção tecnológica de forma farmacêutica associação em dose fixa para tratamento da filariose linfática e estudo de estabilidade forçada dos fármacos / Larissa Araújo Rolim. – Recife: O autor, 2012.
201 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
Inclui bibliografia e apêndices.

1. Dietilcarbamazina. 2. Ivermectina. 3. Estabilidade de medicamentos. 4. Filariose. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-026)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profª Drª. Vânia Pinheiro Ramos

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Profª. Drª. Nereide Stela Santos Magalhães

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Profª. Drª. Ana Cristina Lima Leite

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 07 de Dezembro de 2012,

Tese de Doutorado de Larissa Araújo Rolim, defendida e APROVADA, por decisão unânime, em 07 de Dezembro de 2012 e cuja a Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE, ORIENTADORA E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Profª Drª Maria do Carmo Alves de Lima
(Depto. Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)
Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Profª Drª Miracy Muniz de Albuquerque
(Depto. Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)
Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof Dr José Lamartine Soares Sobrinho
(Depto. Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)
Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof Dr Danilo César Galindo Bedor
(Depto. Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)
Assinatura: _____

TERCEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Profª Drª Geisiane Maria Alves Presmich
(Pós-doc da Universidade Federal da Paraíba - UFPB)
Assinatura: _____

Aos meus pais,

meus eternos incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, a minha orientadora, que possibilitou a concretização deste trabalho, pelo carinho, amizade e ensianamentos, ***Profª. Maria do Carmo Alves de Lima.***

Ao meu Pai, eterno orientador, ***Prof. Pedro José Rolim Neto***, pelo amor, carinho, amizade, compreensão, pelos ensinamentos científicos e pela confiança, espero ter correspondido à altura a toda sua dedicação. Te amo incondicionalmente!

A minha mãe, ***Jaciara Maria de Araújo Rolim***, por seu amor, por suas palavras de estímulo, frente por vezes, ao desânimo pelo esforço diário, as suas preocupações com meu cansaço, minhas tristezas e alegrias. Mãe, muito obrigada por tudo! Você é a minha vida...

Ao meu marido ***Pablo de Ataide Ferreira***, pelo amor, dedicação, companheirismo, e compreensão. Te amo pra sempre e incondionalmente!

A ***Deus,*** por ter me proporcionado mais essa conquista e guiado meus passos para que eu pudesse chegar até aqui.

A toda minha ***família,*** em especial ao meu irmão ***Vinicius Araújo Rolim*** e aos meus primos***, Prof. José Lamartine Soares Sobrinho*** *e* ***Profª. Mônica Felts de La Roca Soares*** por todo amor, ensinamentos e dedicação. E a mais linda ***Maria Tereza Felts Soares*** que chegou trazendo alegria e amor para nossas vidas.

As minhas amigas ***Fabiana Lícia, Keyla Ramos, Lariza Alves, Magaly Lyra, Salvana Costa*** pela amizade, companheirismo e convívio diário... Adoro vocês!

A minha equipe de trabalho, as meninas da filariose linfática: ***Maria Luiza Carneiro Moura, Luise Lopes Chaves, Isabella Macedo*** ...

Ao ***Laboratório de Tecnologia de Medicamentos – LTM,*** minha segunda casa, pela oportunidade de realizar este trabalho e a ***todos os seus integrantes*** pela aprendizagem diária regada a muitas risadas.

Aos amigos ***Danilo Fontes, Luíse Lopes, Sarah Raquel, Rayana Muniz, Magna Vanessa, Otávio Cavalcanti***, ***Iggor Macedo e Bruno Almeida***, pela amizade e companheirismo, sempre!

A ***todos*** que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADF	Associação em Dose Fixa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASAP	Analisador de Área Superficial de Poros
ATR	Reflectância Total Atenuada
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CETENE	Centro Tecnológico do Nordeste
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPMP	*Committee for Proprietary Medicinal Products*
DAD	Detector de arranjo diiodo
DEC	Dietilcarbamazina
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivativa
EUA	Estados Unidos da América
EMg	Estearato de Magnésio
FACEPE	Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
FL	Filariose Linfática
IC	Índice de Carr
ICH	*International Conference on Harmonization*
IH	Índice de Hausner
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*

IVC	Ivermectina
IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier
IT-TOF	*Ion trap-time of flight*
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectro de massas
MB	Misturas Binárias
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDs	Produtos de Degradação
QbD	Quality by Design
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
nm	Nanômetro
M	Molar
Kg	Quilogramas
kV	Quilovolts
µg	Microgramas
ΔH	Variação de entalpia
µm	Micrometro
$J.g^{-1}$	Joule por gramas
ΔE	Variação de energia
mM	Milimolar
d_{ap}	Densidade Aparente
d_{cp}	Densidade Compactada
g	Grama
mg	Miligrama
S_{BET}	Área Superficial modelo Brunauer, Emmet e Teller
NaOH	Hidróxido de Sódio
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
Å	Angstrom
m^2/g	Metro quadrado por grama
2θ/s	Dois teta por segundo
cm^{-1}	Centímetro menos 1
>	Maior que
<	Menor que

L	Litro
A	Fator de frequência
n	Ordem da reação
T	Temperatura
f(α)	Fração decomposta de um sólido em função da temperatura
KJ/mol	Quilojoules por mol
W/m^2	Watts por metro quadrado
m/z	Razão massa carga
$T_{½}$	Tempo de meia-vida

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – Revisão da Literatura

Artigo 1 - O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO DA FILARIOSE LINFÁTICA: ESTADO DA ARTE

Figura 1 – Incidência global da filariose linfática. 30

CAPÍTULO II - Citrato de Dietilcarbamazina

Artigo 2 - CARACTERIZAÇÃO DO ANTIPARASITÁRIO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA: UMA ABORDAGEM *QUALITY BY DESIGN* (QBD*)* DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Figura 1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do citrato de DEC 59
Figura 2 - Repartição granulométrica (a) e tamanho médio de partícula do citrato de DEC (b). 60
Figura 3 - Difratograma do citrato de DEC. 64
Figura 4 - Espectro de absorção na região do infravermelho da DEC e principais grupamentos do citrato de dietilcarbamazina 66
Figura 5 - Curvas de DSC (---) e TG (---) do citrato de DEC, na razão de aquecimento de 10°C.min^{-1}. 69
Figura 6 - Curvas de TG do citrato DEC obtidas a partir de razões d aquecimento crescentes (1,5,10,15 e 20°C/min) e associação com o gráfico de Ozawa. 70

Artigo 3 - ESTUDO DE ESTABILIDADE E PRÉ-FORMULAÇÃO DO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA NO ESTADO SÓLIDO

Figura 1 - Estrutura química do citrato de DEC. 77
Figura 2 - Fluxograma para a realização do estudo. 79
Figura 3 - Curvas de DSC e TG/DTG da DEC. 82
Figura 4 - Curvas TG/DTG da DEC, da MB com DEC/Tabletose® e da Tabletose®. 84
Figura 5 - Curvas TG/DTG da DEC, da MB DEC/PVP e do PVP. 85

Figura 6 - Curvas TG/DTG da DEC, da MB DEC/EMg e do EMg. 86
Figura 7 - Espectro do citrato de DEC, EMg, mistura binária DEC/EMg, PVP, mistura binária DEC/PVP, Tabletose® e mistura binária DEC/Tabletose®, respectivamente..... 87
Figura 8 - Difratogramas do citrato de DEC, do PVP, da mistura binária DEC/PVP, da Tabletose®, da mistura binária DEC/Tabletose®, do EMg e da mistura binária DEC/EMg, respectivamente 88
Figura 9 - Curvas TG da DEC obtidas a partir de razões de aquecimento crescentes (5, 10 e 15°C/min) e associação com o gráfico de Osawa..... 89

Artigo 4 - ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO ANTIHELMÍNTICO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA EM SOLUÇÃO AQUOSA POR CLAE-DAD E CLAE-MS.
Figura 1 - Cromatograma do citrato de DEC obtido com método descrito em compêndios oficiais. 104
Figura 2 - Cromatograma representativo da DEC matéria prima..... 106
Figura 3 - Espetros de massa da segunda ionização da DEC base livre. 109
Figura 4 – Espectros de massa dos respectivos picos do cromatograma.....110
Figura 5 - Cromatograma sob hidrólise ácida; MS da DEC sob hidrólise ácida, e seus prováveis produtos de degradação (PDs) (a), (b) e (c). .....**Erro! Indicador não definido.**
Figura 6 – Reação dos produtos de hidrólise da DEC base livre gerando um novo produto. 112
Figura 7 - Cromatograma de uma amostra de citrato de DEC oxidada por 7 dias. 114
Figura 8 - Mecanismo de oxidação da DEC base livre por ataque eletrofílico..... 115
Figura 9 – Mecanismo de autoxidação da DEC base livre. 115
Figura 10 – Prováveis produtos de degradação da DEC base livre por oxidação. 116
Figura 11 - Cromatograma ampliado para verificação dos produtos de degradação em amostra representativa de comprimido de citrato de DEC 50 mg, submetidos à estudos de estabilidade no modelo acelerado nos primeiros 3 meses..... 119

CAPÍTULO III - Ivermectina

Artigo 5 - APLICAÇÃO DO CONCEITO DE QUALITY BY DESING NO ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DO FÁRMACO IVERMECTINA

Figura 1- Fluxograma do estudo de compatibilidade fármaco-excipiente. 130
Figura 2 - Estrutura química da IVC. 131
Figura 3 – Espectro de MS (a) e de absorção no infravermelho da IVC (b). 132
Figura 4 - Difratograma e eletromicrografia das partículas cristalinas de IVC. 135
Figura 5 - Distribuição de frequência do tamanho das partículas de IVC. 135
Figura 6 - Curvas de DSC para definição da razão de aquecimento da IVC. 137
Figura 7 - Curva TG obtida a 10˚C.min^{-1} sob atmosfera de N_2 com fluxo de 50 mL.min^{-1}. 138
Figura 8 - Curvas TG de IVC sem pré-aquecimento (sample 1) e com pré-aquecimento a 157°C (sample 2) em atmosfera de N_2 a 50mL.min^{-1}. 139
Figura 9 – Espectro de IV-TF de amostras de IVC sem pré-aquecimento (sample 1) e com pré-aquecimento a 157°C (sample 2). 140
Figura 10 - Curvas TG e o gráfico de Ozawa da IVC obtido em cinco razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não-isotérmico. 141
Figura 11 - Espectro de IV-TF da IVC, Tabletose®, Starch®, mistura binária IVC/ Tabletose®, mistura binária IVC/ Starch®. 143

Artigo 6 - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV PARA QUANTIFICAÇÃO DO ANTI-PARASITÁRIO IVERMECTINA

Figura 1 - Estrutura química da IVC ($C_{48}H_{74}O_{14}$) e varredura espectrofotométrica no sistema de solvente selecionado. 154
Figura 2 - Varreduras no UV da IVC evidenciando a seletividade do método. 156
Figura 3 - Varreduras no UV da IVC fotodegradada por diferentes tempos de exposição. 156

Artigo 7 – ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO ANTIPARASITÁRIO IVERMECTINA EM SOLUÇÃO POR CLAE-DAD

Figura 1 – Cromatogramas obtidos nos estudos de degradação da IVC. 167

Figura 2 – Cromatogramas obtidos para os estudos de degradação da IVC.....169
figura 3 – Cinética de degradação fotolítica da IVC em solução.....170

Capítulo IV – Desenvolvimento de Forma Farmacêutica Associação Em Dose Fixa dos fármacos citrato de DEC e IVC

Artigo 8 - DESENVOLVIMENTO DE NOVO COMPRIMIDO PARA O TRATAMENTO DA FILARIOSE LINFÁTICA CONTENDO IVERMECTINA E CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA ASSOCIADO EM DOSE FIXA

Figura 1 - Estudo de compatibilidade citrato de DEC:IVC (1:1, p/p) por DSC.....181
Figura 2 - Estudo de compatibilidade citrato de DEC:IVC (1:1, p/p) por TG.....182

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Artigo 2 - CARACTERIZAÇÃO DO ANTIPARASITÁRIO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA: UMA ABORDAGEM *QUALITY BY DESIGN* (QBD*)* DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Tabela 1 - Resultados de área superficial e porosidade do citrato de DEC matéria-prima.. 61
Tabela 2 - Propriedades de fluxo do citrato de DEC matéria-prima..... 62
Tabela 3 - Solubilidade do Citrato de DEC, em diferentes solventes..... 63
Tabela 4 - Temperaturas iniciais de fusão (Ti), pico de fusão, temperaturas finais de fusão (T_f) e valores de entalpia de todas as amostras analisadas, comparadas através de teste estatístico de análise de variância (ANOVA)..... 67

Artigo 3 - ESTUDO DE ESTABILIDADE E PRÉ-FORMULAÇÃO DO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA NO ESTADO SÓLIDO

Tabela 1 - Temperatura inicial (T_i), temperatura do pico (T_{pico}) e temperatura final (T_f) do evento de fusão e variação da entalpia (ΔH) da DEC e das MB. 83
Tabela 2 - Temperatura inicial de degradação (T_i) das curvas de TG e pico do DTG da DEC e das MB..... 84
Tabela 3 - Energia de ativação (Ea), fator de freqüência (A) da MB obtidos por cinética não-isotérmica (método de Ozawa). 90
Tabela 4 - Doseamento do citrato de DEC em MB com excipientes após estudos de Fotoestabilidade (F) e Estabildiade de Longa Duração (ELG). 90

Artigo 4 - ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO ANTIHELMÍNTICO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA EM SOLUÇÃO AQUOSA POR CLAE-DAD E CLAE-MS.

Tabela 1 - Limites de detecção e quantificação da dietilcarbamazina (DEC), da N-metilpiperazina e N,N-dimetilpiperazina. 106
Tabela 2 - Avaliação da pureza do pico da DEC nas diferentes condições. 107
Tabela 3 – Equações calculadas, a partir da reção de primeira ordem, das hidrólises da DEC, e seus respectivos coeficientes de determinação linear. 113

CAPÍTULO III

Artigo 5 - APLICAÇÃO DO CONCEITO DE QUALITY BY DESING NO ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DO FÁRMACO IVERMECTINA

Tabela 1 - Resultado do estudo de solubilidade semi-quantitativo da IVC. 133

Tabela 2 - Determinação da solubilidade quali-quantitativa em sistemas aquosos. 134

Tabela 3 - Resultados das propriedades de compactação da amostra analisada. 136

Tabela 4 - Dados termoanalíticos da IVC e das MBs com excipientes. 141

Tabela 5 - Energia de ativação (Ea), fator de freqüência (A) das MBs obtidos por cinética não-isotérmica (método de Ozawa). 142

Artigo 6 - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV PARA QUANTIFICAÇÃO DO ANTI-PARASITÁRIO IVERMECTINA

Tabela 1 - Solubilidade da ivermectina (Farmacopéia Brasileira 5ª ed.). 152

Tabela 2 - Resultados da validação do método por espectrofotometria no UV. 154

Tabela 3 - Comaparação dos teores de IVC fotodegradada por CLAE e UV-Vis. 157

Artigo 7 – ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO ANTIPARASITÁRIO IVERMECTINA EM SOLUÇÃO POR CLAE-DAD

Tabela 1 – Resultado das degradações da IVC..... 168

Tabela 2 – Percentual de IVC fotodegrada versus tempo de exposição 169

CAPÍTULO IV

Artigo 8 - DESENVOLVIMENTO DE NOVO COMPRIMIDO PARA O TRATAMENTO DA FILARIOSE LINFÁTICA CONTENDO IVERMECTINA E CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA ASSOCIADO EM DOSE FIXA

Tabela 1 - Composição dos lotes de bancada ADF – citrato de DEC + IVC.....179

Tabela 2 – Controle de qualiade dos lotes de bancada desenvolvidos.....182

RESUMO

O citrato de dietilcarbamazina (DEC) é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da filariose linfática, uma doença endêmica, considerada potencialmente erradicável pela Organização Mundial de Saúde. Apesar disso, o índice de resistência ao tratamento individual é grande, sendo recomendado um tratamento em massa da população em áreas endêmicas com doses individuais ou combinadas do citrato de DEC com a ivermectina (IVC), com o objetivo interromper a transmissão do parasito e erradicar as microfilárias. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar o desenvolvimento de uma forma farmacêutica dose fixa combinada dos fármacos citrato de DEC e IVC, bem como a avaliação da estabilidade dos mesmos. Apesar dos usos consagrados no tratamento da filariose linfática, pouco se sabe a respeito de suas propriedades físico-químicas destes fármacos. Dessa forma, o primeiro passo foi obter perfis térmicos, difratométricos, morfológicos e reológicos, através de técnicas específicas para o citrato de DEC e IVC, bem como avaliar a compatibilidade destes em misturas binárias com excipientes foi avaliada por meio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) como critério de exclusão, e posteriormente, outras análises complementares para confirmação de resultados como termogravimetria, espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios-X, entre outras. Os resultados mostraram que os excipientes estearato de Mg e polivinilpirrolidona devem ser evitados na formulação de formas farmacêuticas contendo citrato de DEC e a lactose e o amido para formulações de IVC, uma vez que apresentaram sinais de interação. Para o delineamento da estabilidade dos fármacos foram realizados estudos de estabilidade forçada do citrato de DEC e IVC, isoladamente, utilizando condições de estresse hidrolítico básico (NaOH) ácido (HCl), neutro (H_2O), oxidativo (H_2O_2) e fotolítico as quais foram avaliadas por CLAE. A partir dos ensaios, puderam ser obtidos produtos de degradação oxidativa, hidrolítica e fotolítica das amostras analisadas com citrato de DEC, o que permitiu que o desenvolvimento e validação de um método indicativo de estabilidade para detecção e quantificação do fármaco e seus produtos de degradação. Porém o método para avaliação da IVC ainda esta em desenvolvimento devido as dificuldades inerentes a este fármaco, o grande número de produtos de degradação gerados nos estudos de degradação forçada. Neste sentido, a etapa final foi o desenvolvimento de forma farmacêutica dose fixa combinada dos fármacos citrato de DEC e IVC, com seus respectivos controles de qualidade e estabilidades, garantindo a qualidade, segurnaça e eficácia da nova forma farmacêutica desenvolvida.

Palavras-chave: Dietilcarbamazina, ivermectina, estabilidade de medicamentos, filariose.

ABSTRACT

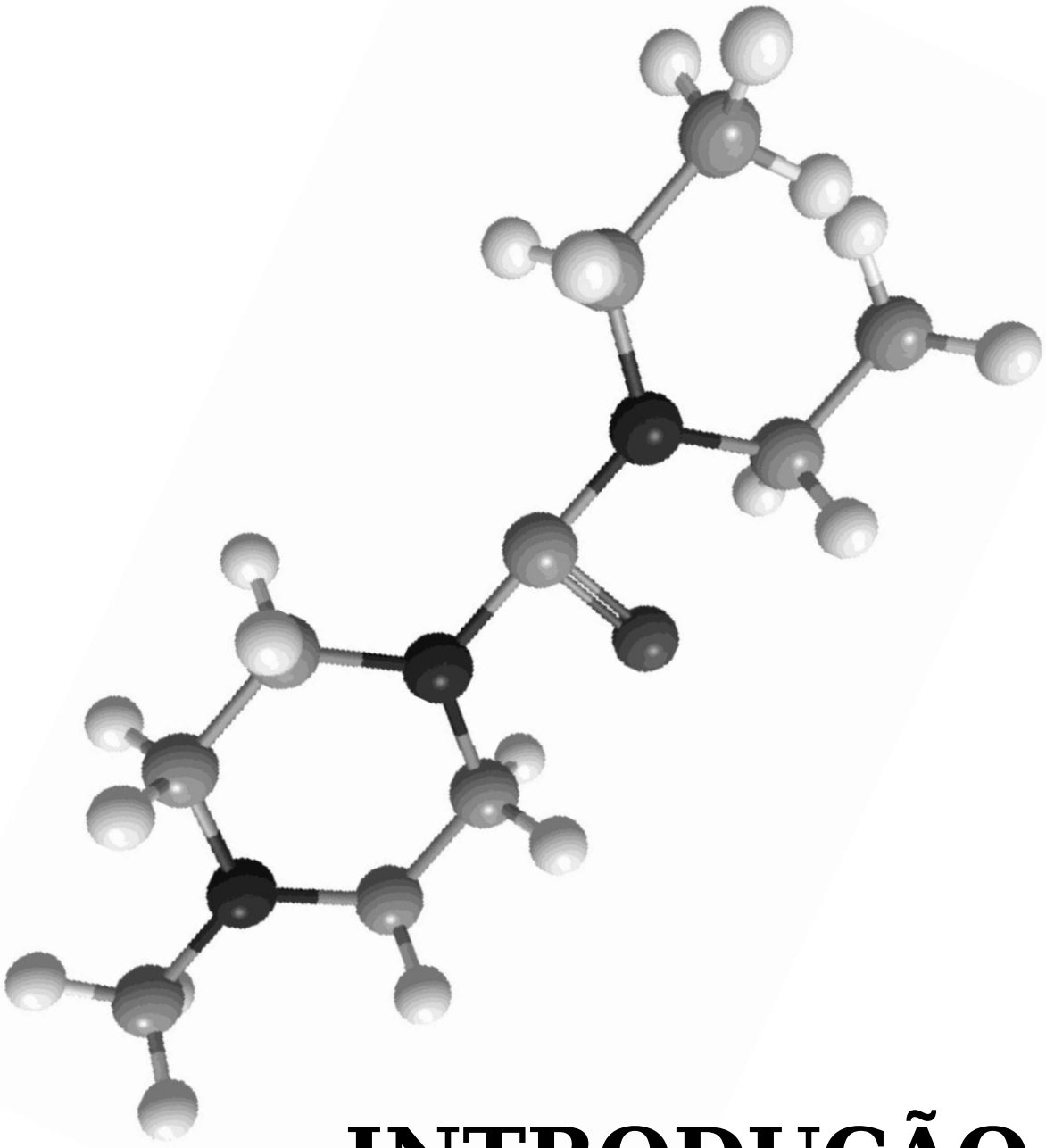
The diethylcarbamazine citrate (DEC) is the drug of choice for treatment of lymphatic filariasis, a disease endemic considered potentially eradicable by the World Health Organization Nevertheless, the rate of resistance to individual treatment is great, and recommended treatment mass of the population in endemic areas with single or combined doses of DEC citrate with ivermectin (IVC) in order to interrupt transmission of the parasite and eradicate the microfilariae. Given the above, the objective of this study was the development of a pharmaceutical form of fixed dose combination drugs DEC citrate and IVC, as well as evaluating the stability thereof. Despite the established use in the treatment of lymphatic filariasis, little is known about their physicochemical properties of these drugs. Thus, the first step was to obtain thermal profiles, difratométricos, morphological and rheological through specific techniques for DEC citrate and IVC, as well as evaluating the compatibility of binary mixtures with excipients was evaluated using differential scanning calorimetry (DSC) as an exclusion criterion, and subsequently other complementary analyzes for confirmation of results as thermogravimetry, infrared spectroscopy, X-ray diffraction, among others. The results showed that the excipients magnesium stearate and polyvinylpyrrolidone should be avoided in the formulation of pharmaceutical dosage forms containing DEC citrate and lactose and starch for formulations of IVC, since showed signs of interaction. To delineate the stability of drug stability studies were performed forced DEC citrate and IVC alone hydrolytic stress conditions using basic (NaOH) acid (HCl), neutral (H_2O), oxidative (H_2O_2) and photolytic which were evaluated by HPLC. From the tests, products could be obtained oxidative, hydrolytic and photolytic of the samples with DEC citrate, which allowed the development and validation of a stability indicating method for the detection and quantification of the drug and its degradation products. However, the evaluation method of IVC still under development due to the difficulties inherent to this drug, the large number of degradation products generated in the forced degradation studies. In this sense, the final step was the development of fixed dose combination dosage form of the drug DEC citrate and IVC, with their quality control and stability, ensuring quality, timelessness and efficacy of new pharmaceutical form developed.

Key-Words: Diethylcarbamazine, ivermectin, stability of medicines, filariasis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
2 OBJETIVOS 26
2.1 Objetivo Geral 26
2.2 Objetivos Específicos 26
3 CAPÍTULO I
Artigo 1 - O TRATAMENTO QUIMIOTERÀPICO DA FILARIOSE LINFÁTICA: ESTADO DA ARTE 28
4 CAPÍTULO II
Artigo 2 - CARACTERIZAÇÃO DO ANTIPARASITÁRIO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA: UMA ABORDAGEM *QUALITY BY DESIGN* (QBD*)* DE PRÉ-FORMULAÇÃO 53
Artigo 3 - ESTUDO DE ESTABILIDADE E PRÉ-FORMULAÇÃO DO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA NO ESTADO SÓLIDO 75
Artigo 4 - ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO ANTIHELMÍNTICO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA EM SOLUÇÃO AQUOSA POR CLAE-DAD E CLAE-MS. . 98
5 CAPÍTULO III
Artigo 5 - **ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DO FÁRMACO IVERMECTINA UTILIZADO COMO ANTIPARASITÁRIO DE AMPLO ESPECTRO** 124
Artigo 6 - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV PARA QUANTIFICAÇÃO DO ANTI-PARASITÁRIO IVERMECTINA 146
Artigo 7 – ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO ANTIPARASITÁRIO IVERMECTINA EM SOLUÇÃO POR CLAE-DAD 162
6 CAPÍTULO IV
Artigo 8 - DESENVOLVIMENTO DE NOVO COMPRIMIDO PARA O TRATAMENTO DA FILARIOSE LINFÁTICA CONTENDO IVERMECTINA E CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA ASSOCIADO EM DOSE FIXA.....174
7 CONCLUSÃO 188
8 PERSPECTIVAS 191

REFERÊNCIAS..... 193
APÊNDICES.....196



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a filariose linfática (FL) tem surgido como um problema crescente em saúde pública em várias partes do mundo. A debilitação física e o estigma social associados à filariose linfática têm sido considerados como a segunda causa mundial de incapacidade para o trabalho. Nas áreas em que a doença é endêmica, a prevalência de infecção aumenta continuadamente, principalmente, pelo crescimento rápido e desordenado dos centros urbanos e pela criação de condições ideais para a multiplicação dos focos de mosquitos transmissores da doença, sendo o *Culex quinquefasciatus* predominante na maioria das regiões endêmicas. Assim, a bancroftose, sinônimo para FL, é considerada hoje uma doença reemergente (DREYER et al, 1996; RAMAIAH et al, 2007).

O desenvolvimento de metodologias de diagnóstico individual e de tratamento em massa tem proporcionado novos horizontes no sentido de eliminar globalmente a *W. bancrofti*. Em 1993, a Força Tarefa para Erradicação de Doenças elegeu a filariose linfática como uma das seis doenças potencialmente eliminâveis. Em maio de 1997, a Assembléia Mundial da Saúde consolidou essa resolução, anunciando a eliminação global da filariose como um problema de saúde pública. Em julho de 1997, em Townsville, Austrália, representantes da Organização Mundial de Saúde (OMS), de seus centros colaboradores, ministérios de saúde, organizações não governamentais, academias científicas e indústrias farmacêuticas estabeleceram que o controle da filariose seria feito baseado em dois grandes pilares: a interrupção da transmissão e o controle da morbidade (DREYER et al., 2009).

O tratamento antifilarial está indicado em todos os indivíduos com evidências de infecção ativa (vermes adultos e/ou microfilárias), independentemente de apresentarem ou não qualquer manifestação clínica relacionada direta ou indiretamente à bancroftose. A droga de escolha para o tratamento individual é a dietilcarbamazina (DEC) (DREYER et al., 2009).

Infelizmente, o poder adulticida da DEC não é 100% e estima-se que cerca de 50 a 60% dos vermes adultos são refratários ao tratamento. Ocorrendo falha no tratamento com a DEC (pelo fato de o paciente apresentar vermes adultos não susceptíveis e continuar produzindo microfilárias) e havendo reaparecimento da hematúria, deve-se lançar mão da co-admininistração da DEC com a ivermectina (6 mg/kg e 400 μg/kg de peso,

respectivamente) ou albendazol (1 comp. 400mg). Essa indicação tem como objetivo a melhor ação microfilaricida da combinação das duas drogas e, conseqüentemente, a obtenção de um maior tempo de clearance das microfilárias circulantes (DREYER, DREYER & NORÕES, 2002).

Então a utilização de terapias de Associação em Dose Fixa (ADF) é uma poderosa ferramenta para um tratamento mais adequado dessa doença, com o desenvolvimento de um comprimido contendo dietilcarbamazina e ivermectina em uma única preparação, seguindo os preceitos técnicos científicos de estabilidade de formas farmacêuticas.

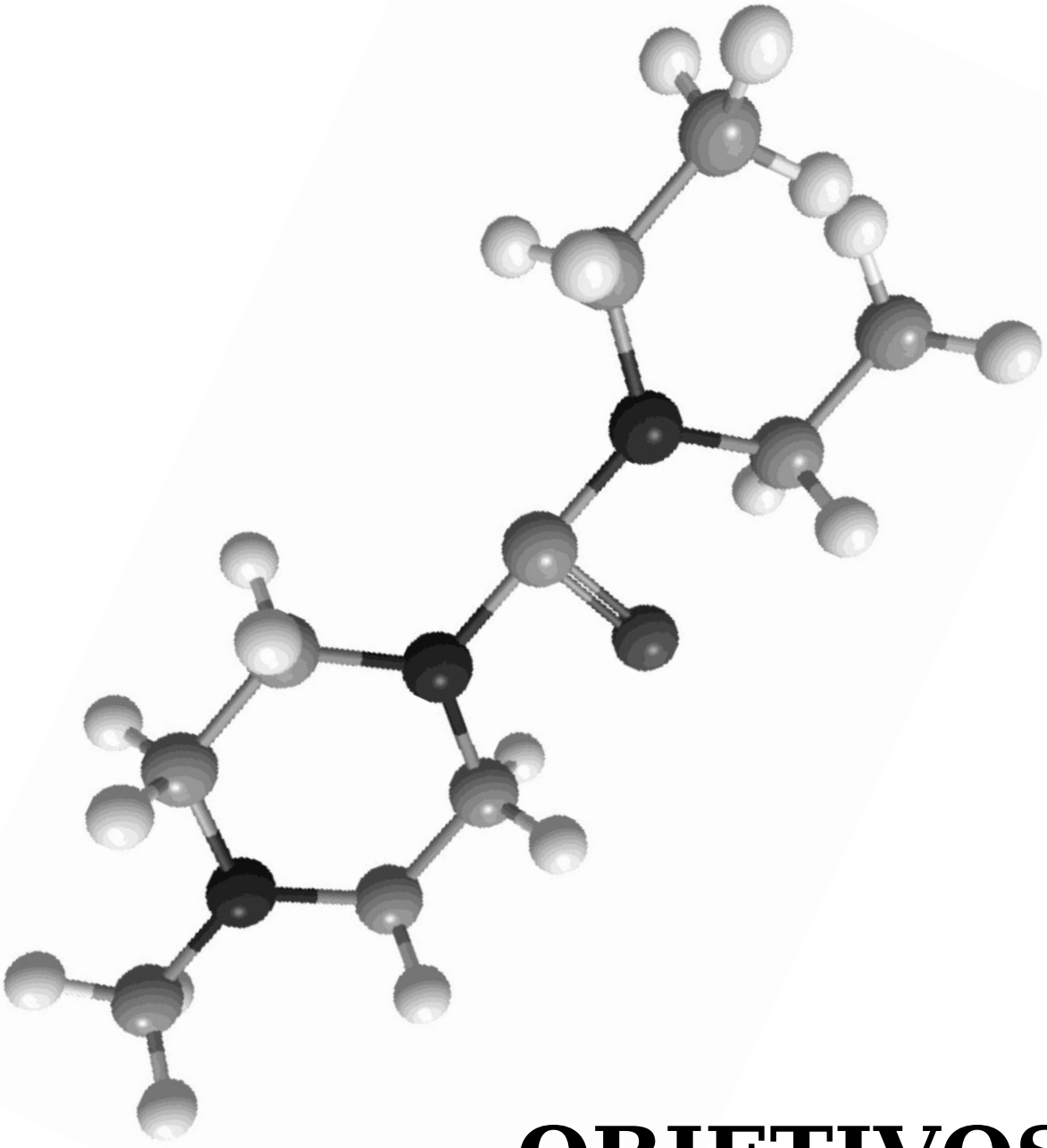
Com isso, milhões de pessoas são e serão submetidas ao tratamento com estes fármacos por longos períodos de tempo. A ingestão prolongada destes pode levar ao seu acúmulo no organismo, podendo estes sofrer uma série de reações inesperadas em condições orgânicas como oxidações, hidrólises ácidas, básicas ou neutras, podendo ainda em condições *in vitro* de armazenamento e estocagem, simular a termo e fotodegradação dos princípios ativos (SILVA et al., 2009; YOSHIOKA, STELLA, 2002).

Estas possíveis reações podem ser mimetizadas pelo "estudo de estresse" que é definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas. No Brasil, a ANVISA rege procedimentos a serem seguidos, uma vez que a identificação e quantificação dos produtos de degradação já eram exigidas no item 2.2.6 da RE nº 560/2002 e no item 2.8 da RE nº 398/2004 – regulamentações específicas sobre estudos de estabilidade, vigentes à época, além dos estudos de fotoestabilidade exigidos no item 2.6, assim como as recomendações para a sua realização (Brasil, 2008). Já no item 2.9 do anexo da RE n° 1, 2005 - Guia para Realização dos Estudos de Estabilidade, já era preconizada a realização do ensaio de identificação e quantificação de produtos de degradação e método analítico correspondente no estudo de estabilidade, para todos os produtos a serem registrados.

Não existe, por sua vez, relatos na literatura sobre os produtos de degradação do DEC, ivermectina e albendazol, sendo estes medicamentos utilizados em larga escala pela população mundial, portanto, é de extrema importância a elucidação, quantificação e avaliação da toxicidade de seus produtos de degradação, a fim de garantir a segurança e eficácia do tratamento para filariose linfática. Contudo, não existe um padrão na realização destes estudos. Alguns estudos, como o realizado por Singh & Bakshi (2000), propõem um

sistema para a classificação de fármacos, tomando como base o comportamento da estabilidade do mesmo diante de variações nas condições submetidas, o qual servirá para o desenvolvimento das metodologias utilizadas na execução deste projeto. Neste sentido o projeto foca os fármacos de escolha utilizados no combate a filariose linfática, uma doença extremamente negligenciada, segundo classificação da Organização Mundial da Saúde e atualmente comercializado pelo Laboratório Farmacêutico FARMANGUINHOS, que conseqüentemente tem interesse em elucidar e qualificar (quanto a toxicidade) seus produtos de degradação.

Sendo, o desenvolvimento de um produto que melhore a situação da população acometida por essa doença facilitando a administração da medicação tornando mais eficaz o tratamento por meio do comprimido dose fixa combinada. Será de relevância técnica-científica e social, constituindo-se dessa forma em avanço no tratamento da filariose linfática, bem como o estudo de degradação dos fármacos e medicamento obtido uma necessidade de saúde pública, pois, milhares de pessoas utilizam tais fármacos, sem o conhecimento de seus produtos de degradação, justificando a aderência do projeto com o setor estratégico de fármacos e medicamentos no Brasil.



OBJETIVOS

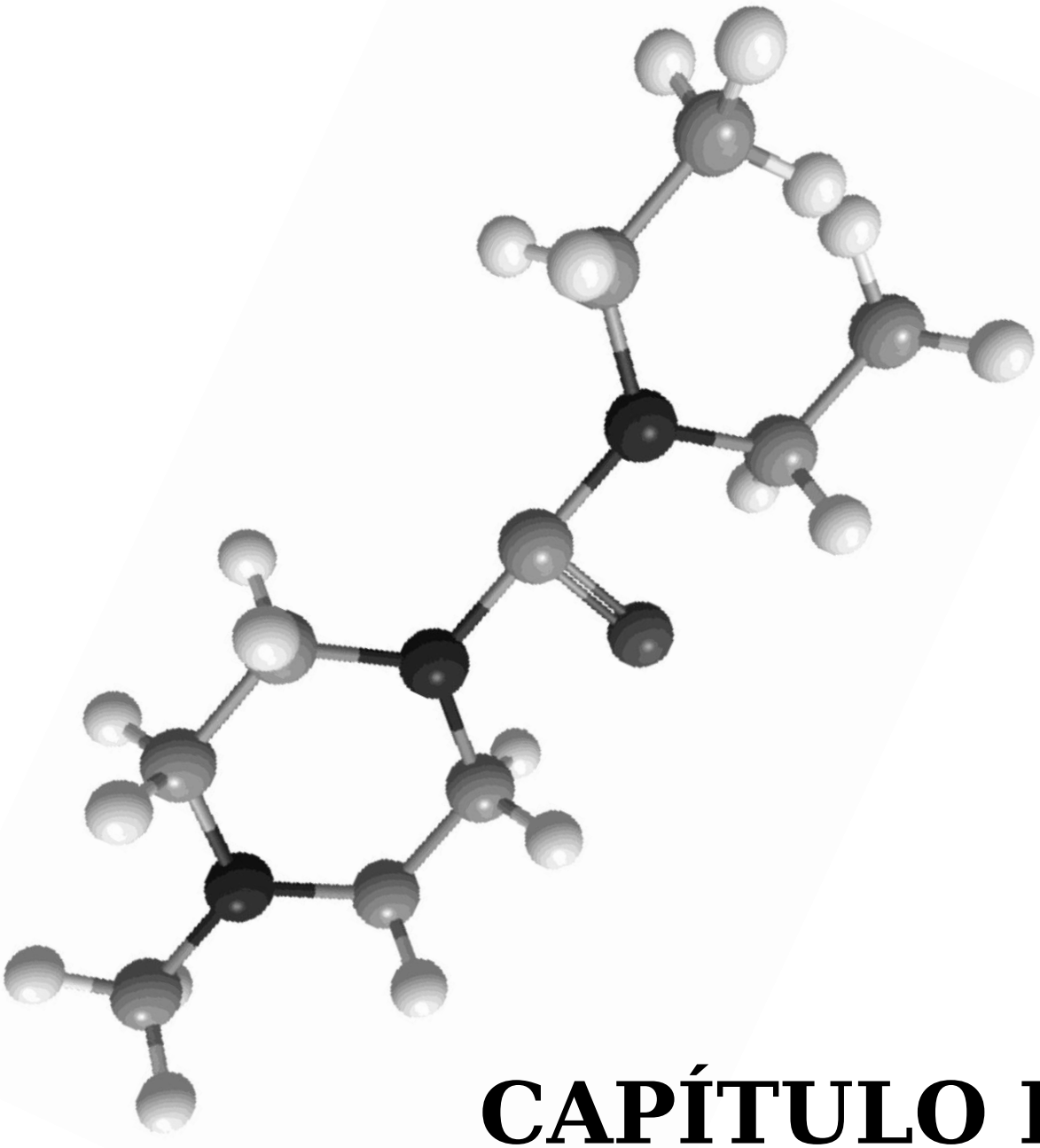
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma forma farmacêutica sólida comprimido de associação em dose fixa dos fármacos citrato de dietilcarbamazina (DEC) e ivermectina (IVC), a fim de desenvolver um produto farmacêutico inovador, bem como, realizar os estudos de estabilidade para garantir qualidade, segurança e eficácia.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterização físico-química das matérias primas, citrato de DEC e IVC;
- ✓ Realização de estudo de estabilidade e pré-formulação do citrato de DEC e IVC com excipientes por diferentes técnicas analíticas;
- ✓ Desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar o citrato de DEC, bem como, seus produtos de degradação por CLAE-DAD, e sugestão dos possíves produtos de degradação em cada estudo a partir de análises por CLAE-MS;
- ✓ Realização de estudo de degradação do citrato de DEC e IVC em solução sob condições ácida, básica e neutra, oxidativas, termolíticas e fotolíticas;
- ✓ Determinação da cinética de degradação citrato de DEC em cada estudo;
- ✓ Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria no UV-VIS para quantificação da IVC em solução;
- ✓ Desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar a IVC, na presença de seus produtos de degradação por CLAE-DAD;
- ✓ Desenvolver forma farmacêutica sólida de associação em dose fixa (ADF) do citrato de DEC e IVC.



CAPÍTULO I

3 CAPÍTULO I : Análise crítica do tratamento atual para a Filariose Linfática

Artigo 1 - O TRATAMENTO QUIMIOTERÀPICO DA FILARIOSE LINFÁTICA: ESTADO DA ARTE

Submetido a Revista Panamericana de Salud Publica – B3 (Qualis CAPES)

RESUMO

Neste artigo de revisão visaram-se correlacionar as ações no controle e principalmente no tratamento da filariose, com boas perspectivas de erradicação da doença. Para este intuito, foi feito um levantamento bibliográfico em literatura especializada demonstrando os possíveis tratamentos individuais e em massa, levando em consideração os custos, benefícios e adesão do paciente. Durante anos foram realizados e viabilizados diversos controles e esquemas de tratamento, porém, a filariose linfática ainda é uma das doenças de mais agravo à saúde pública, devido à incapacidade que causa em seus portadores, levando-os a viver a margem da sociedade, devido ao preconceito e problemas psicossociais.

Palavras – Chave: Filariose, tratamento, ivermectina, dietilcarbamazina, albendazol.

ABSTRACT

In this review article is aimed to control the actions and especiallyin the treatment of filariasis, with good prospects for eradication. For this purpose, a literature review was made in the literature demonstrating the possible individual and mass treatment, taking into account the costs, benefits and patient compliance. Were carried out for years and enabled a number of controls and treatments, but filariasis is still a further aggravation of diseases of public health due to the inability to carry on their cause, leading them to live in the margins of society due to prejudice and problems psychosocial. Therefore, this article aimed to review the actions of control, and especially in the treatment, with good prospects for eradication. For this purpose, a literature review was made in the literature demonstrating the possible individual and mass treatment, taking into account the costs, benefits and patient compliance.

Key-words: Filariasis, treatment, ivermectin, diethylcarbamazine, albendazole.

INTRODUÇÃO

A filariose é uma doença endêmica das regiões tropicais da Ásia, África, América Central e do Sul. O tipo mais comum de filariose, entre as oito existentes, é a filariose linfática (FL), causada pelos vermes nematódeos *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*, cujas larvas (infectantes L3) são transmitidas aos seres humanos por picadas de mosquitos vetores (NESVES et al., 1991). Atualmente é considerada uma doença reemergente e importante agravo de saúde pública no mundo, sendo uma das principais causas de deformidade e incapacidade física que podem levar à exclusão e estigma sociais. Essa uma doença parasitária atinge o sistema linfático, sendo a principal causa de elefantíase e hidrocele, responsável por importantes perdas econômicas em países tropicais e subtropicais (ROCHA, ÁYRES, FURTADO, 2002; GURGEL, CARNEIRO, COUTINHO, 2010).

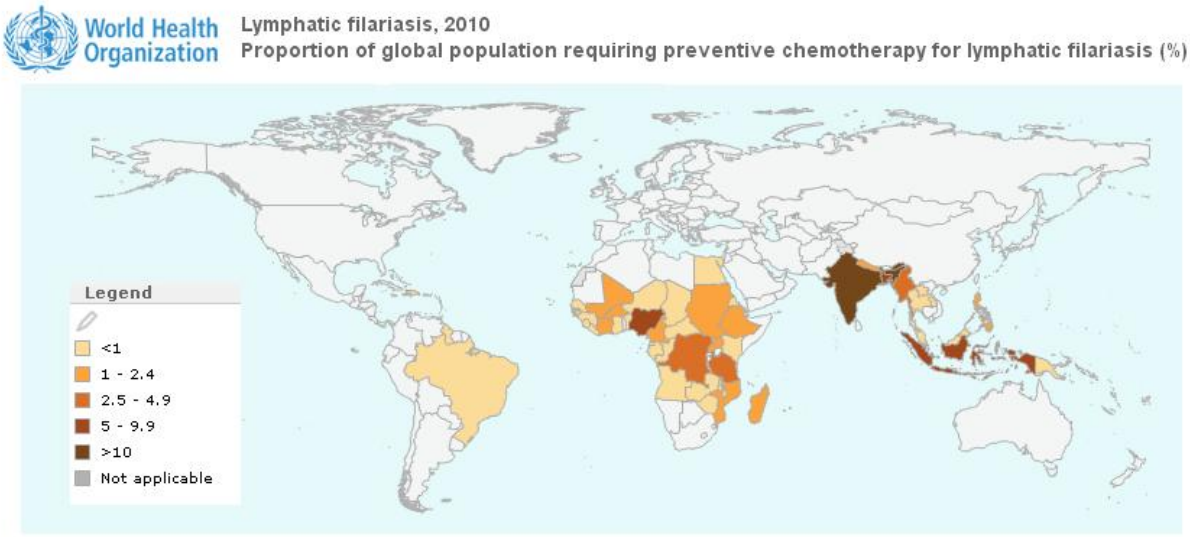
Nas áreas em que a doença é endêmica, a prevalência de infecção aumenta continuadamente, principalmente, pelo crescimento rápido e desordenado dos centros urbanos e pela criação de condições ideais para multiplicação dos focos dos mosquitos transmissores, sendo o *Culex quinquefasciatus* predominante na maioria das áreas endêmicas (REGIS et al., 1996, SILVÉRIO, URBINATTI, 2011).

A FL corre espacialmente de modo focal, em geral em populações com baixas condições socioeconômicas e estima-se que, aproximadamente, 120 milhões de indivíduos sejam portadores de microfilárias circulantes, destes 40 milhões portadores da doença clínica e 80 milhões infectados pelo parasita, dentre as 1,1 bilhões de pessoas que vivem em regiões de risco. A população infectada está distribuída em 83 países de clima tropical e subtropical, sendo encontrada, de forma endêmica, na Ásia, África e ilhas a oeste do Pacífico. Nas Américas, os focos de transmissão ativa de FL, atualmente, encontram-se no Haiti, República Dominicana, Guiana e Brasil (BRASIL, 2009; MATTOS & DREYER, 2008).

Embora a distribuição da infecção pareça global, aproximadamente um terço dos indivíduos infectados reside na Índia, outro terço na África e o restante se encontram, predominantemente, na região ocidental do Pacífico e no sudeste da Ásia. As Américas representam 0,3% da prevalência global e o país de maior número de casos é o Haiti,

seguido pela República Dominicana, Guiana Inglesa e pelo Brasil. A figura 1 representa graficamente os países que necessitam de quimioterapia profilática para o tratamento da filariose linfática.

Figura 1 – Proporção da população global que necessitam de tratamento para filariose linfática.



Fonte: WHO, 2010.

No Brasil, inquérito nacional realizado na década de 1950 mostrou transmissão autóctone em 11 cidades: Manaus (AM), Belém (PA), São Luis (MA), Recife (PE), Maceió (AL), Salvador e Castro Alves (BA), Florianópolis, São Jose da Ponta Grossa e Barra de Laguna (SC) e Porto Alegre (RS) (MEDEIROS, et. al., 2003; BONFIM, et. al. 2003).

Em 2010, no Brasil, a parasitose apresenta distribuição urbana e nitidamente focal, sendo detectada transmissão ativa somente em Recife e cidades de sua região metropolitana, Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista (DREYER, et. al., 2010).

A região metropolitana do Recife, em Pernambuco, Nordeste do país, tem índices de microfilaremicos variando de 2% ate 15%, em comunidades de baixo nível socioeconômico. A população desses quatro municípios é estimada em 2.600.000 habitantes considerando-se a população em risco de adquirir a infecção, a residente em áreas de baixo nível socioeconômico sendo 1.600.000 a população da área endêmica de FL

e estimados em 30.000 o número de microfilarêmicos dados obtidos no ano de 2010 (DREYER, et. al., 2010).

Belém do Pará (Região Norte) e Maceió (Região Nordeste), cidades que até recentemente também eram focos ativos no Brasil já demonstram a interrupção da transmissão da parasitose por dados atuais (BRASIL, 2009, DREYER, et. al., 2009).

A freqüência de parasitados é significativamente maior em jovens do sexo masculino, sendo o pico de microfilarêmicos na população de 20 a 40 anos de idade. A prevalência da infecção aumenta durante a infância e tende a se estabilizar no início da fase adulta (MATTOS & DREYER, 2008; BRASIL, 2009).

A detecção de crianças parasitadas é um forte indício de que ainda está ocorrendo transmissão em uma área, assim como, a ocorrência de morbidade filarial em adultos acima de 30 anos pode estar relacionada à transmissão em períodos anteriores (DREYER, et. al., 2010; JUNGMANN, FIGUEREDO-SILVA, DREYER, 1992).

A maioria dos microfilarêmicos não tem sintomatologia aparente, porém funcionam como fonte de infecção e, do ponto de vista epidemiológico, necessitam de atenção para evitar a dispersão da parasitose (BRASIL, 2009; JUNGMANN, FIGUEREDO-SILVA, DREYER, 1991).

O desenvolvimento de metodologias de diagnóstico individual e de tratamento em massa tem proporcionado a Organização Mundial de Saúde (OMS) executar o programa de erradicação global da FL. Em 1993, a Força Tarefa da OMS para erradicação de doenças elegeu a FL como uma das seis doenças potencialmente elimináveis. Em maio de 1997, a Assembléia Mundial de Saúde consolidou essa resolução, anunciando a eliminação global da filariose como um problema de saúde pública (DREYER, COELHO, 1997). Sendo neste mesmo ano estabelecido pela OMS que o controle da FL seria baseado em dois focos: a interrupção do tratamento e o controle da morbidade (DREYER et al., 2010).

No ano de 2000 foi estabelecida estratégia de combate mundial à FL intitulada Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL), como uma resposta à Resolução de 1997 da Assembléia Mundial de Saúde que considerou essa doença um problema de saúde pública mundial de possível eliminação. As estratégias do programa, para atingir esses objetivos, fundamentaram-se em dois pilares: interrupção da transmissão,

através do tratamento em massa, e controle da morbidade da doença (DREYER, ADDISS, 2000).

Metodologia

Para a realização deste estudo foi efetuado um levantamento bibliográfico que consiste em análise e descrição bibliográfica de livros, monografias, dissertações e teses, artigos e cartilhas de informação que demonstram a situação da FL.

A revisão de artigos cinetíficos foi realizada através da consulta a Biblioteca Virtual de Saúde (*http://regional.bvsalud.org/php/index.php*) e a biblioteca dos Periódicos CAPES, considerado como critério inicial para seleção. Optou-se por estas bases de dados por serem um elo de acesso para pesquisa no MedLine, PubMed e Lilacs que são as principais fontes de publicações científicas na atualidade e, a partir de seu sistema de busca, utilizou-se as palavras-chave: Filariose, Filariose Linfática, tratamento em massa, e os nomes dos respectivos fármacos utilizados no tratamento da enfermidade.

Critérios de Inclusão

Após a leitura inicial foram aplicados os critérios de inclusão aos artigos levantados a princípio. Os critérios de inclusão foram: o artigo ser publicado em periódicos indexados à base de dados que fossem relevantes, independentemente do tempo, o que contribuiria com um histórico da doença; ter utilizado como descritores os termos "Filariose Linfática"; e abordar questões relativas às características das enfermidades e ao tratamento medicamentoso utilizando.

Realizou-se leitura cuidadosa de todos os artigos selecionados, incluindo, neste estudo, publicações de órgãos oficiais sobre distribuição e frequência das enfermidades, assim como outros artigos originais restritos ou não ao intervalo pré-estabelecido de seleção dos demais, em decorrência de seu valor como referência histórica e/ou sua relevância no contexto apresentado.

Critérios de Exclusão

Foram utilizados como critérios de exclusão os artigos que não abordavam questões relativas às enfermidades e ao tratamento da Filariose Linfática, como estudos de caso ou

reações fisiológicas inesperadas, por não ser o objetivo deste trabalho discutir a cerca de eventos isolados.

Resultados e Discussão

Com a aplicação desses critérios de inclusão identificou-se 1082 artigos que abordam diferentes questões acerca dos assuntos mencionados em diferentes períodos. Inicialmente, foram selecionados 147 artigos publicados em diversas línguas sobre o referente assunto em intervalos de publicação diferentes, os que correspondem ao histórico clínico da doença entre 1988 a 2012, e as demais informações, mais atualizadas coletadas de trabalhos que compreendem a década de 90 até os dias atuais. Após a leitura inicial dos títulos e resumos, artigos científicos publicados em diferentes periódicos que abordam a temática da filariose linfática e seus tratamentos 63 artigos foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

TRATAMENTO DA FL

O tratamento antifilarial individual está indicado em todos os indivíduos com evidências de infecção ativa – presença de vermes adultos e microfilárias – independente de apresentarem ou não qualquer manifestação clínica da doença (DREYER et al., 2002). Nas áreas endêmicas para FL existem essencialmente duas modalidades de tratamento: o seletivo e o tratamento em massa ou coletivo. No tratamento coletivo, os indivíduos são examinados e constatada a infecção são tratados juntamente com toda a comunidade.

O programa de controle e eliminação da FL tem como objetivo eliminá-la até 2020. Para que isso ocorra a Organização Mundial de Saúde tem como meta tratar 1.1 bilhão de indivíduos vivendo nas áreas endêmicas até 2020 (OLIVEIRA-MENEZES et. al., 2010). Com a disponibilidade de novas ferramentas diagnósticas, identificando a infecção com a *W. bancrofti*, é imperativo, o quanto antes o tratamento com a droga específica, evitando a progressão dos danos linfáticos (DREYER, ADDISS, 2000).

Outra abordagem terapêutica, envolvendo tratamento coletivo, é a utilização do sal (cloreto de sódio) medicado com a dietilcarbamazina (DEC), numa concentração que pode

variar de 0,1 a 0,6% (DREYER et al., 1995; WHO, 2012). Esta alternativa foi utilizada pela primeira vez em Recife por Hawking e Marques (1967). Varias áreas endêmicas do mundo têm utilizado esta forma de tratamento, principalmente a China e Tanzânia (ANDRADE, 1995), apresentando pleno sucesso no controle da infecção causada pela FL. O tratamento na filaríase linfática bancroftiana, no seu espectro mais amplo, visa à cura da infecção do indivíduo, a interrupção da transmissão comunitária e a resolução ou minimização das repercussões clínicas desta infecção (AMARAL et al., 1994).

Para tanto, o arsenal terapêutico disponível inclui drogas macrofilaricidas (ação contra os vermes adultos) e/ou microfilaricidas (ação contra as microfilárias), intervenções clínicas sobre a morbidade da doença e medidas de caráter sócio-ambiental auxiliares no controle da transmissão. A droga de escolha é a dietilcarbamazina (DEC), que é derivada da piperazina, e tem sido indicada para o tratamento da filariose bancroftiana há mais de cinqüenta anos, tanto individual quanto para o tratamento em massa, por ter a vantagem de ser micro e macrofilaricida (DREYER, NORÕES, 1997; DREYER et al., 1995).

TRATAMENTO INDIVIDUAL

Dietilcarbamazina

Sintetizada como 1-diethylcarbamyl-4-methylpiperazine, em 1947, a DEC é um derivado da piperazina produzida sob a forma de citrato (sal, devido sua instabilidade térmica) possuindo diferentes denominações, de acordo com a indústria farmacêutica que a comercializa. A DEC é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, atingindo concentração plasmática máxima entre 1 a 2 horas após a ingestão oral, bastente solúvel em meios aquosos não se concentra em nenhum órgão específico, não havendo acumulação da mesma no organismo mesmo após longos períodos de tratamento. A excreção da DEC é basicamente renal, com tempo de meia vida sanguíneo a depender do pH urinário (DREYER, NORÕES, 1997).

A DEC possui uma potente ação microfilaricida, porém o seu efeito sobre o verme adulto é parcial, podendo existir até mesmo vermes refratários às ações deste fármaco. Apesar dos mecanismos de ação da DEC ainda serem desconhecidos, alguns estudos

sugerem que a ação da DEC pode ser mediada pelas plaquetas, as quais parecem induzir uma reação inflamatória através da liberação de histamina (NORÕES et al., 1997).

Através do uso da ultrassonografia, foi possível definir a existência de ninhos de vermes com subpopulações sensíveis e outras que não respondiam ao tratamento com a DEC. Isso acontece mesmo quando se administram doses tão altas quanto 12 mg/kg de peso corporal, por um período de até 30 dias e até o momento, não se tem explicação exata para esse mecanismo de falha. Assim, a cura parasitológica de um dado indivíduo está na dependência da sensibilidade dos vermes à droga e, desse modo, não é possível antever a resposta terapêutica em cada indivíduo (NORÕES et al., 2003; MATTOS, DREYER, 2008).

O esquema clássico recomendado pela OMS para o tratamento individual dos microfilarêmicos é o de 6 mg/kg de peso por doze dias. No caso da eosinofilia pulmonar tropical (EPT), ele deve ser prolongado por até 30 dias (Dreyer et al., 1996). É oportuno ressaltar que essa síndrome pode levar o paciente a óbito pelo desenvolvimento de fibrose intersticial pulmonar. Dessa forma, existindo dúvidas quanto ao diagnóstico diferencial em relação a outras síndromes pulmonares eosinofílicas, o teste terapêutico com a DEC se faz imperativo (COUTINHO et al., 1998). É importante frisar que corticoesteróides não estão indicados para o tratamento de EPT, por reduzirem o efeito microfilaricida da DEC e por proporcionarem uma melhora passageira com agravamento posterior do quadro clínico (DREYER et al., 2001).

O efeito macrofilaricida da DEC é dose-independente, a partir de 6 mg/kg, em uma administração única. Portanto, se o tratamento individual objetiva a morte do verme adulto, ele poderá ser feito com a dose única acima recomendada. Até o momento, as tentativas de repetição do tratamento a cada 6 ou 12 meses, por até 4 anos, têm falhado quanto ao propósito de eliminar os vermes adultos que anteriormente foram refratários à ação da DEC, por isso o tratamento deve ser monitorado e mantido pelo menos por 4 a 6 ciclos anuais. Por outro lado, o efeito microfilaricida da DEC em curto prazo é dose dependente. Assim, nos portadores de hematúria filarial, o tratamento de 12 dias deve ser repetido tantas vezes quantas forem necessárias para levar ao desaparecimento de microfilárias circulantes (NEVES et al., 2001 ; DREYER, NORÕES, 1997; OLIVEIRA-MENEZES, et al., 2010).

A DEC não deve ser administrada em mulheres grávidas (apesar de não existirem relatos na literatura de teratogênese em seres humanos) nem durante o primeiro mês de lactação, devido a não comprovação clínica de segurança. Normalmente, pode ser administrada em crianças após o segundo ano de vida, não existindo uma idade limite que impeça a sua utilização em idosos. Porém, há possibilidade do aparecimento de reações adversas sistêmicas nos microfilarêmicos idosos, com outras doenças associadas, tais como cardiopatias ou pneumonopatias (COUTINHO et al, 1998; MEDEIROS, DREYER, 1996).

A DEC, apesar de bem tolerada, pode produzir reações adversas como, sonolência, náusea, febre, cefaléia, artralgia, linfangites, linfadenites, orquite, epididimite, dentre outras. Essas reações podem ser devido a dois fatores: à toxicidade química da droga, que está relacionada à quantidade de dose ingerida, ou reação decorrente da morte do parasita, microfilária ou a forma adulta (DREYER & NORÕES, 1997).

Ivermectina

Descoberta em 1970, a ivermectina (IVC) (22, 23 - diidroavermectina) produzida pelo actinomiceto *Streptomyces avermitilis*, pertence ao grupo das avermectinas (classe das lactonas com 16 membros), sendo um análogo semi-sintético da avermectina B_1 e usada como parasiticida. Esta droga funciona como agonista do ácido gama-aminobutírico (GABA), estimulando a liberação pré-sináptica do mesmo, aumentando sua ligação com os receptores pós-sinápticos. Com isso, abrem-se os canais de cloro e aumenta-se a sua condução intracelular, permitindo a hiperpolarização da membrana neuronal, causando paralisia do tipo flácida e eliminando o parasito. Os efeitos adversos da droga dependem de sua dosagem, porém ela é bem tolerada em seres humanos. (MEDEIROS et al., 2008, TRACY, WEBSTER, 2002, HORVAT et al., 2011).

A IVC imobiliza os organismos atacados por meio da indução de paralisia tônica da musculatura, causando este efeito devido à ação do glutamanto com os canais de cloro abertos. Apesar da sua lipossolubilidade, apresenta-se como um fármaco seguro, devido há uma bomba de efluxo de glicoproteina P na barreira hematencefálica, impedindo a entrada da IVC no sistema nervoso central. (TRACY, WEBSTER, 2002; COUTINHO et al., 1994).

A IVC é o fármaco mais seguro para lugares onde a FL pode coexistir com loiase ou oncocercose, presente em regiões do Haiti, Suriname, Guyana e Costa Rica. Após longos

estudos, desde a década de 80, em 1998 a indústria farmacêutica Merck Sharp and Dohme® - em conjunto com a OMS, faz uma doação deste medicamento aos países africanos que se enquadram neste caso, já que hoje, estima-se que haja ainda cerca de 300 milhões de africanos que residem em regiões em risco de FL (PROGRAMA MECTIZAN, 2011).

Albendazol

O albendazol é um fármaco bem aceito pelo organismo, sendo indicado no tratamento de várias doenças ectoparasitárias, porém, para o tratamento de FL geralmente é usado em única dose (400 mg), e também combinado com outro anti-helmínticos (BIOLCHINI, 2005; DREYER et al., 2006).

É um fármaco do gênero do mebendazol, sendo um carbamato de benzimidazol com potencial atividade nematocidal e cestocida, sendo metabolizada rapidamente pelo fígado e tendo como metabólito principal, o sulfóxido de albendazol, o qual mantém a atividade anti-helmíntica. As reações adversas são raras, porém com o uso contínuo e prolongado pode causar doença hepática, leucopenia e alopecia, não deve ser utilizado nos primeiros três meses por apresentar propriedades teratogênicas. Há a formação de enantiômeros (+) e (-) do sulfóxido de albendazol, porém em humanos o enantiômero (+) é encontrado em concentrações plasmáticas muito mais elevadas e excretado muito mais lentamento que na forma (-) (TRACY, WEBSTER, 2002; HORVAT et al., 2011).

TRATAMENTO EM MASSA

No ano de 2000 foi estabelecida estratégia de combate mundial à FL intitulada Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL), como uma resposta à Resolução de 1997 da Assembléia Mundial de Saúde que considerou essa doença um problema de saúde pública mundial de possível eliminação. As estratégias do programa, para atingir esses objetivos, fundamentaram-se em dois pilares: interrupção da transmissão, através do tratamento em massa, e controle da morbidade da doença (DREYER et al., 1996; DREYER; ADDISS, NORÕES, 2005).

A interrupção da transmissão deve ser orientada para a população sob risco e visa reduzir a carga filarial na comunidade. A disponibilidade de novos esquemas terapêuticos

empregados em regime de dose única anual possibilitou associação efetiva e segura de drogas por um período prolongado de quarenta e oito a oitenta e dois meses (FIGUEREDO-SILVA et.al., 2010).

Os diversos países endêmicos, que aderiram ao programa, optaram por diferentes alternativas de tratamento em função de suas realidades epidemiológicas (FIGUEREDO-SILVA et.al., 1996; OMS, 2012).

Como o índice de resistência ao tratamento individual é grande, mesmo com a associação dos fármacos supracitados, a OMS recomenda desde 2000, em que o Programa para Eliminação Global da Filariose Linfática foi lançado, um tratamento em massa da população (Mass Drug Administration - MDA) com doses individuais ou combinadas dos fármacos: citrato de DEC, IVC e ALB (BABU et al., 2006).

O tratamento em massa da população residente em áreas endêmicas tem como objetivo interromper a transmissão do vírus e erradicação das microfilárias, pois a eficiência dos fármacos utilizados é insatisfatória para eliminar as microfilárias. Porém, estudos demonstram que seis repetições de tratamento em massa da população são capazes de erradicar a microfilaremia em regiões endêmicas (RAMAIAH et al., 2007). Entretanto deve-se ter cuidado, já que o tratamento em massa exclui o exame parasitológico, não tem como saber qual parasito o indivíduo é portador e se ele é portador (DREYER, COELHO, 1997; DREYER et al., 1996).

Citrato de Dietilcarbamazina isolado

A dose única de 6 mg/kg de citrato de DEC é tão efetiva para matar o verme adulto de *W. bancrofti* e provocar supressão da microfilaremia a longo prazo (12 meses), quanto a dose de 6 mg/kg por 12 dias, classicamente recomendada pela OMS (FONTES et al., 2005).

O uso da DEC no sal convencional de cozinha (0,2 - 0,4% por peso da base) é uma boa medida adjuvante na interrupção da transmissão. Essa estratégia foi capaz de consolidar a interrupção da transmissão na China. Estão sendo realizados outros estudos para avaliar a eficácia dessa metodologia em outros países, quer isoladamente, quer complementando-se os ciclos anuais de tratamento supracitados (TRACY, WEBSTER,

2002; DREYER et al., 1995). Em 1997, em Belém e Recife, a DEC era um medicamento indispensável em kits para postos de saúde (BARRAGAT, 1998).

Vários estudos de casos são relatados na literatura que evidenciam os efeitos colaterais deste tratamento, normalmente são resultados da eliminação das filarias e microfilárias, dentre eles BABU e colaboradores em 2006 descreve os efeitos adversos observados em tratamento em massa com DEC realizado em 6 distritos da Índia nos anos de 2002 a 2004, como: náuseas, vômitos, dor de cabeça, febre, giddness e diarréia, os mais relevantes; foi possível observar também que os efeitos adversos decaem de 45 a menos de 10 % em freqüência do primeiro ao quinto dia após ingestão do medicamento (DREYER, DREYER, 2000).

Ivermectina isolada

Apesar da IVC não ser o fármaco de primeira escolha, tem sido utilizada há muitos anos no tratamento de administração em massa da população na África, mostrando eficácia, segurança e poucos efeitos adversos (HEUKELBACH, OLIVEIRA, FELDMEIER, 2003), porém a IVC é um medicamento de alto custo, utilizado devido doação da indústria farmacêutica Merck Sharp and Dohme®. Estudos indicaram que doses anuais únicas de IVC (400 µg/kg de peso), sendo utilizado desde 1987, são eficazes e seguras (DREYER, COELHO, 1997).

A dose única de IVC com 400 µg/kg de peso é, inclusive, mais eficaz que a DEC para suprimir a microfilaremia a curto prazo (até 6 meses) (DREYER, COELHO, 1997; ANVISA, 2012; SUPALI et al., 2008).

Albendazol isolado

Provoca alterações degenerativas nas células do parasita por ligação aos sítios de tubulina sensíveis a colchicina, ocasionando inibição da polimerização ou junção nos microtúbulos. A perda dos microtúbulos citoplasmáticos prejudica a captação de glicose da larva e dos estágios adultos do verme, levando à depleção dos estoques de glicogênio. Mudanças degenerativas em retículo endoplasmático e mitocôndrias e subseqüente liberação de lisozimas resultam na diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP), que fornece a energia necessária à sobrevivência do parasita. Com a diminuição da

produção de energia, o parasita fica imobilizado e, conseqüentemente, morre. De forma secundária, ALB ainda inibe a fumarato redutase, na presença de pequenas quantidades da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), sendo esta a coenzima envolvida em muitos processos de reação de oxidação e redução que ocorrem na célula e utilizado no tratamento de filariose em combinação com outros anti-helmínticos (ANVISA, 2012).

Associação citrato de DEC + IVC

A combinação da DEC com a IVC pode, também, aumentar a supressão da microfilaremia a curto e em longo prazo. Com a administração anual de DEC + IVC em programas de tratamento em massa, há uma redução da prevalência de microfilaremia na população humana, assim como do índice de infectividade dos mosquitos vetores (COUTINHO et al., 1994; ANDRADE et al., 1995; CHANSIRI et al., 2005 RAMAIAH et al., 2007).

A associação citrato de DEC + IVC já foi utilizada em estudos-piloto no Sri Lanka, Haiti, Índia, Polinésia e no Brasil, um estudo-piloto em militares da região metropolitana do Recife (MEDEIROS et al., 1999). Já que a IVC é um potente microfilaricida, em complementação ao citrato de DEC, que tem potente ação macrofilaricida, fato que ocorre frente a diferentes espécies dos causadores da filariose linfática (COUTINHO et al., 1994; CHANSIRI et al., 2005).

Associação IVC + ALB

Adicionalmente ao clearence da microfilaremia, o largo espectro anti-helmíntico da IVC e do ALB é um ponto atrativo para os programas de tratamento em massa. Evidências mais recentes indicam que uma dose anual única de IVC (200 - 400 µg/kg) e uma dose anual única de ALB (400 mg) são ainda mais eficazes no controle da filaríase linfática que quaisquer desses fármacos isoladamente. O período de tratamento é de cerca de 4-6 anos e baseia-se na fecundidade estimada dos vermes adultos (TRACY, WEBSTER, 2002, DREYER et al., 2006, BELIZARIO, 2003).

Na África, onde pode existir a infecção por Onchocerca ou por Loa Loa, com exceção do Egito, o risco potencial de reações adversas severas com o uso da DEC torna

impossível sua distribuição nas regiões endêmicas de bancroftose. Nessas áreas, a co-administração de IVC e ALB é o tratamento de escolha (TRACY, WEBSTER, 2002). Para as drogas mencionadas e para as suas diversas combinações, o nível de cobertura populacional e a duração do tratamento requerido para interromper a transmissão não foram ainda estabelecidos de forma precisa nas áreas endêmicas com diferentes espécies de vetores e com diferentes prevalências de microfilaremia. Porém, estima-se um período que pode variar de 5 a 10 anos, exceto para o sal fortificado com DEC, para o qual ainda não está estabelecido o tempo máximo de tratamento (DREYER et al., 1995; DREYER et al., 1996).

Associação DEC + ALB

Na Samoa Americana, pequena ilha situada no pacífico sul, pertencente aos Estados Unidos da América (EUA) a prevalência da microfiralemia foi reduzida de 11,5% da população para 0,95% em 5 anos de tratamento em massa da DEC em associação ao ALB (RIZZO et al., 2007). A dose de 400 mg de ALB administrada por via oral adicionada à dose de 400 mg de DEC ainda é uma escolha mais adequada para a quimioterapia em massa (TRACY, WEBSTER, 2002; DREYER, MEDEIROS, 1990; DREYER et al., 2006).

O controle do vetor, quando possível, pode ajudar a interrupção da transmissão, além de proporcionar uma melhor adesão das comunidades aos programas de controle (OLIVEIRA-MENEZES et al., 2010; LIANG et al., 2008).

CUSTOS

A doença clínica é um duro encargo social e econômico para os seus portadores e para o Estado. Estima-se que em 2005 existiu um número global de 40 milhões de portadores das duas formas mais prevalente da doença, a hidrocele e o linfedema (WHO, 2005). Há cerca de 16 milhões de portadores de linfedema, e a Índia, sozinha, seria responsável por mais de 7 milhões de indivíduos, atualmente. Entre os portadores de linfedema de todos os países endêmicos não há qualquer dado sobre quanto esse número representaria de portadores de elefantíase (DREYER et al., 2009; MEDEIROS et al., 2003).

A endemia se instala nas comunidades de forma lenta e silenciosa e, muitas vezes, mantém os casos mais deformantes escondidos em suas casas e afastados do sistema de detecção da saúde pública local. Como não é uma doença letal, em muitos dos países endêmicos, a FL não lidera a atenção da mídia nem das políticas públicas, como o fazem doenças com alta mortalidade, como a malária, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e a desnutrição. Por outro lado, ela traduz, para os portadores das formas crônicas, um custo individual importante ainda não devidamente contabilizado e que interfere negativamente na qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares, devido à marginalidade dos portadores da doença, pois ainda há a necessidade de avaliar os custos de médicos-sociais (psicólogos), já que não é levado em consideração o aspecto emocional destes pacientes que são excluídos e negligenciados (MACIEL, FURTADO, MARZOCHI, 1999; DREYER et al., 2009).

A maioria dos países endêmicos não possui evidências bem documentadas das perdas de produção nas economias local e individual ou familiar, nem dos custos governamentais. No entanto, nos últimos anos, observa-se uma maior preocupação em se quantificar o impacto sociocultural da doença, o que fortalece a caracterização da filariose como um problema de saúde pública, de acordo com a Assembléia Mundial da Saúde, em 1997. Ainda assim, existe uma importante subestimação do problema, devido, inicialmente, à falta de dados atualizados das prevalências reais das principais formas crônicas na grande maioria das áreas endêmicas. O último trabalho que aborda o assunto, e de forma global, foi publicado há uma década (MATTOS & DREYER, 2008).

Então, a escolha pelo tratamento ideal se faz necessária, já que viu-se que a prevenção se torna inviável, pois seriam necessários em torno de US$ 70.60 por habitante, para esgoto sanitário, e US$ 38.50 por habitante, para melhorias sanitárias, tornando um programa oneroso (MACIEL, FURTADO, MARZOCHI, 1999; MATTOS & DREYER, 2008).

CONCLUSÃO

Devido à disponibilidade de novas estratégias de controle e tratamento da doença, pode-se constatar que a filariose pode ser erradicada sem trazer conseqüências agravantes

ao paciente, se o mesmo receber tratamento adequado. Com isso evidenciou-se que o melhor tratamento isolado ainda é fazendo-se do uso da dietilcarbamazina, porém em lugares que coexista oncorcecose, o melhor fármaco é a ivermectina, se o portador apresentar tolerância a essas drogas, ainda pode-se utilizar o ALB. Quanto a áreas endêmicas, o melhor tratamento em massa se faz da combinação dos seguintes fármacos, DEC e IVC, pois a DEC possui efeito microfilaricida e macrofilaricida, porém seu efeito macrofilaricida não é tão eficaz, entretanto a forma infectante da doença é o verme jovem, com isso a junção à droga IVC, tornando-o o tratamento mais eficaz e seguro, sendo comprovado através da diminuição significativa da prevalência das microfilárias e infectividade dos mosquitos vetores nos programas utilizados pela OMS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, F.; DREYER, G.; FIGUEREDO-SILVA, J.; NORÕES, J.; CAVALCANTI, A.; SAMICO, S. C.; SANTOS, A.; COUTINHO, A. Live Adult Worms Detected By Ultrasonography In Human Bancroftian Filariasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Estados Unidos, v. 50, n. 6, p. 753-757, 1994.

ANDRADE, L.; MEDEIROS, Z.; PIRES, M. L.; PIMENTEL, A.; ROCHA, A.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COUTINHO, A.; DREYER, G. Comparative Efficacy Of Three Different Diethylcarbamazine Regimens In Lymphatic Filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, p. 319-321, 1995.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Banco de Dados de Medicamentos (2001) Disponível em:<http:/www.anvisa.gov.br/medicamentos/base>, 2012.

BABU, B.V.; RATH, K.; KERKETTA, A.S.; SWAIN, B.K.; MISHRA, S.; KAR, S.K.. Adverse reactions following mass drug administration during the Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis in Orissa State, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.100, p. 464-469, 2006.

BELIZARIO, V.Y.; AMARILLO, M.E; DE LEON, W.U.; DE LOS REYES, A.E.; BUGAYONG, M.G.; MACATANGAY, B.J.C. A comparison of the efficacy of single doses of albendazole, ivermectin, and diethylcarbamazine alone or in combinations against Ascaris and Trichuris spp. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 81, n. 1, 2003.

BIOLCHINI, C. de L. Enteroparasitoses na infância e na adolescência. *Adolescência & Saúde*, v. 2 , n. 1, p., 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica e eliminação da filariose linfática / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. –80 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos), Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

CHANSIRI, G.; KHAWSAK, P.; PHANTANA, S.; SARATAPHAN, N.; CHANSIRI, K. The efficacy of a single-oral-dose administration of ivermectin and diethylcarbamazine on the treatment of feline *Brugia malayi*. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, v. 36, n. 5, p. 1105 – 1109, 2005.

COUTINHO, A.; MEDEIROS, Z.; DREYER, G. História da Filariose Linfática em Pernambuco - I. Aspectos Epidemiológicos e de Controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 29, n. 6, p. 607-612, 1996.

COUTINHO, A.; ROCHA, A.; MEDEIROS, Z. ; DREYER, G. Eosinofilia Pulmonar Tropical Filariótica e o seu Diagnóstico Diferencial. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, v. 53, n. 1, p. 42-51, 1998.

COUTINHO, A. D.; DREYER, G.; MEDEIROS, Z.; LOPES, E.; MACHADO, G. ; GALDINO, E.; RIZZO, J. A.; ANDRADE, L. D.; ROCHA, A.; MOURA, I.; GODOY, J.; OTTESEN, E. A. Ivermectin Treatment Of Bancroftian Filariasis In Recife, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 50, n. 3, p. 339-348, 1994.

DREYER, G.; ADDISS, D. Hope Clubs: new strategy for lymphatic filariasis endemic areas. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 8, n. 1, p. 8, 2000.

DREYER, G.; ADDISS, D.; NORÕES, J. Does Longevity of Adult Wuchereria bancrofti Increase with Decreasing Intensity of Parasite Transmission? Insights from Clinical Observations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 99, p. 883-892, 2005.

DREYER, G.; ADDISS, D.; NORÕES, J.; AMARAL, F.; ROCHA, A.; COUTINHO, A. Ultranosogaphic Assessment Of The Adulticidal Efficacy Of Repeat High-Dose Ivermectin In Bancroftian Filariasis. *Tropical Medicine and International Health*, v. 1, n. 4, p. 427-432, 1996.

DREYER, G.; ADDISS, D. ; ROBERTS, J. ; NORÕES, J. Progression of lymphatic vessel dilatation in the presence of living adult Wuchereria bancrofti. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, n. 2, p. 157-161, 2002.

DREYER, G.; ADDISS, D.; WILLIAMSON, J.; NORÕES, J. Efficacy of co-administered diethylcarbamazine and albendazole against adult Wuchereria bancrofti. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, p. 1118-1125, 2006.

DREYER, G.; AMARAL, F.; NORÕES, J. ; MEDEIROS, Z. ; ADDISS, D. A New Tool To Assess The Adulticidal Efficacy In Vivo Of Antifilarial Drugs For Bancroftian Filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, p. 225-226, 1995.

DREYER, G; BRANDÃO, A. C.; AMARAL, F.; MEDEIROS, Z.; ADDISS, D. Detection By Ultrasound Of Living Adult Wuchereria bancrofti In The Female Breast. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 1, p. 95-96, 1996.

DREYER, G.; COELHO, G. Filariose linfática: doença potencialmente eliminável. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 13, n. 3, p. 537-543, 1997.

DREYER, G.; COUTINHO, A.; ALBUQUERQUE, R. Manisfestações clínicas da filariose linfática bancroftiana. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 35, n. 5, p. 189-196, 1989.

DREYER, G.; DREYER, P. Bases para o tratamento da morbidade em áreas endêmicas de filariose bancroftiana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n. 2, p. 217-221, 2000.

DREYER, G.; DREYER, P.; NORÕES, J. Recomendações para o tratamento da filariose bancroftiana, na infecção e na doença. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 1, p. 43-50, 2002.

DREYER, G.; LOUIS-CHARLES, J.; ROBERTS, J.; LECONTE, F.; WENDT, J. M.; MILORD, M.D.; LAMMIE, P. J. Feasibility and effectiveness of basic lymphedema management in leogane, haiti, an area endemic for Bancroftian Filariasis. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 4, p. e668, 2010.

DREYER, G.; MATTOS, D. A prevenção da elefantíase em áreas endêmicas de bancroftose: realidade ou utopia?. *Prática Hospitalar*, v. Ano IX, p. 94-96, 2007a.

DREYER, G.; MATTOS, D. Perspectives of elephantiasis in an endemic area of Brazil. *Journal of Lymphoedema*, v. 2, p. 24-31, 2007b.

DREYER, G.; MATTOS, D.; FIGUEREDO-SILVA, J.; NORÕES, J. Mudanças de paradigmas na filariose bancroftiana. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 55, p. 355-362, 2009.

DREYER, G.; MATTOS, D.; LINS, R.; FRAIHA, H. Myiasis in a bancroftian filariasis endemic area. *Journal of Lymphoedema*, v. 3, p. 10-16, 2008.

DREYER, G.; MEDEIROS, Z. Filariose Linfática: Ainda Um Desafio. *Ciência Hoje*, v. 12, n. 68, p. 6-7, 1990.

DREYER, G.; NORÕES, J. Dietilcarbamazina No Tratamento da Filariose Bancroftiana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 3, p. 229-240, 1997.

DREYER, G.; ROCHA, A.; RIBEIRO, M. E.; NORÕES, J.; ADDISS, D. O Teste de Og4C3 No Diagnóstico da Filariose Bancroftiana: Uso e Limitações. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, v. 41, n. 1, p. 43-47, 1996.

DREYER, G.; NORÕES, J.; AMARAL, F.; NEN, A.; MEDEIROS, Z. ; COUTINHO, A.; ADDISS, D. Direct Assessment Of The Adulticidal Efficacy Of a Single Dose Of Ivermectin In Bancrofti Filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, p. 441-443, 1995.

FIGUEREDO-SILVA, J.; CAVALCANTI, C.; MONTENEGRO, L.T.; NORÕES, J.; DREYER, G. Diethylcarbamazine and non-diethylcarbamazine related bancroftian granuloma: an immunohistochemical study of eosinophil toxic proteins. *International Journal of Biomedical Science*, v. 6, p. 111-119, 2010.

GURGEL, C. B. F. M.; CARNEIRO, F.; COUTINHO, E. Ciência no século XIX: a Contribuição brasileira para a descoberta do agente etiológico da filariose linfática. *Revista de Patologia Tropical*, v. 39, n. 4, p. 251-259, 2010.

HEUKELBACH, J.; OLIVEIRA, F. A. S. de; FELDMEIER, H.. Ectoparasitoses e saúde pública no Brasil: desafios para controle. *Cad. Saúde Pública*, v. 19, n.5, p.1535-1540, 2003.

HORVAT, A.J.M.; PETROVIC´, M.; BABIC´, S.; PAVLOVIC´, D.M.; AS˘PERGER, D.; PELKO, S.; MANCE, A.D.; KAS˘TELAN-MACAN, M.. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trends in Analytical Chemistry (in press)*, 2011.

JUNGMANN, P.; FIGUEREDO-SILVA, J.; DREYER, G. Bancroftian Lymphangitis In Northeastern Brazil: A Histopathological Study Of 17 Cases. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, p. 114-118, 1992.

JUNGMANN, P.; FIGUEREDO-SILVA, J.; DREYER, G. Bancroftian Lymphadenophathy: A Histopathologic Study Of Fifth-Eight Cases From Northeastern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 45, n. 3, p. 325-331, 1991.

LIANG, J. L.; KING, J.D.; ICHIMORI, K.; HANDZEL, T.; PA'AU, M.; LAMMIE, P.J. Impact of Five Annual Rounds of Mass Drug Administration with Diethylcarbamazine and Albendazole on Wuchereria bancrofti Infection in American Samoa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 78, n. 6, p. 924–928, 2008.

MACIEL, A.; FURTADO, A.F.; MARZOCHI, K.B. Perspectivas da municipalização do controle da filariose linfática na região metropolitana do Recife. *Caderno de Saúde Pública*, v.15, n.1, p. 195-203, 1999.

MARCHETTI, F.; PIESSENS, W. F.; MEDEIROS, Z.; DREYER, G. Abnormalities of the leg lymphatics are not specific for bancroftian filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n. 6, p. 650-652, 1998.

MATTOS, D.; DREYER, G. A filariose bancroftiana: uma perspectiva psicossocial e política para os profissionais da saúde. *Revista Panamericana de Infectología*, v. 8, p. 35-39, 2006.

MATTOS, D.; DREYER, G. A complexidade do custo socioeconômico da filariose linfática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 399-403, 2008.

MEDEIROS, J. P.; ESTEVÃO, L. R. M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SANTOS, J. M.; SIMÕES, R. S.; SIMÕES, M. de J.; EVÊNCIO-NETO, J. Efeito da ivermectina sobre a ciclicidade, gestação e desenvolvimento neonatal em ratos. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.,* v. 45, n. 6, p. 472-480, 2008.

MEDEIROS, Z.; DREYER, G.; ANDRADE, L. D.; PIRES, M. L.; MENDES, J.; PIMENTEL, R. Wuchereria bancrofti Microfilarial Density Of Autochthonous Cases And Natural Culex Infectivity Rates In Northeast Brazil. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, p. 214-217, 1992.

MEDEIROS, Z.; GOMES, J.; BÉLIZ, F.; COUTINHO, A.; DREYER, P. ; DREYER, G. Screening of army soldiers for Wuchereria bancrofti infection in the metropolitan Recife region, Brazil: implications for epidemiological surveillance. *Tropical Medicine and International Health*, v. 4, n. 7, p. 499-505, 1999.

MEDEIROS, Z.; MENEZES, J. A.; CESSE, E. P.; LESSA, F. Controle da filariose linfática no Brasil, 1951 – 2000. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*; v. 12, n. 2, p. 77 – 86, 2003.

NEVES, J. M. L.; NARDI, N. B.; ANDRADE, L.; DREYER, G. In Vitro Differentiation Of Wuchereria bancrofti (Filariidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, n. 10, p. 1011-1016, 1991.

NORÕES, J.; DREYER, G.; SANTOS, A.; MENDES, V. G.; MEDEIROS, Z.; ADDISS, D. Assessment of the efficacy of diethylcarbamazine on adult Wuchereria bancrofti in vivo. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, n. 1, p. 78-81, 1997.

OLIVEIRA-MENEZES, A.; NORÕES, J.; DREYER, G.; LANFREDI, R.M. Ultrastructural analysis of Wuchereria bancrofti (Nematoda: Filarioidea) body wall. Micron (Oxford. 1993), v. 41, p. 526-531, 2010.

PROGRAMA MECTIZAN, "Uma história de sucesso no combate à cegueira dos rios", Jornal Nacional Diário, seção Nacional, Diário de notícias, suplemento especial, tireagem: 54.326, (3840792), Faxinforme, p. 12-14, 2011.

RAMAIAH, K.D.; DAS, P.K.; VANAMAIL, P.; PANI, S.P.. Impact of 10 years of diethylcarbamazine and ivermectin mass administration on infection and transmission of lymphatic filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, p. 555-563, 2007.

REGIS, L.; FURTADO, A. F.; OLIVEIRA, C. M. F. de; BEZERRA, C. B.; SILVA, L. R. F. da; ARAÚJO, J.; MACIEL, A.; SILVA-FILHA, M. H. ; SILVA, S. B.. Controle integrado do vetor da filariose com participação comunitária, em uma área urbana do Recife, Brasil. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, v. 12, n.4, p.473-482, 1996.

RIZZO, J.A.; BELO, C.; LINS, R.; DREYER, G. Children and adolescents infected with Wuchereria bancrofti in Greater Recife, Brazil: a randomized, year-long clinical trial of single treatments with diethylcarbamazine or diethylcarbamazine-albendazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology,* v. 101, p. 423-433, 2007.

ROCHA, A.; ADDISS, D. ; RIBEIRO, M. E. ; NORÕES, J. ; BALIZA, M. ; MEDEIROS, Z.; DREYER, G. . Evaluation Of The Og4C3 Elisa In Wuchereria bancrofti Infections: Infected Persons With Undetectable Or Ultra-Low Microfilarial Densities. TM & IH. *Tropical Medicine and International Health*, v. 1, n. 6, p. 859-864, 1996.

ROCHA, A.; ÁYRES, C. J.; FURTADO, A. Abordagem molecular no diagnostico laboratorial da filaria linfática: Wuchereria bancrofti. *Revista de Patologia Tropical*, v. 31, n. 2, p.161-174, 2002.

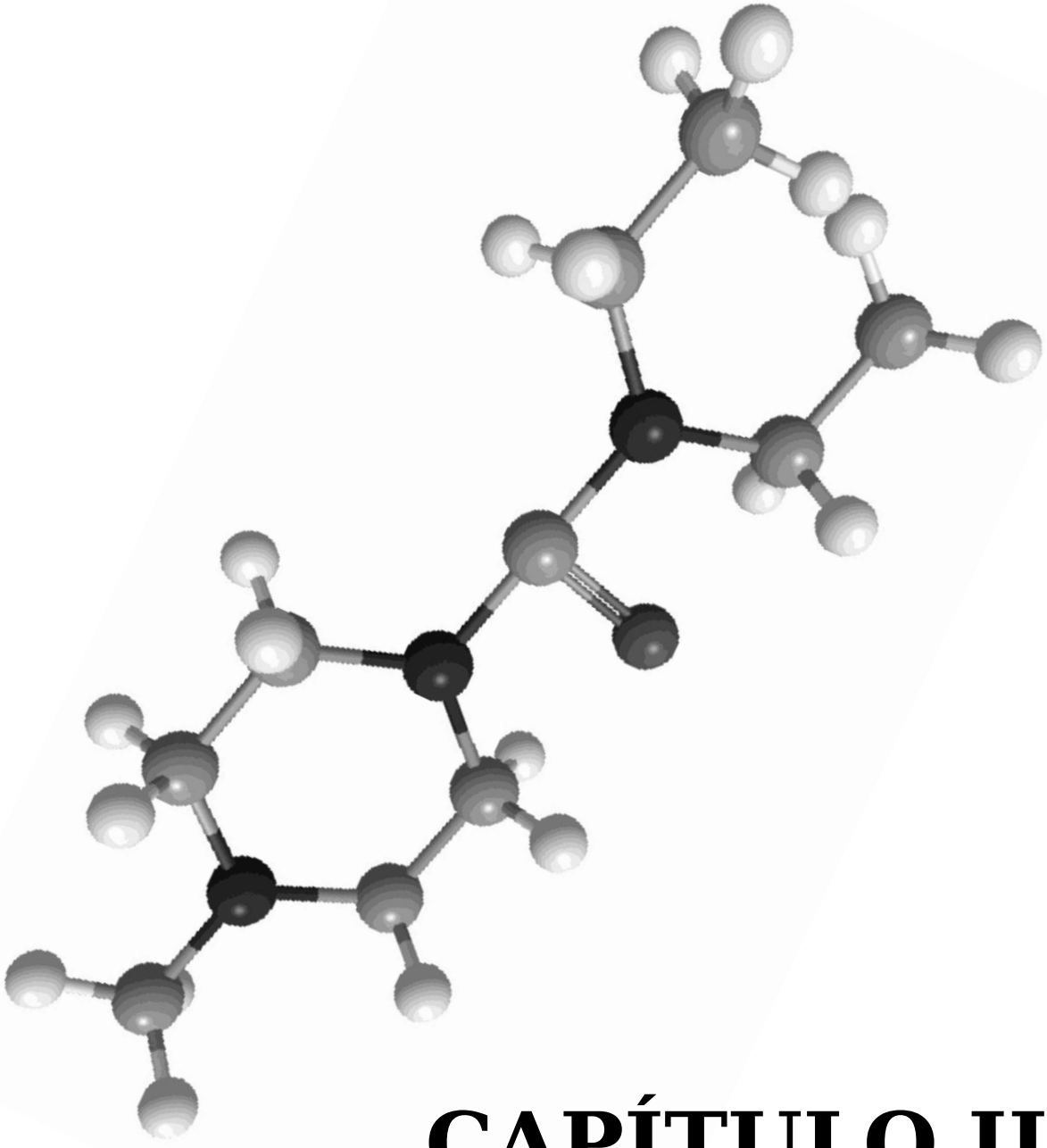
SILVÉRIO, E. de C.; URBINATTI, P. R.. Presença de mosquitos (Diptera: Culicidae) em piscinões na zona leste de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 4, p.504-507, 2011.

SOUZA, W.; SOUTO-PADRÓN, T.; DREYER, G.; ANDRADE, L. D. Wuchereria Bancrofti: Freeze-Fracture Study Of The Epicuticle Of Microfilariae. *Experimental Parasitology*, v. 76, p. 287-292, 1993.

SUPALI, T.; DJUARDI, Y.; PFARR, K.M.; WIBOWO, H.; TAYLOR, M.J.; HOERAUF, A. Doxycycline treatment of *Brugia malayi*-infected persons reduces microfilaremia and adverse reactions after diethylcarbamazine and albendazole treatment. *Clin Infect Dis.*; v. 46, p. 1385-93, 2008.

TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Fármacos usados na quimioterapia das helmintíases. Harrison Medicina Interim, 15" ed., McGraw-Hill. Rio de Janeiro, 2002.

World Health Organization. Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. Wkly Epidemiol Rec. 2005;80:202-12. Disponível em: http://www.who.int/wer/2005/wer8023.pdf.



CAPÍTULO II

4 CAPÍTULO II: Citrato de dietilcarbamazina (DEC)

Artigo 2 - CARACTERIZAÇÃO DO ANTIPARASITÁRIO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA: UMA ABORDAGEM *QUALITY BY DESIGN* (QbD*)* DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Artigo submetido ao Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences – B3 (Qualis CAPES)

RESUMO

O conceito *Quality by Design (QbD)* na área farmacêutica é uma abordagem pró-ativa para o desenvolvimento farmacêutico. A primeira etapa desse processo é a coleta de dados físico-químicos do fármaco, com excipientes fazendo parte do estudo de pré-formulação. O citrato de dietilcarbamazina (DEC) é o fármaco de escolha no tratamento da filariose linfática. O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo detalhado das propriedades da DEC, através de múltiplos ensaios. Perfis térmicos, difratométricos, químicos, morfológicos e reológicos foram obtidos. O espectro de absorção na região do Infravermelho confirmou a estrutura química do citrato de DEC. As micrografias e a difração de raios-X evidenciaram a morfologia e a cristalinidade do fármaco, respectivamente. O estudo de solubilidade confirmou a alta solubilidade em água. A análise térmica forneceu informações importantes sobre temperatura de fusão e degradação do fármaco, e a cinética de degradação não-isotérmica revelou valores de energia de ativação, fator de freqüência e ordem da reação. As propriedades de fluxo proporcionaram uma melhor compreensão do comportamento da matéria-prima. Esses resultados são essenciais para padronizar e estabelecer condições nas quais o citrato de DEC é estável.

Palavras-Chave: *Quality by Design,* citrato de dietilcarbamazina, pré-formulação, propriedades físico-químicas.

ABSTRACT

Pharmaceutical Quality by Design (QbD) is a proactive approach to pharmaceutical development. The first phase is the physic-chemical data collection on drug substances, which is known as preformulation. Diethylcarbamazine (DEC) citrate is used in the treatment of lymphatic filariasis, The aim of this work was provide a detailed study of the

properties of DEC citrate using multiple assays. Thermal, diffractometric, morphological, chemical and rheological drug profiles were obtained. The Infrared spectrum confirmed the chemical structure of DEC citrate. The emicrographs and X-ray diffraction analysis showed the morphology and cristallinity of the drug, respectively. The solubility study confirmed its enormous solubility in water. The thermal analysis provided important information about melting and degradation temperatures, and non-isothermal kinetics revealed values of activation energy, frequency factor and order of reaction. The flow properties provided a better understanding of the behavior of the raw material. The results are essential for standardizing and establishing the conditions which DEC citrate is stable.

Keywords: Quality by Design, diethylcarbamazine citrate, preformulation, physicochemical properties.

1 INTRODUÇÃO

O conceito Q*uality by Design* (QbD) na área farmacêutica é uma abordagem sistemática, científica e pró-ativa para o desenvolvimento farmacêutico, que começa com os objetivos pré-definidos que enfatiza os produtos, a compreensão dos processos e o controle do processo. A primeira fase do estudo é a coleta de dados das propriedades físico-químicas do fármaco, avaliando a possível formação de sal e os excipientes adequados, antes do início da formulação. Esta etapa é conhecida como pré-formulação (GOPINATH & NAIDU, 2011; YU, 2008).

Investigações sobre pré-formulação são projetadas para fornecer todos os dados necessários (especialmente físico-químicos, físico-mecânicos e propriedades biofarmacêutica do fármaco, excipientes e materiais de embalagem) que possam influenciar no desenvolvimento da formulação, no processo de produção, na farmacocinética, nas propriedades biofarmacêutica do produtofinal e na embalagem, de acondicionamento escolhida (GOPINATH & NAIDU, 2011; SOARES-SOBRINHO et al., 2010).

A dietilcarbamazina (DEC) é um dos principais compostos farmacêuticos utilizados no tratamento da filariose linfática (FL), uma doença aparasitáriacrônica, endêmica em regiões tropicais como Ásia, África e America Central e do Sul, sendo o fármaco mais

antigo utilizado no tratamento e o de primeira escolha (BRASIL, 2009; DREYER, DREYER & NORÕES, 2002; WEAVER et al., 2011).

A dietilcarbamazina é um derivado da piperazina, de fórmula molecular $C_{10}H_{21}N_3O$ sintetizada inicialmente como 1-dietilcarbamil-4-metilpiperazina, comercializada, desde o início da década de 50, como sal citrato e fosfato. O citrato de DEC é visto a olho nu como um pó branco, facilmente solúvel em água, devendo ser armazenado longe de fontes luminosas, bem como livre de contato com o ar (BURKOT & ICHIMORI, 2002; USP, 2007; BRITISH PHARMACOPEIA, 2009).

A preferência da aplicação do sal em medicamentos deve-se principalmente por ser estável em condições ambientes e por diminuir consideravelmente ou até mesmo eliminar efeitos colaterias associados à sua utilização. Porém, por ser um sal, as suas propriedades físico-químicas podem abranger séries muitos maiores do que as séries limitadas do fármaco puro (PEREIRA et al., 2005; SILVA et al., 2010; KASIM et al., 2004).

Para desenvolver um medicamento eficaz e seguro é preciso ter amplo conhecimento das propriedades físicas e químicas do fármaco (princípio ativo) e dos excipientes. Dessa forma, durante o desenvolvimento de formas farmacêuticas, a caracterização do princípio ativo deve ser o primeiro passo no delineamento do medicamento, de modo que as informações obtidas por meio desta prática possibilitem uma abordagem racional ao desenvolvimento da mesma. Fatores como o conhecimento das diferentes formas polimórficas, impurezas, tamanhos e morfologia dos cristais, devem possibilitar o controle adequado do material em questão (NERY et al., 2008; SOARES-SOBRINHO et al., 2010; HUANGA & TONGB, 2005).

A caracterização físico-química do fármaco pode ser realizada através de diversas técnicas analíticas, que em geral, são especificadas na monografia de cada fármaco disponível em farmacopéia. Apesar disso, podem-se adotar outras técnicas de caracterização, além das frequentemente adotadas para a obtenção de um arquivo mais completo sobre o fármaco. Dentre elas pode-se citar a análise térmica; determinações de tamanho, forma, porosidade e área superficial das partículas; propriedades de fluxo, atrito e deformação, técnicas espectrométricas como ultravioleta e infravermelho com transformada de Fourier; difração de raios-X; avaliação da dissolução intrínseca, higroscopicidade, dentre outros (NERY et al., 2008; SOARES-SOBRINHO et al., 2010).

O conhecimento destas características é ainda mais relevante quando se trata de fármacos que apresentam polimorfismo e baixa estabilidade diante de exposição à luz, como a DEC de acordo com Silva em 2010. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização da DEC, fornecendo conhecimentos básicos e complementares aos da literatura, necessários ao desenvolvimento racional de formulações estáveis e eficazes.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Material

O citrato de DEC foi sintetizado e doado pela Nortec Quimica®, lote 010276. Foram utilizados os solventes: éter etílico (Dinâmica®), diclorometano (Dinâmica®), acetona (Dinâmica®), acetato de etila (Dinâmica®), álcool etílico (Vetec®), álcool metílico (Dinâmica®), n-hexano (Cinética®), ácido clorídrico (Dinâmica®), peróxido de hidrogênio (Dinâmica®), hidróxido de sódio (Vetec®) e acetonitrila (Carlo Erba®).

2.2 Métodos

2.2.1 Descrição, tamanho de partícula e análise morfológica

A matéria prima foi visualizada a olho nu, para verificação do aspecto e cor. A avaliação da morfologia dos cristais da DEC foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando-se um microscópio Jeol® JSM-5900, após serem fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 15 min (Metalizador Baltec® SCD 050). As eletromicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15 kV.

A determinação da distribuição do tamanho das partículas foi verificada através de tamisação utilizando tamises padronizados e superpostos em ordem decrescente de tamanho de poros (44, 90, 150, 250, 500 e 600 µm), montados em uma base com vibração magnética (Tamizador Bertel®). Uma amostra de 25 g foi colocada no tamis superior e o conjunto foi submetido a tamisação por 15 min. O ensaio foi realizado em triplicata.

2.2.2 Área superficial e tamanho de poros

Para a realização deste ensaio, foi utilizado um Analisador de Área Superficial e Tamanho de Poros–ASAP 2420 Micrometrics®, munido de software próprio para determinar a área superficial (S_{BET}) e porosidade (tamanho de poro e volume total de poros) pelo método Barret-Joyner-Halenda (BJH).

Uma amostra de aproximadamente 200 mg do fármaco foi transferida para o tubo de amostra, para remover qualquer material adsorvido no interior dos poros e na superfície do material, durante 48h a 100°C.

A adsorção física progressiva de nitrogênio a -198°C sobre o material, e subseqüente dessorção deu origem as isotermas adsorção/dessorção, aplicando-se os modelos apropriados para o ajuste dos pontos experimentais. A aplicação do modelo de BET sobre a porção apropriada da curva forneceu o valor da área superficial (de BET e de Langmuir).

2.2.3 Propriedades de Fluxo

A densidade foi determinada através de ensaio com 10 g da amostra em um compactador automático (Tap Density, Varian®) provido de uma proveta normatizada, em triplicata. O volume inicial ocupado pelo produto foi medido, e posteriormente foram realizadas 10 compactações para acomodação do pó. Em seguida, foram realizadas 1250 compactações, que foram repetidas em seguida, para confirmação da manutenção do volume. A relação entre a massa das amostras e o volume ocupado pelo pó antes e após a compactação determinou as densidades aparente (d_{AP}) e de compactação (d_{CP}). A compressibilidade do pó foi avaliada através do Índice de Hausner (IH) e o Índice de Carr (IC) de acordo com as seguintes equações: $IH = d_{CP}/d_{AP}$ e $IC\ (\%) = (d_{CP}-d_{AP})/d_{CP} \times 100$, respectivamente (ALVES et al., 2008; SHUSSELE, 2003).

O ângulo de repouso foi medido pelo cone de pó formado através do escoamento do fármaco através de um funil de dimensões padronizadas sobre uma superfície plana. O ângulo formado entre o cone e a superfície foi medido com auxílio de um transferidor. O tempo de escoamento foi determinado pela medida do tempo necessário para o escoamento de uma quantidade pré-definida de fármaco através do funil, utilizando-se um cronômetro digital (ALVES et al., 2008; SHUSSELE, 2003).

2.2.4 Ensaio de Solubilidade semi-quatitativo

O ensaio de solubilidade semi-quantitativo do citrato de DEC foi realizado segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª Edição. Para o estudo, pesou-se 1 g do fármaco, e foram utilizados os solventes água, éter etílico, diclorometano, acetona, acetato de etila, álcool etílico, álcool metílico, n-hexano, acetonitrila, solução de HCl 0,2 M, solução de NaOH 0,2 M e solução de H_2O_2 3%.

2.2.5 Difração de raios-X (DR-X)

O difratograma do fármaco foi obtido no difratômetro SIEMENS® (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com ânodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo 2θ de 2-60 a uma velocidade de varredura de 0,02º 2θ/s. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

2.2.6 Espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho e Ultraioleta (UV)

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 16 varreduras. Os espectros foram obtidos de 4000 a 650 cm^{-1} na resolução de 4 cm^{-1}.

Para a obtenção da varredura por espectrofotometria na região UV utilizou-se espectrofotômetro da marca SHIMADZU® UV-2401 PC equipado com detector ultravioleta e cubetas de quartzo de seção transversal de 1 cm^2.

2.2.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em Calorímetro Exploratório Diferencial Shimadzu® DSC-60 interligado ao software Shimadzu® TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 50 $mL.min^{-1}$ e diferentes razões aquecimento foram testadas (5, 10 e 15°C.min^{-1}), na faixa de temperatura de 25 - 300°C. As amostras foram colocadas em porta amostra de alumínio

hermeticamente fechados com massas de 1, 2 e 5 mg (± 0,2) de fármaco. Para o cálculo da pureza utilizou-se uma amostra de 2 mg em uma razão de aquecimento de 2°C.min$^{-1.}$ As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

2.2.8 Termogravimetria (TG)

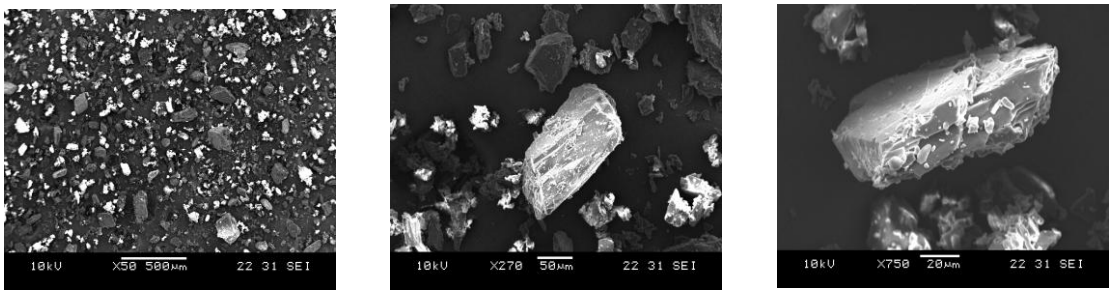
A caracterização termoanalítica através de TG foi realizada em duplicata por meio de termobalança Shimadzu®, modelo TGA Q60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min^{-1}, sendo a massa da amostra de cerca de 5 mg (± 0,4) de DEC, acondicionadas em cadinho de alumina na faixa de temperatura de 25 - 600°C na razão de aquecimento de 10ºC.min^{-1}. Antes dos ensaios, o equipamento foi verificado com amostra padrão de oxalato de cálcio monoidratado para verificação das variações de temperatura e massa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Descrição, tamanho de partícula e análise morfológica

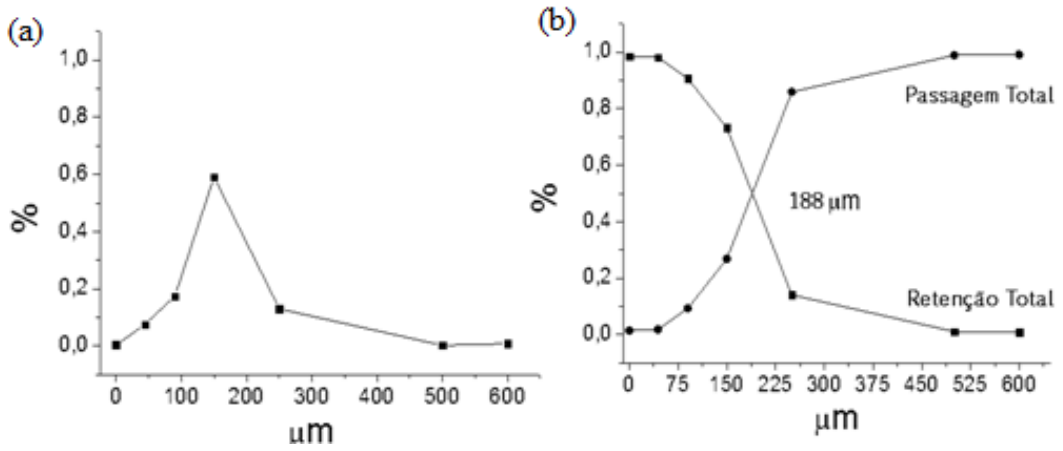
O citrato de DEC apresentou-se como um pó branco e leve, com tendência a formar aglomerados, atendendo a especificação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). As eletromicrografias do citrato de DEC matéria prima estão apresentadas na Figura 1, comprovando sua estrutura cristalina, apesar de, aparentemente, não apresentar estrutura definida nem uniforme.

Figura 1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do citrato de DEC.



A partir da distribuição granulométrica realizada pode-se observar que matéria prima utilizada para o estudo apresenta prevalência de suas partículas distribuídas no intervalo entre 150 e 250 µm (Figura 2). Diante desses resultados, realizou-se uma avaliação da retenção em relação à passagem das partículas nos intervalos avaliados. Nessa avaliação observou-se que o tamanho médio das partículas é de aproximadamente 188 µm (Figura 2). Portanto, de acordo com a Farmacopéia Brasileira, podemos classificar a matéria prima utilizada como um pó semifino, visto que mais de 40% do fármaco passa pela malha de 180 µm de acordo com o gráfico da Curva de Gauss.

Figura 2 - Repartição granulométrica (a) e tamanho médio de partícula do citrato de DEC (b).



3.2 Área superficial e tamanho de poros

O formato da isoterma indica qual o tipo de porosidade da matéria prima. Várias formas de isotermas são conhecidas até hoje, porém, todas são variações de seis tipos principais.

De acordo com a classificação de Brunauer, a isoterma de adsorção/dessorção do citrato de DEC, que, se assemelha com o isoterma do tipo II, indica a ausência de histerese. Apesar disso não se pode afirmar que a ausência da histerese significa a ausência de

porosidade, já que alguns formatos de poro podem levar a processos iguais de adsorção e dessorção (WEBB, 1997).

Outro parâmetro bastante importante para o estudo de um insumo farmacêutico ativo é a distribuição de tamanhos de poro já que está intimamente relacionado à área total do sólido. As distribuições de tamanhos de poros são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados de área superficial e porosidade do citrato de DEC matéria-prima.

Amostra	**Área superficial**		**Diâmetro médio de poro (BET)**	
	BET	Langmuir	Unidade (Å)	Unidade (nm)
DEC	40,38 m²/g	589,56 m²/g	35,73	3,57

A classificação de tamanho de poros é especificada como a largura média, ou seja, a distância média entre duas paredes opostas, e segue recomendações da IUPAC, podendo ser classificada como sendo microporo (largura interna menor que 2 nm ou 20 Å); mesoporo (largura interna entre 2 nm e 50 nm ou 20 Å e 500 Å) ou macroporos (largura interna maior que 50 nm ou 500 Å) (COSTA et al., 2006; TEXEIRA, COUTINHO & GOMES, 2001).

A DEC apresenta diâmetro médio do poro de 35,73 Å, o equivalente a 3,57 nm o que pode ser indicativo da presença de microporos mais largos e principalmente de mesoporos/macroporos, o que facilita a entrada e saída do gás, sem aprisionamento, corroborando com o tipo da isoterma de adsorção/dessorção obtida (TEXEIRA, COUTINHO & GOMES, 2001).

Esses resultados corroboram ainda com o tamanho de partícula do citrato de DEC e com o resultado da área superficial, que apresentou um valor 40, 3784 m²/g, sendo considerdo intermediário. Portanto o tamanho médio de partícula (188 µm - semifino) é diretamente proporcional a área superficial e a classificação dos poros obtidos, com prevalência de meso e macroporos (COSTA et al., 2006).

3.3 Propriedades de fluxo

O estudo das propriedades de fluxo dos materiais é crucial no processo de fabricação de qualquer forma farmacêutica, uma vez que exerce influência na alimentação uniforme das máquinas e, também, nas propriedades físicas e mecânicas dos comprimidos (LIMA et al., 2006).

De acordo com os dados apresentados, observou-se a baixa densidade do citrato de DEC com densidade aparente de 0,45 g/ml e densidade compactada de 0,64 g/mL, conforme relatado na literatura. Por outro lado, o IC exprimiu de forma percentual a capacidade de compactação do pó analisado de 30,08%, onde valores acima de 21 % são considerados de baixo fluxo e compactação, conforme observado no citrato de DEC. Adicionalmente, o Índice de Hausner (1,4), similar ao IC, indicam que valores entre 1,25 e 1,5 exigem a adição de lubrificantes para melhorar o escoamento, enquanto que valores superiores indicam fluxo ruim, conforme apresentado (ALVES et al., 2008; SHUSSELE, 2003). O ângulo de repouso foi infinito para a matéria prima visto que o pó não obteve escoamento, ficando retido no funil.

Nota-se que a associação dos resultados obtidos no tamanho médio de partícula e porosidade da matéria prima apresentam coerência, visto que a prevalência de macroporos, ou seja, a existência de espaços largos entre as partículas, associado ao pó classificado como semifino, já revelam que possivelmente o fármaco apresentaria uma diferença significativa entre a densidade aparente e compactada, o que pôde ser comprovado experimentalmente.

Todos esses parâmetros da reologia do pó sugerem que a produção de formas farmacêuticas sólidas contendo citrato de DEC devem ser realizada através de granulação por via úmida, a qual promove melhoramento da reologia do pó, uniformização das partículas, dentre outros benefícios (AULTON, 2007).

Por outro lado, a presença de excipientes inteligentes atualmente disponíveis possibilita a sua compressão direta, visto que a dose unitária do comprimido é de 50 mg, não gerando um grande aporte de fármaco em escala industrial, diminuindo o custo da produção. Além disso, a compressão por via úmida pode gerar instabilidade do fármaco no momento da molhagem, causando tanto sua solubilização quanto mudança de estado

cristalino, o que pode prejudicar a qualidade do produto final (AULTON, 2007; LACHMAN, LIEBERMAN & KANIG, 2001).

3.4 Ensaio de Solubilidade

Como resultado do estudo de solubilidade, foi observado que o citrato de DEC é muito pouco solúvel em solventes orgânicos, com exceção apenas dos álcoois metílico e etílico, que são os que apresentam maior polaridade dentre os solventes escolhidos, como visto na Tabela 3.

Tabela 2 - Solubilidade do citrato de DEC, em diferentes solventes.

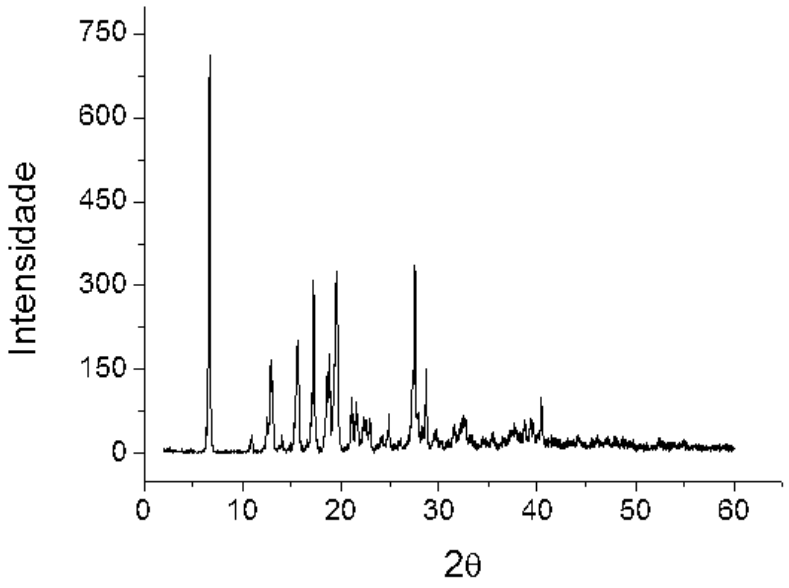
Solventes	**Volume Utilizado**	**Solubilidade**
Água	< 1 mL	Muito Solúvel
Éter etílico	>10 L	Praticamente insolúvel
Diclorometano	<10 L	Muito pouco solúvel
Acetona	<10 L	Muito pouco solúvel
Acetato de Etila	<10 L	Muito pouco solúvel
Alcool Etílico (Etanol)	<1000 mL	Pouco Solúvel
Álcool Metílico (Metanol)	< 100 mL	Ligeiramente Solúvel
N-Hexano	< 1000 mL	Pouco Solúvel
Acetonitrila	<1000 mL	Pouco Solúvel
Sol. HCl 0,2M	< 1 mL	Muito Solúvel
Sol. NaOH 0,2M	< 1 mL	Muito Solúvel
Sol H_2O_2 3%	< 1 mL	Muito Solúvel

Observada a sua alta solubilidade em água, deve-se analisar condições e pontos críticos durante a produção de formas farmacêuticas contendo citrato de DEC para que o fármaco mantenha-se íntegro e estável em locais de elevada umidade.

3.5 Difração de Raios-X

A presença de inúmeros picos ao longo do difratograma (Figura 3) indica que a amostra apresenta estrutura essencialmente cristalina, principalmente a 2θ em torno de 6,58°, sendo o pico mais intenso, podendo ser considerado pico característico do citrato de DEC. Além desse, apresenta outros picos secundários em 12,8°, 15,5°, 17,9°, e 27,5°.

Figura 3 - Difratograma do citrato de DEC.



3.6 Espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho e Ultravioleta (UV)

As técnicas espectrofotométricas estão fundamentadas na absorção da energia eletromagnética por moléculas que dependem tanto da concentração quanto da estrutura das mesmas. De acordo com o intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada, a espectrofotometria de absorção pode ser dividida em ultravioleta, visível e infravermelho, podendo ser utilizada como técnica de identificação e quantificação de substâncias (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

O espectro na região do IV do citrato de DEC (Figura 4) apresenta bandas características, principalmente com relação às bandas típicas de amidas e carbonilas

presentes no citrato (deformação das ligações C=O) bem como bandas típicas de interações intermoleculares, como pontes de hidrogênio.

As bandas referentes aos estiramentos das ligações C–H estão na região compreendida entre 3100 e 2500 cm^{-1}, que não são evidentes pela sobreposição de uma banda alargada referente a interações intermoleculares entre as ligações O–H dos grupamentos ácidos do citrato.

Deformações angulares dos grupamentos $–CH_3$ estão presentes em 1387 cm^{-1} e 1449 cm^{-1} para deformação simétrica e assimétrica, respectivamente.

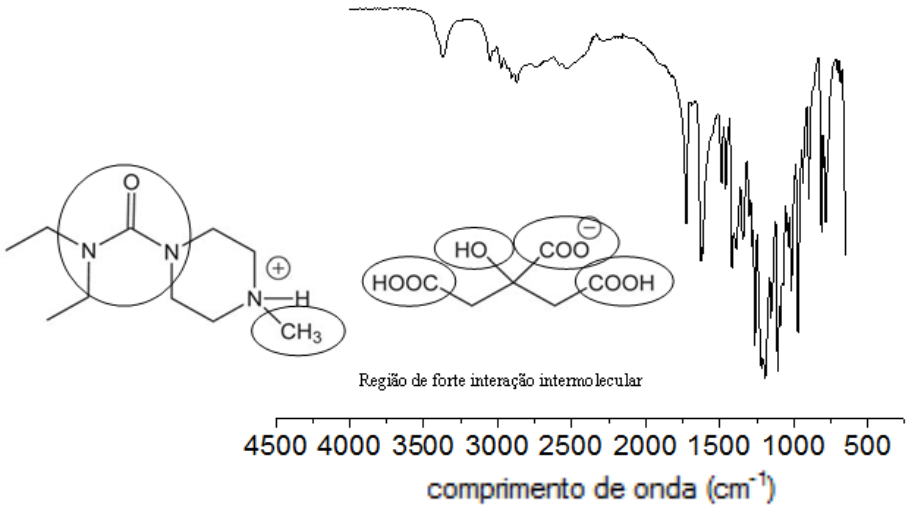
Os grupamentos $–CH_2–$ apresentaram deformação angular simétrica em 1487 cm^{-1} e deformação angular assimétrica em 784 cm^{-1}.

A banda referente à hidroxila do citrato em 3370 cm^{-1} não foi muito pronunciada sugerindo que esse grupamento não esteja fazendo parte de interações de hidrogênio, sendo as hidroxilas dos grupamentos ácidos do citrato bem mais evidentes.

A banda de deformação axial da carbonila referente a dietilcarbamazina encontra-se em 1627 cm^{-1}, um pouco abaixo do esperado devido à dupla substituição, com dois nitrogênios, os quais provocam efeito de ressonância responsável pelo aumento da ligação C=O. O espectro apresenta também bandas de carbonila referentes ao citrato, em 1726 cm^{-1}. Além dessas, a banda em 1193 cm^{-1} é atribuída a deformação axial da ligação C-N das aminas e as de 1418 cm^{-1} atribuída à deformação axial da ligação C-N das amidas.

A banda referente ao íon carboxilato (COO^-), que geralmente aparecem em torno de 1550 cm^{-1}, não foi bastante pronunciada, podendo ter havido sobreposição da banda referente a carbonila da amida, que encontra-se mais alargada. A presença de bandas de carbonila mais intensas que do ânion carboxilato confirma que dos três grupamentos ácidos do citrato, apenas um cedeu o próton para a base (CERVERA et al., 2011; GAMBERINI et al., 2007).

Figura 4 - Espectro de absorção na região do infravermelho da DEC e principais grupamentos do citrato de dietilcarbamazina.



A obtenção do perfil do citrato de DEC por espectrofotometria na região do Ultravioleta não foi possível visto que a sua estrutura molecular não apresenta grupamentos cromóforos, ou seja, ligações duplas suficientes para absorção de energia e conseqüente excitação de elétrons. O arranjo das ligações duplas torna singular cada estrutura molecular, gerando uma absorbância em determinado comprimento de onda na região compreendida entre aproximadamente 200 a 400 nm. A DEC apresenta absorbância em um comprimento de em 210 nm, o que não torna essa caracterização seletiva, visto que várias substâncias inclusive solventes orgânicos podem interferir na sua identificação.

3.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A determinação da pureza por DSC é explicada pela teoria da não linearidade, ou seja, a área onde normalmente é iniciado o evento é decorrente da fusão das impurezas, justificando um processo não linear, através da aplicação da equação de Van't Hoff. Utilizou-se uma razão de aquecimento de 2ºC.min^{-1} (2 mg), obtendo-se uma pureza de 99,99%. A curva DSC apresentou dois eventos endotérmicos, o primeiro relacionado com a fusão do composto e o segundo atribuído a degradação (Figura 5).

Vários fatores são importantes para se obter resultados reprodutíveis em experimentos com DSC como, por exemplo, massa de amostra e razão de aquecimento. [28] Dessa forma, para análise da interferência da massa foram obtidas curvas com amostras de 1, 2, e 5 mg para análise da intensidade do sinal. Não houve diferença quanto ao ponto de fusão obtido que foi de 140,60°C ± 0,54. Na análise da influência da razão de aquecimento, onde razões de 5, 10 e 15 ºC.min^{-1} foram avaliada. Além disso, foram avaliados dois tipos de amostra: citrato de DEC triturada e não triturada.

Todas as curvas DSC obtidas apresentaram dois eventos endotérmicos indicando fusão do fármaco e decomposição térmica, respectivamente. Os valores da temperatura inicial de fusão (T_i) pico de fusão e temperatura final de fusão (T_f) de todas as amostras estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Temperaturas iniciais de fusão (T_i), pico de fusão (T_{pico}), temperaturas finais de fusão (T_f) e valores de entalpia de todas as amostras analisadas, comparadas através de teste estatístico de análise de variância (ANOVA).

Amostra	**$T_{i\,(°C)}$**	**$T_{pico(°C)}$**	**$T_{f(°C)}$**	**ΔH (J/g^{-1})**	**ANOVA (T_{onset})**
$DEC_{1\ mg}$	137,9	140,1	143,2	-131,50	**$F_{critico} = 5,14$** **$F_{calculado} = 1,03$**
$DEC_{2\ mg}$	137,9	140,5	144,3	-122,40	
$DEC_{5\ mg}$	138	140,5	144,3	-137,66	
DEC_{Rz5}	137,4	140,2	142,6	-127,40	**$F_{critico} = 5,14$** **$F_{calculado} = 0,08$**
DEC_{Rz10}	137,9	140,5	144,3	-122,40	
DEC_{Rz15}	138,2	141,4	145,2	-189,50	
$DEC_{2\ mg/\ Rz10}$	137,9	140,5	144,0	-122,41	**$F_{critico} = 9,55$** **$F_{calculado} = 1,03$**
$DEC_{2\ mg/\ Rz10\ Triturada}$	137,6	140,0	143,6	-190,20	

Dentre as variáveis analisadas (massa, razões de aquecimento e preparação da amostra), foram realizados testes estatísticos de análise de variância *one-way*, onde foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa, uma vez que o F

calculado foi menor que o F crítico, evidenciando que os resultados são iguais, com 95% de confiança.

A dietilcarbamazina base, instável à temperatura ambiente, tem ponto de fusão em aproximadamente 47°C visto que isoladamente não apresenta interações intermoleculares fortes. Esse fato torna-se relevante principalmente quando é levado em consideração os países onde a doença é endêmica, os quais são de clima tropical, que, de acordo com a classificação de umidade e temperatura, são da Zona IV, ou seja quentes e úmidos . Dessa forma, a utilização do sal é preferível, pois possibilita a formação de um composto cristalino com temperatura de fusão mais elevada (±140°C), possibilitando a manipulação do fármaco na rotina industrial (SILVA et al., 2010; ICH, 2003).

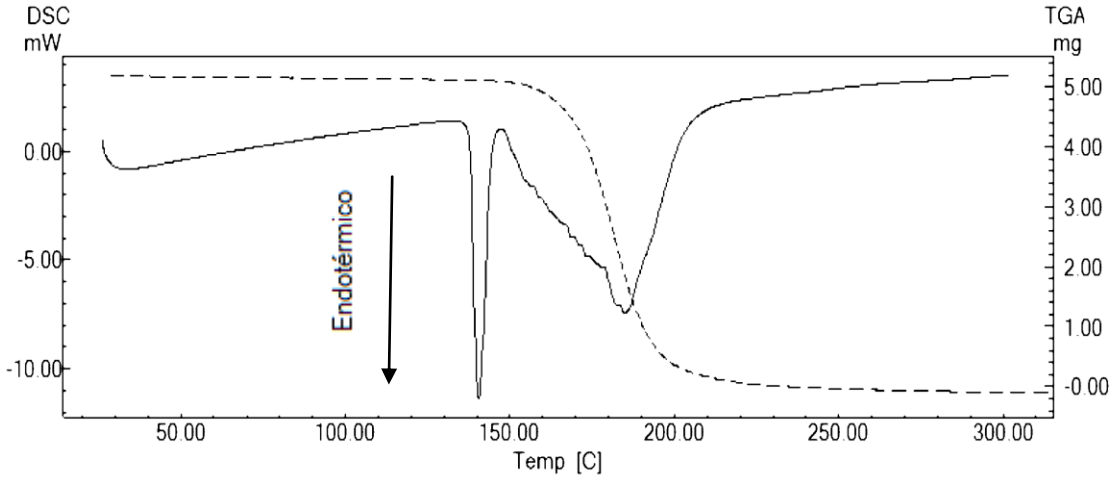
Por outro lado, ocasiona outro problema não menos importante que é a alta higroscopicidade. Essa propriedade pode ter efeitos profundos e geralmente prejudiciais nos processos físico-químicos de interesse das indústrias farmacêuticas uma vez que pode aumentar a tendência à formação de hidratos e polimorfos.

3.8 Termogravimetria (TG)

Na análise termogravimétrica, observou-se que a faixa de temperatura de degradação do fármaco ficou entre 173,33 e 194,34°C, apresentando apenas um evento principal de decomposição, e perda de massa de 94,27% (Figura 6). A análise do DTA confirma a curva DSC obtida, a qual revela a presença de dois eventos endotérmicos. Nota-se que o evento da degradação do fármaco é endotérmico, sendo atípico, porém confirmado pela primeira derivada da curva termogravimétrica.

Apesar das curvas obtidas terem apresentado evento único de decomposição, existe a possibilidade da existência de dois eventos sobrepostos dentro dessa faixa de temperatura: um relacionado à degradação do citrato, e um segundo relacionado a volatilização dietilcarbamazina base (SILVA et al., 2010; CERVERA et al., 2011). Dessa forma, percebe-se que a energia fornecida tem a capacidade de quebrar a ligação iônica existente, deixando livres os dois compostos. Pela proximidade das temperaturas de degradação do citrato e volatilização da DEC, não foi possível diferenciar os dois eventos, sendo caracterizado apenas como degradação do composto como um todo.

Figura 5 - Curvas de DSC (—) e TG (---) do citrato de DEC, na razão de aquecimento de 10°C.min^{-1}.

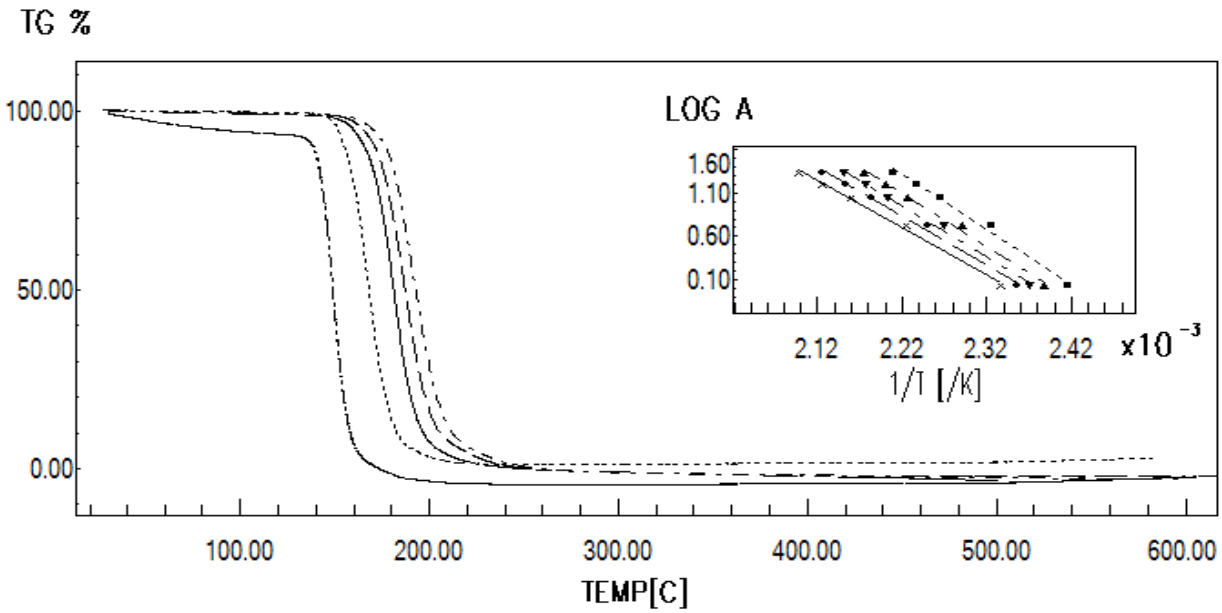


Os parâmetros cinéticos, Energia de ativação (Ea), o fato de frequência (A) e a ordem da reação (*n*) podem fornecer informações sobre o mecanismo e a taxa da reação de decomposição, condições de armazenamento, especialmente, prazo de validade (TITŢA et al, 2008; PIMENTE & ARBILLA, 1998).

O método não-isotérmico estabelecido por Ozawa é um método para determinar os parâmetros de Arrhenius em condições dinâmicas de razão de aquecimento. A energia de ativação (Ea) pode ser determinada a partir de um gráfico do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura, 1/T, desde que *f(*α) (fração descomposta de um sólido em função da temperatura) seja previamente conhecida.

O gráfico que representa as curvas termogravimétricas da DEC isolada em diferentes razões de aquecimento em conjunto com o gráfico de Ozawa (ln da razão de aquecimento em função de 1/T) esta representado na Figura 6, o qual demonstrou uma correlação evidente entre as 5 razões de aquecimento. A Ea calculada pelo método de Ozawa apresentou um valor de 107.62 KJ/mol, fator de freqüência (A) de 1.495 x 10^{12} min^{-1} ordem de reação de n=1.

Figura 6 - Curvas de TG do citrato de DEC obtidas a partir de razões de aquecimento crescentes (1,5,10,15 e 20°C/min) e associação com o gráfico de Ozawa.



4 CONCLUSÃO

As técnicas analíticas utilizadas permitiram um melhor conhecimento sobre a natureza físico-química do antiparasitário citrato de dietilcarbamazina, que ajudarão a fornecer subsídios para o estabelecimento de um perfil de qualidade detalhado a ser adotado no controle de qualidade de rotina para este fármaco e para formulações que o utilizem. Tais informações são imprescindíveis para a padronização e estabelecimento de condições de estabilidade desse fármaco.

5 AGRADECIMENTOS

A CAPES, a FACEPE e ao CNPq, pelo apoio a pesquisa; ao CETENE pela colaboração na realização da análise de área superficial e tamanho de poros, a Tarcila Gomes pela colaboração na realização da difração de raios-X e Sérgio dos Santos pela electromicrografias, ambos do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco. À Nortec Química® pela doação da matéria prima.

6 REFERENCIAS

ALVES, G.M.C.; ROLIM, L.A.; ROLIM-NETO, P.J.; LEITE, A.C.L.; BRONDANI, D.J.; MEDEIROS, F.P.M.; BIEBER, L.W.; MENDONÇA-JUNIOR, F.J.B. *Quim. Nova* **2008**, 31,*2*, 413.

AULTON, M. E.; *Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines,* 3rd ed., Elsevier: Oxford, 2007.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 849.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica e eliminação da filariose linfática. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRITISH PHARMACOPOEIA, HM Stationery Office: London, England, p. 1919, 2009.

CARR, R.; *Chem. Eng.* **1965**, *72*, 69.

CERVERA, M. F.; HEINÄMÄKI, J.; PAZ, N.; LÓPEZ, O.; MAUNU, S. L.; VIRTANEN, T.; HATANPÄÄ, T.; ANTIKAINEN, O.; NOGUEIRA, A.; FUNDORA, J.; YLIRUUSI, J.; *AAPS PharmSciTech*, **2011**, *2*, 637.

COSTA, A. C. F. M.; VILAR, M. A.; LIRA, H. L.; KIMINAMI, R. H. G. A.; GAMA, L.; *Cerâmica* **2006**, *52*, 255.

DREYER, G. ; DREYER, P. ; NORÕES, J. . Recomendações para o tratamento da filariose bancroftiana, na infecção e na doença. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 1, p. 43-50, 2002.

Farmacopeia Brasileira, 5ª ed., Atheneu: Rio de Janeiro, 2010.

GAMBERINI, M. C.; BARALDI, C.; TINTI, A.; PALAZZOLI, F.; V. FERIOLI, V.; *J. Mol. Struct.* **2007**, *840*, 29.

ICH, Q1A (R2) (2003). Stability testing of new drug substances and products, in: International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva,.

LACHMAN L.; LIEBERMAN H A.; KANIG JL. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LIMA, A. W. S. (2006) *Reações adversas ao tratamento em massa com dietilcarbamazina em populaçõs de áreas endêmicas de filariose linfática no Recife-PE*. Dissertação de mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.

MAXIMIANO, F.P.; COSTA, G.H.Y.; SOUZA, J.; CUNHA-FILHO, M.S. *Quim. Nova* **2010**, 33, *8*, 1714.

NERY, C. G. C.; PIRES, M.A.S.; PIANETTI, G.A.; VIANNA-SOARES, C.D. *Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 44, p. 61-73, 2008.

PEREIRA, A.; BICALHO, B.; LILLA, S.; DE NUCCI, G.; Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. *Química Nova*, v. 28, p. 107-11, 2005.

SCHUSSELE, A.; BAUER-BRANDL, A.; *Int. J. Pharm*. **2003**, *257*, 301.

SILVA, C. C. P.; MARTINS, F. T.; HONORATO, S. B.; BOECHAT, N.; ALEJANDRO P. AYALA, A. P.; JAVIER ELLENA, J.; *Cryst. Growth Des*. **2010**, *10*, 3095

SILVA, C.C.P. (2010). *Caracterização de estado sólido de insumos farmacêuticos ativos: clorpropamida, nevirapina e dietilcarbamazina.* Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil.

SOARES, M. F. L. R.(2011) *Desenvolvimento tecnológico de comprimido antirretroviral em associação dose fixa de zidovudina, lamivudina e efavirenz*. Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.D.L.R.; LOPES, P.Q.; CORREIRA, L.P. SOUA, F.S.; MACÊDO, R.O.; ROLIM-NET, P.J. A Preformulation Study of a New Medicine for Chagas Disease Treatment: Physicochemical Characterization, Thermal Stability, and Compatibility of Benznidazole. *AAPS PharmSciTech.*, v. 11, n. *3*, p. 1391-1396, 2010.(a)

SOARES-SOBRINHO, J. L.; LYRA, M.A.; ALVES, L.D.S.; ROLIM-NETO, P.J. Caracterização Físico-Química do Tripanomicida Benznidazol para o Desenvolvimento de Medicamentos *Lat. Am. J.Pharm*., v. 29, p. 803-807, 2010(b).

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 808.
USP, The United States Pharmacopeia 30 ed. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, Maryland, U.S.A, 2007.

VIEIRA, A. C. C. (2011**)** *Obtenção e caracterização de complexo de inclusão e sistema multicomponentes no incremento da solubilidade do efavirenz na terapia anti-hiv*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

WEAVER, A.; BROWN, P.; HUEY, S.; MAGALLON, M.; BOLLMA, E. B.; DOMINIQUE MARES, D.; STREIT, T. G.; MARYA LIEBERMAN, M.; *Neglec. Trop. Diseases* **2011**, *5*, e1005

WEBB, P. A.; ORR, C.; *Analytical Methods in Fine Particle Technology*; Micromeritics Instruments Corp.; Norcross,1997; p 24.

Artigo 3 - ESTUDO DE ESTABILIDADE E PRÉ-FORMULAÇÃO DO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA NO ESTADO SÓLIDO

Artigo Aceito no Journal of Thermal Analysis and Calorimetry – B1 (Qualis CAPES)
(comprovação em apêndice)

RESUMO

O citrato de dietilcarbamazina (DEC) é o principal fármaco utilizado no programa de combate à filariose linfática (FL). O objetivo desse estudo foi avaliar a estabilidade do citrato de DEC em misturas binárias (MB) 1:1 (p/p) com alguns excipientes, primeiramente, através de DSC, e posteriormente, após seleção de algumas MB com indício de interação, através de técnicas complementares: TG/DTG, FT-IR, difração de raios-X (DRX) e estudos de estabilidade seguidos de quantificação por CLAE. Das misturas analisadas por DSC, foram selecionadas as MB com Tabletose®, representando os excipientes que contém lactose, e as MB com polivinilpirrolidona (PVP) e estearato de magnésio (EMg). As análises complementares por FT-IR e DRX não apresentaram indício de interação nas MB. As curvas TG/DTG com a MB DEC/ Tabletose® não evidenciaram sinais de interação, ao contrário das curvas com PVP e EMg, corroborando com os resultados da cinética não-isotérmica, na qual as MB com PVP e EMg diminuíram a energia de ativação da reação. Os estudos de estabilidade realizados mostraram que o tempo influencia na estabilidade das MB, principalmente com o PVP que muitas vezes contem impurezas que degradam o fármaco. Dessa forma, os excipientes avaliados, principalmente o PVP e o EMg devem ser evitados.

Palavras-chave: Estabilidade térmica, Compatibilidade fármaco-excipiente, Análise térmica.

ABSTRACT

Diethylcarbamazine (DEC) is the main drug used in the treatment of lymphatic filariasis (LF). The objective of this study was to evaluate the stability of DEC in binary mixtures

(MB) 1:1 (w / w) with some excipients, first, by DSC, and later, after selecting some evidence of interaction in BM, using complementary techniques as TG / DTG, FT-IR, X-ray diffraction (XRD) and stability studies followed by quantification by HPLC. In the BM analyzed by DSC, it were selected those with Tabletose ®, representing the excipients containing lactose, the BM with PVP and MgS. The additional analysis by FT-IR and XRD showed no evidence of interaction in the BM. The curves of TG/DTG with the BM DEC / Tabletose® showed no signs of interaction, unlike the curves with PVP and MgS, confirming the results of non-isothermal kinetics, in which the BM with PVP and MgS decreased the activation energy of the reaction. Stability studies have shown that the period of storage influences the stability of BM, especially with PVP that often contains impurities that degrade the drug. Thus, the excipients evaluated, especially the PVP and MgS should be avoided.

Key-words: Thermal stability, Drug-excipient compatibility, Thermal analysis.

1 INTRODUÇÃO

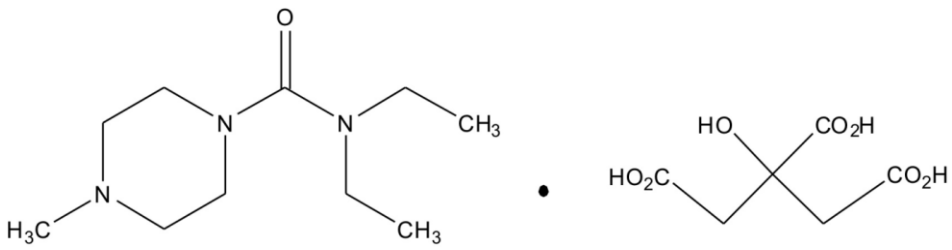
A filariose linfática (FL) é uma das principais causas de morbidade aguda e crônica que afeta a população de áreas tropicais e subtropicais da Ásia, África, Pacífico Ocidental e algumas regiões da América. É estimado que mais de 1,2 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco da doença e dos 120 milhões dos casos reais, 91% são causados pelo verme *Wuchereria bancrofti*. (BOCKARIE et al., 2009; RAMAIAH et al., 2007; SILVA et al., 2010).

O citrato de dietilcarbamazina (DEC) é o principal fármaco utilizado no programa de combate à FL. Apesar dos mecanismos de ação do fármaco ainda serem desconhecidos, alguns estudos sugerem que sua ação pode ser mediada pelas plaquetas, as quais parecem induzir uma reação inflamatória através da liberação de histamina (HOTI, et al., 2010; PALUMBO, 2008; RAMASAMY, et al., 2011).

A dietilcarbamazina, [N, N-dietil-4-Metilpiperazina-1-carboxamida], é um derivado da piperazina, sintetizado como um sal de citrato devido ao aumento da sua estabilidade em relação à base livre (Figura 1). É visto como um pó branco, facilmente solúvel em água

com peso molecular de 391,42 g/mol. (Farmacopéia Britânica, 2009; SILVA, et al., 2010; USP, 2011).

Figura 1 - Estrutura química do citrato de DEC.



O estudo de compatibilidade fármaco-excipiente representa uma fase importante no estudo de pré-formulação no desenvolvimento de formas farmacêuticas. De fato, potenciais interações físicas e químicas entre fármaco e excipientes podem afetar a natureza química, a estabilidade e biodisponibilidade dos fármacos e, conseqüentemente, sua eficácia (OLIVEIRA, et al., 2010; SOARES, et al., 2010; SOARES-SOBRINHO, et al., 2010; TIŢA, et al., 2011; VERMA, GARG, 2005; VIANA, et al., 2008).

A análise térmica é utilizada na indústria farmacêutica como um rápido e confiável método para estudar e prever a estabilidade farmacêutica, o controle de qualidade e para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (BERTOL, et al., 2010; OLIVEIRA, YOSHIDA, GOMES, 2011; SOARES, et al., 2010; VERMA, GARG, 2005; VIANA, et al., 2008).

Diferentes métodos são relatados em estudos de compatibilidade e estabilidade fármaco-excipiente. Entretanto, a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) tem se mostrado uma ferramenta importante no início de qualquer estudo de pré-formulação de qualquer forma farmacêutica no estado sólido possibilitando a obtenção de informações sobre as possíveis interações entre os componentes da formulação, de acordo com a mudança de aparência, desaparecimento dos picos endotérmico ou exotérmico e / ou variações nos valores de entalpia das correspondentes as curvas da mistura fármaco-excipiente (BRUNI, et al., 2010; BUCCI, MAGRI, MAGRI, 2000; OLIVEIRA, et al., 2010; TIŢA, et al., 2011; VERMA, GARG, 2005).

No entanto, a interpretação dos dados obtidos por DSC nem sempre é fácil, portanto, para evitar erros, o uso de outras técnicas como Termogravimetria (TG) espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), difração de raios-X (DRX), bem como parâmetros cinéticos (energia de ativação, fator de freqüência e ordem de reação) é muito aconselhável como ferramentas complementares para auxiliar na interpretação dos resultados. (OLIVEIRA, et al., 2010; PERES-FILHO, et al., 2011; TITA, et al., 2011; VIANA, et al., 2008).

Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade do citrato de DEC em misturas binárias (MB) 1:1 (p/p) com alguns excipientes farmacêuticos comumente utilizados no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Material

O citrato de DEC foi sintetizao e doado pela Nortec Quimica®, lote 010276. Para o preparo das MB, foram utilizados os seguintes excipientes: celulose microcristalina, talco, polivinilpirrolidona (PVP) K-30, croscarmelose sódica, Starch® (amido pré-gelatinizado), Starlac® (85% lactose monoidatada + 15% amido – composto *spraydried*) Flowlac® (lactose monoidratada *spraydried*), Tabletose® (lactose monoidratada), estearato de magnésio, polietilenoglicol (PEG) 4000 e Aerosil® (dióxido de silício coloidal).

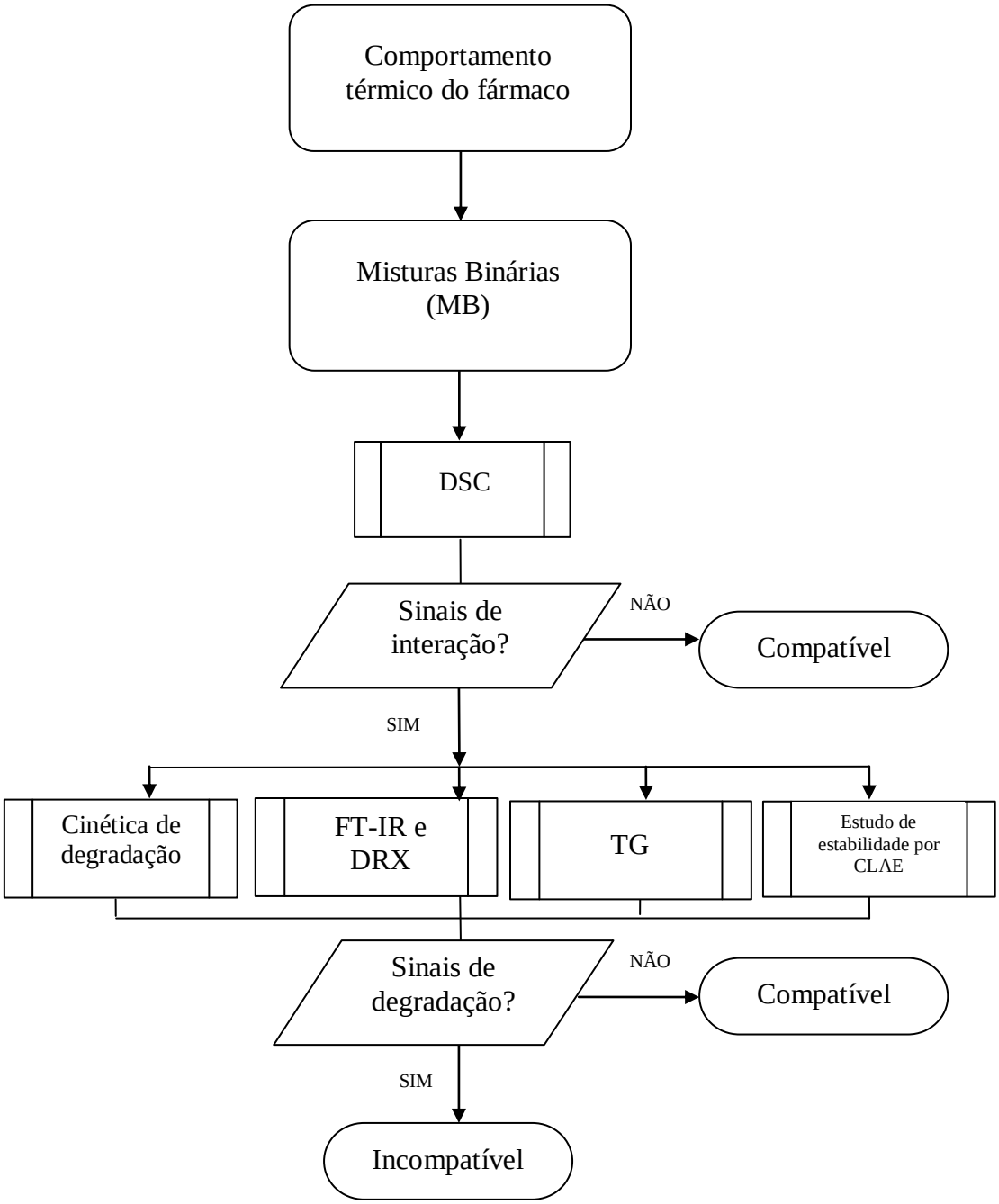
As misturas binárias 1:1 (p/p) do citrato de DEC com os excipientes foram preparadas utilizando almofariz e pistilo, triturando a mistura durante 3 minutos cada. As amostras foram armazenadas em fascos ampola.

2.2 Métodos

O fluxograma apresentado na Figura 2 apresenta o protocolo utilizado para a realização do estudo. Na primeira etapa, foram realizadas análises do citrato de DEC isoladamente e em MB. Os valores referentes a temperatura inicial de fusão *(*T_i*)* foram adotados como indicadores de interação fármaco-excipiente. Posteriormente, após a

triagem e seleção das misturas, foram utilizadas técnicas complementares para auxiliar na interpretação dos resultados do DSC: TG, FT-IR, DRX, estudos de estabilidade seguidos de quantificação por CLAE e avaliação da cinética de decomposição não-isotérmica do citrato de DEC isolado e em MB.

Figura 2 - Fluxograma para a realização do estudo de pré-formulação do citrato de DEC.



2.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curvas DSC do citrato de DEC e das MB foram obtidas utilizando Calorímetro Shimadzu® DSC-60 interligado ao software Shimadzu® TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 50 $mL.min^{-1}$ e razão de aquecimento de 10°C.min^{-1} na faixa de temperatura de 25–300°C. As amostras foram colocadas em porta amostra de alumínio hermeticamente fechadas com massas de 2 mg (± 0,2) de fármaco e 4 mg (± 0,2) das MB. As determinações foram realizadas em triplicata. Para as análises do fármaco isolado, foram utilizadas amostras trituradas com almofariz e pistilo, da mesma forma que as MB. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

2.2.2 Termogravimetria (TG)

As análises TG foram realizadas por meio de termobalança Shimadzu®, modelo TGA Q60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 $mL.min^{-1}$, sendo a massa da amostra de cerca de 5 mg (± 0,4) de citrato de DEC e das MB, acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 600°C na razão de aquecimento de 10ºC.min^{-1}. Antes dos ensaios, a termobalança foi vereficada com oxalato de zinco.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos, o método de Ozawa foi aplicado em amostras do fármaco isolado e das MB selecionadas, utilizando o *software* apropriado instalado no equipamento TA60 Shimadzu®. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições e equipamento para as análises do TG supracitadas, nas razões de aquecimanto de 5, 10 e 15°C min^{-1} (ARAUJO, et al., 2005; CIDES, et al., 2006; SALVIO-NETO, MATOS, 2011; SANTOS, et al., 2004).

2.2.3 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Difração de Raios-X (DRX)

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. As amostras foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 16 varreduras.

As micrografias foram obtidas de 4000 a 650 cm^{-1} na resolução de 4 cm^{-1}.

O difratograma do fármaco e das MB foi obtido no difratômetro SIEMENS® (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com ânodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo 2θ de 2-60 a uma velocidade de digitalização de 0,02º 2θ/s. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

2.2.4 Estudos de Estabilidade

Para os estudos de estabilidade, uma fração das MB selecionadas foram armazenadas em frascos ampola por 12 meses em condições de estabilidade de longa duração (temperatura e umidade) em câmara de estabilidade Nova Ética® e, em paralelo, a outra fração foi submetida a câmara de fotoestabilidade em placas contendo uma camada fina das MB, em câmara Nova Ética® (Model C242) que consiste em uma associação de lâmpadas branca e UV, como emissão de 30.000 lux e 13,33 W/m^2 por hora durante 12 dias. Após os testes, as amostras foram analisadas por CLAE.

As soluções foram preparadas de forma que a concentração final de citrato de DEC fosse de 60 $\mu g.mL^{-1}$, utilizando água ultrapura como diluente. As condições cromatográficas utilizadas foram: volume de injeção de 10 µL, fase móvel constituída de solução de fosfato de potássio dibásico (10 g/L) acidificada com ácido fosfórico (pH 3) e acetonitrila na proporção 90:10; fluxo de 0,8 mL/min, coluna C8 (250 x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 µm) a 30°C.

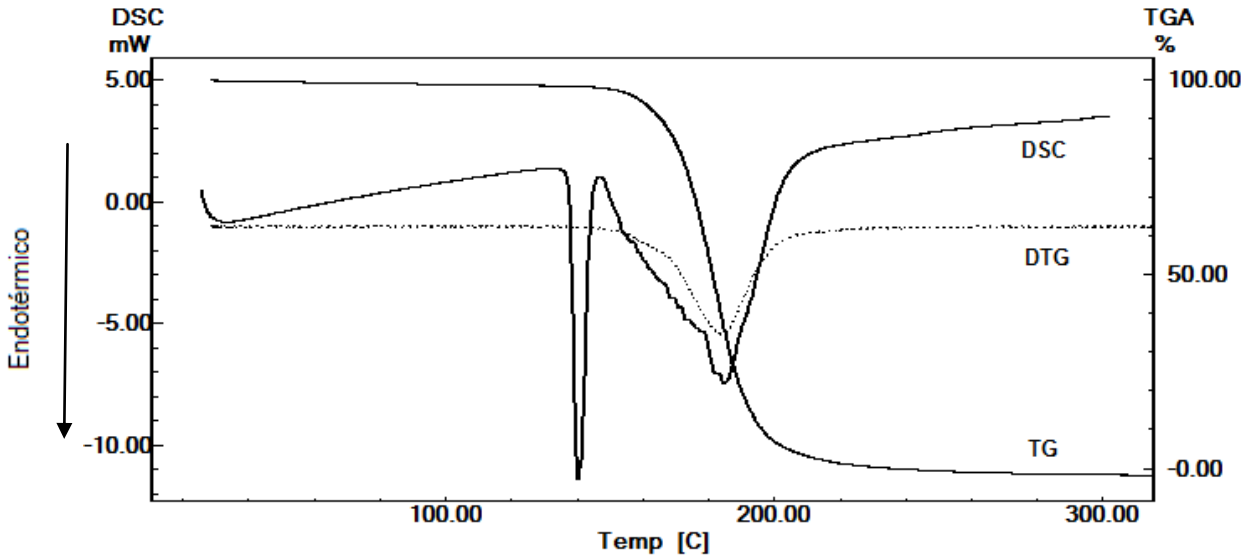
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comportamento Térmico da DEC

A curva DSC (Figura 3) apresentou dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro relacionado a fusão na faixa de temperatura de 137,9°C - 144,3°C (ponto médio = 140,5°C; Δ = -122,41 J/g^{-1}) e o segundo está relacionado com a decomposição térmica com início de decomposição em 159°C (ponto médio = 184°C; Δ = -1,70 KJ/g^{-1}).

A análise termogravimétrica (Figura 3) revelou a faixa de temperatura para a degradação do fármaco, apresentando um perfil principal na faixa de temperatura de 173,33-194,34°C, confirmado através da primeira derivada do TG (DTG), a qual apresenta apenas um pico, e uma perda de massa de 94,27%.

Figura 3 - Curvas de DSC e TG/DTG do citrato de DEC.



3.2 Misturas Binárias

Com relação às misturas binárias, em todos os excipientes houve diminuição significativa da entalpia envolvida no processo, quando comparado à entalpia de fusão do citrato de DEC isolado.

Dos 11 excipientes analisados, 6 apresentaram temperaturas de início de fusão em 137,9 ± 2°C: talco, celulose microcristalina, croscarmelose, Starch®, Aerosil® e PEG; e 4 apresentaram uma diminuição, sendo a mais baixa a da Tabletose®, que apresentou o início do processo de fusão em 130,8°C.

Nota-se que todos os excipientes que apresentam em sua composição lactose, sofreram uma alteração maior quanto a mudança da temperatura de início de fusão, o que é um indício de que haja interação entre os componentes da mistura, principalmente ligações de hidrogênio.

Além dos excipientes que continham lactose, o PVP diminuiu o ponto de fusão do citrato de DEC para 133,1°C.

Na mistura DEC/EMg, o evento relacionado à fusão do citrato de DEC foi omitido. A curva DSC do EMg isolado apresenta alguns eventos sucessivos de perda de água adsorvida e estrutural (aproximandamente 4,5%), na faixa de 60 a 100°C, e sua fusão inicia próxima a faixa de 110°C, seguida de um pequeno evento endotérmico que é explicado pela presença de uma pequena quantidade de palmitato de magnésio na amostra (BRUNI, *et al.*, 2010). Dessa forma, o desaparecimento do pico de fusão do citrato de DEC poderia explicado por dois mecanismos: pela possível solubilização do citrato de DEC no estearato (BRUNI, et al., 2010; REZENDE, SANTORO, MATOS, 2008; TIȚA, et al., 2011) ou solubilização na água de desidratação emergida do estearato na faixa de 60 a 100°C, uma vez que o citrato de DEC apresenta uma altíssima solubilidade em água (TIȚA, et al., 2011).

Tabela 1 - Temperatura inicial (T_i), temperatura do pico (T_{pico}) e temperatura final (T_f) do evento de fusão e variação da entalpia (ΔH) do citrato de DEC e das MB.

	T_i (°C)	**T_{pico} (°C)**	**T_f (°C)**	**ΔH**
DEC	137,9	140,5	144,1	-190,20
DEC/PVP	****133,1**	138,3	141,4	-62,83
DEC /Talco	137,4	139,8	142,9	-67,71
DEC /Celulose Microcristalina	137,0	140,0	143,2	-69,31
DEC /Starch®	137,8	140,1	143,0	-55,85
DEC /Tabletose®	****130,8**	135,4	141,1	-91,60
DEC /Croscarmelose sódica	138,4	138,4	141,5	-59,68
DEC /Flowlac®	****133,3**	138,0	142,8	-58,86
DEC /Starlac®	****131,4**	135,9	141,1	-98,46
DEC /PEG	136,5	139,6	142,6	-92,57
DEC /Aerosil®	135,3	139,3	142,3	-82,10
DEC /EMg	*--	--	--	--

*: Não foi possível visualisar o evento de fusão do citrato de DEC.

** : Misturas binárias que apresentaram mudança quanto à temperatura inicial de fusão (T_i).

Com os resultados obtidos pelo DSC, optou-se pela seleção das MB com três excipientes para a análise mais aprofundada: a Tabletose®, representando os excipientes que continham lactose em sua composição; o PVP e o EMg.

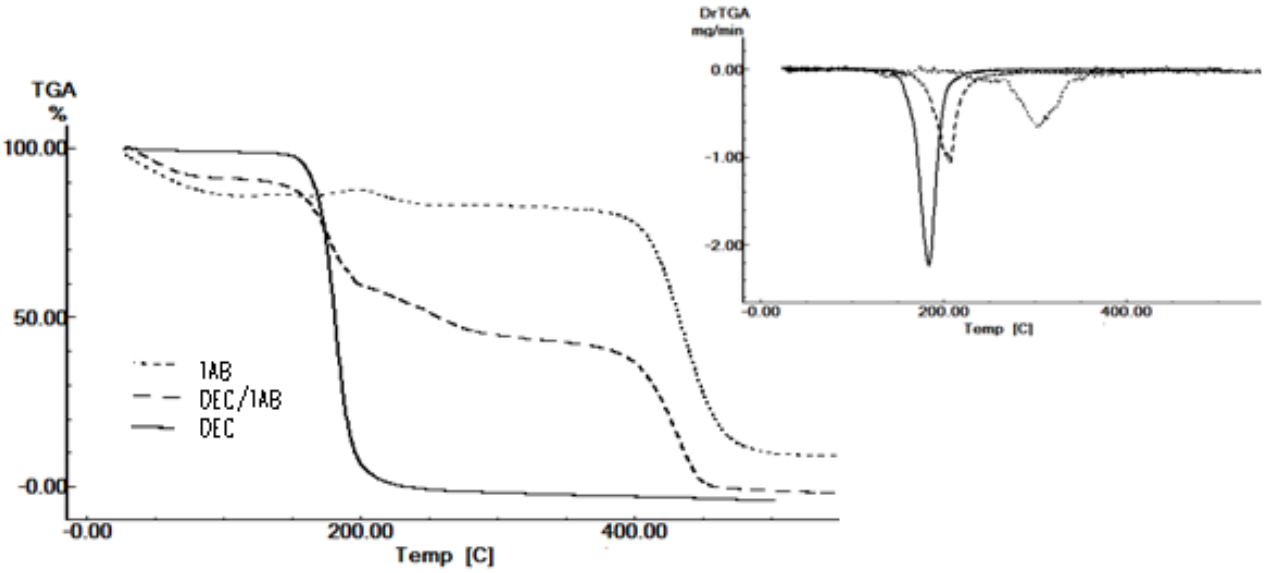
3.3 Termogravimetria (TG)

Os resultados obtidos a partir das curvas TG/DTG estão expressos na Tabela 2. Na curva de TG da mistura DEC/Tabletose® (Figura 4) observou-se um leve retardo do início da degradação do citrato de DEC. No DTG, o evento de degradação da amostra evidencia um alargamento bastante pronunciado que pode ser explicado pela sobreposição de três eventos presentes nas curvas de TG/DTG das substâncias isoladas: degradação do citrato de DEC, transição cristalina da lactose seguida de fusão.

Tabela 2 - Temperatura inicial de degradação (T_i) das curvas de TG e pico do DTG da DEC e das MB.

Amostra	**T_i (C°) TG**	**T_{pico} DTG**
DEC	169,0	181,0
DEC/ Tabletose®	189,5	207,3
DEC/PVP	162,5	179,4
DEC /EMG	189,0	239,0

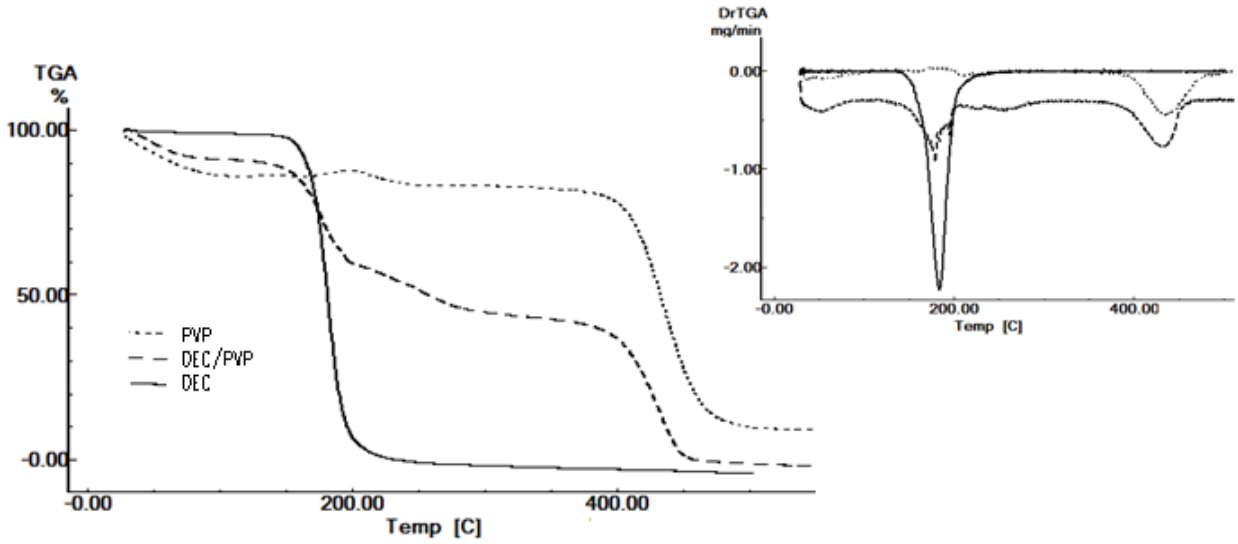
Figura 4 - Curvas TG/DTG da DEC, da MB com DEC/Tabletose® e da Tabletose®.



Na curva TG da MB DEC/PVP (Figura 5) O início da degradação do citrato de DEC foi antecipado para 162,0°C, e este. O evento principal dadegradação do citrato de DEC na mistura não se apresenta como evento de fase única, como no fármaco isolado, além de o evento relaionado à degradação do PVP na mistura permanecer inalterado. A perda dessa característica evidencia uma interação sentre o fármaco e o excipiente, que pode ter sido ocasionada pelo processo de trituração que a amostra sofreu, concedida pelas características agregantes do PVP (ARAÚJO, et al., 2003; CIDES, et al., 2006; PERES-FILHO, et al., 2011). Com isso podemos sugerir que parte do citrato de DEC pode ter sido disperso no PVP, sendo degradada lentamente.

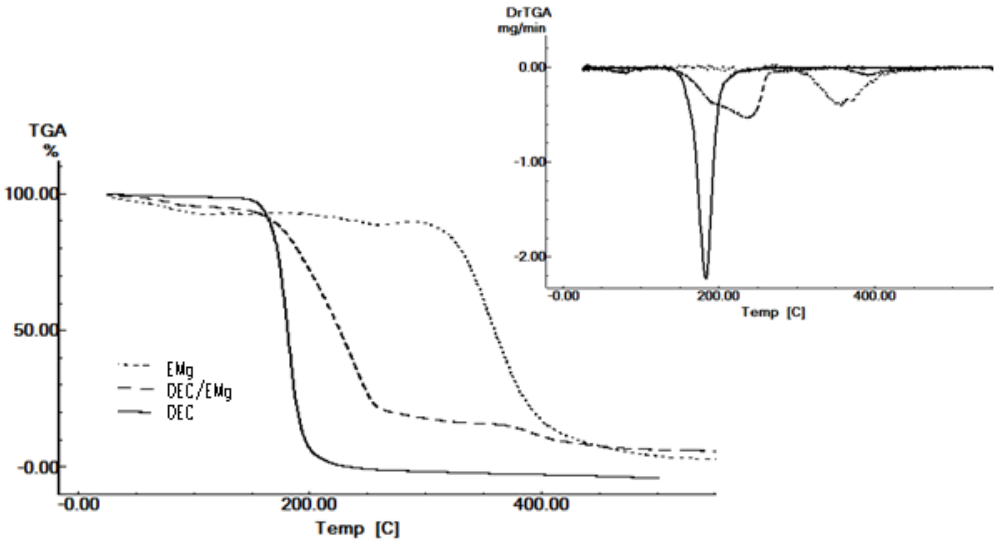
Esse fator não pode ser necessariamente, considerado uma interação que possa prejudicial ao fármaco, visto que algumas vezes, a dispersão do fármaco em uma matriz pode ser de interesse farmacêutico, desde que nenhuma interação química tenha ocorrido.

Figura 5 - Curvas TG/DTG da DEC, da MB DEC/PVP e do PVP.



A curva TG da mistura DEC/EMg (Figura 6) confirma a teoria da solubilização do citrato de DEC no estearato visto que observa-se um alargamento bastante pronunciado do pico do DTG do evento relacionado a degradação na mistura, sendo, portanto, caracterrístico da mistura e não apenas uma soma dos eventos das substâncias isoladas. Além disso, observa-se que o evento relacionado à degradação do estearato não aparece na curva TG da MB, corroborando com a teoria acima, na qual a degradação da mistura ocorreu quase por completo (82%) no evento de degradação principal, tendo um pico mais pronunciado em 239°C.

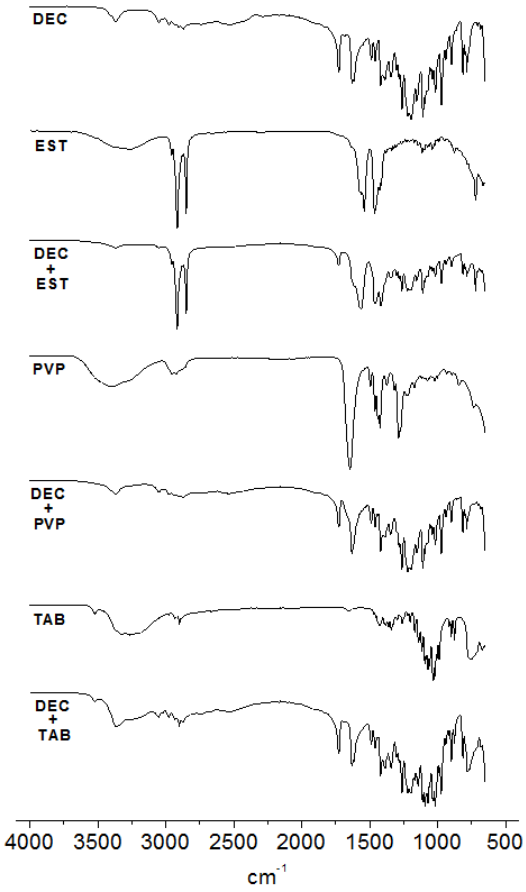
Figura 6 - Curvas TG/DTG da DEC, da MB DEC/EMg e do EMg.



3.4 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Difração de Raios-X (DRX)

Os espectros do citrato de DEC e das MB com os excipientes selecionados estão representados na Figura 7. Em todos os espectros observa-se apenas sobreposição das bandas características do citrato de DEC isoladamente e dos excipientes. No espectro da MB com o EMg, a região da banda correspondente a ligação C-N do grupamento amida da DEC (1418 cm^{-1}) encontra-se alargada, em relação ao espectro do citrato de DEC isolado, devido a presença de grupamentos do estearato, na mesma região. O mesmo ocorre com a região da banda referente a deformação axial da carbonila (1676 - 1500 cm^{-1}) que sofre sobreposição de bandas referentes ao grupo carbonila do estearato (1615 - 1540 cm^{-1}) (PHAECHAMUD, CHAROENTEERABOON, MAHADLEK, 2009).

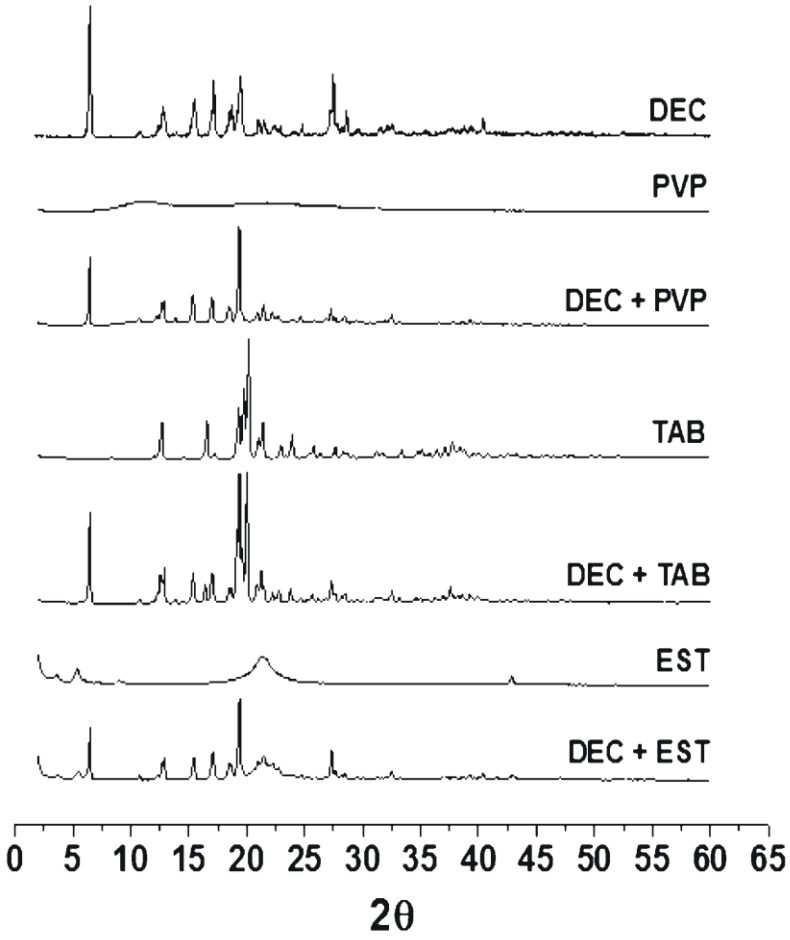
Figura 7 - Espectro do citrato de DEC, EMg, mistura binária DEC/EMg, PVP, mistura binária DEC/PVP, Tabletose® e mistura binária DEC/Tabletose®, respectivamente



No espectro de infravermelho das misturas binárias DEC/PVP e DEC/Tabletose®, as principais bandas referentes ao citrato de DEC apresentaram-se idênticas as do espectro do fármaco isolado, sendo algumas delas sobrepostas por bandas referentes aos excipientes, porém a simples sobreposição não pode ser considerada uma incompatibilidade.

Em todos os difratogramas (Figura 8) das MB observa-se a presença do pico principal característico do citrato de DEC em 6,5°, bem como dois picos secundários em 12,8°e 15,5°, comprovando que a presença dos excipientes não alterou a cristalinidade do fármaco, mesmo com excipientes de caráter amorfo, como o PVP.

Figura 8 - Difratogramas do citrato de DEC, do PVP, da mistura binária DEC/PVP, da Tabletose®, da mistura binária DEC/Tabletose®, do EMg e da mistura binária DEC/EMg, respectivamente.



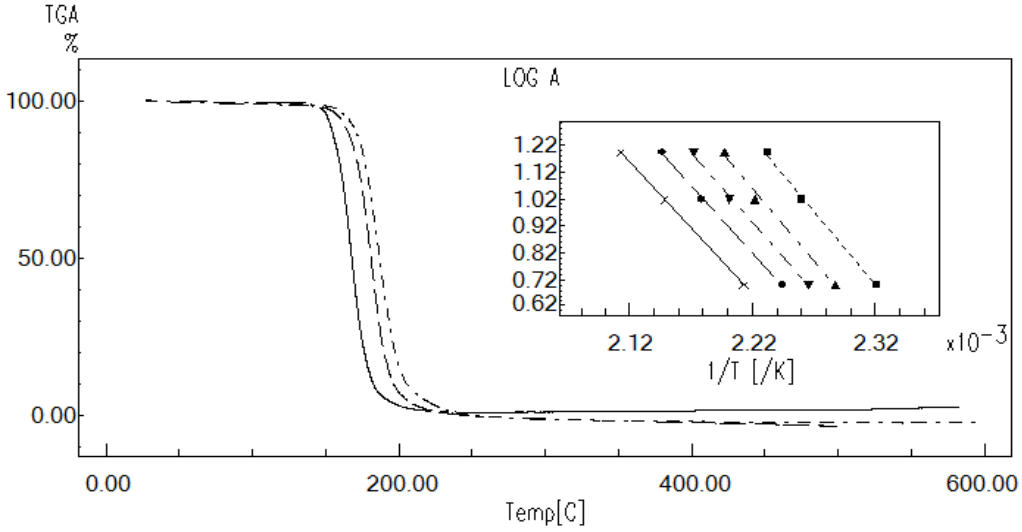
3.5 Cinética de degradação

Os parâmetros cinéticos, Energia de ativação (Ea), fator de frequência (A) e a ordem da reação (*n*) podem fornecer informações sobre o mecanismo e a razão de decomposição da reação, condições de armazenamento, especialmente, prazo de validade (SOVIZI, 2010; TIŢA, et al., 2010; TIŢA, et al., 2008).

O método não-isotérmico estabelecido por Ozawa é um método para determinar os parâmetros de Arrhenius em condições dinâmicas de razão de aquecimento. A Ea pode ser determinada a partir de um gráfico do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura, 1/T, desde que *f(*α) (fração descomposta de um sólido em função da temperatura) seja previamente conhecida (ARAUJO, et al., 2005; CIDES, et al., 2006; FELIX, et al., 2009; SALVIO-NETO, MATOS, 2011; SANTOS, et al., 2004; TIŢA, et al., 2010).

O gráfico que representa as curvas TG do citrato de DEC isolado em diferentes razões de aquecimento em conjunto com o gráfico de Ozawa (*ln* da razão de aquecimento em função de 1/T) esta representado na Figura 9, o qual demonstrou uma correlação evidente entre as 3 razões de aquecimento. A Ea calculada pelo método de Ozawa apresentou um valor de 107.62 KJ/mo^{-1}, fator de freqüência (A) de 1.495 x 10^{12} min^{-1} ordem de reação de *n*=1.

Figura 9 - Curvas TG da DEC obtidas a partir de razões de aquecimento crescentes (5, 10 e15°C/min) e associação com o gráfico de Ozawa.



A Ea também foi calculada pelo método de Ozawa, para o mesmo evento de degradação do citrato de DEC, nas MB selecionadas. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Energia de ativação (Ea), fator de freqüência (A) da MB obtidos por cinética não-isotérmica (método de Ozawa).

Amostra	Energia de Ativação (E_a)	Fator de Frequencia (A)
DEC	107,62 KJ/mol	$1,495 \times 10^{12}$ min^{-1}
DEC/Tabletose®	107,04 KJ/mol	$6,217 \times 10^{10}$ min^{-1}
DEC/PVP	65,06 KJ/mol	$8,761 \times 10^{4}$ min^{-1}
DEC/EMg	86,98 KJ/mol	$5,096 \times 10^{8}$ min^{-1}

A energia de ativação da mistura binária DEC/ Tabletose® apresentou decaimento de menos de 1% em relação a DEC isolada. As MB com PVP e EMg diminuíram consideravelmente a energia de ativação corroborando com os resultados da análise térmica, os quais evidenciaram sinais de interação.

3.6 Estudos de Estabilidade

Os resultados da quantificação do citrato de DEC após estudos estabilidade estão representado na Tabela 4.

Tabela 4 - Doseamento do citrato de DEC em MB com excipientes após estudos de Fotoestabilidade (F) e Estabildiade de Longa Duração (ELG).

Amostra	DEC_F (%)	DEC_{ELD} (%)
DEC/EMg	100,05	98,85
DEC/PVP	95,23	83,78
DEC/Tabletose®	99,04	93,68

*F = Fotoestabildiade; ELD = Estabilidade de Longa Duração

A MB com EMg apresentou valor dentro do esperado, adotando-se o valor de referência 100% ± 5. Em contrapartida, a MB com PVP e com Tabletose®, apresentaram valores abaixo do esperado, sendo essa diminuição mais pronunciada com o PVP. O decaimento do citrato DEC na presença da Tabletose® pode ser explicado pelo desencadeamento da reação de Maillard promovido pelo contato contínuo da DEC com o excipiente, na qual as hidroxilas da lactose reagem com grupamentos amina da DEC (BERTOL et al., 2010; PERES-FILHO et al., 2011; SOARES-SOBRINHO, 2010).

Já o decaimento da DEC na presença do PVP provavelmente se deu pela presença de impurezas de peróxido de hidrogênio no excipiente, já relatada na literatura (BAERTSCH, 2005; HARTANUE et al., 2000; WATERMAN, ADAM, HONG, 2003).

Em alguns compêndios oficiais (Farmacopéia Britânica, 2009) já é comprovada a instabilidade da DEC na presença de peróxido de hidrogênio, relatando inclusive a presença de produtos de degradação oriundos dessa reação, o que também foi detectado por estudos prévios do nosso grupo. Dessa forma, o citrato de DEC em contato com o PVP durante 12 meses pode ter sido degradado pelas impurezas contidas na matéria-prima.

Esses resultados ressaltam a importância de metodologias analíticas adequadas para a quantificação do fármaco bem como produtos oriundos da sua degradação visto que a simples presença de um excipiente poderá ocasionar a degradação do fármaco e conseqüentemente, perda de sua segurança e eficácia.

4 CONCLUSÃO

O estudo de estabilidade e compatibilidade do citrato de DEC com diferentes excipientes foi realizado, primeiramente através de DSC, e em uma segunda etapa, após seleção dos excipientes, por técnicas complementares: TG/DTG, FT-IR, DRX, estudos de estabilidade com as MB selecionadas seguido de quantificação por CLAE-DAD.

Apesar de a análise térmica ser uma técnica eficiente em estudos de compatibilidade fármaco-excipiente, a técnica de DSC oferece vantagens significativas, por isso é considerada uma ferramenta rápida durante o processo de pré-formulação.

Das misturas analisadas por DSC, apenas alguns excipientes indicaram a existência de alguma possível interação. Dessa forma, para as outras análises foram selecionadas as MB com Tabletose®, representando os excipientes que continham lactose (Flowlac®, Starlac®, Tabletose®), o PVP e o EMg.

As análises complementares por FT-IR e DRX não apresentaram nenhum indício de interação entre as MB. As curvas de TG/DTG com a MB DEC/ Tabletose® não evidenciou sinais de interação, ao contrário das curvas com PVP e EMg, corroborando com os resultados da cinética não-isotérmica, na qual as MB com PVP e EMg diminuíram a energia de ativação da reação. Os estudos de estabilidade realizados mostraram que o tempo influencia na estabilidade das MB, principalmente com o PVP que muitas vezes contem impurezas que degradam o fármaco. Esses excipientes podem ser evitados durante o estudo de pré-formulação uma vez que foi observada uma interação do citrato de DEC com os mesmos.

5 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A.A.S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L.P.; CARVALHO, F.M.S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J.R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 260, n. 2, p. 303-314, 2003.

ARAÚJO, A.A.S.; CIDES, L.C.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R.; BRUNS, R.E. Effects of experimental conditions on the estimation of kinetic parameters of the thermal decomposition of AZT using factorial design. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry,* v. 79, p. 697-701, 2005.

BAERTSCHI S.W. Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation by Taylor & Francis Group, LLC, 2005, 483p.

BERTOL, C.D.; CRUZ, A.P.; STULZER, H.K.; MURAKAMI, F.S.; SILVA, M.A.S. Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal

and non-isothermal conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 102, p. 187-192, 2010.

BOCKARIE, M.J.; PEDERSEN, E.M.; WHITE, G.B.; MICHAEL, E. Role of Vector Control in the Global Program to Eliminate Lymphatic Filariasis. *Annu. Rev. Entomol*. v. 54, p. 469-487, 2009.

British Pharmacopoeia (2009), HM Stationery Office: London, England p. 1919.

BRUNI,G.; BERBENNI, V.; MILANESE, C.; GIRELLA, A.; MARINI, A. Drug-excipient compatibility studies in binary and ternary mixtures by physico-chemical techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 102, p. 193-210, 2010.

BUCCI, R.; MAGRI, A.D.; MAGRI, A.L. DSC in the chemical analysis of drugs. Determinations of diclofenac in pharmaceutical formulations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 61, p. 369-376, 2000.

CIDES, L.C.S.; ARAÚJO, A.A.S.; SANTOS-FILHO, M; MATOS, J.R. Thermal behavior, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 84, n. 2, p. 441-445, 2006.

FELIX, F.S.; CIDES DA SILVA, L.C.; ANGNES, L.; MATOS, J.R. Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal.Conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.95, p.877-880, 2009.

HARTANUER, K.J.; ARBUTHNOT, G.N.; BAERTSHI, S.W.; JOHNSON, R.A.; LUKE, W.D.; PEARSON, N.G.; RICKARD, E.C.; TINGLE, C.A.; TSANG, P.K.; WIENS, R.E. Influence of peroxide impurities in povidone and crospovidone on the stability of raloxifene

hydrochloride in tablets: identification and control of an oxidative degradation product. *Pharm Dev Tech*, v. 5, n. 3, p. 303-310, 2000.

HOTI, S.L.; PANI, S.P.; VANAMAIL, P.; ATHISAYA MARY, K.; DAS, L.K.; DAS, P.K. Effect of a single dose of diethylcarbamazine, albendazole or both on the clearance of *Wuchereria bancrofti* microfilariae and antigenaemia among microfilaria carriers: A randomized trial. *The National Medical Journal Of India,* v. 23, n 2, 2010.

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, n.7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, P.R.; STULZER, H.K.; BERNARDI, L.S.; BORGMANN, S.H.M.; CARDOSO, S.G.; SILVA, M.A.S. Sibutramine hydrochloride monohydrate Thermal behavior, decomposition kinetics and compatibility studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.100, p. 277-282, 2010.

PALUMBO, E. Filariasis: diagnosis, treatment and prevention. *Acta biomed*, n. 79, p. 106-109, 2008.

PERES-FILHO, M.J.; GAETI, M.P.N.; OLIVEIRA, S.R.; MARRETO, R.N.; LIMA, E.M. Thermoanalytical investigation of olanzapine compatibility with excipients used in solid oral dosage forms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 104, p. 255-260, 2011.

PHAECHAMUD, T.; CHAROENTEERABOON, J.; MAHADLEK, J. haracterization and in-vitro drug release of a chitosan-magnesium stearate monolithic matrix system. Asian *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 4, n. 5, p. 265-276, 2009.

PIMENTEL, A.S.; ARBILLA, A. Cinética não-isotérmica na análise térmica de sólidos. *Química nova*, v. 21, n.3, 1998.

RAMAIAH, K.D.; DAS, P.K.; VANANMAIL, P.; PANI, S.P. Impact of 10 years of diethylcarbamazine and ivermectin mass administration on infection and transmission of lymphatic filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, p. 555-563, 2007.

RAMASAMY, D.; D.; LAXMANAPPA, H.S.; SHARMA, R.; DAS, M.K. Influence of anti-filarial chemotherapy strategies on the genetic structure of *Wuchereria bancrofti* populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 106, n. 2, p.240-247, Março de 2011.

REZENDE, R.L.O.; SANTORO, M.I.R.M.; MATOS, J.R. Stability and compatibility study on enalapril maleate using thermoanalytical techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 93, n. 3, p. 881-886, 2008.

SALVIO-NETO, H.; MATOS, J. R. Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi solid pharmaceutical form. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 97, p. 367–374, 2009.

SALVIO-NETO, H.; MATOS, J. R. Compatibility and decomposition kinetics studies of prednicarbate alone and associated with glyceryl stearate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 103, p. 393-399, 2011.

SANTOS, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M.; TRINDADE, M.F.; ARAÚJO, A.S.; FERNANDES, V.J.; SOUZA, A.G. Kinetic study of dpivaloylmethane by Ozawa method. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 75, p. 591-597, 2004.

SILVA, C.C.P.; MARTINS, F.T.; HANORATO, S.B.; BOECHAT, N.; AYALA, A.P.; ELLENA, J. Triple Structural Transition below Room Temperature in the Antifilarial Drug Diethylcarbamazine. *Citrate Crystal Growth & Design*, v.10, n. 7, p. 3094-3101, 2010.

SOARES, M.F.D.L.R.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; LOPES, P.Q.; CORREIR, L.P.; SAOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O.; ROLIM-NETO, P.J. Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. DOI 10.1007/s10973-010-1185-y

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.D.L.R.; LOPES, P.Q.; CORREIA, L.P.; SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O.; ROLIM-NETO, P.J. A preformulation study of a new medicine for chagas treatment: physico-chemical characterization, thermal stability and compatibility of benznidazole.*AAPS PharmSciTech.* v. 11, n. 3, p. 1391-1396, 2010.

SOVIZI, M. R. Thermal behavior of drugs. Investigation on decomposition kinetic of naproxen and celecoxib. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.102, p. 285–289 , 2010.

The United States Pharmacopeia 30 ed. (2007) United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, Maryland, U.S.A.

TIŢA, B.; MARIAN, E.; VLASE, G.; DOCA, N.; VLASE, T. Comparative kinetic study of decomposition of some diazepine derivatives under isothermal and non-isothermal conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.94, p. 447-452, 2008.

TITŢA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; RUSU, G.; TIŢA, D. Thermal stability of ibuprofen. Kinetic study under non-isothermal conditions. *Rev. Roum. Chim.* v. 55, n. 9, p. 553-558, 2010.

TIŢA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TIŢA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* v.56, p. 221– 227, 2011.

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

VIANA, O.S.; ARAÚJO, A.A.S.; SIMOES, R.A.; SOARES.; MATOS, C.R.S.; GRANGEIRO-JÚNIOR, S.; LIMA, C.M.; ROLIM-NETO, P.J. Kinetic Analysis of the Thermal Decomposition of Efavirenz and Compatibility Studies with Selected Excipients. *Lat. Am. J. Pharm. v.* 27, n. 2, p. 211-216, 2008.

WATERMAN, K.; ADAMI, R.; HONG, J. Impurities in Drug Products in, Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals, *Ahuja,* SA, San Diego: Academic Press, p. 75–88, 2003.

Artigo 4 - ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO ANTIHELMÍNTICO CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA EM SOLUÇÃO AQUOSA POR CLAE-DAD E CLAE-MS.

Artigo a ser submetido ao Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis – A2 (Qualis CAPES)

RESUMO

O citrato de dietilcarbamazina (DEC), derivado de piperazina, é o fármaco de escolha para o tratamento da filariose linfática, amplamente utilizado, porém não há relatos na literatura a cerca de seus produtos de degradação (PD) e mecanismos degradativos, portanto este trabalho teve como objetivo elucidar a rota degradativa da DEC, para cada condição estudada. Foi utilizado um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) indicativo de estabilidade capaz de quantificar seus PDs, bem como o CLAE acoplado à espectrometria de massas (MS) para identificação dos PDs obtidos. Os resultados evidenciaram que a DEC degrada sob variação de pH, gerando três PDs por hidrólise ácida, sendo um deles uma impureza de síntese (N-metilpiperazina). Os espectros de massas referentes aos picos do cromatograma das amostras de hidrólise possiblitaram a sugestão de um mecanismo de degradação para os outros possíveis PDs. Nas degradações oxidativas, a DEC apresentou dois produtos de degradação, mostrando-se bastante sensível ao estresse oxidativo. O espectro de massas dos picos referentes aos PDs permitiram a sugestão de um mecanismo de degradação. As amostras degradadas permitiram o cálculo das cinéticas das reações. As hidrólises apresentraram reação de primeira ordem, evidenciando que a hidrólise não depende da concentração das soluções hidrolíticas; já a oxidação apresentou reação de segunda ordem, na qual a concentração de H_2O_2 é relevante. Não foi possível calcular a cinética da fotodegradação uma vez que a DEC apresentou-se relativamente estável. Os comprimidos de DEC submetidos a estudos de estabilidade acelerada apresentaram 5 PDs: os da hidrólise e os da oxidação, evidenciando que a forma farmacêutica de mercado carece de maior investigação quanto a segurança de uso continuado do medicamento quando estes PDs são encontrados.

Palavras-chave: Produtos de degradação; Hidrolise; Oxidação; Cinética Química.

ABSTRACT

Diethylcarbamazine citrate (DEC) is the drug of choice for the treatment of lymphatic flariose. The piperazine derivate is widely used, but there are no reports in the literature about its degradation products (DP) and degradative mechanisms, so this study aimed to elucidate the degradative route of DEC for each condition studied. We used an analytical indicative of stability method by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) able to quantify their DPs, as well as HPLC coupled to mass spectrometer (MS) to elucidate the PDs obtained. The results showed that DEC degraded under varying pH, generating 3 DPs by acid hydrolysis products, one being an impurity of synthesis (N-methylpiperazinyne) since its concentration increases, while the DEC degrades. The mass spectrum of hydrolysis peaks in the chromatogram allowed the suggestion of a degradation mechanism for possible PDs. In the oxidative degradation, DEC presented two degradation products, being very sensitive to oxidative stress. The mass spectrum of the peaks relating to PDs allowed suggesting a degradation mechanism. The degraded samples allowed the calculation of the kinetics of reactions. The hydrolysis presented first order reaction, indicating that hydrolysis does not dependent on the hydrolytic solutions, whereas the oxidation reaction showed second order, in which the concentration of H_2O_2 is relevant. It was not possible to calculate the kinetics of photodegradation since the DEC had been relatively stable. DEC tablets submitted to accelerated stability studies showed 5 PDs: both of hydrolysis and oxidation PDs, showing that the form is out of pharmaceutical quality specifications.

Key-words: degradation products; Hydrolysis. Oxidation, Chemistry kinetics

1 INTRODUÇÃO

O estudo de estabilidade é uma etapa fundamental para garantir a qualidade e segurança de um medicamento. A partir desse estudo pode-se obter evidências sobre o comportamento das alterações de um medicamento ao longo do tempo, sob a influência de uma variedade de fatores, estabelecendo o prazo de validade, assim como as condições de armazenamento do medicamento (ICH, 2003; SEHAWAT, MAITHANI, SINGH, 2010).

Espera-se que todos os métodos analíticos aplicados no estudo sejam, verdadeiramente, indicativos de estabilidade, a fim de detectar e quantificar com precisão o fármaco e todas as suas substâncias relacionadas. Com isso, as prováveis mudanças que possam ocorrer durante o processo de formulação e produção, armazenamento e transporte poderão ser controladas (BAERTSCHI, 2006; HUYNH-BA, 2009; SEHRAWAT, MAITHANI, SINGH, 2010).

Conforme descrito pelo ICH, o processo para estabelecer um método indicativo de estabilidade envolve testes de estresse, que auxiliam na identificação dos prováveis produtos de degradação, que por sua vez ajudam a estabelecer as vias de degradação, a estabilidade intrínseca da molécula e a validar o poder indicativo de estabilidade dos procedimentos analíticos utilizados, assim como para os estudos de pré-formulação (BAERTSCHI, 2006; ICH, 1996).

A dietilcarbamazina (DEC) [N, N-dietil-4-Metilpiperazina-1-carboxamida] é um derivado da piperazina, sintetizado como um sal de citrato (Farmacopéia Britânica, 2009; SILVA, et al., 2010; USP, 2011). O citrato de DEC é o principal fármaco utilizado no programa de combate à filariose linfática. O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de método indicativo de estabilidade e a realização do estudo da degradação da DEC em solução aquosa por CLAE-DAD e CLAE-MS, bem como a aplicação do método desenvolvido para avaliação de produtos farmacêuticos submetidos a estudo de estabilidade acelerado.

2 PARTE EXPERIMAENTAL

2.1 Substâncias e Reagentes

A DEC matéria prima foi sintetizada e doada pela Nortec Química®, lote 010276. As substâncias relacionadas da DEC: N-metilpiperazina e N,N-dimetilpiperazina, descritas em compêndios oficias (Farmacopéia britânica, 2009), foram adquiridas da Sigma-Aldrich®, grau reagente . Os comprimidos de DEC (50 mg / lote 10080735) foram doados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro os quais são fabricados por Farmanguinhos® FIOCRUZ. Os solventes utilizados foram acetonitrila (Carlo Erba®), água ultra-pura

(obtida em sistema MILI Q®), ácido clorídrico 36,5%, v/v (Dinâmica®), hidróxido de sódio (Vetec®), peróxido de hidrogênio 36,5%, v/v (Dinâmica®). Para a preparação da fase móvel, foi utilizado fostato de potássio dibásico (Sinth®) e ácido fosfórico (Dinâmica®).

2.2 Estudo de degradação em solução aquosa

Os estudos de degradação hidrolítica foram conduzidos com a matéria prima da DEC (em solução aquosa a 60 $\mu g.mL^{-1}$) a temperatura ambiente de 25°C, utilizando soluções de HCl 2M, para hidrólise ácida; NaOH 1M, para à básica; solução de peróxido de hidrogênio a 3%, para a oxidativa e água ultra pura em câmara de fotoestabilidade Nova Ética® (modelo C242), que consiste na associação de lâmpadas UV e fluorescente com emissão de 30.000 lux e 13,33 w/m^2 por hora, para a fotolítica, à temperatura ambiente. Para determinação do teor de DEC em cada condição testada foram retiradas alíquotas das reações em 24, 48, 120 e 168 horas.

2.3 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade e condições cromatográficas

Inicialmente, as soluções dos estudos de estresse que apresentaram degradação suficiente (10 a 30% de decaimento do ativo, BAERTCHI, 2006) foram selecionadas e submetidas individualmente a análise por CLAE-DAD, seguindo os parâmetros descritos na monografia específica do fármaco pela Farmacopéia Americana (USP, 2011) para análise de substâncias relacionadas, que consiste na utilização de uma coluna C18 (3,9 x 150 mm, 5 µm), como fase estacionária, uma solução metanol:solução de fosfato de potássio dibásico em água (57 mM, pH 3,7), 1:9 (v/v), como fase móvel, com fluxo de 0,8 $mL.min^{-1}$. Como a separação do fármaco e seus produtos de degradação não foi seletiva, portanto, alterações em componentes do método como solvente da fase móvel, fluxo e temperatura do forno da coluna foram julgados.

Para quantificação da DEC e amostras degradadas, o método analítico utilizado foi desenvolvido e validado por CLAE – DAD, em equipamento Shimadzu® equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A,

detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP, sendo os dados tratados através do software Shimadzu® LC solution 1.0, de acordo as seguintes condições cromatográficas: coluna C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm) a 30°C e como fase móvel uma solução isocrática de acetonitrila : solução de fosfato de potássio dibásico (20 mM) acidificada com ácido fosfórico pH 3, na proporção 1:9, com fluxo de 0,8 mL/min.

Para elucidação das estruturas químicas dos produtos de degradação da DEC foi utilizado um CLAE-MS da Shimadzu® de marca e modelo semelhante ao CLAE-DAD, acoplado a espectrômetro de massas com tecnologia *Ion Trap - Time of Flight* (IT-TOF) Shimadzu®, com scan de 90 a 300 m/z, com condições semelhante ao método por CLAE-DAD exceto pela composição da fase móvel em que a solução de fosfato de potássio dibásico foi substituída por uma solução de ácido fórmico em mesmo pH.

2.4 Validação do método indicativo de estabilidade

O método foi validado em relação aos parâmetros descritos pela *International Conference on Harmonization* (ICH Q2A, 1994, ICH Q2B, 1996). Foi preparada uma solução de citrato de DEC em água ultra-pura na concentração de 500 µg/mL, com posteriores diluições volumétricas, água ultrapura como diluente, para constituição da curva com as concentrações de 30, 50, 60, 70 e 90 $\mu g.mL^{-1}$. Para cálculos dos teores das impurezas de síntese do citrato de DEC (N-metilpiperazina e N,N-dimetilpiperazina) foram realizadas curvas analíticas na faixa de 0,9, 1,8; 2,7; 3,6 e 4,5 $mg.mL^{-1}$ para a N-metilpiperazina e 0,84; 1,68; 2,52; 3,36 e 4,2 $mg.mL^{-1}$ para a N,N-dimetilpiperazina para verificação da linearidade do método para essas duas substâncias de forma semelhante ao citrato de DEC. A análise estatística dos ensaios foi realizada com a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados da média de cada um dos três pontos de concentração de três curvas autênticas, permitindo o cálculo de limite de detecção e quantificação do citrato de DEC e substâncias relacionadas (ICH Q2B, 1996).

A precisão foi avaliada em dois níveis (ICH Q2B, 1996): repetitividade, por 6 determinações autênticas a 100% da concentração do teste, e a precisão intermediária foram realizadas análises em dois dias diferentes com analistas diferentes.

A exatidão foi determinada após o estabelecimento da linearidade e do intervalo, sendo verificada a partir de amostras obtidas com a matéria prima de citrato de DEC nas concentrações de 30, 60 e 90 $\mu g.mL^{-1}$, em triplicata para cada concentração, comparando com o valor obtido pela mesma análise realizada com o padrão.

A seletividade do método foi avaliada através do fator de resolução e tempo de retenção relativo existente na construção da curva de linearidade com as substâncias relacionadas N-metilpiperazina e N,N-dimetilpiperazina. Além disso, a seletividade foi estabelecida através da determinação de pureza de cada pico do citrato de DEC nas amostras submetidas ao estudo de estresse utilizando o detector de DAD.

A robustez do método foi avaliada analisando a variação do fabricante do fosfato de potássio dibásico (componente da fase móvel), avaliando as marcas Carlo Erba® e Sinth®, a temperatura do forno da coluna cromatográfica (29, 30 e 31°C), o fluxo da fase móvel (0,75; 0,80 e 0,85 $mL.min^{-1}$) e a estabilidade da solução amostra em 24h à 2-8°C.

2.5 Cinéticas de degradação

A ordem de reação para as cinéticas de hidrólise da DEC foram determinadas representando o percentual de fármaco residual em função do tempo (ordem zero), do logaritmo neperiano do percentual de fármaco em função do tempo (primeira ordem) e inverso do percentual de fármaco em função do tempo (segunda ordem). Os coeficientes de regressão linear foram obtidos, sendo o coeficiente mais próximo da unidade indicador da ordem das degradações do citrato de DEC (SINKO, 2008).

O modelo cinético pode ser representado pelas seguintes equações:

$C = Co - k.t$	$t90\% = (0,1 \times Co) / k$	(Ordem zero)
$\ln C = \ln Co - k.t$	$t90\% = 0,16 / k$	(Primeira ordem)
$1 / C = 1/ Co + k.t$	$t90\% = 1 / (9k \times Co)$	(Segunda ordem)

Onde Co é a concentração dos reagentes no tempo zero, C é a concentração após reação n tempo t e k, a constante de reação (SINKO, 2008).

2.6 Avaliação do teor de produtos de degradação em forma farmacêutica sólida

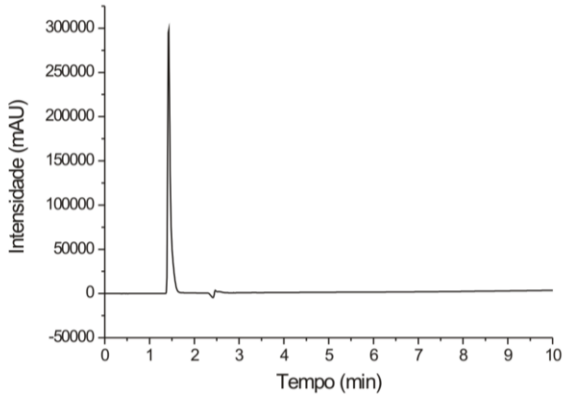
A fim de cumprir o que estabelece o ICH, foi analisado o teor dos produtos de degradação, os quais foram detectados em um lote de produção industrial representativo em forma farmacêutica comprimido de citrato de DEC de 50mg (lote n° 10080735 fabricado por Farmanguinhos® FIOCRUZ) após estudo de estabilidade acelerada (45°C ± 2°C / 75% UR ± 5%, por 3 meses), a fim de avaliar a necessidade de notificá-los (0,05% a 0,2%) ou identificá-los e qualificá-los (maior que 0,2%) devido a dose diária de 420 mg (para pacientes microfilarêmicos) ou 840 mg (para pacientes com vermes adultos) (ICH Q3B).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento do método analítico

Inicialmente na tentativa de avaliar as amostras degradadas de citrato de DEC, foi utilizada a metodologia descrita nos compêndios oficias que descreve a utilização de coluna octadecilsilano (C18). Porém, a reprodução do método não foi possível, o qual apresentou um perfil cromatográfico diferente do descrito pelos compêndios oficiais (Figura 1) em que o tempo de retenção da DEC base seria em aproximadamente 7 min.

Figura 1 - Cromatograma do citrato de DEC obtido com método descrito em compêndios oficiais.



Na tentativa de manter os constituintes básicos do método (fase estacionária e fase móvel) pequenas alterações foram realizadas. Inicialmente o fluxo da fase móvel foi reduzido na tentativa de proporcionar um retardo na eluição da DEC, possibilitando assim a separação do fármaco e suas substâncias relacionadas. Foram testados os fluxos de 0,4, 0,6 e 0,8 mL/min, em triplicata, obtendo os tempos de retenção de 2,8 min (com fluxo de 0,4 $mLmin^{-1}$), 2,2 min (com fluxo de 0,6 $mLmin^{-1}$) e 0,8 min (com fluxo de 0,8 $mLmin^{-1}$).

A partir dessas análises foram testadas todas as amostras degradadas, em que nenhuma diferença foi notada nos cromatogramas apenas um decaimento do teor da DEC, demonstrando, portanto que o método não foi capaz de detectar seus produtos de degradação.

A pouca seletividade do método deve-se a fase estacionária uma coluna C_{18} com a qual a DEC não possui nenhuma afinidade química. Dessa forma, era de se esperar que a DEC, ao ser eluida pela fase móvel descrita, não apresentasse nenhuma afinidade pela coluna, e, portanto, não houve separação da DEC e seus produtos de degradação com a reprodução desse método.

Com esse resultado, viu-se a necessidade de substituir a fase estacionária do método por outra que apresentasse afinidade pelas substâncias a serem analisadas. Optou-se por uma coluna octasilano (C8), de especificações diferentes, isto é, 250 x 4,6 mm e 5µm de tamanho de partícula. Além da substituição do solvente orgânico utilizado (metanol) por acetonitrila devido a menor absortividade da acetonitrila no ultravioneta 190 nm em comparação ao metanol (210 nm).

3.2 Validação do método indicativo de estabilidade

A linearidade da curva analítica na faixa de 30 a 90 μgmL^{-1} foi obtida (r = 0,9996), visto que segundo o ICH (ICH Q2B, 1996), o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99, sendo assim, o valor de r obtido na análise da DEC pelo método desenvolvido obedece aos limites estabelecidos.

Para os cálculos dos teores das impurezas de síntese da DEC, foram calculadas curvas da N-metilpiperazina e N,N-dimetilpiperazina, obtendo-se coeficiente de correlação linear

de 0,9641 e 0, 9904, respectivamente, demonstrando a que o método também é linear para a N,N-dimetilpiperazina, sendo a N-metilpiperazina um pouco inferior ao preconizado pelos compêndios oficiais, por não possuir uma retenção adequada pela fase estacionária, eluindo logo após o volume morto da coluna.

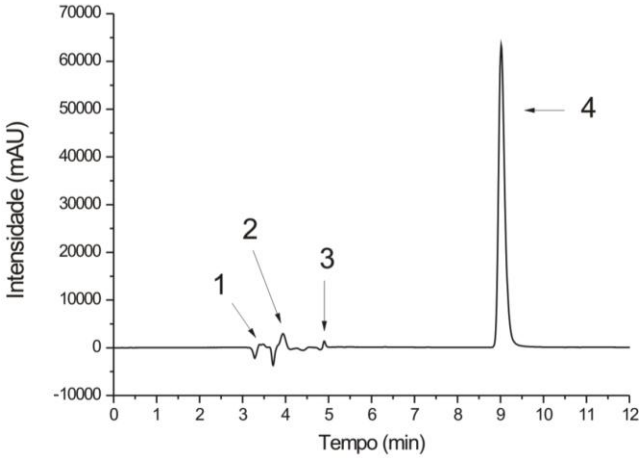
A partir da média dos desvios padrão das curvas obtidas foi possível calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada substância: DEC (1), N-metilpiperazina (2) e N,N-dimetilpiperazina (3), que estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Limites de detecção e quantificação da dietilcarbamazina (DEC), da N-metilpiperazina e N,N-dimetilpiperazina.

Analito	**Curva**	**LQ**	**LD**
1	área = 19932,1808 x conc. – 17444,5689	0,5184 µg.mL^{-1}	0,1555 µg.mL^{-1}
2	área = 8238,33 x conc. – 8880,83	1,798 µg.mL^{-1}	0,8397 µg.mL^{-1}
3	área = 78007,73 x conc. – 122459,33	0,3429 µg.mL^{-1}	0,1028 µg.mL^{-1}

O cromatograma da DEC matéria prima, obtido a partir das condições de análise da DEC e suas substâncias relacionadas, está representado na Figura 2. O cromatograma típico demonstra as duas impurezas de síntese, o citrato e a DEC, com os seguintes tempos de retenção: N-metilpiperazina (TR_1 = 3,44), citrato (TR_2 = 4,10), N,N-dimetilpiperazina (TR_3 = 4,98) e a DEC (TR_4 = 9,1).

Figura 2 - Cromatograma representativo da DEC matéria prima.



*Legenda: 1: N-metilpiperazina; 2: citrato; 3: N,N-dimetilpiperazina e 4: dietilcarbamazina (DEC).

O tempo de retenção da DEC (9,1 min ± 0,8) encontrado no presente trabalho com método CLAE-DAD, modo isocrático, foi maior em relação ao tempo citado na literatura (MATHEW, KALYANASUNDARAM, 2001), devido principalmente a mudança no fluxo da fase móvel e temperatura do forno da coluna, possibilitando uma separação mais lenta e eficaz da DEC e suas substâncias relacionadas.

Os resultados referentes à avaliação da precisão inter e intra-ensaio para a DEC, foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) two-way em que o $F_{calculado}$ para dias foi 1,38 e para analistas 0,09, ambos inferior ao $F_{crítico}$ de 10,61 sendo o método considerado preciso neste parâmetro.

Os resultados referentes à avaliação da repetitividade não excederam um RSD de 5%, assim, os valores encontrados atendem aos limites estabelecidos (ICH Q2B, 1996).

Os resultados referentes à avaliação da exatidão do método estão apresentados na Tabela 5, em que o teste estatístico empregado na avaliação foi o t de Student, encontrando um $t_{calculado}$ de 0,0041; 0,3322 e 0,0053 para os valores de concentração baixa (30 μgmL^{-1}), média (60 μgmL^{-1}) e alta (90 μgmL^{-1}), respectivamente, todos abaixo do $t_{crítico}$ de 2,9199 (ICH Q2B, 1996), sendo o método considerado exato.

Especificidade do método foi avaliada pela capacidade do método detectar e quantificar as amostras com degradação suficiente da DEC matéria prima, cujos cromatogramas estão de cada degradação serão discutidos individualmente. Com relação à seletividade do método desenvolvido, não foram observados interferentes em nenhuma das amostras analisadas (Tabela 2) de acordo com o cálculo de pureza do pico cromatográfico.

Os parâmetros cromatográficos para o método validado foram checados para confirmar que o sistema estava trabalhando corretamente durante as análises, obtendo-se para a DEC os valores médios de: tempo de retenção (9,13 ± 0,52), resolução (21,34 ± 2,33), assimetria (1,33 ± 0,29) e número de pratos teóricos (558719,54 ± 18956,78).

Tabela 2 - Avaliação da pureza do pico da DEC nas diferentes condições.

	Threshould	**Index**
Hidrólise básica (NaOH a 1 M)	0,9881 ± 0,0167	1.0000
Hidrólise ácida (HCl a 2 M)	0,9969 ± 0,0014	1.0000
Oxidação (H_2O_2 a 3%)	0,9988 ± 0,0011	1.0000
Fotodegradação em solução	0,9988 ± 0,0023	1.0000
Termodegradação em solução	0,9985 ± 0,0234	1.0000

Após verificação dos parâmetros cromatográficos, a robustez foi verificada com a variação para a temperatura do forno, os quais foram tratados estatisticamente por ANOVA fator único, os resultados estatísticos demonstraram com 95% de confiança que o F calculado de 0,043 foi inferior ao F tabelado de 3,682. Sendo para esta deliberada e pequena variação, este considerado robusto. Outra variação proposta foi a avaliação de diferentes fabricantes do sal fosfato utilizado na preparação da fase móvel do método. Os resultados demonstraram com 95% de confiança, por teste "t Student", o t calculado foi 0,987, menor que o t tabelado de 2,228, portanto o método foi considerado robusto para estes dois diferentes fabricantes.

O fluxo de deslocamento da fase móvel também foi avaliado, considerando uma variação dentro do aceitável durante a qualificação do equipamento. A variação proposta foi de ± 0,05 $mLmin^{-1}$. O tratamento estatístico demonstrou, com 95% de confiança, que o F calculado 1,765 foi menor que o F tabelado de 3,682, o que possibilitou a conclusão que este foi robusto também para variação de fluxo proposta.

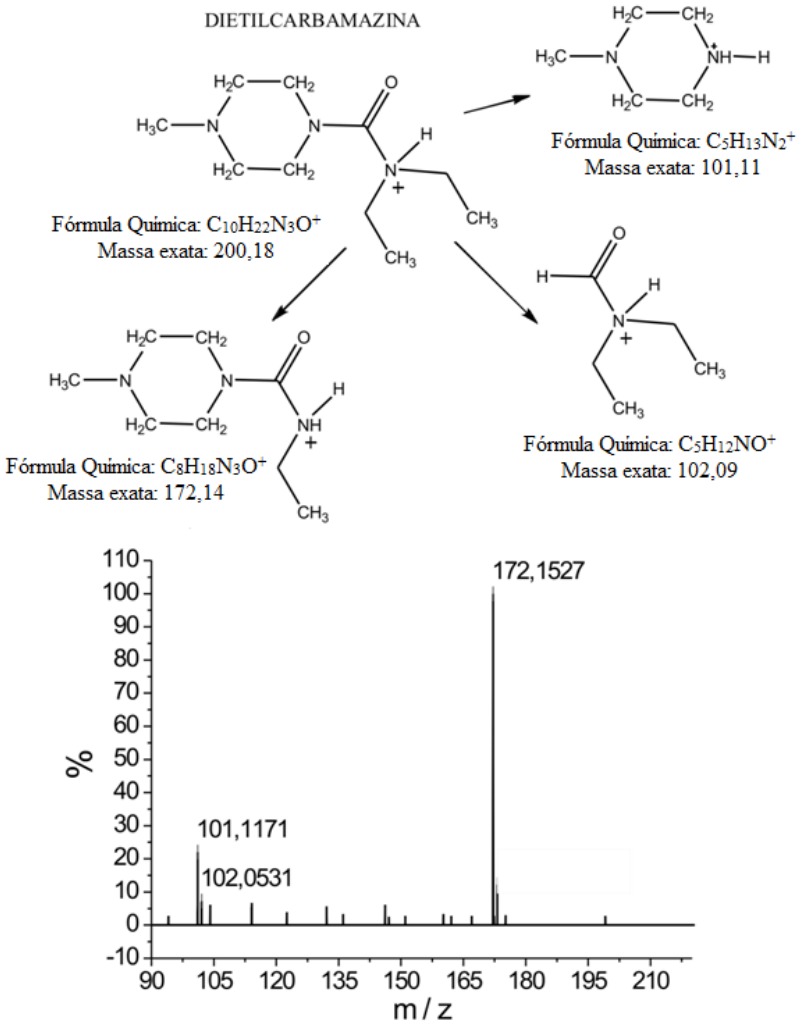
Por fim, a estabilidade das amostras foi verificada, em 24 horas (teste "t Student") apresentando um $t_{calculado}$ de 1,080 e o $t_{tabelado}$ de 2,446, com 95% de confiança.

3.3 Avaliação do teor de produtos de degradação

Para avaliar os produtos de degradação, as amostras obtidas através dos testes de estresse foram quantificadas por um método preciso, simples e seletivo para quantificação da DEC e seus produtos de degradação conforme método descrito anteriormente.

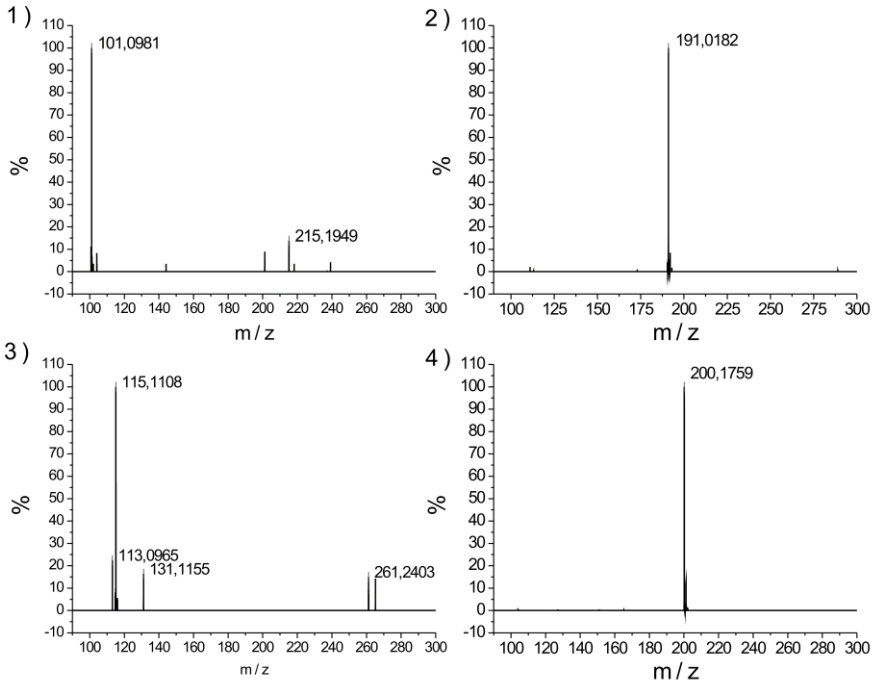
Para proposição das rotas degradativa, a fragmentação do ínon da DEC base foi realizada, demostrando que a amida central da molécula é seu maior ponto de tensão intramolecular, conforme descrito na Figura 3.

Figura 3 - Espetros de massas da fragmanetação da DEC base livre.



As amostras obtidas foram avaliadas por CLAE-MS, que possibilitou identificar a relação massa/carga (m / z) dos produtos de degradação e impurezas de síntese do citrato de DEC. O cromatograma (figura 2) demonstra as duas impurezas de síntese, o citrato e a DEC, com os seguintes tempos de retenção: N-metilpiperazina (TR_1 = 3,44), citrato (TR_2 = 4,10), N,N-dimetilpiperazina (TR_3 = 4,98) e a DEC (TR_4 = 9,1), confirmados pelos espectros de MS ilustrados na figura 4.

Figura 4 – Espectros de massa dos respectivos picos do cromatograma.



*Legenda: 1: N-metilpiperazina; 2: citrato; 3: N,N-dimetilpiperazina e 4: dietilcarbamazina (DEC).

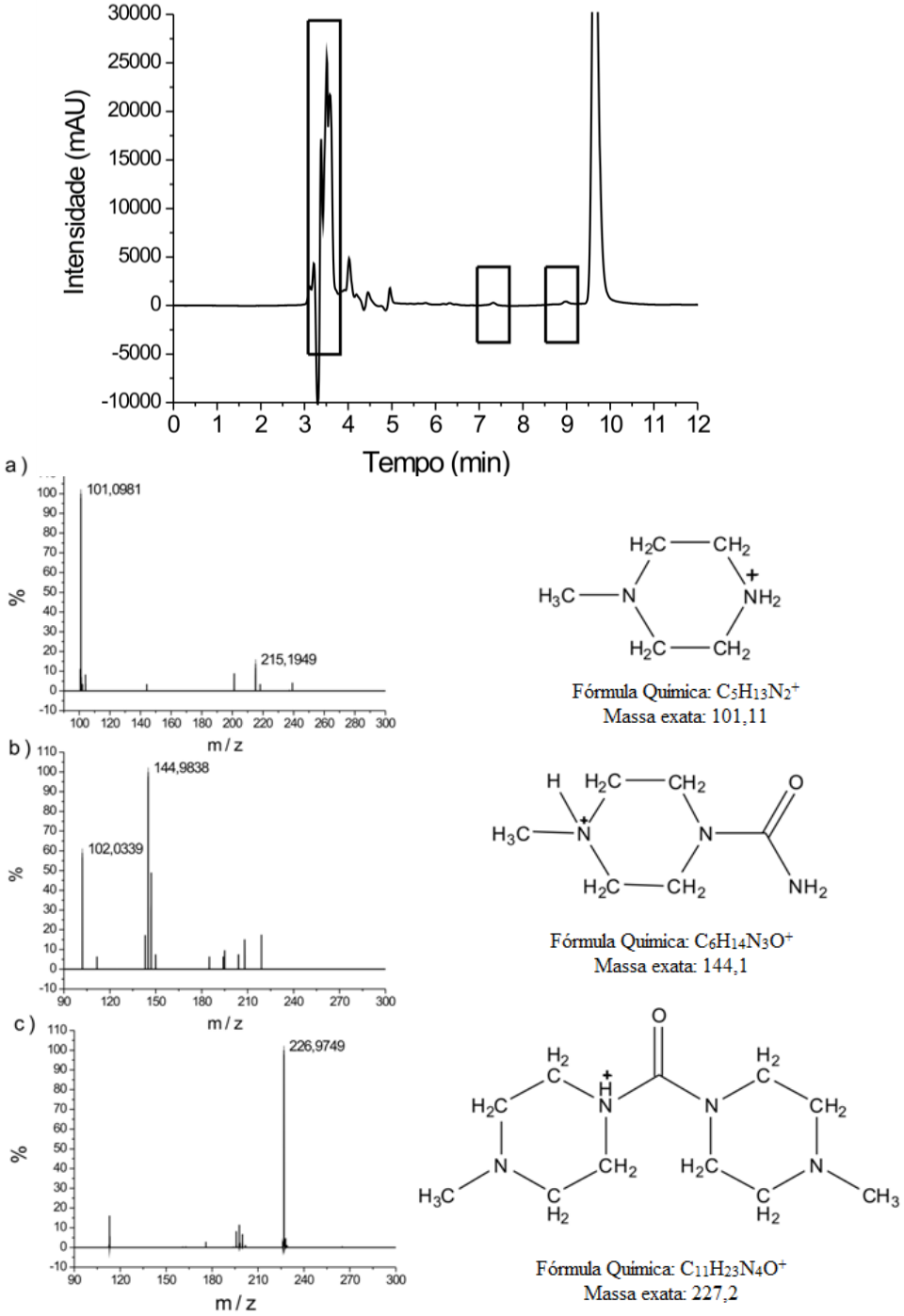
3.3.1 Hidrólise da DEC

As amostras submetidas à hidrólise neutra não apresentaram degradação após o período máximo de análise em 30 dias (a 25°C), evidenciando a estabilidade da DEC base livre em solução aquosa. Portanto, para hidrólise neutra foram realizadas novas análises com adição de temperatura a reação para que o fornecimento de calor atingisse a energia de ativação necessária para hidrólise da DEC em pH neutro, já que em condições mais amenas a reação não ocorreu. DEC base livre demonstrou-se mais estável a degradação ácida (2M), visto a necesidade de realizarmos os estudos degradativos com o dobro da concentração da solução degradativa utilizada na degradação alcalina (1M).

As amostras submetidas à hidrólise evidenciaram o aparecimento do mesmo produto de degradação obtido na fragmentação da DEC (PDH-1, 1-metilpiperazina), bem como de mais dois produtos de degradação minoritários em 7,2 (PDH-2) e 8,7 (PDH-3) bitidos na

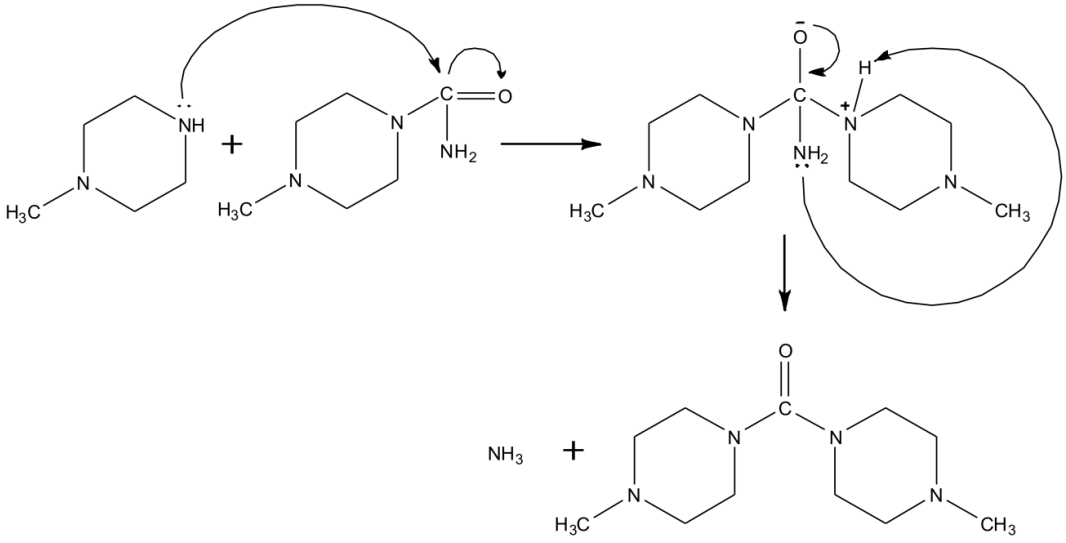
hidrólise ácida. O cromatograma obtido a partir das análises de citrato de DEC sob hidrólise ácida e os espectros de massa referentes aos PD estão descritos na Figura 5.

Figura 5 - Cromatograma sob hidrólise ácida; MS da DEC sob hidrólise ácida, e seus prováveis produtos de degradação (PDs) (a), (b) e (c).



A rota degradativa da DEC base livre por hidrólise poderia ocorrer por dois diferentes mecanismos: com a hidrólise do grupamento amida central ou da amina terciária da cadeia lateral (SOLOMOS, 2009). O espectro de massas do cromatograma da amostra de hidrólise ácida evidenciou que os dois produtos obtidos a partir da reação sofrem uma segunda reação, a qual produz o PDH-3, segundo o mecanismo da Figura 6.

Figura 6 – Reação dos produtos de hidrólise da DEC base livre gerando um novo produto.



As amostras de DEC submetidas à hidrólise ácida (HCl 2M), básica (NaOH 1M) e neutra (H_2O a 50°C) reagiram por tempo total de 7 dias, apresentando decaimento característico do teor da DEC, o que possibilitou os cálculos cinéticos para reação de hidrólise. Os parâmetros cinéticos obtidos demonstraram que a decomposição hidrolítica da DEC em condições ácida, básica e neutra, segue uma reação de primeira ordem, calculados de acordo com a seguinte equação: ln C = ln Co – k.t, onde Co é a concentração inicial, C a concentração remanescente, k a constante de velocidade (s^{-1}) e t é o tempo (s), com as respectivas equações descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Equações calculadas, a partir da reação de primeira ordem, das hidrólises da DEC, e seus respectivos coeficientes de determinação linear.

Hidrólise	Equação	R^2
Ácida (HCl 2M a 25°C)	$Y = 4,664 - 0,00157 . x$	0,9982
Básica (NaOH 1M a 25°C)	$Y = 4,5471 – 2,2828.10^{-4} . x$	0,9872
Neutra (H_2O a 50°C)	$Y = 4,5920 – 2,3367.10^{-4} . x$	0,9976

O gráfico obtido das cinéticas de degradação da DEC foi calculado a partir do logaritmo neperiano do percentual de fármaco em função do tempo, para as três condições hidrolíticas, evidenciando um comportamento de reação de primeira ordem, no qual a hidrólise da DEC base livre dependeria apenas da concentração de citrato de DEC no meio. Porém, essa conclusão pode ser justificada pela grande concentração de água no meio. Dessa forma, os termos da equação tendem ao infinito, podendo ser uma reação de pseudo-primeira ordem, já que foi observado que a reação independe do pH, ou seja, da concentração das soluções hidrolíticas, confirmando que a reação ocorre devido ao ataque nucleofílico da água, sendo a diminuição do pH apenas um catalizador, aumentando ou diminuindo a velocidade da reação de hidrólise.

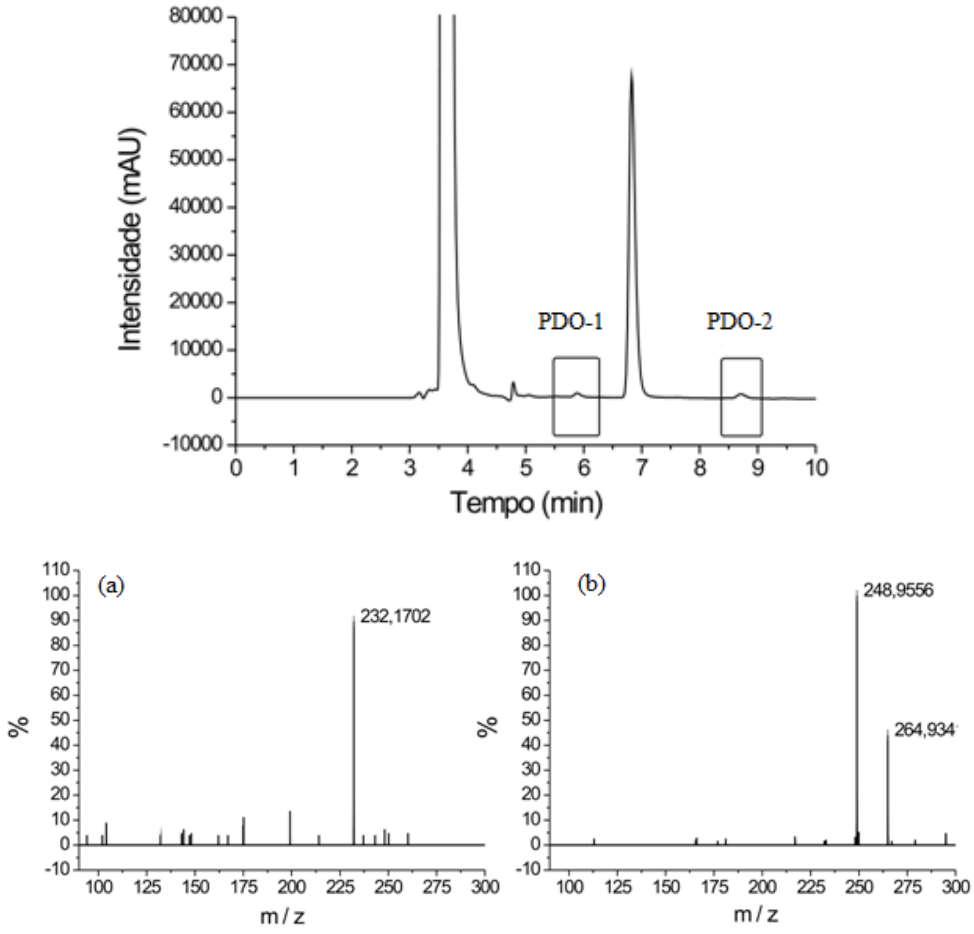
As constantes de velocidade das reações de hidrólise são semelhantes ao coeficiente angular das retas obtidas, tomadas com o sinal oposto. Sua análise revelou que, nestas condições experimentais o valor da taxa constante de decomposição hidrolítica do DEC base livre em condições ácida, básica e neutra, são, respectivamente, $k = 0,00157$ horas^{-1}, $2,2828.10^{-4}$ horas^{-1}, $2,3367.10^{-4}$ horas^{-1}.

3.4 Oxidação em solução

A DEC base livre apresenta uma estrutura química bastante susceptível à oxidação, pela presença de duas aminas terciácias e uma amida. As aminas terciárias são oxidadas facilmente por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aos seus respectivos N-Óxidos (BAERTSCHI, 2005).

A análise dos cromatogramas das amostras de citrato de DEC, oxidadas por 7 dias, permitiu a detecção de dois produtos da degradação oxidativa (PDO - 1) e (PDO - 2) com tempo de retenção de 5,9 min e 9,0 min, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Cromatograma de uma amostra de citrato de DEC oxidada por 7 dias.



*Legenda: (a): PDO-1 DEC base livre por oxidação no tempo de retenção de 5,9 minutos; (b): PDO-2 da DEC base livre por oxidação no tempo de retenção de 9,0 minutos.

Nos cromatogramas das amostras de citrato de DEC, oxidadas por 7 dias, há o aparecimento de um pico muito intenso correspondente ao peróxido de hidrogênio, agente oxidante do estudo, em aproximadamente 4 min.

O espectro de massas e os cromatogramas das amostras degradadas por oxidação (Figura 7) revelaram as massas dos produtos oriundos da degradação oxidativa, e assim,

pôde-se sugerir a estrutura química de dois possíveis produtos, bem como, sugerir um mecanismo de degradação.

A degradação de fármacos por oxidação é tipicamente autoxidativa, ou seja, é iniciada pela formação de radial livre, a qual é etapa fundamental, seguida de uma etapa de propagação, também chamada de reação em cadeia (MATTOS, et al., 2003; MELO, et al., 2009).

Os produtos da degradação oxidativa da DEC base livre ocorreram, possivelmente, por dois mecanismos: autoxidação, envolvendo a formação de radical livre; e através da reação com peróxido de hidrogênio, envolvendo um ataque eletrofílico nos nitrogênios da molécula, sem a formação de radicais livres, conforme figuras 8 e 9.

Figura 8 - Mecanismo de oxidação da DEC base livre por ataque eletrofílico.

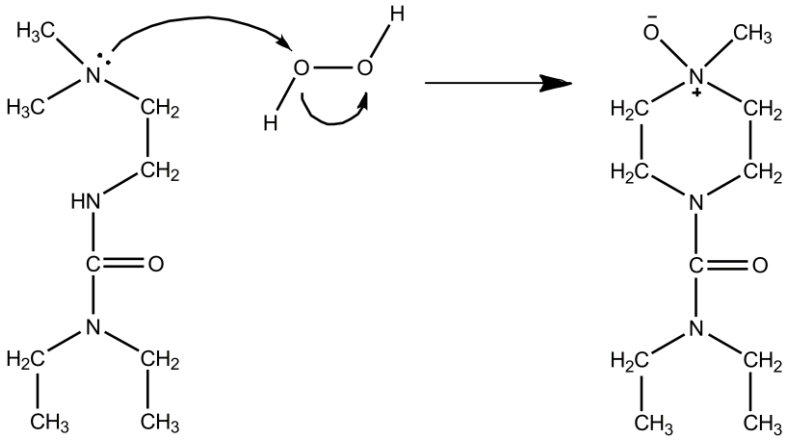
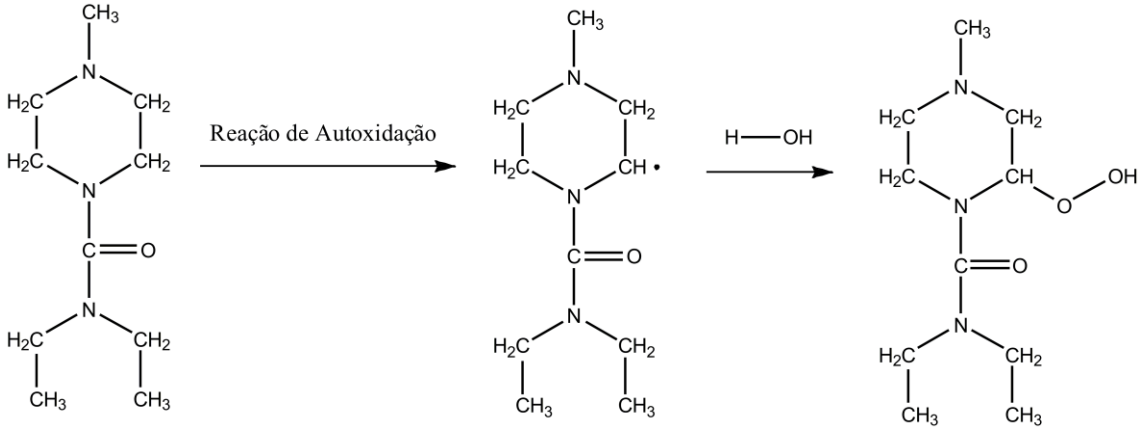


Figura 9 – Mecanismo de autoxidação da DEC base livre.

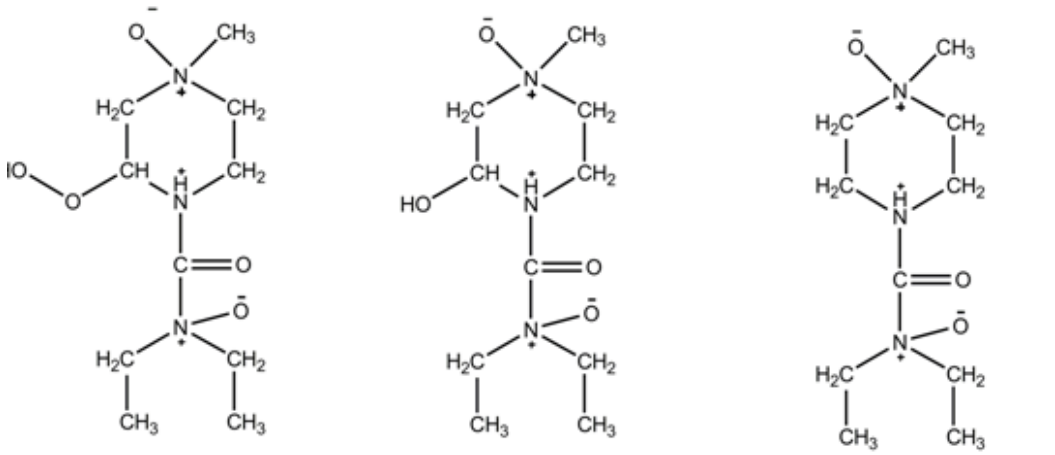


A reação de autoxidação de aminas é, provavelmente, o principal mecanismo de oxidação. A remoção de hidrogênio do carbono α da piperazina é provavelmente o mais importante mecanismo da iniciação de oxidação. O radical livre resultante (R•) é muito susceptível ao ataque do oxigênio atmosférico e forma um radical livre peróxido (ROO•) bastante instável. A formação desse radical é possível, pois o par de elétrons livre do nitrogênio estabiliza o orbital semi-preenchido do radical formado. Dessa forma, aminas terciárias são bastante suscetíveis a oxidação, o que foi comprovado através dos resultados (BAERTSCHI, 2005; DALMÁZIO, 2007).

Por esse motivo, N-óxidos estão sempre presentes como impurezas de co-oxidação de aminas terciárias, devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio durante a reação de autoxidação. Oxidação de aminas com peróxido de hidrogênio ocorre por ataque eletrofílico, não envolvendo a formação de radicais (BAERTSCHI, 2005; DALMÁZIO, 2007).

Através da relação massa carga dos espectros de massas das amostras degradadas, e com base nos mecanismos de oxidação supracitados, foram propostos os 4 possíveis produtos de degradação oxidativa da DEC, conforme figura 10.

Figura 10 – Prováveis produtos de degradação da DEC base livre por oxidação.



A reação de oxidação apresenta uma etapa limitante, que é a geração de um radical livre, o qual desencadeia as reações posteriores, como comentados anteriormente. Dessa

forma, a maior parte das reações de oxidação segue uma cinética de segunda ordem, ou seja, dependem da concentração do fármaco, bem como da geração espontânea do radical livre, no caso de reações de autoxidação, e da concentração de O_2 no meio, para reações envolvendo ataque eletrofílico. (BAERTSCHI, 2005; DALMÁZIO, 2007; MATTOS, et al., 2003; MELO, et al., 2009).

Os parâmetros cinéticos obtidos demonstraram que a decomposição oxidativa da DEC seguiu uma reação de segunda ordem, calculados de acordo com a seguinte equação: $1/C = 1/Co + k.t$ (cinética de segunda ordem), onde Co é a concentração inicial, C a concentração remanescente, k a constante de velocidade (s^{-1}) e t o tempo (s), comprovando que a oxidação da DEC depende da concentração de ambos os reagentes: da DEC, e do peróxido de hidrogênio ($R^2 = 0,9998$).

A constante de velocidade da reação foi igual à inclinação da reta obtida, tomada com o sinal oposto. Sua análise revelou que, nestas condições experimentais o valor da taxa constante de decomposição oxidativa da DEC em solução de peróxido de hidrogênio 3% foi $k = 5,2157 \times 10^{-5}$ $horas^{-1}$.

3.5 Fotodegradação em solução

Para realização do estudo de fotodegradação do citrato de DEC em solução fez-se necessário a quantificação da iluminância e irradiância da câmara de fotoestabilidade utilizada. Com a utilização de um luxímetro obteve-se o perfil de lux emitidos por hora (n° lux = $2875.h - 1,164 \times 10^{-10}$), estabelecendo, portanto, para nossa análise que o tempo total de exposição segundo recomendação do ICH para 1.200.000 lux corresponde a 41h de exposição.

Para determinação da irradiância, foi utilizado a avaliação da fotoestabilidade do quinino, em que preconiza-se para irradiância de 200 $W.hm^{-2}$ corresponda-se uma absorbância relativa aos fotoprodutos do quinino em 0,5A. A avaliação da média da diferença de absorbância das amostras de quinino expostas permitiram o cálculo do tempo mínimo de exposição de acordo com o ICH de 15 horas de exposição (irradiância = $0,033.h + 0,0032$).

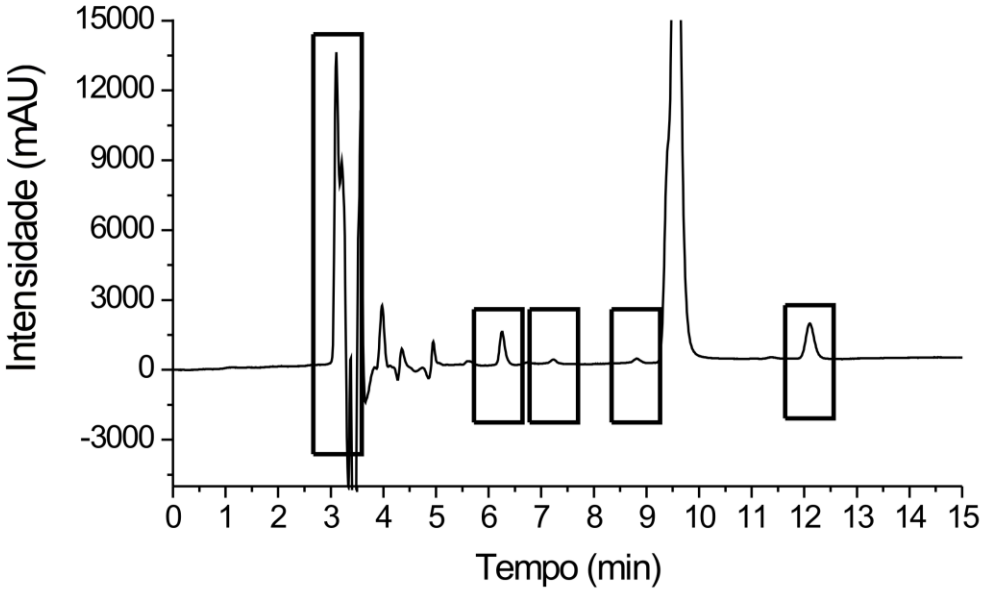
Portanto, as mudanças nas soluções foram monitoradas por CLAE-DAD em função do tempo de exposição, possibilitando a detecção e quantificação de 1 fotoproduto relevante, FP-1 (Tr = 3,44), refernte a N-metilpiperazina, sendo analisada a amostra com 44h de exposição à irradiação, visto que, com esse tempo de exposição a amostra recebe toda irradiância e iluminância preconizada pelo ICH. Porém não foi possível calcular a cinética degradativa da DEC em solução aquosa devido à estabilidade da DEC frente a esse procesos degradativo, já que amostras com 7 dias de exposição não possuíram decaimento superior a 15 % de DEC.

3.6 Avaliação de produtos de degradação em forma farmacêutica sólida

O cromatograma dos comprimidos de DEC (figura 11) obtidos após estudo de estabilidade acelerada apresentou 5 produtos de degradação, dos quais 3 foram os mesmos da hidrólise (Tr = 3,2; Tr = 6,2; Tr = 8,9), e 2 da oxidação (Tr = 6,2; Tr = 12,2). Esses resultados revelam que a forma farmacêutica disponibilizada atualmente no programa de combate a filariose linfática não apresenta estabilidade assegurada pela presença destes PDs, originados possivelmente pela presença de excipientes que não são compatíveis com o citrato de DEC, ou por inadequação da embalagem primária assoociada às más condições de armazenamento.

Uma vez que a DEC apresenta alta higroscopicidade, as reações de hidrólise tornam-se mais viáveis, o que foi confirmado através dos estudos. Além disso, a sua estrutura química, contendo aminas terciárias com pares de elétrons disponíveis, permite a geração espontânea de radicais livres, o que desencadeia o processo oxidativo.

Figura 11 - Cromatograma ampliado para verificação dos produtos de degradação em amostra representativa de comprimido de citrato de DEC 50 mg, submetidos à estudos de estabilidade no modelo acelerado nos primeiros 3 meses.



4 CONCLUSÃO

As condições de degradação empregadas no estudo foram suficientes para degradar a DEC e gerar produtos de degradação, os quais foram quantificados por CLAE-DAD e identificados por CLAE-MS. O espectro de massas da fragmentação da DEC base livre demonstrou os pontos de tensão da molécula, auxiliando na interpretação dos dados obtidos a partir dos estudos de degradação.

As hidrólises da DEC base livre (ácida, básica e neutra a 50°C) ocasionaram a degradação, de forma que todas apresentaram cinética de primeira ordem, ou seja, a reação de hidrólise não dependeu do pH do meio, servindo apenas como catalisador da reação.

Através da avaliação das amostras obtidas por hidrólise ácida, os produtos de degradação gerados puderam ser identificados, através do espectro de massas, dentre os quais um é uma impureza do citrato de DEC presente na matéria prima. Os outros dois poderam ser elucidados, e foi proposta uma rota degradativa.

A DEC base livre mostrou-se bastante suscetível a oxidação, produzindo dois produtos de degradação relevantes, os quais puderam ser revelados através dos respectivos

espectros de massas. A partir dos resultados, pôde-se sugrerir os possíveis mecanismos de degradação. A reação de oxidação seguiu uma cinética de segunda ordem. Não foi possível calcular a cinética de fotodegradação DEC base livre, visto que a molécula apresentou-se estável, tomando-se como base o tempo máximo de exposição segundo o ICH.

A avaliação das formas farmacêuticas submetidas a estudo de estabilidade acelerado evidenciaram a formação de 5 produtos de degradação, os mesmos advindos da hidrólise e da oxidação. Os resultados obtidos mostraram que a formulação distribuída para o tratamento da filariose linfática não apresenta qualidade adequada, uma vez que o método indicativo de estabildiade foi capaz de detectar 5 produtos de degradação, em apenas 3 meses de exposição a condições aceleradas. Nesse sentido, fica comprovada a importância dos estudos de pré-formulação, os quais deveriam ser realizados previamente a fim de avaliar a susceptibilidade da DEC base livre a degradação.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco - Brasil, Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE - Brasil, Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico – CNPq Brasileiro, pelo auxílio financeiro a essa pesquisa e A NORTEC® Química Fina pela doação da matéria prima.

5 REFERÊNCIAS

BAERTSCHI, S.W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 8, p. 758- 767, 2006.

BRITISH PHARMACOPOEIA, HM Stationery Office: London, England, 2009 p. 1919.

DALMÁZIO, I. Aplicação da espectrometria de massas com ionização electrospray no monitoramento de processos oxidativos avançados de interesse ambiental: degradação de fármacos, avaliação de sistemas oxidativos e oxidação do isopreno. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 159 p, 2007.

HUYNH-BA, K. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development. Editor Springer, New York, USA, 2009.

International Conference on Harmonisation (ICH). Guidance for industry Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products. nov, 2003.

MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 372-380, 2003.

MELO, S.A.S.; TROVÓ, A.G.; BAUTITZ, I.R.; PUPO, R.F NOGUEIRA. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G. G. Z.; LIU, L.; PORTER, W. Developing solid oral dosage forms: Pharmaceutical Theory and Pratices. 1. ed. New York: Elsevier, 2009.

SEHRAWAT, R.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review. *Chromatographia*, v. 72, p. 1-6, 2010.

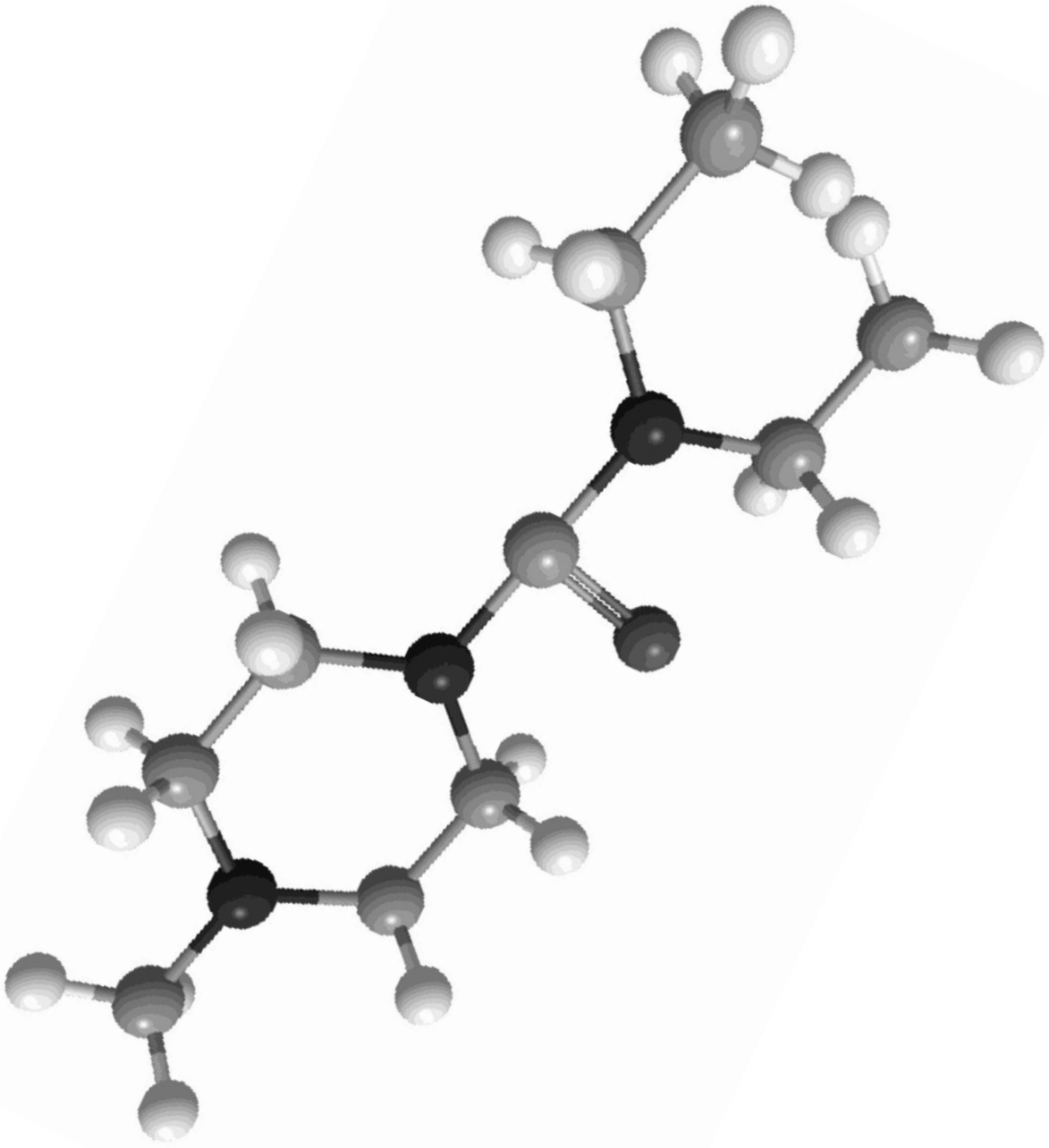
SILVA, C.C.P.; MARTINS, F. T.; HONORATO, S. B.; BOECHAT, N.; AYALA A.P.; JAVIER ELLENA, J. Triple Structural Transition below Room Temperature in the Antifilarial Drug Diethylcarbamazine Citrate. *Crystal Growth & Design*, v. 10, n. 7, p. 3094-3097, 2010.

SINKO, P. J. Martin – Físico-farmácia e ciências farmacêuticas. Editora Artmed. 5ªEd. 810p. 2008.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. Química Orgânica, Vol I e II, 9ª ed., Editora LTC, 2009.

WU, Y.; LEVONS, J.; NARANG, A.S.; RAGHAVAN, K.; RAO, V.M. Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug–Excipient Incompatibility. *AAPS PharmSciTech*, v. 12, n. 4, p. 1248-1263, 2011.

USP, The United States Pharmacopeia 30 ed. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, Maryland, U.S.A. 2007.



CAPÍTULO III

5 CAPÍTULO III: Ivermectina (IVC)

Artigo 5 - ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DO FÁRMACO IVERMECTINA UTILIZADO COMO ANTIPARASITÁRIO DE AMPLO ESPECTRO

Artigo a ser submetido ao AAPS PharmSciTeh – B2 (Qualis CAPES)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a matéria prima ivermectina (IVC) sob os conceitos do Quality by Desin (QbD) para um fármaco amplamente utilizado por suas características farmacológicas. Foram realizadas análises por espectoscopia de absorção no infravermelho, de massas para identificação da molécula, análises para confirmação da estrutura cristalina do fármaco (microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X), bem como, analíse de repartição granulométrica, densidade aparente e compatada, que permitiu cocluir que mesmo apresentando uma estrutura cristalina a IVC possui boas características de fluxo e compressibilidade. A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a termogravimetria (TG) foram utilizadas para caracterização térmica da IVC, determinação do ponto de fusão (157°C), temperatura inicial de degradação (305°C), perdas de massa com o aumento da temperatura (3 eventos, a primeira uma dessolvatação e a degradação em duas etapas consecutivas). Utilizando as técnicas supracitadas foi possível realizar um estudo de compatibilidade IVC:excipientes (utilizados em formas farmacêuticas sólidas), que demonstrou uma incompatibilidade da IVC com lactose e amido. Com base nesses resultados o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, bem como o controle de qualidade das formas já existentes no mercado pode ser realizado de forma mais racional, com um melhor entendimento das características da IVC.

Palavras-chave: caracterização físico-química, matéria prima, técnicas analíticas.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the raw material ivermectin (IVC) under the concepts of Quality by Desin (QbD) for a drug widely used for their pharmacological characteristics. Were analyzed by infrared absorption espectoscopia, mass to identify the molecule, analysis to confirm the crystalline structure of the drug (eletronic scanning

microscopy and X-ray diffraction) as well as analyzing particle size distribution, apparent density and compatada, allowing cocluir even presenting a crystalline structure IVC has good flow characteristics and compressibility. The Differential Scanning Calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TG) were used for thermal characterization of IVC determining the melting point (157°C) initial temperature of degradation (305°C), mass loss with increasing temperature (3 mass loss steps, a first desolvation and degradation in two consecutive steps). Using the above techniques it was possible to perform a compatibility study IVC: excipients (used in solid dosage forms), which demonstrated an incompatibility of the IVC with lactose and starch. Based on these results the development of pharmaceutical forms, as well as quality control of the ways already on the market can be performed more rationally, with a better understanding of the characteristics of IVC.

Keywords: physical-chemical characterization, raw material, analytical techniques.

INTRODUÇÃO

A ivermectina é um produto semissintético obtido a partir da avermectina sintetizado naturalmente pelo microorganismo streptomyces avermitilis. Consiste em uma mistura de homólogos e contém não menos que 80% da dihidroavermectina B1a (H_2B_{1a}) e não mais que 20% da dihidroavermectina B1b (H_2B_{1b}) (CERKVENIK et al., 2001; Õmura, 2008).

É utilizada como princípio ativo com ampla ação medicamentosa com aplicação em tratamento de sarnas, vermes e piolhos, atuando no sistema nervoso e função muscular, resultando em paralisia e morte dos parasitos (DENT et. al., 1997).

A ivermectina deve ser considerada um fármaco crítico, que deve ser controlado em suas característica físicas e químicas, na indústria farmacêutica. Quimicamente a IVC apresenta-se como uma mistura de isômeros estruturais, os quais possuem atividade e toxicidade diferentes, sendo preconizado que a matéria prima não possua menos que 80% do isômero B_{1a} (USP, 2011), enquanto que fisicamente comapresenta-se como um fármaco pouco solúvel de estrutura cristalina (classe II na classificação biofarmacêutica), todos estes pontos críticos devem ser trabalhados na obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.

O conceito de Quality by Desin (QbD) é uma sistemática, científica, baseada no risco integral, e abordagem pró-activa para o desenvolvimento de medicamentos que começa com objetivos previamente definidos e enfatiza produto e compreensão do processo de fabricação, bem como controle de processos (YU, 2008). O QbD significa que a garantir a qualidade, melhorando os métodos científicos devem ser utilizados nas fases da pesquisa, desenvolvimento e design, para que o processamento do produto seja o mais breve quanto possível (XU, KHAN, BURGESS, 2011; WU et al, 2007). O QbD identifica características críticas dos fármacos para a qualidade da perspectiva de produção, que traduz os atributos que o medicamento deve possuir para garantir a segurança e eficáfia para os usuários dos produtos farmacêuticos.

Desta forma, é iminente a necessidade de rever e aprimorar a caracterização físico-química da IVC, uma vez que, só os testes farmacopéicos atualmente exigidos, não são suficientes para apontar diferenças sutis entre as matérias-primas. Esta avaliação pode ser uma das ferramentas da qualidade da referida matéria-prima que, mesmo se originada de diversos fabricantes e utilizada na fabricação de comprimidos, deve proporcionar discriminação de resultados ou interpretação consistente.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Foram utilizados dois lotes de ivermectina, um lote de matéria prima cedido pelo Laboratório Veterinário Vallée® (Lote: 07016/2010, fabricado na China), e o padrão de ivermectina adquirido na Sigma Aldrich®, lote: 70288-86-7 (pureza: 95% H_1B_{1a} + 2% de H_1B_{1b}).

As misturas binárias (MB) 1:1 (p/p) da IVC com os excipientes foram preparadas utilizando almofariz e pistilo, triturando a mistura durante 3 minutos cada. Para o preparo das MBs foram utilizados os excipientes: celulose microcristalina (CMC), talco, polivinilpirrolidona (PVP) K-30, croscarmelose sódica, Starch® (amido pré-gelatinizado), Starlac® (85% lactose monoidatada + 15% amido – obtidos por *spraydried*), Flowlac® (lactose monoidratada *spraydried*), Tabletose® (lactose monoidratada) e Aerosil® (dióxido de silício coloidal).

Metodologias

Identificação Química

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 10 varreduras, de 650 a 4000 cm^{-1} na resolução de 4 cm^{-1}. Em adição a identificação por IV foi realizado o espectro de massas utilizando um equipamento marca Shimadzu® IT-TOF, com ionização por nebulização térmica e analisador de massas por tempo de vôo, sendo utilizado para diluição do fármaco um sistema acetonitrila:água (50:50), por ionização positiva, com scan de 80 a 950 m / z.

Determinação do teor e Estudo de Solubilidade

As amostras e o padrão de trabalho de IVC foram obtidas a partir de uma diluição inicial de 10 mg de IVC em solução diluente de acetonitrila:metanol:água (26:64:10), com 5 min de agitação por sonicação, para balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se a concentração final de 200 µg/mL, com posteriores diluições para 50, 100 e 150 µg/mL para obtenção da curva de calibração da matéria prima, bem como, a realização de três curvas autências de 50, 75, 100, 125 e 150 µg/mL para determinação da linearidade do padrão de IVC, possibilitando a determinação do teor de IVC na matéria prima utilizada neste trabalho.

Inicialmente, as soluções obtidas foram submetidas individualmente a análise por CLAE - DAD, seguindo, inicialmente, os parâmetros descritos por Cione & Silva, 2007-2008, que consiste na utilização de uma coluna C18 250 x 4,6 mm (5 µm) a 25°C, como fase estacionária, uma solução metanol:acetonitrila:ácido acético a 0,2% (260:640:100 mL v/v), como fase móvel, com fluxo de 1,5$mL.min^{-1}$ a 254nm. Após algumas análises o método foi otimizado, modificando-se a composição e o fluxo da fase móvel para: metanol:acetonitrila:ácido fosfórico a 0,2% (260:640:100 mL v/v), como fase móvel, com fluxo de 1 $mL.min^{-1}$ a 254 nm.

Para determinação da solubilidade da IVC foram realizados dois estudos: um estudo inicial semi-quantitativo de acordo com o recomendado pela Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010) e USP (2011), sendo testados os solventes: acetato de etila, acetona, acetonitrila, ácido clorídrico 0,2 M, água, álcool etílico absoluto, álcool metílico diclometano, éter etílico, hidróxido de sódio 0,2 M, n-hexano e peróxido de hidrogênio 3% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ª ed. 2010; USP, 2011). E um estudo quantitativo utilizado o método descrito para determinação do teor de IVC por CLAE-DAD em que amostras de IVC foram adicionadas a soluções de: água, pH 6,8 (50 mL de sol. H_2KPO_4 0,1M + 23,65 mL sol. NaOH 0,1M + água q.s.p 100 mL), pH 4,0 (9,35 mL de Na_2HPO_4 0,2 M + 10,65 mL de ácido cítrico 0,1M + água q.s.p. 100mL), pH 1,2 (50 mL de solução tampão H3BO3.KCl 0,1M + 97mL de sol HCl 0,2M + água q.s.p. 200mL) com e sem a lauril sulfato de sódio (LSS) a 1%, até obtenção de solução saturada (com retirada de alíquotas em 24, 72 e 168 horas).

Determinação das características físicas e particulares

Os difratogramas do fármaco foram obtidos no difratômetro SIEMENS® (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com ânodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo 2θ de 2-60 a uma velocidade de digitalização de 0,02º 2θ/s. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

A avaliação da morfologia dos cristais de IVC foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando-se um microscópio Jeol® JSM-5900, após serem fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 15 min (Metalizador Baltec® SCD 050). As eletromicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15 KV.

A determinação da distribuição do tamanho das partículas foi verificada através de tamisação utilizando tamises padronizados e superpostos (0, 75, 90, 150, 250, 425, 500 µm), montados numa base munida de vibração magnética (Tamizador Bertel®) durante 20 minutos, em triplicata.

A densidade do pó foi determinada através de ensaio com 10 g das amostras em um compactador automático (Tap Density, Varian®) provido de uma proveta normatizada, em

triplicata. O volume inicial ocupado pelo produto foi medido, e posteriormente foram realizadas 10 compactações para acomodação do pó. Em seguida, foram realizadas 1000 compactações, que foram repetidas em seguida, de forma que não foi observada mudança no volume medido. A relação entre a massa das amostras e o volume ocupado pelo pó antes e após a compactação determinou as *densidades aparente* (d_{AP}) e de *compactação* (d_{CP}). A compressibilidade do pó foi avaliada através do Índice de Hausner (IH) e o Índice de Carr (IC) de acordo com as seguintes equações: $IH = d_{CP}/d_{AP}$ e $IC\ (\%) = (d_{CP}-d_{AP})/d_{CP} \times 100$, respectivamente. O ângulo de repouso foi medido pelo cone de pó formado através do escoamento do fármaco através de um funil de dimensões padronizadas sobre uma superfície plana. O tempo de escoamento foi determinado pela medida do tempo necessário para o escoamento de uma quantidade pré-definida de fármaco através do funil, utilizando-se um cronômetro digital.

Caracterização térmica da IVC

Para realização da caracterização térmica da IVC foram realizadas análises de calorimetria exploratória diferencial (*diferential scaning calorimetry* - DSC) e termogravimetria (TG). A curvas DSC foram obtidas utilizando Calorímetro Shimadzu® DSC-60 interligado ao software Shimadzu® TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 50 $mL.min^{-1}$ em variadas razões de aquecimento (5, 10, 15 e 20°$C.min^{-1}$) na faixa de temperatura de 25–300°C. As amostras foram colocadas em porta amostra de alumínio hermeticamente fechadas com massas de 2 mg (± 0,2) de amostra, em triplicata. O índio e o zinco foram utilizados para calibrar o equipamento quanto a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

As análises TG foram realizadas por meio de termobalança Shimadzu®, modelo TGA Q60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 $mL.min^{-1}$, sendo a massa da amostra de cerca de 5 mg (± 0,4), acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 600˚C na razão de aquecimento de 10º$C.min^{-1}$. Antes dos ensaios, a termobalança foi verificada com oxalato de cálcio hidratado.

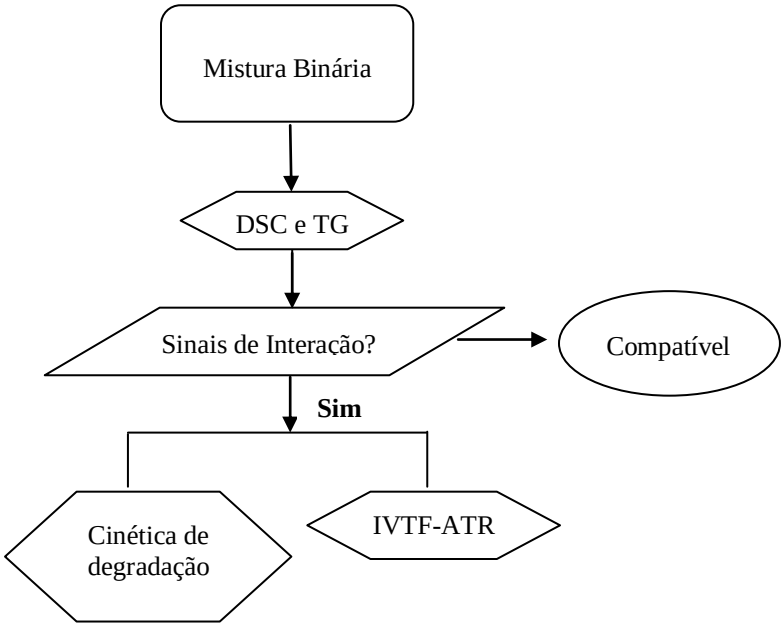
A investigação cinética de degradação não isotérmica da IVC foi obtida a partir dos dados de TG pela aplicação do método de Ozawa. Foram utilizadas taxas de aquecimento

2,5, 5,0, 10, 20 e 40°C.min^{-1}, escala de temperatura entre 30-600°C, em cadinhos de platina com aproximadamente 5 mg de amostras e atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL.min^{-1}).

Estudo de Compatibilidade Fármaco-Excipiente

O fluxograma apresentado na Figura 1 apresenta o protocolo utilizado para a realização do estudo. Na primeira etapa, foram realizadas análises da IVC isoladamente e em MB por DSC e TG, sendo os valores referentes a temperatura inicial de fusão (T_i) e temperatura inicial de decomposição (T_d) foram adotados como indicadores de interação fármaco-excipiente.

Figura 1- Fluxograma do estudo de compatibilidade fármaco-excipiente.



As análises de TG para o cálculo da cinética de degradaçãoe IV-TF seguiram os mesmos parâmetros descritos para as análises da IVC isolada.

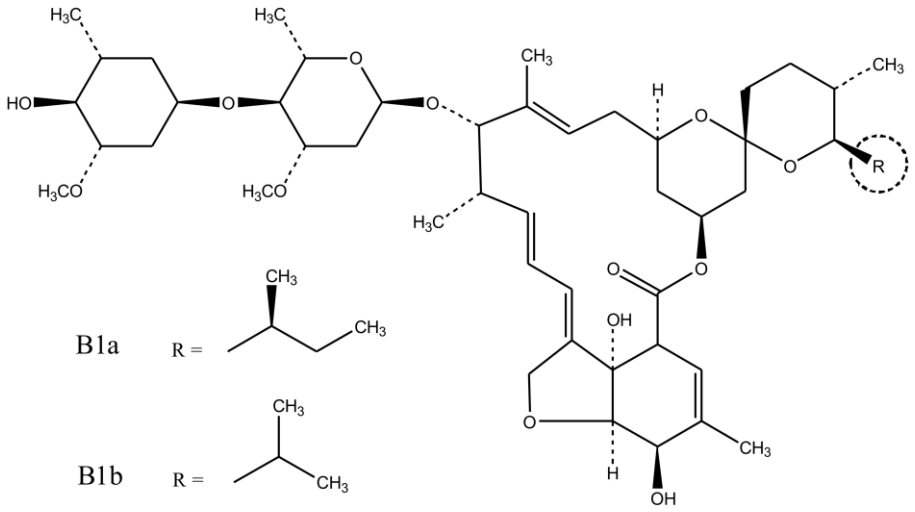
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação química da IVC

A espectrometria de absorção na região do infravermelho (IV) constitui hoje um dos principais recursos para a identificação estrutural de substâncias orgânicas, sendo de

extrema importância para o controle de qualidade de matérias primas e excipientes, quando comparamos espectros obtidos com a matéria prima às substâncias de referência podem denunciar a degradação antecipada das mesmas, ou ainda caracterizar processos tecnológicos como é o caso das micro e nanopartículas que normalmente devem se ligar fracamente aos fármacos para atuarem na melhoria da solubilidade ou vetorização dos mesmos, sendo tais ligações perceptíveis nos espectros de IV-TF.

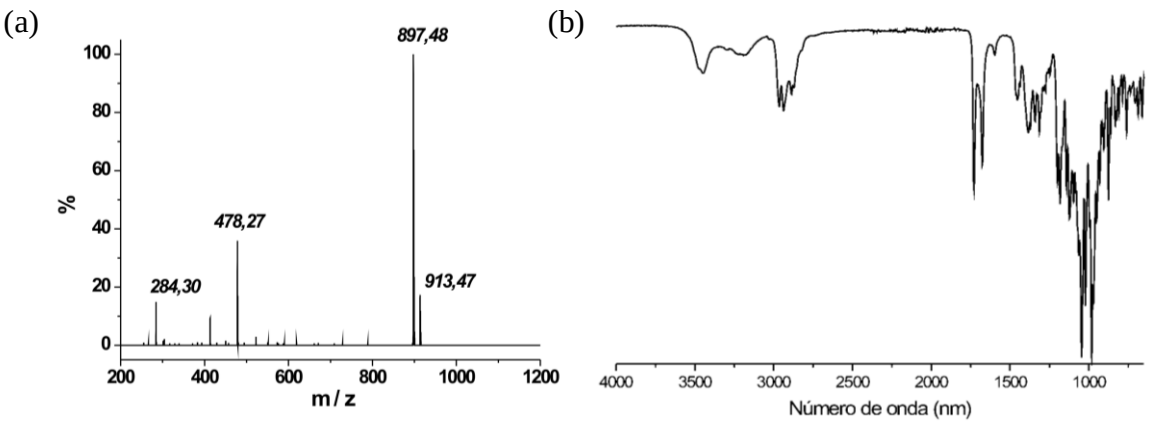
Figura 2 - Estrutura química da IVC.



A matéria prima de IVC é constituída normalmente de isômeros estruturais que diferenciam em um grupamento CH_3 na estrutura conforme ilustrado na figura 2. Compostos orgânicos com grupamentos éteres apresentam, normalmente, bandas características da presença de ligações C-O, como é o caso da molécula de IVC que é composta apenas de átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio, formando anéis e grupamentos hidroxilas, éteres e 1 grupamento éster. Nos espectros obtidos (Figura 3b) foi possível determinar 6 regiões como características inerentes da IVC, inicialmente pode-se observar os sinais: em 3500 cm^{-1}, referente a deformação axial de O-H; 2964,99 e 2937,33 cm^{-1} são característicos de grupamentos metila, deformação axial de C-H; 1728,92 cm^{-1} é característico de cetona alifática saturada; 1675,79 cm^{-1} indicando lactonas insaturadas com ligação dupla adjacente ao grupo -O-, devido ao grupo C=C; entre 1383,87 e 1313,84

cm^{-1} mostram absorção moderada de cetonas, em conseqüência das vibrações axial e angular; 1198,96 e 1182,48 cm^{-1} indicam absorção de ésteres em lactonas; entre 1142,13 e 1021,91 cm^{-1} aferiu-se a absorção mais característica de éteres alifáticos, sendo devido à deformação axial assimétrica de -C-O-C-; 982,11 e 970,57 cm^{-1} as duas bandas de deformação angular simétrica fora do plano de =C-H do alquenos terminais; 950,78 e 929,74 cm^{-1} apresenta-se deformação angular fora do plano de -O-H; 904,25 a 832,48 cm^{-1} essas bandas intensas na região de baixa freqüência provém da deformação angular fora do plano das ligações de -C-H do anel; 807,96 a 706,11 cm^{-1} indicam deformação angular fora do plano de -C-H; e 686,98 e 661,13 cm^{-1} demonstram deformação angular fora do plano de -C=C- dos anéis.

Figura 3 – Espectro de MS (a) e de absorção no infravermelho da IVC (b).



O espectro de massas da IVC é bem peculiar, não é possível detectar a massa bruta do fármaco como pico característico, o pico mais intenso é detectado em 897 m/z correspondente a um dímero de $H_2B1a + Na^+$, seguido de picos secundários em 284 m/z, 478 m/z, relativos a fragmentação de ionização, e 913 m/z ($H_2B1a + K^+$). Se a IVC não tivesse essa capacidade de formação de complexos no espectro de massas deveriam haver 2 picos com diferente intensidades de acordo com a qualidade da matéria prima: 874 m/z ($CH_2CH_3 – H_2B1a$) e 860 m/z ($CH_3 – H_2B1b$).

Estudo de solubilidade e teor (CLAE - DAD)

A IVC é obtida a partir de biossíntese de microorganismos como o *S. avermectinius*, que sintetizam não só a ivermectina como outras avermectinas, portanto, a matéria prima farmacêutica passa por uma série de etapas de purificação/recritalização em que a especificação de pureza para ser utilizado como matéria prima farmacêutica é não menos que 80% da H_2B_{1a} e não mais que 20% da H_2B_{1b} calculado para amostra anidra, livre de etanol e de dimetilformamida (ÕMURA, 2008; SHI et al., 2001).

O resultado da análise de teor médio por CLAE-DAD da matéria prima de trabalho foi 93% ± 0,9 % de H_2B_{1a} em relação ao padrão, encontrando-se adequada para o uso de acorco com compêndios oficiais (USP, 2011; Britsh Pharmacopeia, 2009).

A absorção de fármacos, a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral, depende de sua liberação e dissolução nas condições fisiológicas e da permeabilidade nas membranas biológicas. Com base nestas considerações, pode-se afirmar que a dissolução do fármaco em meio aquoso, é uma etapa limitante. O resultado do estudo de solubilidade da IVC evidenciou a baixa solubilidade em água da IVC (tabela 1), confirmando os resultados já descritos na literatura (USP, 2011).

Tabela 1 - Resultado do estudo de solubilidade semi-quantitativo da IVC.

Solvente	**Volume de solubilização**	**Classificação**	**Termo descritivo**
Acetato de etila	10 mL	Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Acetona	30 mL	Solúvel	De 10 a 30 partes
Acetonitrila	100 – 1000 mL	Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Água	>10000 mL	Praticamente insolúvel	>10000 partes
Álcool etílico	30 – 70 mL	Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Álcool metílico	30 mL	Solúvel	De 10 a 30 partes
Diclorometano	10 mL	Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Éter etílico	30 mL	Solúvel	De 10 a 30 partes
H_2O_2 3%	>10000 mL	Praticamente insolúvel	>10000 partes
HCl 0,2M	>10000 mL	Praticamente insolúvel	>10000 partes
NaOH 0,2M	>10000 mL	Muito pouco insolúvel	>10000 partes

N-Hexano	1000 – 10000 mL	solúvel	De 1000 a 10000 partes

Para uma avaliação mais detalhada, a avaliação da solubilidade em sistemas aquosos foi determinada quantitativamente por CLAE-DAD, os resultados estão desctritos na tabela 2.

Tabela 2 - Determinação da solubilidade quali-quantitativa em sistemas aquosos.

Amostra	**Tempo**	**Teor (µg/mL)**
H_2O	168 horas	----
H_2O + LSS 1%	72 horas	10,43
pH 1,2	72 horas	819,41
pH 1,2 + LSS 1%	72 horas	61,86
pH 4,0	72 horas	11.403,30
pH 4,0 + LSS 1%	72 horas	259,01
pH 6,8	72 horas	21.747,73
pH 6,8 + LSS 1%	72 horas	23,756,06

Com base nos resultados obtidos pode-se inferir que a solubilidade aquosa da IVC encontra-se abaixo do limite de quantificação do método (LQ = 6,58 µg/mL), calculado a partir da curva de linearidade do padrão (y = 3568,51.x – 30518,48), o que corrobora com o encontrado na literatura que é de 4 µg/mL (Merck Index, 2006), as demais amostras foram analisadas no tempo de 72h, pois os meios utilizados já estava saturados neste tempo.

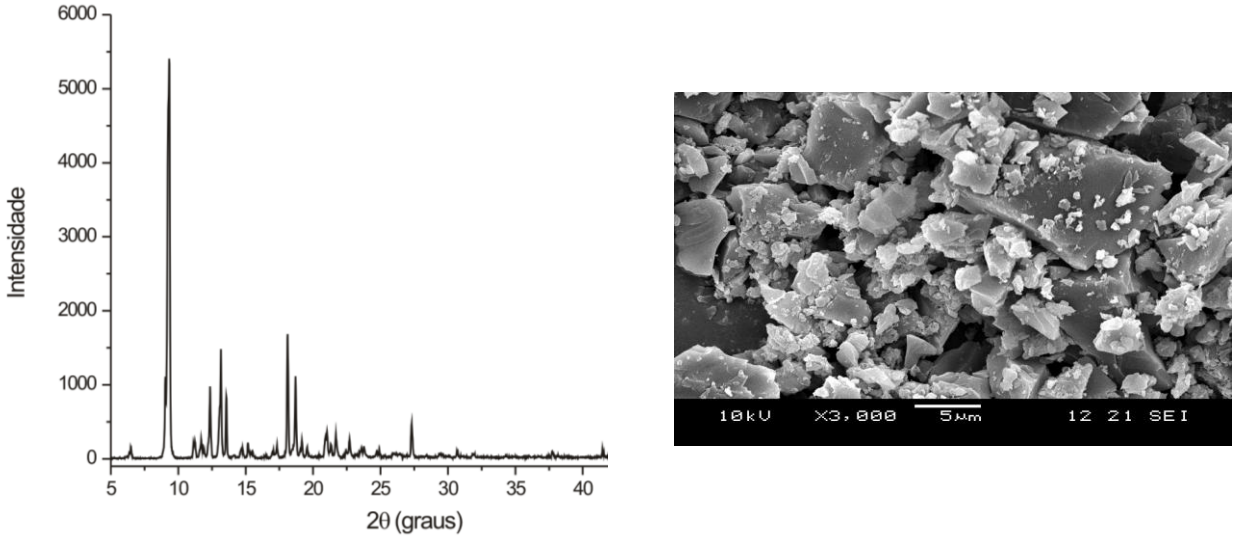
Determinação das características físicas e particulares

A difração de Raios-X é uma técnica de grande versatilidade e rapidez na aplicação de amostras policristalinas, tais como o monitoramento de amostras no desenvolvimento de produtos farmacêuticos em laboratório e no controle de qualidade industrial, fornecendo informações sobre tamanho e estrutura dos cristais. Esta técnica é baseada no princípio de que quando um material é irradiado por raios X monocromáticos, para um cristal perfeitamente alinhado, no qual os átomos são empacotados regularmente e a distância

entre os planos cristalográficos é definida pelas características físicas da amostra, a qual pode ser usada para medir com precisão os espaçamentos do retículo cristalino.

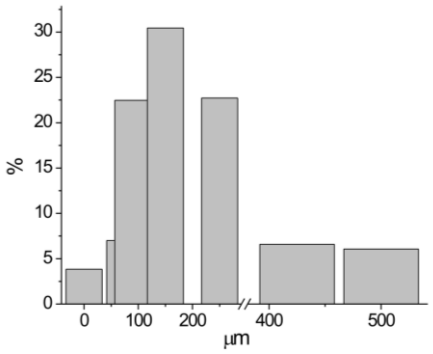
Neste ensaio foi estabelecido o padrão de difração do pó da IVC revelando ou a presença de uma série de picos, podendo ser observado a presença de um pico distinto a 2θ em torno de 9,32°, além de outros secundários de menor intensidade em 9,04°, 12,36°, 13,16°, 13,56°, 18,12°, 18,7° e 27,32° (Figura 4), evidenciando o comportamento tipicamente cristalino do fármaco que possui influência relevante na sua solubilização e fluidez.

Figura 4 - Difratograma e eletromicrografia das partículas cristalinas de IVC.



A partir da distribuição granulométrica realizada (Figura 5) pode-se observar que matéria prima utilizada para o estudo apresenta possui uma prevalência de suas partículas distribuídas no intervalo entre 90 e 250 µm.

Figura 5 - Distribuição de frequência do tamanho das partículas de IVC.



Diante desses resultados, realizou-se uma avaliação da retenção em relação à passagem das partículas nos intervalos avaliados. Nessa avaliação obteve-se que o tamanho médio das partículas é de aproximadamente 198 µm. Portanto, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010), podemos classificar a matéria prima utilizada como um pó semifino. Esse conhecimento se faz de extrema importância, visto que a velocidade de dissolução é diretamente proporcional à área superficial das partículas, e como a dissolução é um fator crítico para esse fármaco, a determinação do tamanho e morfologia das partículas da IVC permite correlacionar esses fatores.

As propriedades físico-mecânicas de compactação e reologia da IVC foram realizadas, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados das propriedades de compactação da amostra analisada.

Parâmetros	**Valores obtidos**
dap (g/mL)	0,67
d*cp* (g/mL)	0,74
IH	1,10
IC	10,44

De acordo com os dados apresentados, observou-se a baixa densidade do IVC, conforme relatado na literatura. Porém, o Índice de Carr exprimiu de forma percentual a capacidade de compactação do pó analisado, onde valores de até 10 % são considerados de excelente fluxo e compactação, conforme observado na IVC. Adicionalmente, o Índice de Hausner, similar ao IC, indicam que valores entre 1,00 e 1,11 apresentam um excelente fluxo e não exigem a adição de lubrificantes para melhorar o escoamento, enquanto que valores superiores indicam fluxo ruim.

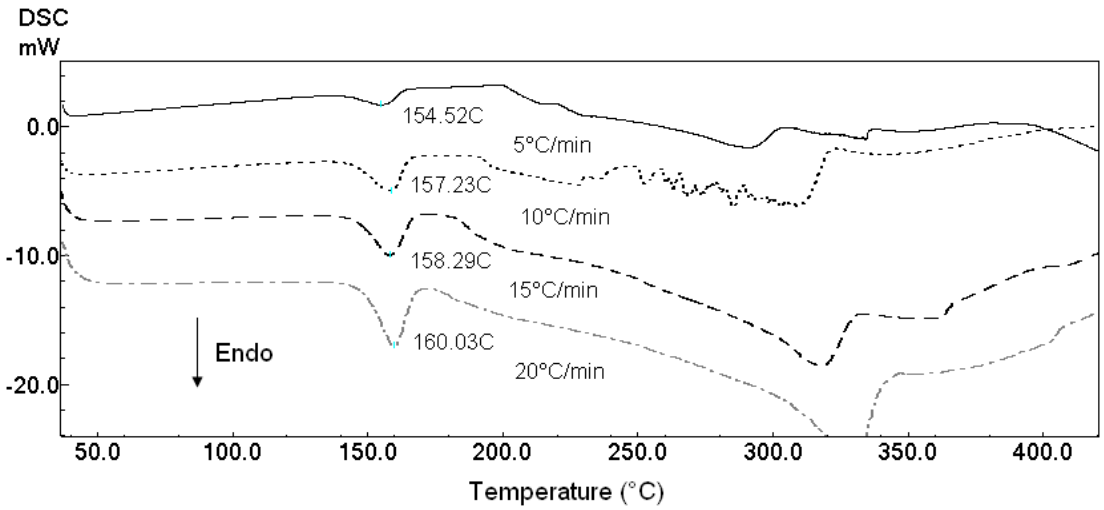
Paralelamente, através da determinação do ângulo de repouso observou-se que a IVC flui livremente, possuindo tempo de 2 ± 1 segundo. Este comportamento diverge do esperado devido a morfologia cristalina das partículas (Figura 6) que favorece interações entre as partículas. Portanto, o processamento do fármaco pode ser realizado por

compressão direta já que apesar das características cristalinas da IVC, a mesma apresenta um bom fluxo e boas características de compressibilidade.

Caracterização térmica da IVC

Através das curvas de DSC realizadas para a verificação da faixa de fusão da IVC (Figura 6) nas razões de aquecimento de 5, 10, 15 e 20ºC.min^{-1}, pode-se evidenciar um pico endotérmico na faixa de temperatura entre 152,96 e 164,2ºC (média), característico do processo de fusão do fármaco, porém o pico de fusão possui valores diferentes quando analisado em diferentes razões, sendo antecipado quanto menor a razão de aquecimento utilizada. De acordo com o Merck Index (1999) a faixa de fusão da IVC é de 155-157°C, portanto, a razão de aquecimento mais apropriada para avaliação térmica da IVC é 10°C/min que permite a determinação de ponto de fusão de 157,4 ± 0,7 °C.

Figura 6 - Curvas de DSC para definição da razão de aquecimento da IVC.



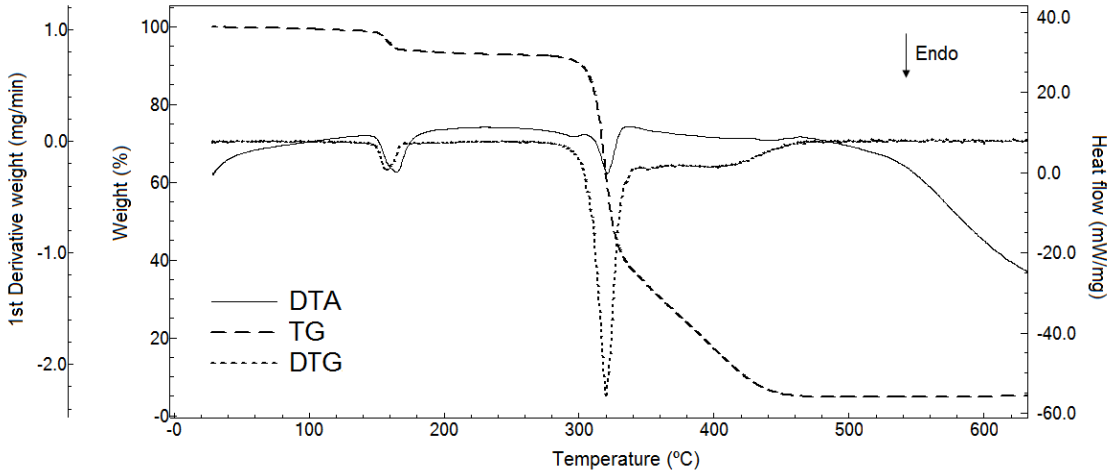
Adicionalmente, a pureza da IVC foi calculada através da aplicação da equação de Van't Hoff na linearização do evento de fusão com análise obtida a razão de 0,5°C/min, verificado em triplicata (em adição há análise realizada por CLAE-DAD, item descrito anteriormente). Neste modelo a pureza é determinada através do desvio da linearidade do evento de fusão, o qual ocorre pela presença de impurezas. Conhecendo-se o desvio da linearidade, pode-se inferir sobre o fator de correção na linearização da reta. Logo, a pureza da IVC mostrou-se em torno de 98,4 %, com um fator de correção calculado para as

impurezas de 8,36 %, dado discrepante do teor encontrado por CLAE-DAD, sendo esta técnica inadequada para determinação de pureza da IVC, provavelmente devido a entalpia envolvida no processo estar relacionada não só a fusão do fármaco, como também, a evaporação de solventes residuais, evento a ser discutido.

As curvas TG forneceram informações sobre a composição e estabilidade térmica da IVC, dessa forma, foi possível determinar a temperatura inicial de decomposição da matéria prima, bem como as etapas de degradação da IVC acompanhando possíveis reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição.

A partir da avaliação das curvas de TG do fármaco MP e padrão analítico, observou-se que a IVC apresenta três eventos térmicos característicos, a primeira perda de massa ocorre durante a fusão do fármaco entre 153 a 164ºC (Δm = 5,04 %), o segundo estágio de decomposição entre 312 a 327˚C (Δm = 58,54 %), seguido da terceira e última degradação entre 341 a 427°C (Δm = 29,35%) referente a carbonização da IVC (Figura 7), eventos determinado pela primeira derivada do TG.

Figura 7 - Curva TG obtida a 10˚C.min^{-1} sob atmosfera de N_2 com fluxo de 50 mL.min^{-1}.

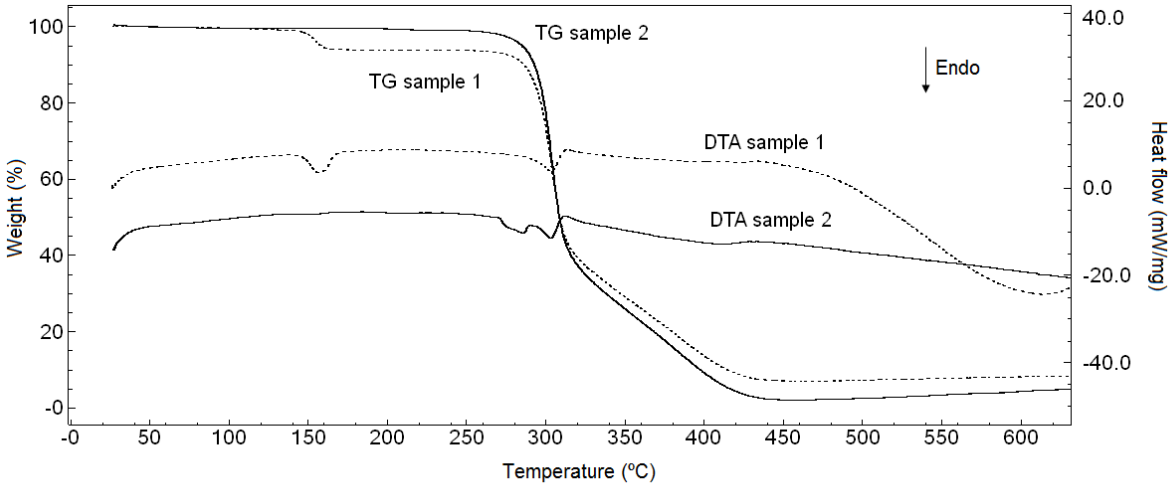


A matéria prima de IVC possui em sua rede cristalina a presença de formamida e etanol, solventes utilizados para purificação/recristalização da mistura de avermectinas produzidas pela biossíntese dos microorganismos. De acordo com as especificações contidas em compêndios oficiais a análise desses solventes residuais deve ser por cromatografia gasosa (CG) com no máximo 5% de etanol e 3% de dimetilformamida (USP,

2011). Porém, pode-se observar que a análise por TG também é capaz de quantificar o teor de solventes residuais totais, correspondendo amajoritariamente o primeiro evento de perda de massa sofrida pela matéria prima da IVC.

Para comprovação que o primeiro evento de perda de massa da IVC não corresponde a uma degradação propriamente dita, e sim a uma dessolvatação de etanol e dimetilformamida foi realizada uma análise de TG com uma amostra sem pré-aquecimento (amostra 1) e uma segunda amostra de IVC pré-aquecida até a temperatura de fusão, com posterior resfriamento e re-aquecimento até 600°C da amostra (amostra 2), curvas ilustradas na figura 8.

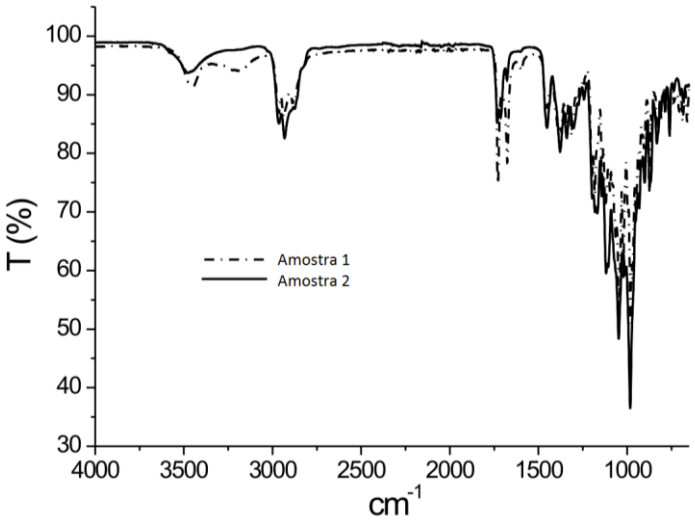
Figura 8 - Curvas TG de IVC sem pré-aquecimento (sample 1) e com pré-aquecimento a 157°C (sample 2) em atmosfera de N_2 a 50mL.min^{-1}.



A análise das curvas TG obtida permite indicar que no primeiro aquecimento os solventes residuais evaporam ($T_{ebulição}$ etanol = 78.4 °C e $T_{ebuliação}$ dimetilformamida = 153°C, descritas no Merck Index, 2006), visto que o decaimento calculado até o ponto de fusão da IVC (157°C), que coincide, aproximadamente, com a temperatura de ebulição da dimetilformamida, corresponde a 6,5% em média, valor semelhante ao calculado por CG para o padrão analítico (soma dos dados forncedios pela Sigma Aldrich® referentes ao quantitativo de dimetilformamida e etanol no lote utilizado nesse trabalho) somado ao teor de água por Karl Fisher (Farmacopéia Brasileira, 2010).

Como análise adicional foi realizado a análise de IV-TF da amostra pré-aquecida até a temperatura de fusão da IVC (amostra 1) e amostra sem pré-tratamento (amostra 2) ilustrado na figura 9, demosntrando a permanência das bandas características da IVC mesmo após o aquecimento, não evidenciando sinais de degradação do fármaco. Caracterizando, assim, a análise de TG da IVC como técnica auxiliar na determinação de solventes residuais da purificação/recristalização deste fármaco.

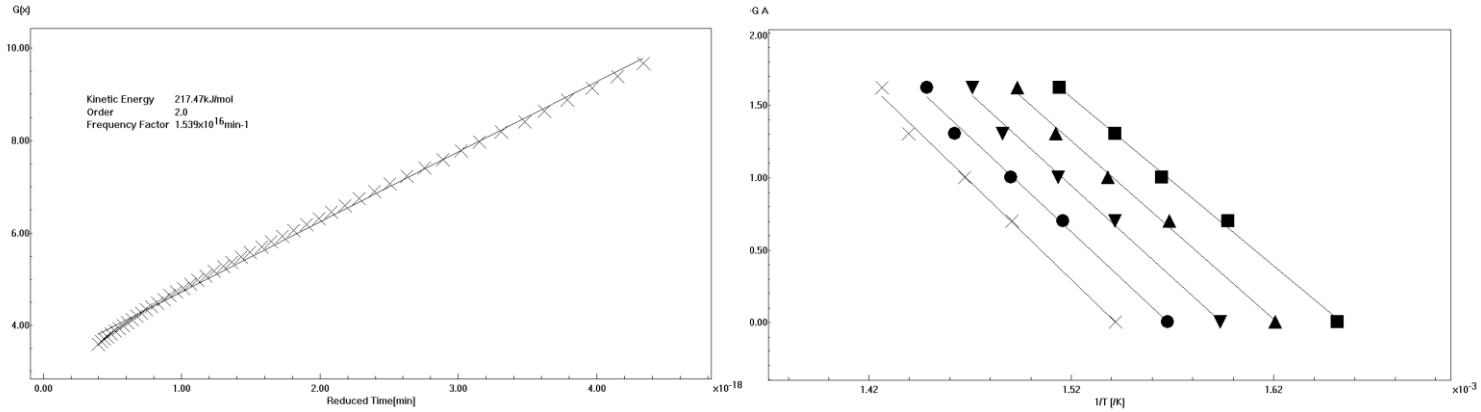
Figura 9 – Espectro de IV-TF de amostras de IVC sem pré-aquecimento (sample 1) e com pré-aquecimento a 157°C (sample 2).



Em decorrência do primeiro evento de perda de massa da curva TG não representar um evento de decomposição, a análise da cinética não-isotérmica da IVC foi realizada avaliando apenas o segundo evento de perda de massa (310-330°C) (ALVES et al., 2010).

Nessas análises as curvas de TG são deslocadas para temperaturas mais elevadas a medida que a razão de aquecimento aumenta (2,5, 5, 10, 20 e 40°C/min), o permite a aplicação do método de Ozawa, pela boa correlação entre as cinco razões de aquecimento e, por essa decomposição térmica a Ea calculada foi de 217,47 $kJ.mol^{-1}$, com reação de degradação de 2ª ordem e fator de freqüência de colisões entre as moléculas de IVC de 1539 x 1016 min^{-1} (Figura 10).

Figura 10 - Curvas TG e o gráfico de Ozawa da IVC obtido em cinco razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não-isotérmico.



Estudo de Compatibilidade Fármaco-Excipiente

O comportamento das misturas binárias mostraram que com todos os excipientes houve diminuição significativa da entalpia envolvida no processo fusão, quando comparado à entalpia de fusão do fármaco isolado, bem como pequenas mudanças na forma do pico com poucas variações da temperatura de fusão, indicando ausências de incompatibilidade na maioria dos casos. Os dados das curvas de TG e DSC obtidos no estudo de compatibilidade estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados termoanalíticos da IVC e das MBs com excipientes.

Amostra	T onset/°C	T fusão/°C	ΔH ($J.g^{1}$)	T_{onset} decomposição	% decomposição
IVC	144,04	159,42	-134,58	305,29	-53,59
IVC + PVP K-30	149,54	160,01	-36,24	307,49	-27,62
IVC + Talco	144,12	157,8	-152,8	307,06	-50,02
IVC + CMC	147,18	159,53	-33,18	310,12	-34,59
IVC + Starch®	145,47	161,28	-33,92	297,83	-63,88
IVC + Tabletose®	142,9	149,9	-129,33	292,77	-59,6
IVC + Croscarm.	144,57	156,57	-26,37	305,69	-51,92
IVC + Flowlac®	141,27	149,35	-137,44	284,99	-50,74

IVC + Starlac®	144,98	150,91	-99,4	293,66	-60,69
IVC + Glicolato	144,06	156,5	-35,45	306,3	-52,4
IVC + Aerosil®	147,9	162,63	-59,58	308,36	-27,36

Nas curvas DSC das misturas binária de IVC com excipientes de lactose (Tabletose® e Flowlac®), houve uma diminuição da temperatura de fusão de 1 a 3°C do inicio da temperatura de fusão, o que pode ser indicativo de ocorrencia de interação fármaco-excipiente. Adicionalmente, a temperatura de inicial de degradação (2º evento de perda de masssa) antecipou em mais de 10°C nas MB com lactose e amido (Starch®, Tabletose®, Flowlac® e Starlac®), de acordo com as curvas TG/DTG.

Portanto a Tabletose® foi selecionada como representante dos excipientes contendo lactose e Starch®, contendo amido, em foram avalidadas a cinéticas não-isotérmicas nas razões de 10, 20 e 40°C/min para a IVC matéria prima e as MBs contendo estes excipientes.

Tabela 5 - Energia de ativação (Ea), fator de freqüência (A) das MBs obtidos por cinética não-isotérmica (método de Ozawa).

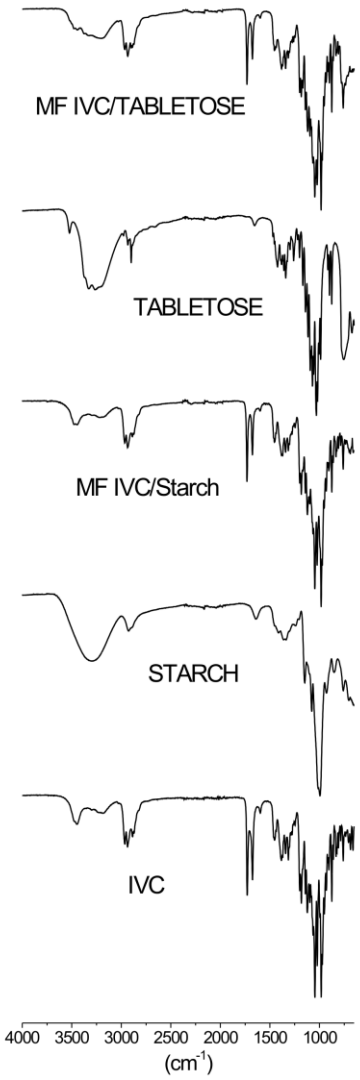
Amostra	**Energia de Ativação (E_a)**	**Fator de Frequencia (A)**
IVC	216,03 KJ/mol	$1{,}620 \times 10^{16}$ min^{-1}
IVC/Tabletose®	180,21 KJ/mol	$2{,}985 \times 10^{13}$ min^{-1}
IVC/Starch®	200,44 KJ/mol	$7{,}632 \times 10^{14}$ min^{-1}

A energia de ativação da mistura binária IVC/ Tabletose® apresentou decaimento de mais de 15% em relação a IVC isolada, enquanto que a mistura IVC/Starch® apresentou decaimento de cerca de 7% na energia de ativação corroborando com os resultados da análise térmica, os quais evidenciaram sinais de interação.

Os espectros de absorção no IV da IVC e das MB com os excipientes selecionados estão representados na Figura 11. Em todos os espectros observa-se apenas sobreposição das bandas características da IVC isoladamente e dos excipientes, sendo algumas delas

sobrepostas por bandas referentes aos excipientes, porém a simples sobreposição não pode ser considerada uma incompatibilidade, portanto a técnica de IV-TF não foi seletiva para evidenciar possíveis incompatibilidades entre a IVC e os excipientes avaliados.

Figura 11 - Espectro de IV-TF da IVC, Tabletose®, Starch®, mistura binária IVC/ Tabletose®, mistura binária IVC/ Starch®.



CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através da caracterização realizada foram de fundamental importância, pois permitiram a determinação das principais características físico-químicas da IVC, fornecendo informações relevantes em relação à qualidade da matéria prima utilizada, assim como de seu comportamento frente a diferentes técnicas frequentemente utilizadas na caracterização de produtos farmacêuticos, que vem sendo desenvolvidas para esse fármaco, buscando superar essa característica, que se constituía como uma barreira tecnológica e terapêutica da IVC, antihelmíntico utilizado no combate a filariose.

REFERÊNCIAS

ALVES, R.; REIS, T. V. S.; SILVA, L. C. C.; STORPÍRTIS, S.; MERCURI, L. P.; MATOS, J. R. Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 46, n. 2, p. 343-351, 2010.

CAMPBELL, W. C.; BENZ, G. W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*. v. 7, n. 1, p. 1–16, 1984.

CERKVENIK, V.; DOGANOC, D.Z.; SKUBIC, V.; BEEK, W.M.J.; KEUKENS, H.J. Thermal and long-term freezing stability of ivermectin residues in sheep milk. *European Food Research Technology*, v. 213, p. 72–76, 2001.

LEHNER, A. F.; PETZINGER, E.; STEWART, J.; LANG, D. G.; JOHNSON, M. B.; HARRISON, L.; SEANOR, J. W.; TOBIN T. ESI^+ MS/MS confirmation of canine ivermectin toxicity. *Journal of Mass Spectrometry*, n. 44, p. 111-119, 2009. DOI: 10.1002/jms.1477.

ÕMURA, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 31, p. 91–98, 2008.

Farmacopéia Brasileira, Métodos Gerais, 5ª ed., Atheneu: São Paulo, 2011.

SHI, Q.; HILL, C.; HILL, J.A. 2001. Purification process of anti-parasitic fermentation product. United States Patent (Patent nº 6,265,571 B1).

XU, X.; KHAN, M.A.; BURGESS, D.J. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: I. Formulation, processing design and risk assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 419, p. 52‑59, 2011.

WU, H., KHAN, M., HUSSAIN, A.S., Process control perspective for process analytical technology: integration of chemical engineering practice into semiconductor and pharmaceutical industries. *Chem. Eng. Commun.* v. 194, p. 760‑779, 2007.

YU, L.X., Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. *Pharmaceutical Research*, v. 25, p. 781‑791, 2008.

USP, United States Pharmacopeia, Veterinary Drugs, 31th Edition, 2011.

Artigo 6 - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV PARA QUANTIFICAÇÃO DO ANTI-PARASITÁRIO IVERMECTINA

Artigo submetido ao Latin American Journal of Pharmacy – B3 (Qualis CAPES)

RESUMO

A ivermectina (IVC) é uma lactona macrocíclica semissintética que consiste na mistura da avermectina B1a e B1b, utilizada no tratamento de diversas parasitoses. A ausência de um método rápido para quantificação da IVC é de relevância para o desenvolvimento e produção de produtos farmacêuticos a base de IVC. Portanto, o presente estudo descreve o desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria no UV para o doseamento da IVC. O método foi desenvolvido a partir da solubilização da IVC em álcool etílico com posterior diluição no sistema de solventes álcool etílico/água (80:20) para quantificação em ultravioleta (λ = 245 nm), a 12 $\mu g.mL^{-1}$. O método desenvolvido foi validado demonstrando-se robusto, preciso, seletivo, exato e linear (4, 10, 11, 12, 13, 14 e 20 $\mu g.mL^{-1}$) com valores de LD e LQ, 0,0098 $\mu g.mL^{-1}$ e 0,3265 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente, sendo o coeficiente de variação inferior a 5% e as análises estatísticas realizadas por ANOVA One-Way e Teste t-Student.

Palavras-chave: ivermectina, espectrofotometria, quantificação, validação.

ABSTRACT

Ivermectina (IVC) is a semi-synthetic macrocyclic lactone consisting of a mixture of avermectin B1a and B1b used to treat various parasitic infections. The lack of a quick method for quantifying IVC hampers the development and production of pharmaceutical products based on IVC. The present study thus describes the development and validation of an analytic UV spectrophotometric method for dosing IVC. The method involved solubilization of IVC in ethyl alcohol followed by dilution in a system of ethyl alcohol/water solvents (80:20) for quantification under ultraviolet light (λ = 245 nm), at 12 $\mu g.mL^{-1}$. The method developed was validated and shown to be robust, precise, selective,

accurate and linear (4, 10, 11, 12, 13, 14 e 20 µg.mL^{-1}) with DL and QL of 0.0098 µg.mL^{-1} and 0.3265 µg.mL^{-1}, respectively, with a variation coefficient of less than 5% and statistical analysis was carried out using one-way ANOVA and Student's t test.

Keywords: ivermectin, spectrophotometry, quantification, validation.

INTRODUÇÃO

A ivermectina (IVC), uma lactona macrolídica semissintética de 16 membros, foi isolada em 1975 e introduzida no mercado farmacêutico internacional em 1981. Derivada das avermectinas, uma classe originada de produtos da fermentação do *Streptomyces avermitilis*, apresenta amplo espectro de ação contra helmintos, aracnídeos, insetos e parasitas de animais e seres humanos, também sendo usada, de maneira bem sucedida, como pesticida agrícola (CAMPBEL, 1984; ÕMURA, 2008).

A IVC é utilizada atualmente como tratamento de escolha em várias áreas endêmicas de filariose linfática no mundo, segundo recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS), como alternativa terapêutica ou como co-tratamento com o citrato de dietilcarbamazina (OMS, 2005).

A IVC consiste na mistura da avermectina A_1a, 5-O-dimetil-22,23-dihidro (H_2B_1a) e avermectina A_1b, 5-O-dimetil-25-di(1-metilpropil)-22,23-dihidro-25-(1-metiletil)-(H_2B_1b), contendo no mínimo 90% de H_2B_1a, geralmente conhecidos como 22,23 dihidroavermectina B_1a e B_1b (USP, 2011). Dentre as quais, a avermectina B_1a serve de partida para a produção de um análogo semi-sintético, 22,23 - dihidroavermectina B_{1b}, ou ivermectina, cuja estrutura pode ser considerada como um híbrido entre os componentes B_{1a} e B_{1b} (Fig. 1), com estrutura semelhante aos antibióticos macrólidos, porém, desprovida de atividade antibacteriana (CHABALA et al., 1980; ERGETON et al., 1979).

Não existem em compêndios oficias ou literatura científica métodos rápidos e simples para doseamento imediato da IVC matéria prima e produto farmacêutico. Sendo observado apenas métodos por: cromatografia líquida de alta eficiência UV-Vis (PRIETO et al., 2003; USP, 2011; Farmacopéia Britânica, 2009), ou acoplado a espectrometria de massas (RAICH-MONTIU et al., 2008), eletroforese (KOWALSKI et al., 2003) e fluorescência (RÜBENSAMA et al., 2011), sendo que os trabalhos publicados abrangem

principalmente a determinação deste composto em fluídos biológicos ou associados a outros fármacos (DURDEN, 2006).

Apesar das vantagens indiscutíveis na utilização das técnicas citadas, elas apresentam algumas limitações como o alto custo da instrumentação e da operação, tempo relativamente longo de análise e ainda a necessidade de experiência no manuseio do equipamento e tratamento de amostras (SOARES-SOBRINHO et al., 2008).

Estes métodos apresentam custo relativamente baixo e grande número de aplicações, sendo também uma importante ferramenta para determinação de parâmetros fisico-químicos (ROCHA, TEIXEIRA, 2009). Contudo, nenhum método analítico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta visível (UV-Vis) foi relatado para IVC. A disponibilidade comum da instrumentação, simplicidade dos procedimentos, velocidade, precisão e exatidão da técnica fazem dela uma das alternativas analíticas mais empregadas (ROJAS & OJEDA, 2009).

O método é útil na extração de informações qualitativas e quantitativas e baseia-se na medição da absorbância máxima a um comprimento de onda que caracteriza a substância com adequação nas condições operacionais, verificando-se a relação linear entre a absorbância medida e a concentração do princípio ativo (ROLIM, 2010).

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar aplicabilidade e confiabilidade de um método exige uma avaliação denominada validação (RIBEIRO et al., 2007).

Esta definição implica, sobretudo, que uma investigação detalhada foi realizada e dá provas de que um método analítico, quando corretamente aplicado, produz resultados que são adequados à finalidade, bem como confirma sua eficácia com um alto grau de precisão (ARAÚJO, 2009).

A quantificação da IVC como matéria prima e em produtos farmacêuticos carece do desenvolvimento de uma técnica analítica, utilizando espectrofotometria UV-Vis para controle de qualidade. Como alternativa às metodologias já existentes, o presente estudo descreve o desenvolvimento e a validação de um método analítico simplificado para quantificação deste fármaco, atendendo às exigências da *International Conference on*

Harmonization (ICH Q2A e ICH Q2B, 1995) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE n° 899 de 2003, conferindo praticidade, confiabilidade, segurança e baixo custo na aplicação deste método à rotina da indústria farmacêutica.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria prima, reagentes e equipamentos

Para as etapas correspondentes ao desenvolvimento do método e sua validação, foram utilizadas como matéria prima a IVC doada pela Valée Indústria Veterinária® e padrão de IVC (Sigma Aldrich®). Os reagentes, todos de grau analítico, foram acetato de etila (Dinâmica®), acetona (Dinâmica®), acetonitrila (CarloErba®); ácido clorídrico 0,2M (dinâmica), álcool etílico absoluto (Synth® e Dynamic®), álcool metílico (Cinética®), diclometano (Vetec®), éter etílico (Cinética®), hidróxido de sódio 0,2 M (Vetec®), n-hexano (Dinâmica®) e peróxido de hidrogênio 3% (Dinâmica®). Espectrofotômetro UV-Vis Cary 300 Conc Variam®, cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico Varian®, em todos os parâmetros foram utilizadas balanças (Bioprecisa®) e vidrarias analíticas.

Desenvolvimento do método por Espectrofotometria no UV-Vis

Devido às características da IVC, que lhe conferem uma baixa solubilidade, foi realizada a avaliação da solubilidade da mesma com diversos solventes (25º C): acetato de etila, acetona, acetonitrila, ácido clorídrico 0,2 M, água, álcool etílico absoluto, álcool metílico diclometano, éter etílico, hidróxido de sódio 0,2 M, n-hexano e peróxido de hidrogênio 3% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ª ed.) e misturas destes com água, em diferentes proporções, a fim de escolher uma melhor solução diluente para utilização no método analítico, levando em consideração o poder de solubilização do princípio ativo, custo, toxicidade do solvente e sensibilidade do fármaco frente ao comprimento de onda utilizado.

A proporção deste sistema foi determinada de acordo com a estabilidade da IVC em permanecer solúvel por 48h, em repouso, após sua completa solubilização e sob influência da luz. As proporções avaliadas no estudo foram 50:50, 60:40, 70:30 e 80:20 do solvente/água purificada (v/v). Procedeu-se varredura no espectrofotômetro na faixa de 200

a 400 nm para escolher o comprimento de onda que apresentaria o valor de absorbância mais adequado para o método.

Preparação da solução amostra

As amostras de IVC foram analiticamente pesadas e solubilizadas em álcool etílico absoluto, obtendo-se uma concentração de 200 $\mu g.mL^{-1}$(solução estoque), sendo diluída utilizando-se como sistema de solventes álcool etílico absoluto/água purificada (80:20, v/v), obtendo-se uma concentração final de 12 $\mu g.mL^{-1}$, em triplicata.

Preparação da curva controle

Partindo da solução estoque do padrão de IVC (200 $\mu g.mL^{-1}$), foram realizadas diluições com o sistema álcool etílico absoluto/água purificada (80:20, v/v) para a obtenção das seguintes concentrações: 4, 10, 11, 12, 13, 14 e 20 $\mu g\ mL^{-1}$. A curva controle foi preparada diariamente e utilizada para os cálculos das concentrações.

Validação do método

Após o desenvolvimento do método, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, robustez, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão, de acordo com as normas estabelecidas pelo ICH Q2A e Q2B e pela RE n° 899 de 2003 (ANVISA). A confiabilidade dos parâmetros estudados foi observada pelo coeficiente de variação (CV%) inferior a 5% e, para cada parâmetro analisado, foram realizadas análises estatísticas através da ANOVA One-Way e Teste t-Student.

Seletividade / Especificidade

Inicialemente, para determinação da seletividade foram avaliados três amostras: duas amostras contaminadas com diluentes utilizados em formas farmacêuticas sólidas: celulose microcristalina e lactose, na proporção 1:1 (p/p), bem como o doseamento de amostra contaminada com fármaco citrato de dietilcarbamazina (DEC), utilizado no tratamento da filariose linfática, em associação a IVC, podendo ser considerado um contaminante de produção. Adiconalmente foram realizadas análises da IVC solução amostra em câmera de fotoestabilidade Nova Ética® (modelo C242) qualificada, que

consiste na associação de lâmpadas UV e fluorescente (branca fria) com emissão de 30.000 lux e 13,33 w/m^2 por hora, para a avaliação da fotodegradação da IVC, à temperatura ambiente (25°C). As análises foram realizadas em triplicata, com o auxílio de um padrão interno (amostras recobertas no interior da câmera) e padrão externo (amostras recobertas amarmazenadas a 25°C ao abriga da luz). Para assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos na quantficação da IVC pelo método desenvolvido, as amostras supracitadas foram analisadas por CLAE-DAD, segundo método adaptado para doseamento da IVC e suas substâncias relacionadas descrito na farmacopéa americana (USP, 2011).

Robustez

Para sua determinação, os seguintes parâmetros foram alternados e aplicados ao preparo da amostra e/ou método analítico: influência da luminosidade por meio da presença e ausência de luz branca fria, fabricante do solvente utilizado, comprimento de onda: 244,8; 245 e 245,2 nm de leitura, mimetizando uma possível falta de calibração do equipamento.

Linearidade

Realizado pela regressão linear de três curvas autênticas, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios, em sete concentrações diferentes: 4, 10, 11, 12, 13, 14 e 20 $\mu g.mL^{-1}$. A variação média do estudo foi realizada com intervalo de 33% a 166% da concentração média IVC.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Calculados pela razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares das respectivas curvas multiplicadas por 3 e 10 para o limite de detecção e quantificação, respectivamente.

Precisão

Determinada através da repetitividade de análise e precisão intermediária. A repetitividade foi verificada por seis determinações autênticas a 100% da concentração do teste e a precisão intermediária foi realizada em dois dias por dois analistas diferentes (ICH, 1995; BRASIL, 2003).

Exatidão

Verificada a partir de amostras de IVC matéria prima e padrão nas concentrações de 80, 100 e 120%, em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento do método analítico

De acordo com a análise da solubilidade e estabilidade da IVC frente aos diferentes solventes, observou-se maior solubilidade nos de baixa polaridade (acetato de etila, diclorometano e éter etílico) e média polaridade (acetona, álcool metílico e álcool etílico) (Tabela 1). Os resultados obtidos forneceram informações importantes sobre o comportamento do fármaco, possibilitando a escolha inicial do solvente mais adequado para a completa solubilização, permitindo máxima estabilidade da solução e proporcionando sua quantificação adequada.

Porém, devido menor toxicidade, custo acessível e uso freqüente nos laboratórios de controle de qualidade das indústrias farmacêuticas, o álcool etílico foi escolhido como meio para a solubilização da IVC no método desenvolvido, mesmo este não sendo o solvente mais eficaz para solubilização do fármaco.

Somado a este fato, para a escolha final do sistema a ser utilizado, levou-se em consideração a possível adição de uma proporção de água ao sistema, o que as facilita as leituras provenientes de estudos de preparação de complexos com ciclodextrinas, dispersões sólidas e ensaios de dissolução (SOARES-SOBRINHO, et al., 2008).

Tabela 1. Solubilidade da ivermectina (Farmacopéia Brasileira 5ª ed.).

Solvente	Volume para solubilização	Classificação	Termo descritivo
Acetato de etila	10 mL	Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Acetona	30 mL	Solúvel	De 10 a 30 partes

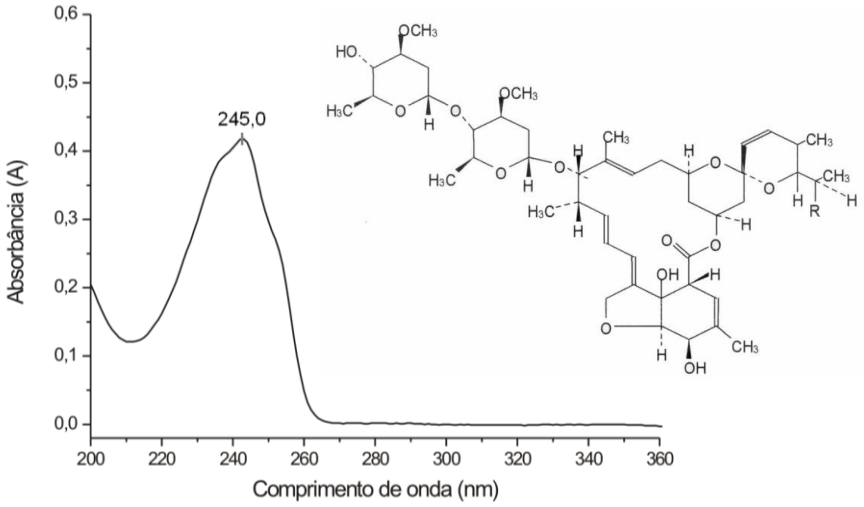
Acetonitrila	100 – 1000 mL	Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Água	>10000 mL	Praticamente insolúvel	>10000 partes
Álcool etílico	30 – 70 mL	Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Álcool metílico	30 mL	Solúvel	De 10 a 30 partes
Diclorometano	10 mL	Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Éter etílico	30 mL	Solúvel	De 10 a 30 partes
H_2O_2 3%	>10000 mL	Praticamente insolúvel	>10000 partes
HCl 0,2M	>10000 mL	Praticamente insolúvel	>10000 partes
NaOH 0,2M	>10000 mL	Praticamente insolúvel	>10000 partes
N-Hexano	1000 – 10000 mL	Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes

Houve instabilidade das soluções, após 48h em repouso, com formação de microcristais de IVC e conseqüente turvação, na concentração de 50:50 de álcool etílico absoluto/água purificada (v/v). As soluções de 60:40, 70:30 e 80:20 mantiveram-se estáveis após as 48h de avaliação, sendo admitida como concentração de escolha para o método, devido maior estabilidade química, a concentração de 80:20 de álcool etílico absoluto:água purificada (v/v). De acordo com os experimentos realizados, ficaram definidos a utilização de álcool etílico na primeira diluição e 80:20 de álcool etílico absoluto/água purificada (v/v) na segunda diluição.

Após a escolha do sistema de solventes para amostra, realizou-se varredura espectrofotométrica com IVC, na concentração de 12 $\mu g.mL^{-1}$, entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm, observando-se absorbância máxima em 245 nm (Figura 1). Os espectros eletrônicos de moléculas orgânicas contendo cromóforos são normalmente complexos, porque a superposição de transições vibracionais com transições eletrônicas leva a uma combinação de linhas superpostas. O resultado é uma banda larga que freqüentemente parece ser contínua.

A figura 1 representa a varredura espectrofotométrica da IVC que possui absortividade em 245 nm devido as transições de elétrons n (não ligantes) dos átomos de oxigênio ou π (das duplas ligações) para o estado excitado π∗, já que as energias necessárias para estes processos situam-se em uma região espectral 200 a 700 nm. Estes dois tipos de transições requerem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais π. Portanto pode se exemplificar as insaturações conjugadas com átomos de oxigênio presentes na molécula da IVC como centros cromóforos.

Figura 1 - Estrutura química da IVC ($C_{48}H_{74}O_{14}$) e varredura espectrofotométrica no sistema de solvente selecionado.



Após as análises, ficaram definidos a utilização dos solventes álcool etílico/sistema de diluição (álcool etílico/água, 80:20, v/v) para a primeira e segunda diluições, respectivamente e comprimento de onda de 245 nm no espectrofotômetro UV-Vis.

Validação do método analítico

Os resultados obtidos com a validação deste método estão resumidos na Tabela 2, sedo detalhados nos tópicos seguintes.

Tabela 2 - Resultados da validação do método por espectrofotometria no UV.

Parâmetro	**Resultados**

λ	245 nm
Faixa de linearidade (µg.L^{-1})	4 – 20
R^2	0,9998
slope	0,0352
Intercept	0,0023
Equação da reta	Y = 0,0352X – 0,0023
LD (µg.L^{-1})	0,009
LQ (µg.L^{-1})	0,033
Repetitividade	0,14
Precisão intermediária	F cal. 0,479 F tab. 18,51
Exatidão 10 µg.L^{-1}	F cal. 0,225
Exatidão 12 µg.L^{-1}	F cal. 0,893 F tab. 2,776
Exatidão 14 µg.L^{-1}	F cal. 0,047

Seletividade / Especificidade

Utilizando o método desenvolvido, a solução amostra de IVC foi contaminada com 2 excipientes e uma possível impureza, o citrato de DEC, como este fármaco possui absorção máxima no comprimento de onda de 210 nm, não houve interferência na absorção da IVC neste comprimento de onda (na concentração de 12 µg mL^{-1} de DEC), bem como, as amostras com excipientes utilizados na produção de formas farmacêuticas sólidas que obtiveram concentrações semelhantes (CV < 2) quando analisadas por CLAE-DAD e por UV-Vis pelo método desenvolvido, conforme ilustrado na figura 2.

Portanto o método demosntra-se específico para a IVC, já que no comprimento de onda avaliado (245nm) não obtevese resposta analítica para as contaminações realizadas.

Em contrapartida, amostras de IVC submetidas a estresse fotolítico foram avaliadas com o objetivo de verificar se o método desenvolvido seria seletivo para os produtos da fotodegradação da IVC, isto é, seria capaz de quantificar a IVC com confiabilidade analítica mesmo frente a uma mistura de compostos quimicamente semalhantes. Os resultados obtidos com o tempo para análises das amostras de IVC estão ilustrados na figura 3, em que se observa um decaimento incipiente da banda de absorbância principal da IVC de acordo com o tempo de exposição, podendo indicar a seletividade do método.

Figura 2 - Varreduras no UV da IVC evidenciando a seletividade do método.

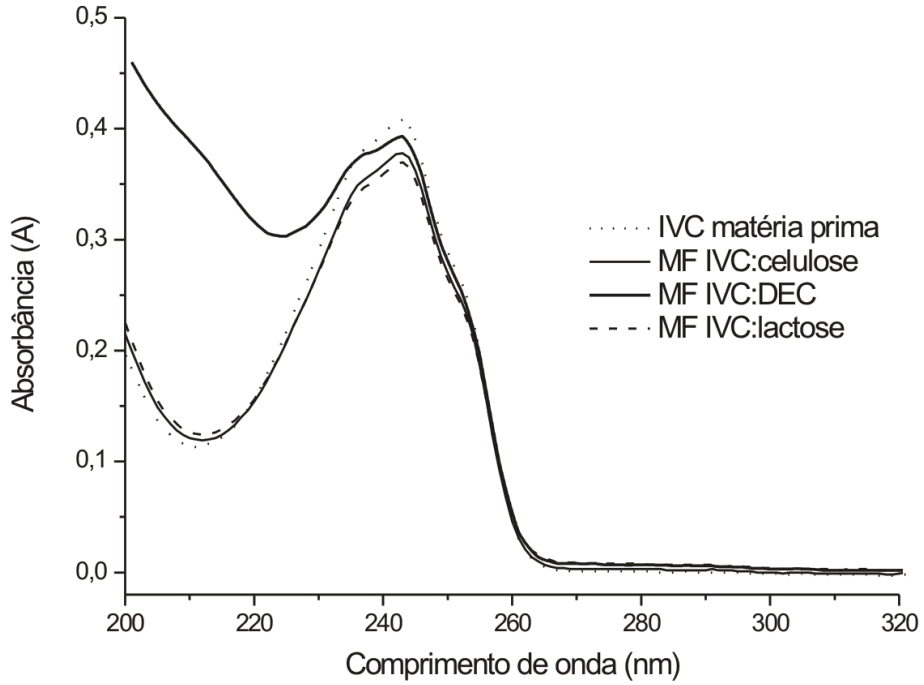
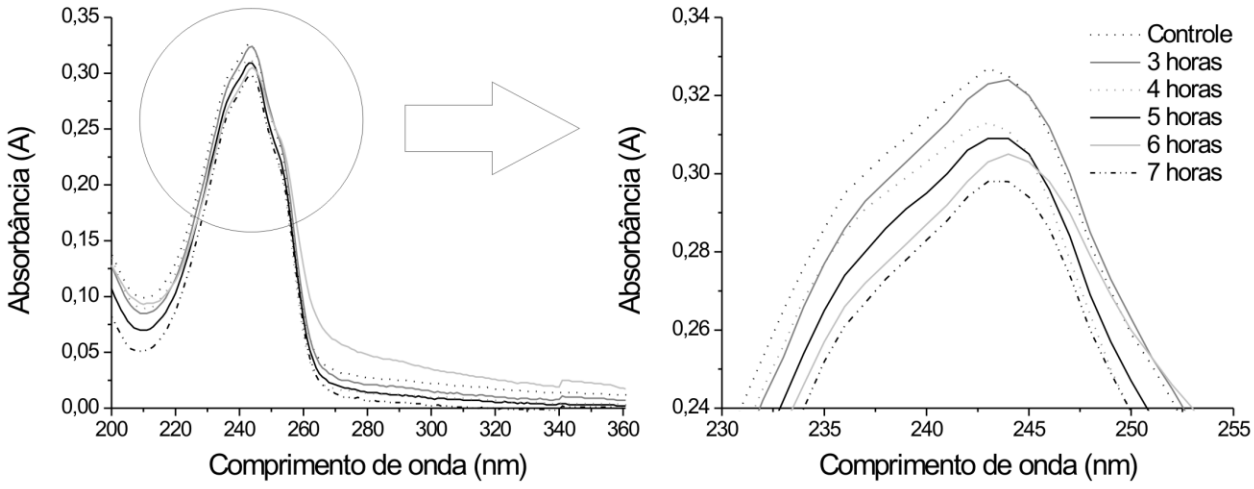


Figura 3 - Varreduras no UV da IVC fotodegradada por diferentes tempos de exposição.



Porém, quando os dados da absorbâcia em 245 nm são comparados aos dados obtidos por CLAE-DAD, observa-se uma discordância nas concetração obtidas pelos dois

métodos de quantificação, descritos na tabela 3. Portanto, o método desenvolvido não demonstrou seletividade para os produtos de degradação obtidos por fotodegradação.

Tabela 3 - Comaparação dos teores de IVC fotodegradada por CLAE e UV-Vis.

Amostra	***% (CLAE)***	***% (UV-VIS)***
Matéria prima IVC (controle interno)	99,30	99,89
Solução fotodegradada 3h	96,99	98,36
Solução fotodegradada 4h	93,25	97,21
Solução fotodegradada 5h	90,10	97,60
Solução fotodegradada 6h	86,96	96,63
Solução fotodegradada 7h	82,02	94,89

Robustez

O método desenvolvido demonstrou ser robusto quanto à variação dos fabricantes de álcool etílico. De acordo com os resultados obtidos, o F calculado para esse parâmetro foi de 4,804, inferior ao F tabelado (7,709), sendo o CV de 4,82% e 1,65% para os fabricantes Synth® e Dynamic®, respectivamente. Com relação à avaliação da estabilidade das soluções a partir da preparação das amostras e da influência da luminosidade, obteve-se um F calculado de 1,124 (F tabelado = 3,106), já para a variação do comprimento de onda o F calculado foi de 0,075 (F tabelado = 5,143), demonstrando que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos.

Linearidade

O intervalo das concentrações estudadas (4, 10, 11, 12, 13, 14 e 20 µg mL^{-1}) mostrou-se linear após as análises estatísticas pelo método dos mínimos quadrados. Foram obtidas curvas com equações de retas y = 0,0352 (±0,0002)X – 0,0023 (±0,0027) e com bom coeficiente de correlação (R^2= 0,9998). Os CV% para as concentrações citadas foram, respectivamente, 0,083, 0,430, 1,101, 0,720, 0,463, 1,337 e 0,149.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

De acordo com a estimativa dos limites de detecção e quantificação o método apresentou sensibilidade para identificar e quantificar a IVC, diferenciando as leituras, dos ruídos do equipamento, com valores de 0,0098 µg mL^{-1} e 0,0325 µg mL^{-1} para o limite de detecção e limite de quantificação, respectivamente.

Precisão e exatidão

O método desenvolvido demonstrou ser preciso nos dois níveis avaliados, repetitividade e precisão intermediária. Na repetitividade os resultados obtidos apresentaram um coeficiente de variação de 0,161%, abaixo do valor máximo especificado. Na precisão intermediária foi provado que o método é preciso para análises feitas por analistas diferentes dentro de um mesmo dia e em dias diferentes, pois através do tratamento estatístico utilizando ANOVA One-Way, foi obtidos F calculados de 0,479, para o F crítico de 18,513.

Os resultados de exatidão evidenciaram uma concordância entre os valores de absorbância das médias obtidas para cada concentração com a matéria-prima (MP) e com o padrão secundário (PS). A análise estatística através do teste t de Student comprovou a similaridade dos resultados, demonstrando que o t calculado para cada concentração foi de 0,225, 0,089 e 0,048, respectivamente, sendo menor do que o *t* tabelado 2,776.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido atende as exigências legais vigentes do ICH e ANVISA para a validação de uma metodologia analítica, apresentando-se robusto, linear, seletivo, preciso e exato. Correlacionando-se o desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos, os laboratórios podem gerar resultados bastante eficientes e produtivos, garantindo a qualidade analítica e assim as boas práticas de laboratório e fabricação. Desta forma, o método de quantificação da IVC por espectrofotometria de UV-Vis, permitirá uma análise quantitativa rápida, de baixo custo, com qualidade e segurança estatística desejáveis, sendo uma alternativa vantajosa sobre os outros métodos existentes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro da CAPES, CNPq e FACEPE, bem como ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados, da Universidade Federal do Piauí, pela parceria no desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, De 29/05/2003.

CAMPBELL, W.C. & BENZ, G. W. Ivermectin a review of efficacy and safety. *J. Vet. Pharmacol. Ther*., v. 7, p. 1-16, 1984.

CHABALA, J. C.; MROZIK, H.; TOLMAN, R. L.; ESKOLA, P.; LUSI, A. & PETERSON, L. H.; Ivermectin, a new broadspectrum antiparasitic agent. *J. Med. Chem.*, v. 23, p. 1134-1136, 1980.

DURDEN, D. A. Positive and negative electrospray LC-MS/MS methods for quantitation of the antiparasitic endoctocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, ivermectin and selamectin in milk. *J. Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, v. 850, n. 1-2, p. 134-146, 2006.

EGERTON, J. R.; OSLIND, D. A.; BLAIR, L. S.; EARY, C. H.; SUHAYDS, D. & CIFELLI, S. Avermectins, new femaly of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1 component. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 15, p. 372-378, 1979.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Métodos Gerais, 5ª ed., Atheneu: São Paulo, 2010.

Farmacopéia Britânica (2009).

International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995.

International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

J-MONTIU RAICH, KA KROGH, M GRANADOS, JA JÖNSSON & B HALLING-SØRENSEN. *Journal of Chromatography A*, v. 1187, n. 1-2, p. 275-280, 2008.

KOWALSKI, P.; BIENIECKI, M.; OLEDZKA, I. & LAMPARCZYK, H. Validated capillary electrophoretic method for the analysis of ivermectin in plasma after intragastric administration in pigs and horses. *Biomedical Chromatography*, v.18, p.302-310, 2003. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.320/full em 15/03/2011>

ÕMURA, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 31, p. 91–98, 2008.

Organização Mundial Da Saúde (OMS), (2005).

PRESMICH, G. M. A., ROLIM L.A., CAVALCANTI O.R.B.R., SILVA K.E.R. & ROLIM-NETO P.J. Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico por Espectrofotometria no UV para Determinação Quantitativa do Anti-Neoplásico β-Lapachona. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29, n. 5, p. 645-695, 2010.

PRIETO, J.G.; MERINO, G.; PULIDO, M.M.; ESTEVEZ, E., MOLINA, AJ, VILA, L., ALVAREZ, AI, Improved LC method to determine ivermectin in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* v.31, p. 639-645, 2003.

RIBEIRO, F. A. L., FERREIRA M. M. C.; MORANO S. C., SILVA L. R. DA & SCHNEIDE R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de

mérito na validação de métodos analíticos uniitariados. *Química Nova,* v. 31, n. 1, p. 164-171, 2007.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004 – 2008 A review. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2009.

ROJAS F. S. & OJEDA C. B. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria em UV-Vis. Analytica Chimica Acta, v. 635, p. 22–44, 2009.

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R.B.; KIST, T.L.& PIZZOLATO, T.M. A liquid–liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and fluorescence detection.**,** *Analytica Chimica Acta* (Print), v. 705, p. 24-29, 2011.

SOARES M.F.L.R., SOARES-SOBRINHO J.L., GRANGEIRO-JÚNIOR S., SILVA K.E.R. & ROLIM-NETO P.J. Métodos de Determinação do Ornidazol em Comprimidos Revestidos: Desenvolvimento, Validação e Comparação Estatística. *Lat. Am. J. Pharm*., v. 27, n. 5, p. 688-782, 2008.

USP, United States Pharmacopeia, Veterinary Drugs, 31th Edition, 2011.

Artigo 7 – ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO ANTIPARASITÁRIO IVERMECTINA EM SOLUÇÃO POR CLAE-DAD

Artigo em construção, os resultados apresentados podem sofrer modificações, em função da otimização do método analítico.

RESUMO

A ivermectina (IVC) é um derivado de avermectina com ação contra helmintos, aracnídeos e insetos, amplamente utilizada nas terapias em humanos e na medicina veterinária, porém, não há relatos na literatura a cerca de seus produtos de degradação (PDs) e mecanismos degradativos. Portanto, este trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplado a detector de arranjo diodo, capaz de quantificar a IVC na presença de seus PDs, já que, não foi possível quantificar os PDs devido a co-eluição deles no método desenvolvido. A partir do desenvolvimento do método analítico selecionou as melhores condições degradativas para a IVC (decaimento de teor entre 10 e 30 %) sob variação de pH (HCl 0,1M e NaOH 0,01M), condições oxidativas (H_2O_2 6%) e fotolíticas, além de demonstrar que o fármaco é termoestável na temperatura de 50°C por 24h. Não foi possível calcular as cinéticas de degradação da IVC sob condições hidrolíticas, devido ao período de tempo avaliado, mas, como houve decaimento expressivo da IVC quando submetida a fotodegradação pode-se calcular a cinética de primeira ordem para esta condição. Comprimidos de IVC e uma formulação líquida (solução oral manipulada) foram submetidos a estudos de estabilidade acelerada por 3 meses e apresentaram decaimento significativo com o aparecimento de PDs, sem a possibilidade de quantificação relativa devido a co-eluição dos PDs da IVC no método desenvolvido.

Palavras-chave: Produtos de degradação, ivermectina, hidrólise; oxidação; cinética química.

ABSTRACT

Ivermectin (IVC) is a derivative of avermectin suit against helminths, arachnids and insects, widely used in therapies for human and veterinary medicine, but there are no reports in the literature about its degradation products (DPs) and degradative mechanisms. Therefore, this study aimed to develop an analytical method by High Performance Liquid Chromatography coupled to diode array detector, able to quantify the IVC in the presence of their DPs, since it was not possible to quantify the DPs due to co-elution the method developed them. From the development of the best analytical method selected degradative conditions for the IVC (decay content of between 10 and 30%) under varying pH (HCl 0.1 M and NaOH0.01 M), oxidative conditions (H_2O_2 6%) and photolytic, and demonstrate that the drug is thermostable at 50 °C for 24h. It was not possible to calculate the degradation kinetics of IVC under hydrolytic conditions due to the time period measured, but since there was a significant decay of the IVC when subjected to photodegradation can calculate the first order kinetics for this condition. Tablets IVC and a liquid formulation (oral solution manipulated) were subjected to accelerated stability studies for 3 months and showed significant decay with the appearance of PDs, without the possibility of relative quantification due to the co-elution of DPs in the method developed.

Keywords: Decomposition products, ivermectin, hydrolysis, oxidation and chemical kinetics.

INTRODUÇÃO

O número de trabalhos existentes na literatura a respeito da estabilidade da ivermectina é bastante reduzido, tanto quanto se trata da molécula isoladamente ou mesmo presente em formulações (medicamentos de uso humano ou veterinario) (ÕMURA, 2008).

A ivermectina (22,23-dihidroavermectina B1a + 22,23-dihidroavermectina B1b) e utilizada como principio ativo com ampla ação medicamentosa com aplicacao em tratamento de sarnas, vermes e piolhos. E derivada da bactéria *Streptomyces avermitili* e atua no sistema nervoso e função muscular, resultando em paralisia e morte (CULLY et al., 1994; DENT et al., 1997). A ivermectina (IVC) presenta baixa toxicidade quando em formulações, porém, pode ser enquadrado como altamente tóxico quando puro, devido a

atuação direta no sistema nervoso central quando inalado (HTTP://extoxnet.orst.edu/pips/abamecti.htm).

Paralelamente, o número de métodos de análise de formulações contendo IVC e suas impurezas / produtos de degradacao, é também bastante reduzido. As metodologias constantes em farmacopeias (British Pharmacopeia, 2007), servem como base para o desenvolvimento de métodos, porém não abrangem a detecção de produtos de degradação, provenientes de estudos de estabilidade.

O presente trabalho tem como objetivo desesenvolver uma metodologia analítica e seletiva para produtos de degradação, desenvolvida utilizando-se amostras degradadas sob condicoes de estabilidade forçada (hidrólise ácida, hidrólise alcalina, luz, calor e oxidação), bem como, avaliar os percentuais de degradação em função do tempo e a presença destes produtos de degradação em formualações comerciais após estudo de estabilidade acelerado.

PARTE EXPERIMENTAL

Substâncias e Reagentes

Foram utilizados dois lotes de ivermectina, um lote de matéria prima cedido pelo Laboratório Veterinário Vallée® (Lote: 07016/2010, fabricado na China), e o padrão de ivermectina adquirido a Sigma Aldrich®, lote: 70288-86-7 (pureza: 95% H_1B_{1a} + 2% de H_1B_{1b}).

Os solventes utilizados foram acetonitrila (Carlo Erba®), água ultra pura (obtida em sistema MILI Q), ácido clorídrico 36,5 %, v/v (Dinâmica®), hidróxido de sódio (Vetec®), peróxido de hidrogênio 36,5 %, v/v (Dinâmica®). Para a preparação da fase móvel, foi utilizado fostato de potássio dibásico (Sinth®) e ácido fosfórico (Dinâmica®).

Equipamentos

Para quantificação da IVC e amostras degradadas, o método analítico utilizado foi desenvolvido e validado por CLAE – DAD, em equipamento Shimadzu® equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injector

automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP, sendo os dados tratados através do software Shimadzu® LC solution 1.0.

Estudo de degradação forçada

Os estudos de degradação hidrolítica foram conduzidos com a matéria prima da IVC em solução H_2O:ACN (80:20) a 200 µg/mL, utilizando soluções de HCl 0,01, 0,1 e 1M, para hidrólise ácida; NaOH 0,01, 0,1 e 1M, para à básica; solução de peróxido de hidrogênio a 3, 6 e 9%, para a oxidativa e água ultra pura em câmara de fotoestabilidade Nova Ética® (modelo C242), que consiste na associação de lâmpadas UV e fluorescente com emissão de 30.000 lux e 13,33 w/m^2 por hora, para a fotolítica, à temperatura ambiente. Os estudos hidrolíticos da IVC foram realizados sem o aquecimento das amostras estressadas, para avaliação das condições de degradação isoladas, sem a presença de nenhum agente catalisador, exceto, a hidrólise neutra em que a solução de IVC foi submetida a 60°C em água ultrapura, devido a baixa velocidade de reação. Para determinação do teor de IVC em cada degradação foram retiradas alíquotas das reações em 24 horas (SINGH, BAKSHI, 2000; YOSHIOKA, STELLA, 2002).

Condições Cromatográficas

As amostras e o padrão de trabalho de IVC foram obtidas a partir de uma diluição inicial de 20 mg de IVC matéria prima em 50 mL de acetonitrila, com 5 min de agitação por sonicação, em balão volumétrico de 200 mL aferido com acetonitrila. Obtendo-se a concentração final de 200 µg/mL, com posteriores diluições volumétricas utilizando o sistema de solventes H_2O:ACN (80:20), para obtenção da curva de calibração com as concentrações de 50, 100 e 150 µg/mL, sendo a concentração de trabalho de 100 µg/mL.

Para o doseamento das amostras degradadas de IVC utilizou-se inicialmente o método descrito na literatura na farmacopéia britânica (2009) que consiste em utilizar coluna C18 (250 x 4,6 mm e 5µm) e fase móvel de água:metanol:acetonitrila (15:34:51, v/v/v) a 1 mL.min^{-1} com volume de injeção de 20 µL (245 nm), para doseamento do fármaco IVC e suas substâncias relacionadas (British Pharmacopoeia, 2009). Porém o método não desmonstrou-se seletivo, pois o pico cromatográfico da IVC não estava puro (análise realisada por DAD acoplado a software Shimadzu LCsolution 1.0), portanto, as

soluções obtidas foram submetidas a análise seguindo os parâmetros descritos por Cione & Silva, 2007-2008, que consiste na utilização de uma coluna C18 (5 µm) a 25°C, como fase estacionária, uma solução metanol:acetonitrila:ácido acético a 0,2% (260:640:100 mL v/v), como fase móvel, com fluxo de 1,5 $mL.min^{-1}$ a 254 nm. Após algumas análises o método foi otimizado, modificando-se a composição e o fluxo da fase móvel para: metanol:acetonitrila:ácido fosfórico pH 3 (260:640:100 mL v/v), como fase móvel, com fluxo de 1 $mL.min^{-1}$ a 245 nm.

Cinéticas de degradação

A ordem de reação para as cinéticas de hidrólise da DEC foram determinadas representando o percentual de fármaco residual em função do tempo (ordem zero), do logaritmo neperiano do percentual de fármaco em função do tempo (primeira ordem) e inverso do percentual de fármaco em função do tempo (segunda ordem). Os coeficientes de regressão linear foram obtidos, sendo o coeficiente mais próximo da unidade indicador da ordem das degradações da DEC (SINKO, 2008).

O modelo cinético pode ser representado pelas seguintes equações:

$C = Co - k.t$	$t90\% = (0,1 \times Co) / k$	(Ordem zero)
$\ln C = \ln Co - k.t$	$t90\% = 0,16 / k$	(Primeira ordem)
$1 / C = 1/ Co + k.t$	$t90\% = 1 / (9k \times Co)$	(Segunda ordem)

Onde Co é a concentração dos reagentes no tempo zero, C é a concentração após reação n tempo t e k, a constante de reação (SINKO, 2008).

Avaliação do teor de produtos de degradação em formas farmacêuticas

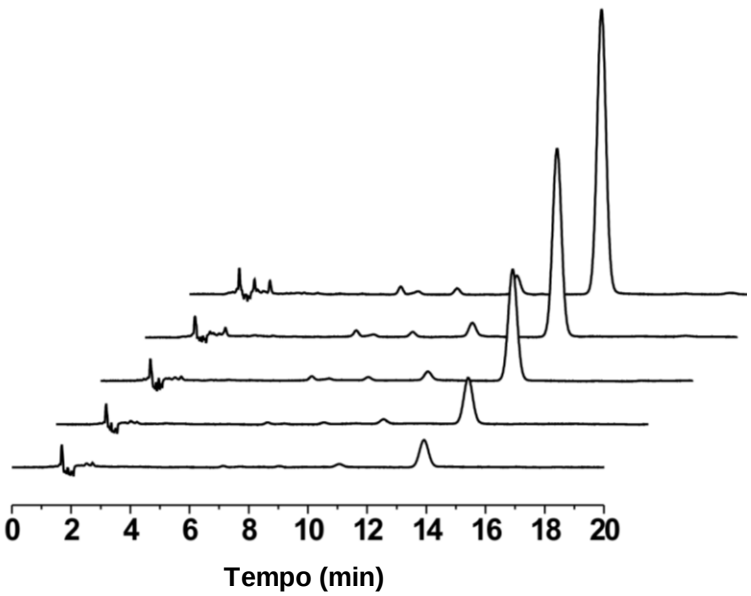
A fim de cumprir o que estabelece o ICH e ANVISA, foi analisado o teor dos produtos de degradação no produto referência brasileiro (Revectina®, SolvayFarma indústria farmacêutica) em forma farmacêutica comprimidos de IVC de 6 mg (lote n° 1045130) e em forma farmacêutica líquida obida em escala de bancada (solução oral de IVC constituída de: IVC (0,12%), propilenoglicol (20%), polissorbato 80 (1%), fosfato de sódio dibásico anidro (0,13%), fosfato de sódio monobásico anidro (0,78%),

butilhidroxitolueno (0,1%), EDTA (0,01%), metilparabeno (0,1%), propilparabeno (0,05%), álcool etílico (q.s.), sacarina sódica (0,05%), flavorizante (0,3%) adaptada de FERREIRA, SOUZA, 2011) após estudo de estabilidade no modelo acelerado (45°C ± 2°C / 75% UR ± 5%, em 0 e 3 meses), a fim de avaliar a necessidade de notificá-los ou identificá-los e qualificá-los de acordo com a dose diária administrada de IVC (ICH, 2002; ICH, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizada a análise da IVC isoladamente para determinação das curvas de calibração, bem como, de contaminantes e impurezas da matéria prima. O método demonstrou um perfil cromatográfico satisfatório para IVC, já que é possível identificar no cromatograma os isômeros H_2B_{1a} (majoritário) Tr = 13,9 min e o H_2B_{1b} (minoritário) Tr = 11,06, bem como algumas impurezas com tempos de retenção menores (2,72; 7,13 e 9,03 min), com pureza de pico adequada, conforme pode ser observado na figura 1 que representa cromatogramas de 12,5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL de IVC matéria prima.

Figura 1 – Cromatograma obtido para determinação do teor de IVC.



Diante dos resultados, o estudo de degradação inicial buscou determinar os parâmetros de degradação ideal (10 a 30% de decaimento de IVC) para seleção das amostras, e posterior desenvolvimento de método analítico capaz de quantificar os produtos de degradação da IVC. Portanto, foram avaliadas condições degradativas variadas descritas na tabela 1 em relação ao percentual de IVC.

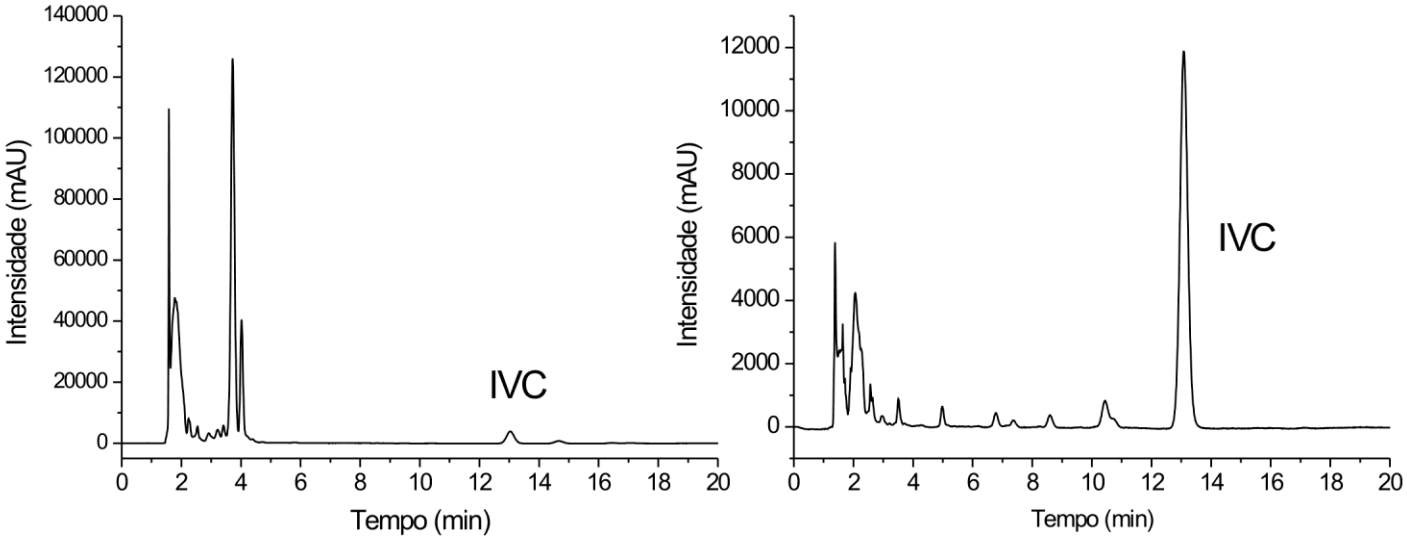
Tabela 1 – Resultado das degradações da IVC.

Hidrólises	**teor de IVC**
NaOH 0,01M por 24h a 50°C	81,6%
NaOH 0,1M por 24h a 50°C	67,9%
NaOH 1M por 24h a 50°C	22,34%
HCl 0,01M por 24h a 50°C	90,2%
HCl 0,1M por 24h a 50°C	51,8%
HCl 1M por 24h a 50°C	30,03%
H_2O_2 3% a 25°C	90,53%
H_2O_2 6% a 25°C	87,7%
H_2O_2 9% a 25°C	73,11%

Para as hidrólises, o tempo de degradação de 24 horas com as concentrações menores de 0,01M de HCl e NaOH foram as que obtiveram concentrações ótimas de degradação, enquanto que para a oxidação com peróxido de hidrogênio a concentração intermediária de 6% foi a mais adequada entre as testadas.

A partir destas análises inicias as amostras supracitadas foram selecionadas para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade, porém devido ao grande número de produtos de degradações formados o método descrito no item *"Condições Cromatográficas"*, obtido após algumas adaptações, ainda não possui confiabilidade analítica para quantificação dos produtos de degradação da IVC, visto que, é possível observar a co-eluição dos produtos de degradação, nas diferentes condições de degradação, como nas hidrólises ácida e básica ilustrados na figura 2, garantindo apenas a pureza do pico dos isômeros H_2B_{1a} e H_2B_{1b}.

Figura 2 – Cromatogramas obtidos para os estudos de degradação da IVC.



Paralelamente ao estudo de degradação hidrolítica foi realizado o estudo de degradação fotolítica da solução amostra de IVC em que foi possível determinar o decaimento de IVC em função do tempo de exposição, valores descritos na tabela 2.

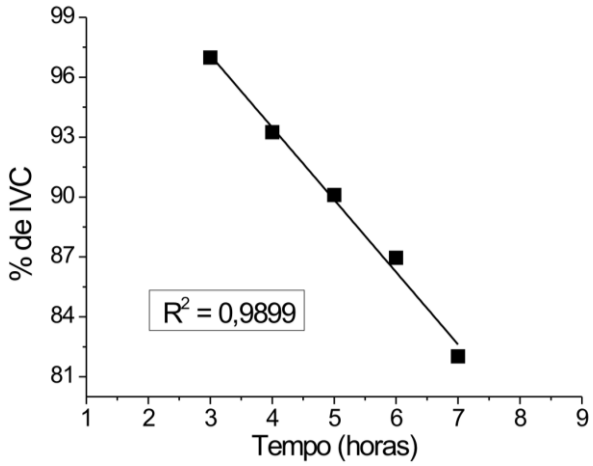
Tabela 2 – Percentual de IVC fotodegrada versus tempo de exposição.

Amostra	***% (CLAE)***
Matéria prima IVC (controle interno)	99,30
Solução fotodegradada 3h	96,99
Solução fotodegradada 4h	93,25
Solução fotodegradada 5h	90,10
Solução fotodegradada 6h	86,96
Solução fotodegradada 7h	82,02

Semelhante aos resultados obtidos nas degradações hidrolíticas, não foi possível avaliar com confiabilidade analítica a produção de produtos de degradação na degradação

fotolítica devido a co-eluição entre os produtos de degradação. Porém como é possível determinar a pureza do pico cromatográfico da IVC no método otimizado foi possível o cálculo da cinética de degradação fotolítica na solução amostra de IVC, que apresentou-se de ordem zero, com velocidade de reação de -3,63 horas^{-1}, figura 3.

Figura 3 – Cinética de degradação fotolítica da IVC em solução.



A análise dos produtos farmacêuticos: comprimidos de IVC de 6 mg e em forma farmacêutica líquida (solução oral manipulada) de IVC após estudo de estabilidade no modelo acelerado demontraram um decaimento médio de 7,2% (± 0,43) e 12,1% (± 0,86), respectinvamente, porém, não foi possível a quantificação relativa dos produtos de degradação gerados devido a co-eluição dos mesmos.

CONCLUSÃO

A grande dificuldade existente no desenvolvimento de um método analítico indicativo de estabilidade para IVC se dá devido a grande estrutura química da IVC, que se degrada em um número elevado de moléculas menores, muitas vezes, com polaridades bastante semelhantes, sendo uma etapa crítica a separação desses produtos de degradação na análise cromatográfica. Sendo assim, se faz necessário realizar novas análises cromatográficas em busca de um método seletivo para quantificadação da IVC e seus produtos de degradação.

REFERÊNCIAS

BRITISH PHARMACOPEIA, Veterinary, The stationery Office, London, 2009.

CIONE, A. P.P.; SILVA, P.M. Validação de Metodologia para Análise de Ivermectina e Indicativos de Estabilidade da Molécula Sob Diferentes Condições de Degradação Forçada. Revista Analytica, n°32, Dezembro 2007/Janeiro 2008.

CULLY, D. F.; VASSILA, D. K.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; VAN DER PLOEG; SCHAEFFER, J. M.; ARENA, J. P. Cloning of na avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from Caenorhabditis elegans. *Nature*, v. 371 n. 6499, p. 707-711, 1994.

DENT, J.A.; DAVIS, M. WAYNE & AVERY, L.A. avr-15 encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in Caenorhabditis elegans. *EMBO J.* v. 16, n. 19, p. 5867-5879, 1997.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. Disponível em: http://extoxnet.orst.edu/pips/abamecti.htm, Acessado em 20 de Junho de 2012.

FERREIRA, A. O.; SOUZA, G.F. Preparações Orais Líquidas, 3ª edição, Pharmabooks Editora, 2011.

International Conference on Harmonization, "**ICH Q3A-(R):** Impurities in New Drug Substances," Step 5, 2002.

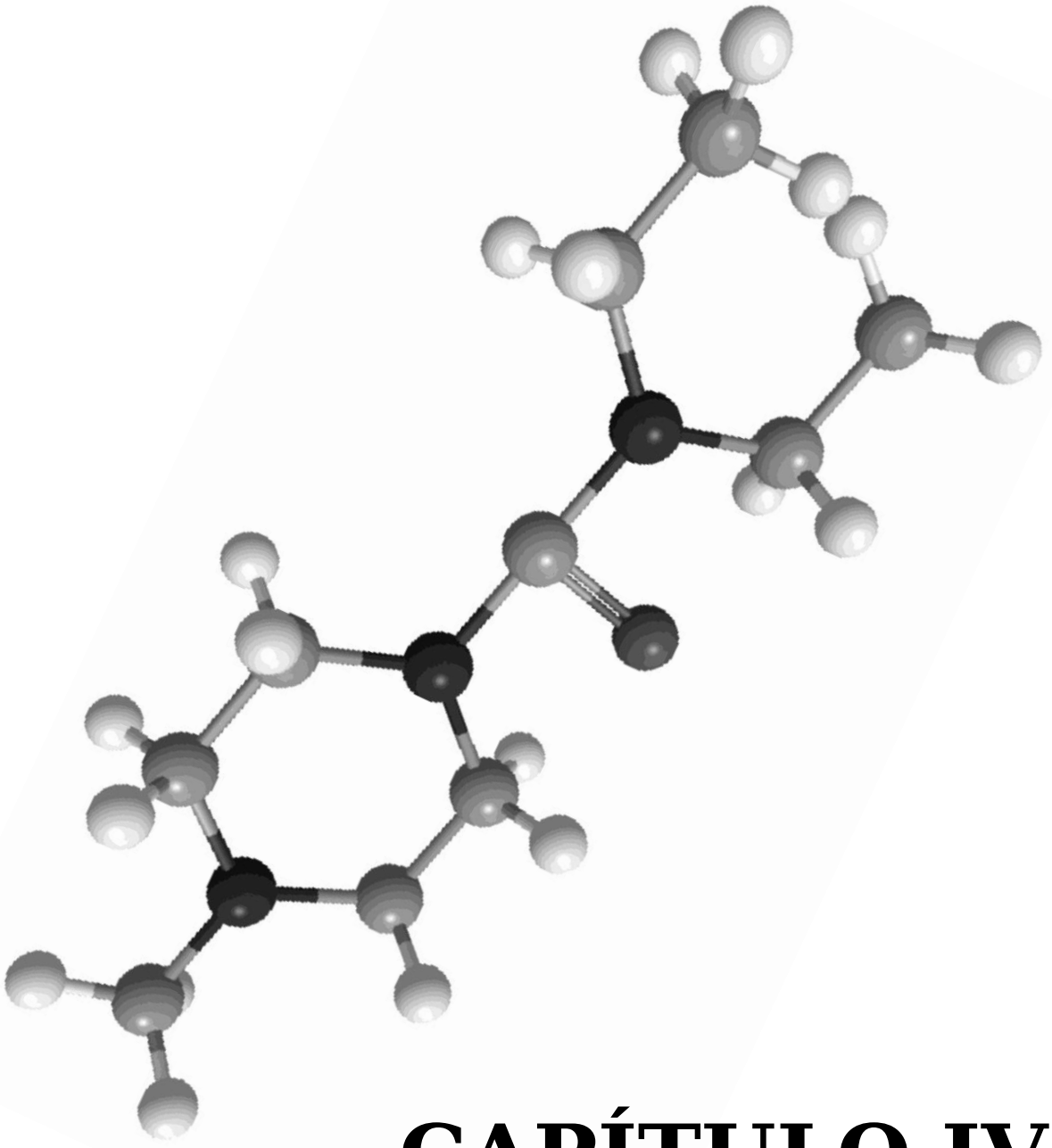
International Conference on Harmonization, "**ICH Q3B-(R):** Impurities in New Drug Products," Step 5, 2003.

ÕMURA, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 31, p. 91–98, 2008.

SINKO, P. J. Martin – Físico-farmácia e ciências farmacêuticas. Editora Artmed. 5ªEd. 810p. 2008.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharmaceutical Technology,* v. 24, p.1-14, 2000.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V.J. *Stability of Drugs and Dosage Forms* Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2002.



CAPÍTULO IV

6 CAPÍTULO IV: *Desenvolvimento de Forma Farmacêutica Associação em Dose Fixa dos fármacos citrto de DEC e IVC*

ROLIM, L.A. OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE FORMA FARMACÊUTICA ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA PARA O TRATAMENTO DA FILARIOSE LINFÁTICA E ESTUDO DE ESTABILIDADE FORÇADA DOS FÁRMACOS, **2012.**

Artigo 8 - DESENVOLVIMENTO DE NOVO COMPRIMIDO PARA O TRATAMENTO DA FILARIOSE LINFÁTICA CONTENDO IVERMECTINA E CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA ASSOCIADOS EM DOSE FIXA

Artigo em construção, os resultados apresentados podem sofrer modificações, aguardando a conclusão dos estudos de estabilidade.

RESUMO

Causadora da elefantíase, a filariose linfática coloca em risco um bilhão de pessoas em todo o mundo, onde mais de 40 milhões se encontram gravemente incapacitadas ou apresentam deformações. Dos infectados, um terço vive na Índia, um terço na África e o restante na Ásia, Pacífico Ocidental e Américas. O fármaco de escolha para o combate à filariose é a dietilcarbamazina, porém, seu efeito terapêutico em vermes adultos não é eficaz, atingindo apenas 50% de letalidade dos vermes adultos, sendo, portanto associado ao tratamento com a ivermectina, com maior potencial adulticida, atingindo assim a erradicação total do parasita no hospedeiro homem. Com isso, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento tecnológico de um novo comprimido contendo os fármacos antiparasitários de primeira escolha terapêutica para a filariose, citrato de dietilcarbamazina e ivermectina (DEC - 50 mg e IVC - 6 mg) associados em dose fixa. O produto visa agregar novas vantagens à terapia atual ao reduzir o número de comprimidos administrados ao dia, se reduz o custo da terapia e se amplia a adesão do tratamento pelos pacientes, possibilitando maior acesso e redução de erros na administração. O comprimido foi obtido com peso de 180 mg, sendo 56 mg de insumos farmacêuticos ativos e 124 mg de excipientes (estearato de magnésio, B.H.T., Celulose 250), sendo os resultados dos ensaios de controle de qualidade aplicados à forma farmacêutica desenvolvida apresentaram-se de acordo com as especificações. Conclui-se que a abordagem integrada da tecnologia farmacêutica proporcionou a obtenção de um novo produto farmacêutico dentro das exigências regulatórias vigentes.

Palavras-Chave: citrato de dietilcarbamazina, ivermectina, comprimido, associação.

ABSTRACT

Causing elephantiasis, lymphatic filariasis endangers a billion people around the world, where more than 40 million are severely disabled or have deformations. Of those infected, a third live in India, one third in Africa and the rest of Asia, Western Pacific and the Americas. The drug of choice to combat filariasis is diethylcarbamazine, but its therapeutic effect on adult worms is not effective, reaching only 50% mortality of adult worms, so being associated with treatment with ivermectin, with greater potential adulticide, thus achieving complete eradication of the parasite in the host man. Thus, this paper presents the technological development of a new tablet containing antiparasitic drugs of first choice treatment for filariasis, ivermectin and diethylcarbamazine citrate (DEC - 50 mg and CVI - 6 mg) fixed-dose related. The product aims to add new benefits to current therapy to reduce the number of tablets taken daily reduces the cost of therapy and expands treatment adherence by patients, enabling greater access and reduced administration errors. The tablet was obtained weighing 180 mg, with 56 mg of active pharmaceutical ingredients and 124 mg of excipients (magnesium stearate, BHT, Cellulose 250), and the results of tests for quality control applied to the developed dosage form are presented according to the specifications. It is concluded that the integrated approach of pharmaceutical technology afforded obtaining a new pharmaceutical product within the current regulatory requirements.

Keywords: diethylcarbamazine citrate, ivermectin, tablets, association.

INTRODUÇÃO

A filariose linfática é uma doença crônica, negligenciada, de caráter debilitante, que atinge pessoas de todas as idades e de ambos os sexos, além de constituir um problema de saúde pública de magnitude significativa em mais de 80 países, distribuídos principalmente nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. Essa enfermidade vem ocupando, há onze anos, o 2° lugar no ranking mundial das doenças incapacitantes, já que está associada à debilitação física e ao estigma social. Nas áreas que a doença é endêmica, a prevalência de infecção aumenta continuamente. Isso ocorre, principalmente, pelo crescimento rápido e desordenado dos centros urbanos e pela criação de condições ideais para a multiplicação

dos focos de mosquitos transmissores da doença (BRASIL, 2005; BRASIL, 2008; SILVA, SILVA & OLIVEIRA, 2008).

A transmissão da doença ocorre devido à presença das formas embrionárias, chamadas de microfilárias, encontradas no sangue humano, que são sugadas pelos mosquitos hematófagos, sendo o *Culex quinquefasciatus* predominante no momento do repasto. A Wuchereria bancrofti é um parasita exclusivamente do ser humano que se desenvolve no sistema linfático, até formar vermes adultos (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009).

No Brasil, a filariose permanecia de forma endêmica em apenas três capitais: Belém, Manaus e Recife. Nas duas primeiras cidades, houve uma significativa redução da transmissão, sendo recife a cidade com o maior número de casos do país. Desde a década de 50, pesquisas e ações de controle da filariose vêm sendo desenvolvidas no Brasil. Nesse contexto, o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), em Recife, vem desenvolvendo assessorias e treinamentos de recursos humanos relacionados ao agravo da filariose desde a década de 80 (BRASIL, 2008).

O tratamento antifilarial está indicado em todos os indivíduos com evidências de vermes adultos e/ou microfilárias, ou seja, de infecção ativa, independentemente de apresentarem ou não qualquer manifestação clínica relacionada direta ou indiretamente à bancroftose. A droga escolhida na terapêutica individual é a dietilcarbamazina (DEC). Infelizmente, o poder adulticida do fármaco não é 100% e estima-se que cerca de 50 a 60% dos vermes adultos são refratários ao tratamento. Isso acontece mesmo quando se administram doses tão altas da droga quanto 12 mg/kg de peso corporal, por um período de até 30 dias. O esquema clássico recomendado pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento individual dos microfilarêmicos é o de 6 mg/kg de peso por doze dias (DREYER, DREYER & NORÕES, 2002).

Ocorrendo falha no tratamento com o citrato de DEC, pelo fato do paciente apresentar vermes adultos não susceptíveis e continuar produzindo microfilárias, havendo reaparecimento da hematúria, deve-se lançar mão da co-admininistração da dietilcarbamazina com a ivermectina (6 mg/kg e 400 μg/kg de peso, respectivamente). Essa indicação tem como objetivo a melhor ação microfilaricida da combinação das duas drogas e, consequentemente, a obtenção de um maior tempo de clearance das microfilárias

circulantes. Assim, a melhoria da eficácia do tratamento depende do paciente aderir quase perfeitamente ao tratamento, sendo essa adesão enfraquecida pela complexidade dos regimes posológicos (BRASIL, 2005; DREYER, DREYER & NORÕES, 2002).

Nesse sentido, não só a posologia combinada destes fármacos antifilariais se torna interessante para a maior eficácia do tratamento, mas a associação física desses fármacos em um único produto farmacêutico em dose fixa combinada (DFC). Os comprimidos de DFC possuem diversas vantagens sobre os fármacos utilizados isoladamente (monoterapia). Dentre elas, destaca-se a menor quantidade dos erros de prescrição porque as doses recomendadas são padronizadas pela OMS; diminuição do número de comprimidos a ser ingerido, fato que favorece a adesão do paciente ao tratamento e, havendo falha na ingestão do DFC, os pacientes não podem escolher qual fármaco irão ingerir evitando-se assim o risco da monoterapia e o consequente desenvolvimento da resistência aos quimioterápicos (SILVA, 2010).

A escolha pelo uso da dose fixa combinada está se tornando cada vez mais frequente, devido aos seus inúmeros benefícios. Apontada na Nota Técnica, em agosto de 2009, mudanças no tratamento da tuberculose inclui a adoção da apresentação farmacêutica de comprimidos DFC com quatro ativos, DFC 4 em 1, para o tratamento da fase intensiva da TB Dessa forma, a Organização Mundial de Saúde e a União Internacional Contra Tuberculose e Doenças Pulmonares recomendam o uso de doses fixas combinadas de fármacos antituberculose, para prevenir a monoterapia e consequente resistências ao tuberculostático (LAVOR, 2010; SILVA, 2010). O aumento da eficácia, menor incidência de efeitos adversos devido ao uso de doses menores, otimização da adesão ao tratamento pela simplificação do tratamento, são algumas das vantagens comprovadas das DFC (ANVISA, 2010).

Assim, visou-se a elaboração do produto farmacêutico de associação em dose fixa combinada do citrato de DEC e IVC, seguindo os preceitos técnicos científicos de estabilidade de formas farmacêuticas, com o objetivo de ampliar o efeito microfilaricida da administração em massa da DEC, além de viabilizar a população um tratamento da filariose mais seguro e eficaz, propiciar uma maior adesão do paciente ao tratamento, acarretar redução do custo produtivo deste medicamento e ampliar o poder de compra dos governos, garantindo o acesso universal a um número cada vez maior de pacientes (SOARES, 2011).

PARTE EXPERIMENTAL

Material

Para obtenção tecnológica da forma farmacêutica proposta utilizamos os princípios ativos: ivermectina (IVC), doada pela indústria veterinária Vallée® (validade 12/2012) e citrato de dietilcarbamazina (DEC), doado pela indústria farmacêutica Farmanguinhos® (validade 01/2013); bem como os excipientes: celulose microcristalina, estearato de magnésio e Butil-hidróxi-tolueno (BHT), fornecidos pela Colorcon® e Megle Excipientes®.

Análise térmica dos fármacos por calorimetria exploratória diferencial

Na área farmacêutica estudos de decomposição térmica de fármacos e medicamentos, a avaliação de estabilidade, a caracterização térmica de fármacos, a identificação de polimorfos, a determinação de pureza e os estudos de compatibilidade de formulações farmacêuticas são determinados a partir de técnicas conhecidas com, Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG) (OLIVEIRA et al., 2010).

As curvas de DSC dos fármacos foram obtidas por meio de um calorímetro da marca Shimadzu®, modelo DSC-60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50mL/min, sendo a massa das amostras analisadas em torno de 5,0 mg, acondicionadas em cadinhos de alumínio, nas razões de aquecimento de 10, 15 e 20°C/mim, até a temperatura de 600°C (ALENCAR et al., 2006).

As curvas termogravimétricas dos fármacos foram obtidas por meio de termobalança Shimadzu®, modelo DTG 60H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL/min, sendo a massa das amostras analisadas em torno de 10,0 mg (± 0,5), acondicionadas em porta amostra de alumina a 5°C/min até a temperatura de 600°C.

Desenvolvimento de forma farmacêutica comprimido associação em dose fixa dos fármacos citrato de dietilcarbamazina e ivermectina

Após a seleção dos excipientes que não apresentaram incompatibilidade com os fármacos isoladamente ou melhoraram alguma das propriedades dos mesmos, iniciou-se o

processo de formulação do produto. As propriedades reológicas inadequadas dos fármacos poderiam inviabilizar um processo produtivo por compressão direta, porém, devido ao baixo aporte de fármacos no medicamento proposto: 50 mg de DEC e 6 mg de IVC foi possível a obtenção dos lotes por esta técnica.

Foram obtidos três lotes de bancada (tabela 1), dose fixa combinada com uma planificação quantitativa do agente antioxidante (BHT) visando estabelecer a concentração necessária para proteção dos fármacos frente a possível degradação por oxidaçãodos fármacos.

Tabela 1 - Composição dos lotes de bancada ADF – citrato de DEC + IVC.

Composição	***LB1***	***LB2***	***LB3***
DEC	27,8%	27,8%	27,8%
IVC	3,4%	3,4%	3,4%
Celulose microcristalina	67,8%	67,7%	67,3%
Estearato de Mg	1%	1%	1%
BHT	0%	0,1%	0,5%

Os lotes foram obtidos por compressão direta, utilizando punção de 10 mm, cada lote com 300 g, objetivando comprimido DFC de peso médio de 180 mg, obedecendo a seguinte sequência na produção:

- A IVC (fármaco crítico, devido sua dosagem muito baixa em relação ao peso médio dos comprimidos, 6 mg) foi pesada e adicionada ao misturador;
- O citrato de DEC foi pesado e adicionado, misturando-se por 5 min;
- O BTH (agente oxidante) foi adicionado, misturando-se por 5 min;
- Para garantir a uniformidade da mistura, a celulose microcristalina foi pesada em 2 partes, sendo a primeira adicionada, misturando-se por 5 min, e posteriormente a segunda parte é acrescentada, misturando-se por mais 5 min;
- Por fim, o estearato de Mg foi adicionado, misturando-se por 5 min.

Controle de qualidade físico-químico das formas farmacêuticas obtidas

Os controles de qualidade foram realizados segundo Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010).

A avaliação do peso médio, em que foi efetuado a média aritmética na pesagem individual de 20 unidades, retirados ao acaso de uma mesma amostra, em uma balança analítica Shimadzu®, AUX 220.

Para o teste de dureza comprimidos foram submetidos à ação de Durômetro Varian®, um aparelho que mede a força em newtons, aplicada diametralmente, necessária para esmagá-lo.

O teste de friabilidade visou determinar a resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica depois de efetuadas 100 rotações em friabilômetro, Vankel®, FRI-001.

O teste de desintegração permitiu verificar se comprimidos se desintegram dentro do limite de tempo especificado, quando seis unidades do lote foram submetidas à ação de desintegrador, Nova Ética®, 301-AC.

Os ensaios de dissolução *in vitro* constituem importante meio de caracterização da qualidade biofarmacêutica oral, possibilitando o controle da qualidade farmacêutica e o estabelecimento de correlações com os dados obtidos *in vivo*. O conhecimento e controle das variáveis que podem influenciar a liberação da substância ativa bem como a padronização e conseqüente calibração e validação de equipamentos e procedimentos fortalecem a importância destes ensaios, tornandoos mais confiáveis, robustos e exeqüíveis. A dissolução (dissoludor, Varian, modelo VK-7000/7010/750D) foi realizada por meio de método de dissolução adaptado (MANADAS et al., 2002).

O doseamento (cromatógrafico, Shimadzu® Prominence, 228/45001/32, com bomba de pressão, LC-20AT) da forma farmacêutica foi realizado separadamente. Para a IVC, o método foi adaptado de Cione & Silva, 2007-2008, utilizando uma coluna C18 (250 x 4,6 cm, 5 µm) a 25°C, como fase estacionária, metanol:acetonitrila:ácido fosfórico pH 3 (260:640:100 mL v/v), como fase móvel, com fluxo de 1 mL.min-1 a 245 nm e volume de injeção de 20 µL. Enquanto que, para o citrato de DEC utilizou-se uma coluna octasilano (C8), de 250 x 4,6 mm e 5µm de tamanho de partícula, a 30°C, e como fase móvel uma solução isocrática de acetonitrila / solução de fosfato de potássio dibásico (20 mM)

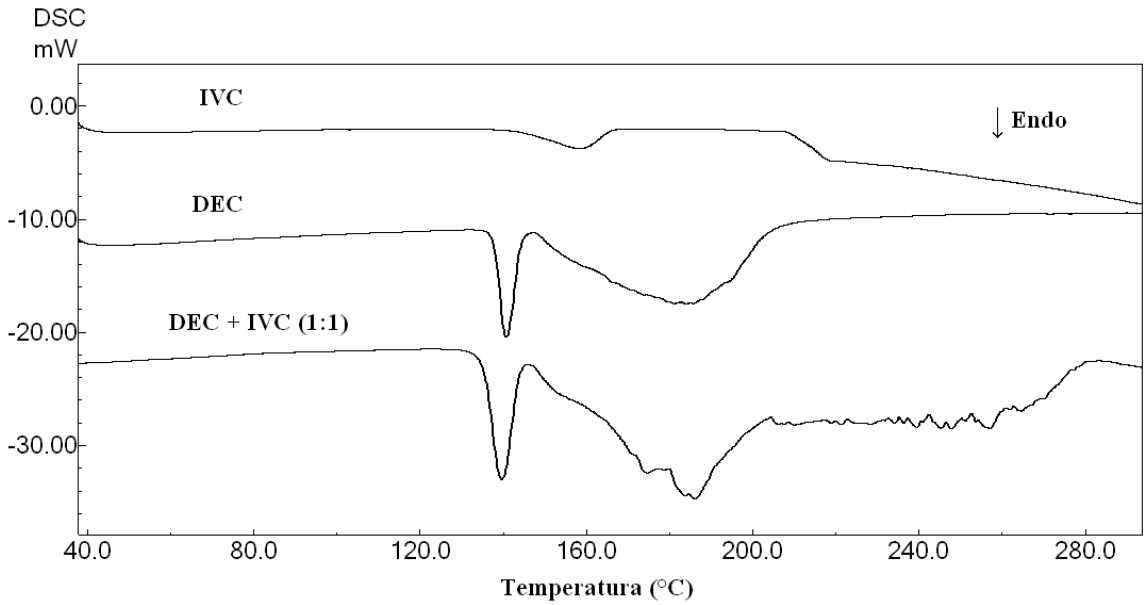
acidificada com ácido fosfórico pH 3, na proporção 1:9 (v/v), com fluxo de 0,8 mL/min a 220 nm, sendo este método previamente desenvolvido e validado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Compatibilidade fármaco:fármaco

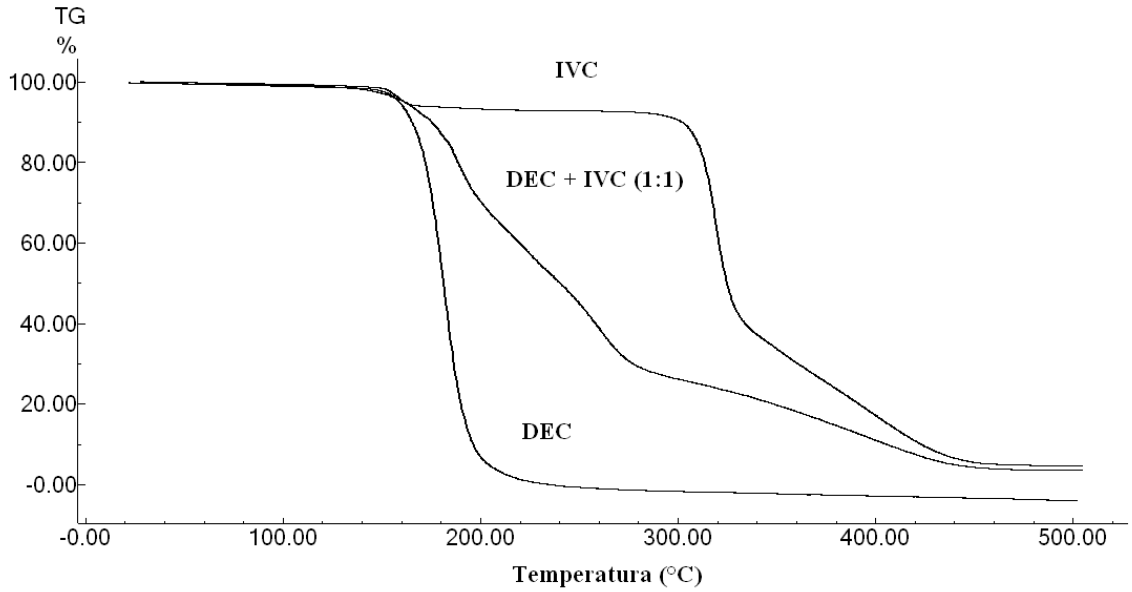
Inicialmente, realizou-se um estudo de compatibilidade fármaco-fármaco (citrato de DEC:IVC), a fim de avaliar possíveis interações. O citrato de DEC foi misturado a IVC em gral com pistilo, com trituração e pulverização dos pós por cerca de 5 min, na porporção 1:1 (p/p). A mistura obtida foi analisada por DSC e TG, em triplicata, para visualização de seus eventos térmicos, como pode-se observar na figura 1 e 2.

Figura 1 - Estudo de compatibilidade citrato de DEC:IVC (1:1, p/p) por DSC.



As curvas TG e DSC da mistura binária dos fármacos IVC e citrato de DEC demosntraram-se como uma soma dos eventos térmicos das moléculas isoladamanete, não apresentando nenhuma antecipação ou deslocamento de eventos de fusão e degradação dos fármacos, sendo estes considerados compatíveis (BIANCHIN et al., 2010).

Figura 2 - Estudo de compatibilidade citrato de DEC:IVC (1:1, p/p) por TG.



Controles de qualidade

Os resultados dos controles de qualidade aplicados ao produto desenvolvido estão apresentados na Tabela 2, confirmando a adequação dos comprimidos desenvolvidos as especificações da farmacopeia. A determinação do peso para formas farmacêuticas em dose unitária, no caso de comprimidos não revestidos com 180 mg de peso, deve ser 100,0% ± 5,0%. Para o doseamento se manteve a lógica dos produtos contendo tais fármacos isolados, de 90 a 100% realizado com método descrito para IVC.

Tabela 2 – Controle de qualiade dos lotes de bancada desenvolvidos.

Controle de Qualidade	***Especificação***	***LB1***	***LB2***	***LB3***
Peso Médio	900 mg, aceita-se entre 855 e 945 mg (± 5%)	**181,125 mg**	**182,125 mg**	**181,935 mg**
Dureza	15 Kgf, aceita-se de 12 a 18 Kgf (± 2 Kgf)	**10,485 Kgf**	**9,52Kgf**	**11,62Kgf**
Friabilidade	≤ 1,5%	**0,06%**	**0,05%**	**0,02%**
Desintegração	≤ 30 min	**22'41"**	**13'00"**	**25'03"**
Dissolução				
DEC	Q ≥ 80 % em 30 min	**98,82**	**99,56**	**99,12**
IVC		**92,76**	**92,43**	**90,30**
Doseamento				

DEC	100%, aceita-se de 90 a	**100,99**	**99,13**	**100,01**
IVC	110%	**99,56**	**99,88**	**99,71**

Para a dissolução, uma vez que não existem métodos descritos na literatura para IVC, fármaco crítico devido a sua baixíssima solubilidade em água, o ensaio foi executado com o meio suco gástrico simulado (tampão em pH 1,2 de HCl/NaCl) adicionando-se 0,5 % do tensoativo lauril sulfato de sódio. Na avaliação dos lotes obtidos traçou-se o perfil de liberação dos fármacos por 2h sendo possível observar que a DEC tinha de 90 a 100% de seu teor dissolvido em 15 minutos e a IVC só atinge esse mesmo percentual de teor dissolvido em 30 minutos. Quanto à uniformidade de conteúdo, realizou-se através do doseamento dos componentes ativos de dez doses unitárias para determinar se os fármacos estão dentro dos limites especificados, devendo possuir sua uniformidade controlada para garantir maior segurança clínica do produto (BRASIL, 2010).

Com os resultados descritos não é possível excluir um dos lotes de bancada, pois todos os parâmetros avaliados apresentaram-se dentro das especificações determinadas.

Para a finalização do estudo faz-se necessário avaliar a estabilidade dos lotes obtidos, visto que os fármacos apresentam instabilidade oxidativas (IVC) e hidrolíticas (DEC). Um estudo de estabilidade acelerada em câmera de estabilidade a 40°C e 75%UR encontra-se em andamento, para repetição de todos os controles de qualidade realizados no tempo 0 (zero).

CONCLUSÃO

O desenvolvimento do comprimido contendo os fármacos antiparasitários associados em dose fixa, citrato de Dietilcarbamazina (DEC, 50 mg) e Ivermectina (IVC, 6 mg), superou todos os desafios tecnológicos expostos. O comprimido obtido apresentou peso final de 180 mg, encontando-se dentro das especificações de controle de qualidade para forma farmacêutica proposta.

A avaliação da estabilidade dos lotes obtidos será de extrema importância para seleção da melhor formulação desenvolvida e material de acondicionamento adequado, já

que ambos os fármacos utilizados na obtenção do comprimido para o tratamento da filariose linfática apresentam um tipo de instabilidade: oxidativas e hidrolíticas.

5 REFERÊNCIAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Registro de Associações em Dose Fixa para o Tratamento da Hipertensão Arterial - 1ª Edição - Brasília – DF, 2010.

BIANCHIN, M. D.; BLATT, C. R.; SOARES, A. S.; GUERREIRO, I. C. K. Avaliação da qualidade de comprimidos de propranolol e enalapril distribuídos no sistema público de saúde em uma cidade do sul do Brasil, *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 17, n. 2, p. 491 – 498, 2010.

BRASIL, Farmacopéia Brasileira -. [CD-ROM]. 4ª edição, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005 - Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, **D.O.U**. 01 ago. 2005.

BRASIL, Tiragem: 1.ª edição de 2008. Manual de Coleta de Amostras Biológicas para Diagnóstico de Filariose Linfática por Wuchereria bancrofti Brasília, DF, Série A. Normas e Manuais Técnicos 2008.

BRASIL, Tiragem: 1.ª edição de 2009 - Guia de Vigilância Epidemiológica e Eliminação da Filariose Linfática. MINISTÉRIO DA SAÚDE / Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica Brasília, DF, Série A. Normas e Manuais Técnicos 2009.

BRASIL, Farmacopéia Brasileira - Volume 1. [CD-ROM]. 5ª edição, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasília, DF, 2010.

CIONE, A. P.P.; SILVA, P.M. Validação de Metodologia para Análise de Ivermectina e Indicativos de Estabilidade da Molécula Sob Diferentes Condições de Degradação Forçada. *Revista Analytica*, n. 2, Dezembro 2007/Janeiro 2008.

DREYER, G.; DREYER, P.; NORÕES, J. Recomendações para o tratamento da filariose bancroftiana, na infecção e na doença. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. v.35, n.1, p. , 2002.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA VII. [CD-ROM]. 7ª ed. Lisboa: Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento; 2002.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica.** 3. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. p. 1517.

LAVOR, E. P. – Estudo de pré-formulação para dose fixa combinada dos tuberculostáticos – rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (4 em 1), 2010.

LIANG, J.L.; KING, J.D.; ICHIMORI, K.; HANDZEL, T.; MOLISAMOA, P.; LAMMIE, P.J. Impact of Five Annual Rounds of Mass Drug Administration with Diethylcarbamazine and Albendazole on Wuchereria bancrofti Infection in American Samoa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 78, n. 6, p. 924–928, 2008.

LIMA, B. V. de; VILELA, A. F.; ANDRADE, C. E.O. Avaliação da qualidade de comprimidos de ácido ascórbico comercializados nas farmácias de Timóteo – MG. Farmácia e Ciência, 2011.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 4, 2002.

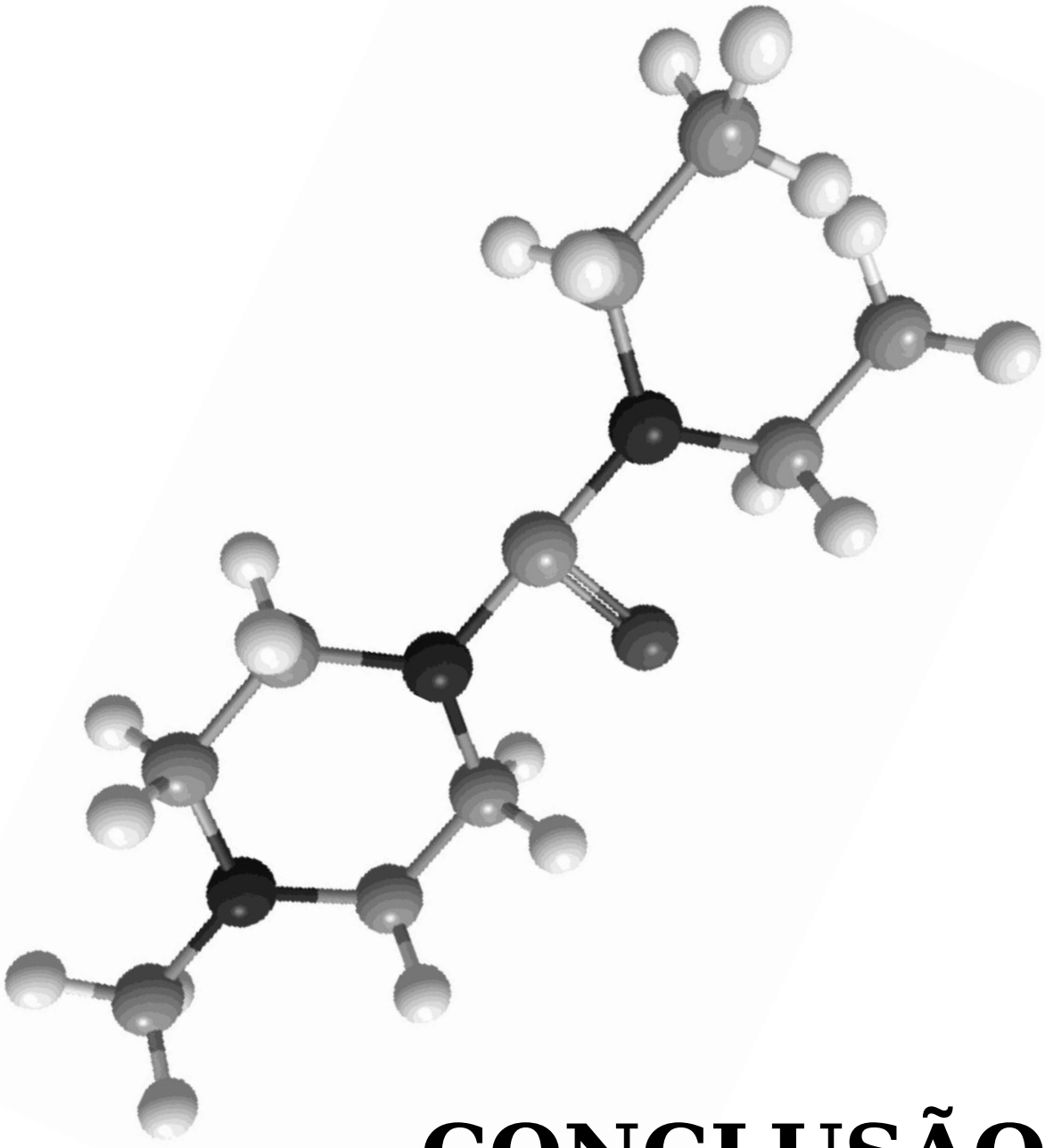
MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. H. Y.; SOUSA, J.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico Benznidazol. *Química Nova*, v. 33, n. 8, p. 1714-1719, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; SOARES, C. D. V.; PIANETTI, G. A. Análise térmica aplicada à caracterização da sinvastatina em formulações farmacêuticas - *Print version*, *Química Nova*, v.33, n.8, 2010.

SILVA, A. M. Estudo para o desenvolvimento de comprimidos dose fixa combinada (DFC) 3 em 1 para o tratamento da tuberculose – Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2010. xxxii, 156f. : il. col.; 30 cm. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, 2010.

SILVA, E. C. B. F. da; SILVA, M. A. L. da; & OLIVEIRA, P. A. dos S. Filariose Linfática: Avanços e Perspectivas do Diagnóstico Laboratorial – Revisão Lymphatic Filariasis: Progresses and Perspectives of the Laboratorial Diagnostic, 2008.

SOARES, M. F. DE LA R. Desenvolvimento tecnológico de comprimido antirretroviral em associação dose fixa de zidovudina, lamivudina e efavirenz. Tese de doutorado – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPE, Brasil, 2011.



CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Devido à disponibilidade de novas estratégias de controle e tratamento da doença, pode-se constatar que a filariose pode ser erradicada sem trazer conseqüências agravantes ao paciente, se o mesmo receber tratamento adequado. Com isso evidenciou-se que o melhor tratamento isolado ainda é fazendo-se do uso da dietilcarbamazina, porém em lugares que coexista oncorcecose, o melhor fármaco é a ivermectina, se o portador apresentar tolerância, ainda pode-se utilizar o ALB. Quanto a áreas endêmicas, o melhor tratamento em massa se faz da combinação dos fármacos DEC e IVC, pois a DEC possui efeito microfilaricida em larvas jovens, enquanto a IVC em vermes adultos, tornando-o o tratamento mais eficaz e seguro, sendo comprovado através da diminuição significativa da prevalência das microfilárias e infectividade dos mosquitos vetores nos programas utilizados pela OMS.

As técnicas analíticas utilizadas para caracterização físico-química dos fármacos citrato de DEC e IVC permitiram um melhor conhecimento sobre a natureza físico-química dos antiparasitários, que ajudarão a fornecer subsídios para o estabelecimento de um perfil de qualidade detalhado a ser adotado no controle de qualidade de rotina para este fármaco e para formulações que o utilizem. Tais informações são imprescindíveis para a padronização e estabelecimento de condições de estabilidade desse fármaco.

O estudo de estabilidade e compatibilidade do citrato de DEC e IVC com diferentes excipientes foi realizado, inicialmente por DSC, e em uma segunda etapa por técnicas complementares. Das misturas analisadas por DSC, apenas alguns excipientes indicaram a existência de alguma possível interação. Dessa forma, para as outras análises foram selecionadas as MB com Tabletose®, representando os excipientes que continham lactose (Flowlac®, Starlac®, Tabletose®), para o citrato de DEC e IVC, o PVP e o EMg (citrato de DEC) e Starch®(IVC).

As análises complementares por FT-IR e DRX não apresentaram nenhum indício de interação entre as MB. Porém, os estudos cinéticos demonstraram uma diminuíção da energia de ativação das reações nas MBs de citrato de DEC e IVC. Os excipientes PVP e o EMg (para o citrato de DEC), bem como, amido e lactose (para a IVC) devem ser evitados

durante o estudo de pré-formulação uma vez que foi comprovada a instabilidade dos fármacos na presença deles.

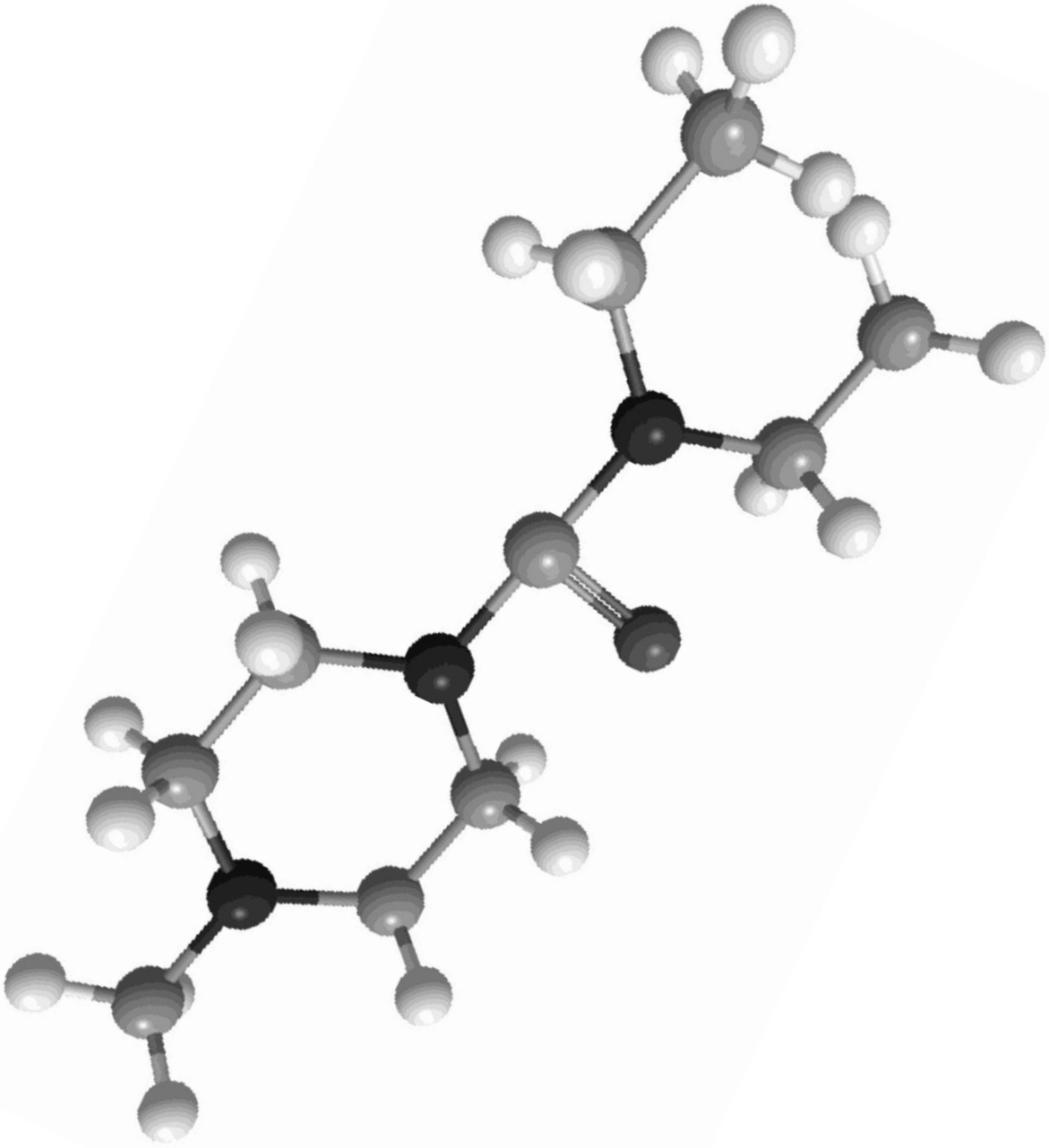
As condições de degradação empregadas no estudo foram suficientes para degradar a DEC e gerar alguns produtos de degradação, os quais foram quantificados por CLAE-DAD e identificados por CLAE-MS.

A avaliação das formas farmacêuticas submetidas a estudo de estabilidade acelerado evidenciaram a formação de 5 produtos de degradação, os mesmos advindos da hidrólise e da oxidação. Os resultados obtidos mostraram que a formulação distribuída para o tratamento da filariose linfática não apresenta qualidade adequada, uma vez que o método indicativo de estabilidade foi capaz de detectar 5 produtos de degradação, em apenas 3 meses de exposição a condições aceleradas. Nesse sentido, fica comprovada a importância dos estudos de pré-formulação, os quais deveriam ser realizados previamente a fim de avaliar a susceptibilidade da DEC base livre a degradação.

Enquanto que as degradações da IVC em solução empregadas foram suficientes para degradar a DEC e gerar produtos de degradação, porém os mesmos não foram quantificados por CLAE-DAD com confiabilidade analítica. O desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar os produtos de degradação da IVC se faz necessário, devido ao grande numero de produtos de degradação potencialmente gerados.

Adicionalmente, foi desenvolvido e validado, de acordo com as exigências legais vigentes, um método analítico para quantificação da IVC por espectrofotometria de UV-Vis, que permitirá uma análise quantitativa rápida, de baixo custo, com qualidade e segurança estatística desejáveis, sendo uma alternativa vantajosa sobre os outros métodos existentes.

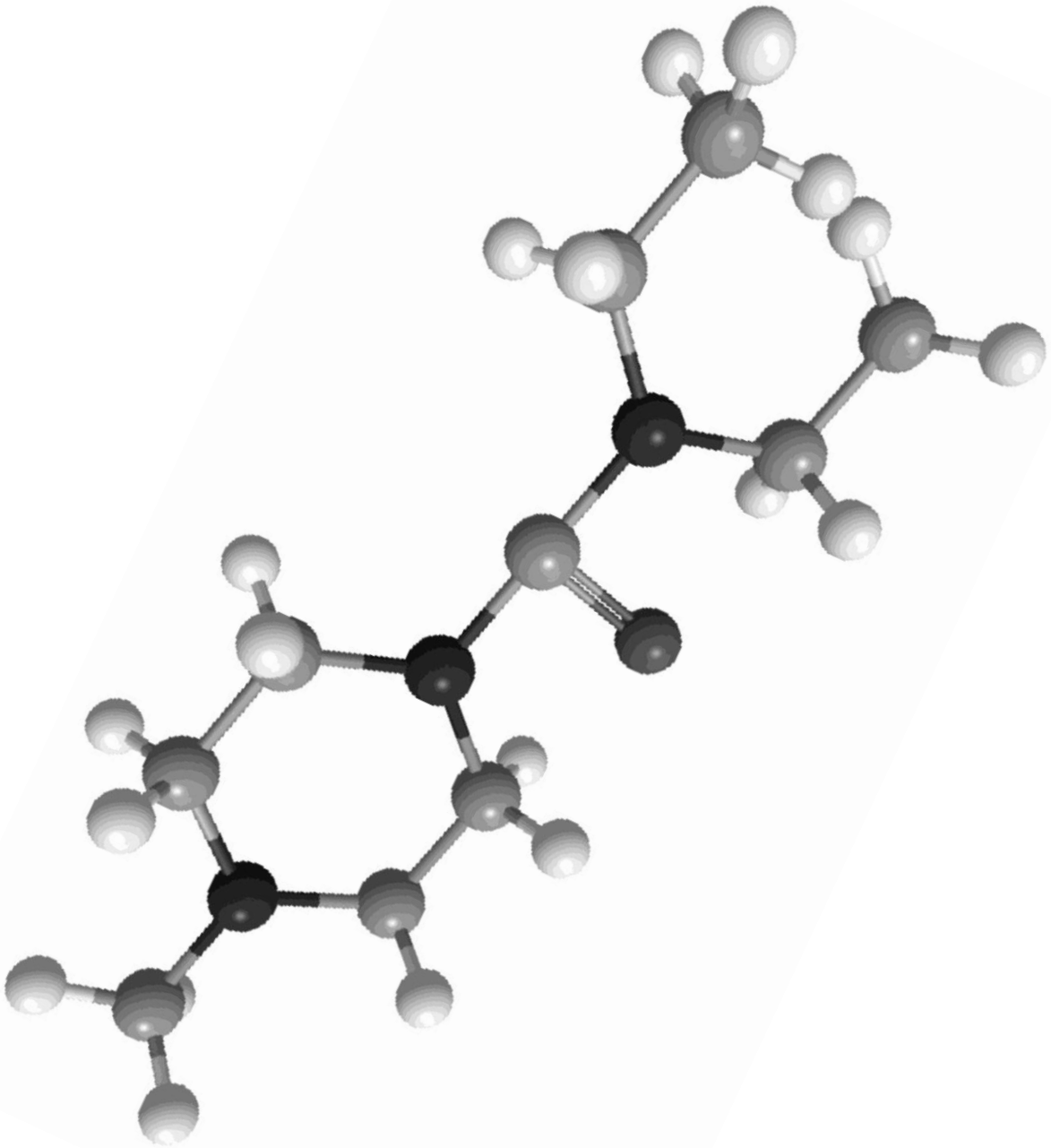
Por fim, o desenvolvimento do comprimido contendo os fármacos associados em dose fixa, citrato de Dietilcarbamazina (DEC, 50 mg) e Ivermectina (IVC, 6 mg), superou todos os desafios tecnológicos expostos. Porém, a avaliação da estabilidade dos lotes obtidos será de extrema importância para seleção da melhor formulação, já que, ambos os fármacos utilizados para o tratamento da filariose linfática apresentam algum tipo de instabilidade.



PERSPECTIVAS

8 PERSPECTIVAS

- ✓ Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação simultânea dos fármacos na forma farmacêutica desenvolvida;
- ✓ Desenvolver método indicativo de estabilidade simultâneo dos fármacos na forma farmacêutica desenvolvida;
- ✓ Realizar o estudo de estabilidade no modelo acelerado, segundo a RE nº 01/2005 (ANVISA) para seleção do acondicionamento primário e definição da composição para a forma farmacêutica proposta;
- ✓ Desenvolver uma formulação de dose única adulto (DEC 420 mg + IVC 28 mg) propondo uma forma farmacêutica diferente, em cápsula gelatinosa dura, devido ao grande aporte de fármacos com características desfavoráveis a compressão;
- ✓ Realizar ensaio pré-clínico para avaliação da forma farmacêutica desenvolvida na erradicação da microfilaremia em animais infectados com a filariose linfática em parceria com o Grupo de Pesquisa em Filarioses: Filariose Linfática - Prof. Dr. Gilberto Fontes.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**.** *RE n.º 01, de 29 de julho de 2005***,** do Guia para realização dos estudos de estabilidade**.** Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008* - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, Brasília, Diário Oficial da União, 15 jul. 2008. Disponível em: http://www.sindusfarma.org.br/informativos/ BBPAF03808.doc.

DREYER, G.; DREYER, P.; NORÕES, J. Recomendações para o tratamento da filariose bancroftiana, na infecção e na doença. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 1, p. 43-50, 2002.

DREYER, G.; MATTOS, D.; FIGUEREDO-SILVA, J.; NORÕES, J. Mudanças de paradigmas na filariose bancroftiana. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 55, p. 355-362, 2009.

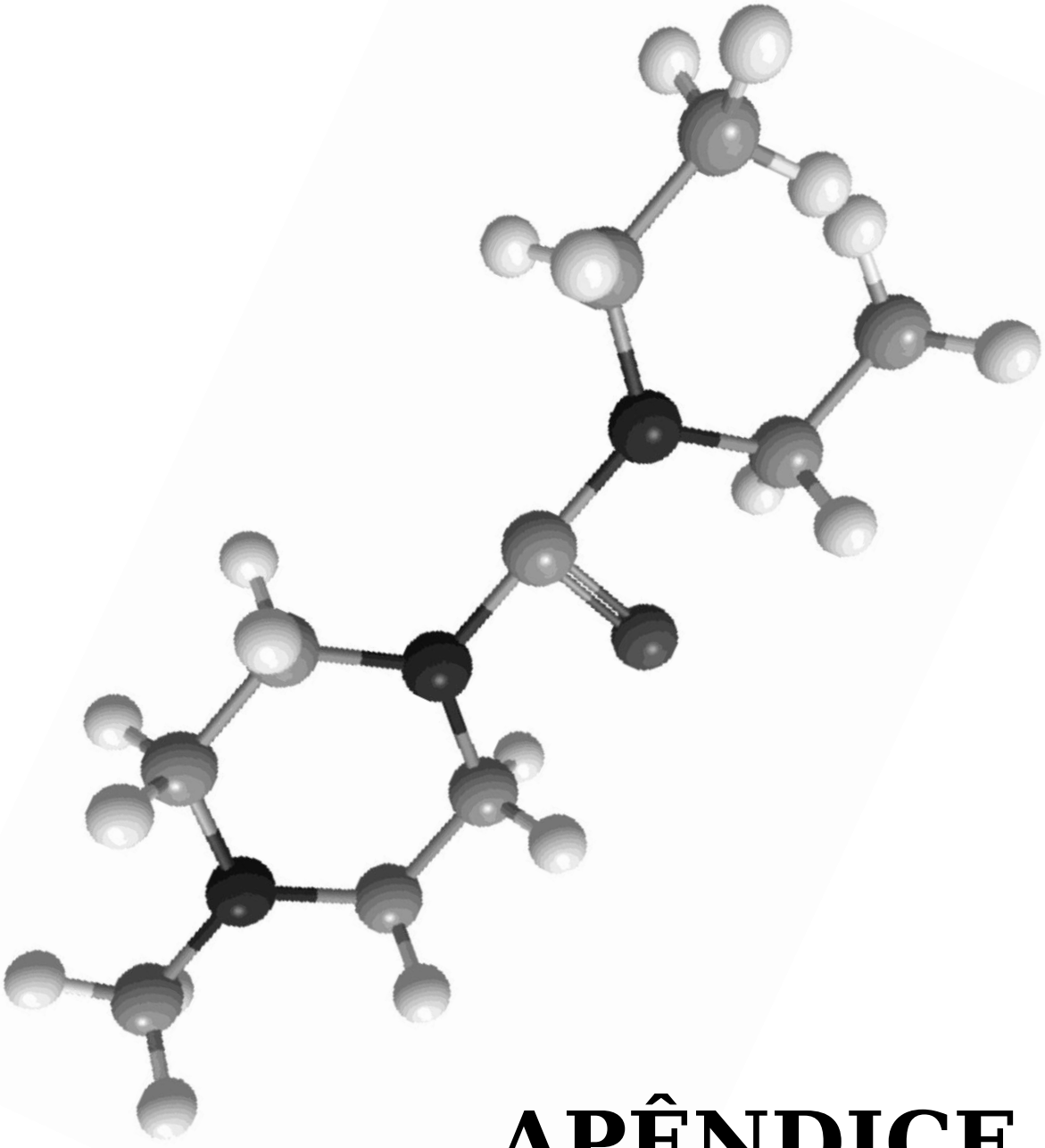
International Conference on Harmonization, "ICH Q3A-(R): Impurities in New Drug Substances," Step 5, 2002.

International Conference on Harmonization, "ICH Q3B-(R): Impurities in New Drug Products," Step 5, 2003.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM-NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, n. 2, p. 1-8, 2009.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharmaceutical Technology*, v. 24, p.1-14, 2000.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V.J. *Stability of Drugs and Dosage Forms* Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2002.



APÊNDICE

Author's personal copy

J Therm Anal Calorim
DOI 10.1007/s10973-012-2775-7

Study of stability and drug-excipient compatibility of diethylcarbamazine citrate

Luíse L. Chaves · Larissa A. Rolim · Maria L. C. M. Gonçalves · Alexandre C. C. Vieira · Lariza D. S. Alves · Monica F. R. Soares · José L. Soares-Sobrinho · Maria C. A. Lima · Pedro J. Rolim-Neto

Received: 19 June 2012 / Accepted: 12 October 2012
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2012

Abstract Diethylcarbamazine citrate (DEC) is the main drug used in the lymphatic filariasis treatment. This study aimed to evaluate drug-excipient compatibility of binary mixtures (BMs) (1:1, w/w), initially by differential scanning calorimetry (DSC), and subsequently, if there were any interaction evidence, by complementary techniques, such as thermogravimetric (TG), non-isothermal kinetics, Fourier transform infrared (FT-IR), and X-ray diffraction (XRD). For the analyses of the BMs by DSC, we selected those with Tabletose®, representing the excipients containing lactose, polivinilpirrolidona (PVP), and magnesium stearate (MgS). The additional analyses by FT-IR and XRD showed no interaction evidence. The TG curves of DEC–Tabletose® showed no signs of interaction, unlike the TG curves of PVP and MgS, confirming the results of non-isothermal kinetics, in which the BMs with PVP and MgS decreased the reaction activation energy. Thus, it was concluded after evaluation that the excipients, especially the PVP and MgS, should be avoided.

Keywords Thermal stability · Drug-excipient compatibility · Thermal analysis · Diethylcarbamazine citrate

L. L. Chaves · L. A. Rolim · M. L. C. M. Gonçalves · A. C. C. Vieira · L. D. S. Alves · M. F. R. Soares · J. L. Soares-Sobrinho (✉) · P. J. Rolim-Neto
Department of Pharmaceutical Sciences, Pernambuco Federal University, Rua Arthur de Sá, s/n, Recife, PE 50740-521, Brazil
e-mail: joselamartine@hotmail.com

M. C. A. Lima
Department of Antibiotics, Pernambuco Federal University, Rua Arthur de Sá, s/n, Recife, PE 50670-910, Brazil

Published online: 08 November 2012

Introduction

Lymphatic filariasis (LF) is one of the major causes of acute and chronic morbidity that affects the population of tropical and subtropical areas of Asia, Africa, Western Pacific, and some regions of America. It is estimated that over 1.2 billion people live in areas at risk of disease and among the 120 million of real cases, 91 % are caused by the worm *Wuchereria bancrofti* [1–3].

The diethylcarbamazine (DEC) is the main drug used in the treatment program against LF. Although the mechanisms of action of the drug are still unknown, some studies suggest that its action may be mediated by platelets, which may induce an inflammatory reaction through the release of histamine [4–6].

The DEC, [*N*,*N*-diethyl-4-methylpiperazine-1-carboxamide], is a piperazine derivate, synthesized as a citrate salt (Fig. 1) because of its increased stability compared with the free base. It appears as a white powder soluble in water with a molecular weight of 391.42 g mol^{-1} [3, 7, 8].

The study of drug-excipient compatibility is an important stage in the preformulation studies during the development of pharmaceutical forms. Indeed, potential physical and chemical interactions between drug and excipients can affect the chemical nature, stability, and bioavailability of drugs and, consequently, its effectiveness [9–14].

Different methods are reported in the studies of drug-excipient compatibility and stability. However, the differential scanning calorimetry (DSC) has proven to be an important tool at the forefront of any solid dosage form preformulation study to quickly obtain information about possible interactions among the formulation components—according to appearance, shift, or disappearance of the endothermic or exothermic peaks, and/or variations in the enthalpy values in thermal curves of drug–excipient mixture [9, 12, 13, 15, 16].

ROLIM, L.A. OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE FORMA FARMACÊUTICA ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA PARA O TRATAMENTO DA FILARIOSE LINFÁTICA E ESTUDO DE ESTABILIDADE FORÇADA DOS FÁRMACOS, **2012.**