



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

POTENCIAIS FORMULAÇÕES COM O BENZNIDAZOL PARA TRATAMENTO DE CRIANÇAS COM A DOENÇA DE CHAGAS

Flávia Patrícia Morais de Medeiros

Doutoranda

Prof. Dr. Pedro J. Rolim Neto

Orientador

AGOSTO, 2010



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

POTENCIAIS FORMULAÇÕES COM O BENZNIDAZOL PARA TRATAMENTO DE CRIANÇAS COM A DOENÇA DE CHAGAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas – Área de Concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos

Flávia Patrícia Moraes de Medeiros - Doutoranda

Prof. Dr. Pedro J. Rolim Neto - Orientador

AGOSTO, 2010.

Medeiros, Flávia Patrícia Moraes de
Potenciais formulações com o benznidazol para
tratamento de crianças com doença de Chagas / Flávia
Patrícia Moraes de Medeiros. – Recife : O Autor, 2010.
XVI, 173 folhas; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2010.

Inclui bibliografia e apêndices.

1. Benznidazol. 2. Doença de Chagas. 3.
Formulações - Crianças e lactentes. I. Título.

615.012
615.4

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2010-166



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

Reitor

Prof Amaro Henrique Pessoa Lins

Vice-reitor

Prof Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Pró-reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-graduação

Prof Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof José Thadeu Pinheiro

Vice-diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Prof Dalci José Brondani

Vice-chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Prof Antônio Rodolfo de Faria

**Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas**

Prof Pedro José Rolim Neto

**Vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas**

Profa Beate Saegesser Santos



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

Recife, 20 de agosto de 2010.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 20 de agosto de 2010 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Maria Nelly Caetano Pisciotano
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: _____

TERCEIRO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Ana Cristina Lima Leite
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Isabela de Alencar Araripe
Quilelli Correa
(DNDi América Latina / OMS)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba - UFPB)

Assinatura: _____

TERCEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Evani de Lemos Araújo
(Escola Pernambucana de Saúde FBV) – IMIP

Assinatura: _____

Dedico esta pesquisa:

aos meus pais, Gilberto e Fátima, que me ensinaram que estudar é sempre o melhor caminho;

ao meu irmão André que dividiu comigo a ausência dos pais durante a universidade;

ao meu marido Paulo que está comigo em todos os momentos, na saúde e na doença, na alegria e na tristeza e porque não nesta maravilhosa conquista;

a minha princesa Helena, bênção das nossas vidas, que não compreende ainda a ausência, mas me fortalece a cada sorriso;

por fim, a todas as crianças que poderão receber um tratamento com mais segurança e eficácia e que não me deixaram desanimar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver e diariamente ser instrumento dos seus ensinamentos;

Ao Prof Dr Pedro Rolim, pelas orientações, pelo respeito, por me encaminhar profissionalmente e a mim, confiar desafios acadêmicos, por acreditar que sempre conseguiria;

Ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco “Governador Miguel Arraes - LAFEPE” que autorizou esta pesquisa e que disponibilizou recursos técnicos, financeiros e infra-estrutura, a todos os colegas farmacêuticos (Selma, Jovita, Júnior, Marcos André, Ana, Marco, Roseane, Sílvia, Raquel, Deborah, Márcia, Josimar, Diógenes, Elcy, Ângela, Amanda), aos que não estão mais conosco, aos diretores técnicos (Leduar Guedes e Davi Santana), a todos os colaboradores que de forma direta ou indiretamente figuram nesta realização;

A iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi, sigla em inglês), em especial a Dra. Isabela Ribeiro, coordenadora de projetos, e, as consultoras Luciana Gonçalves, Karin Bruening e Eloan Pinheiro pelas discussões técnicas durante os desafios, pela presença constante, pelo apoio, por fim, por estar neste projeto.

A Suênia e a Magda (pesquisadoras da DNDi) pelo apoio analítico, pela disponibilidade de repetir exaustivamente sempre que necessário, por ter bom humor, por ser boa companhia, por tudo, muito obrigada.

Ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (UFPE), a todos os seus integrantes, em especial, àqueles que acompanharam o nascimento deste projeto: Rosali e Lamartine, e a você Larissa que também o abraçou, serei sempre grata.

A Profa Beate Saegesser Santos e sua equipe, pelo apoio nos testes preliminares de fotodegradação e, a Profa Fernanda Pimentel, pelos ensinamentos estatísticos e no planejamento fatorial, além da discussão dos resultados.

Aos parceiros do Laboratório de Estudos do Estado Sólido da Plataforma de Métodos Analíticos, Altivo Pitaluga Jr; ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Prof Dr. André Galembeck e ao Instituto de Tecnologia de

Pernambuco, Dr. Osmar Baraúna, que realizaram as análises necessárias a caracterização do ativo.

Aos familiares queridos (tias/tios, primas/primos, sobrinha,) e aos amigos de coração (Janaína, Líbia, Ana Luísa e Elisângela, ...) que sempre torceram e me fortaleceram, a vocês, afirmo que a distância não impede a presença em pensamento, obrigada por tudo.

Por fim, um especialíssimo agradecimento, a “minha equipe técnica” da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento do LAFEPE, Aíla, Aline, Zênia, Thayse, Marcones e Jaffe, e mais recentemente Bruno, que não mediram esforços para a realização desta pesquisa, que também estiveram comigo na saúde e na doença, na alegria e na tristeza, mas sempre rindo à toa, até das dificuldades, não conseguiria jamais sozinha, só com vocês, muitíssimo obrigada, consegui, na realidade conseguimos. Acredito que este projeto é o retrato de uma realização em equipe. Estivemos juntos, no lugar certo e na hora certa, com as pessoas certas. NADA É POR ACASO

RESUMO

A tripanossomíase americana é uma zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Há 16 a 18 milhões de pessoas infectadas nas Américas, com mais de 100 milhões expostas ao risco de infecção, sendo considerada endêmica na América Latina. Além da transmissão vetorial, há também a transmissão oral, por transfusão sanguínea e congênita (mãe para filho). Os lactentes e as crianças são tratados a partir de preparações extemporâneas do comprimido de benznidazol 100 mg. O objetivo principal desta pesquisa é o desenvolvimento de uma formulação pediátrica líquida (suspensão) e outra sólida (comprimido) para o tratamento da doença de Chagas em lactentes e crianças. Foi avaliado em laboratório diferentes formas de manipular as preparações extemporâneas a partir do comprimido de 100 mg do benznidazol e implicam em grande variabilidade de dose administrada, sendo a preparação, a partir da pulverização do pó, ajustada por peso, este ressuspenso em água e administrado com seringa dosadora, é a forma com menor variação. Foi realizada a caracterização físico-química e do estado sólido do insumo farmacêutico ativo benznidazol, os cristais apresentaram baixa solubilidade em água, não apresentam polimorfos e é constituído por partículas finas. O estudo de solubilidade realizado para o benznidazol definiu os meios de dissolução em “condição sink”, sendo selecionado o meio composto por suco gástrico + laurilsulfato de sódio 1%. No estudo de degradação forçada, o benznidazol, após 30 dias, apresentou-se degradado na solução de peróxido a 3%. Este também é sensível a luz. Foi desenvolvido e validado o método indicativo para estudo de estabilidade. Foram desenvolvidas as formulações de suspensão de benznidazol a 2% e o comprimido de benznidazol a 12,5 mg, utilizando os estudos de planificação qualitativa e quantitativa de excipientes e acompanhadas através dos parâmetros de controle de qualidade. As formulações estão em estudo de estabilidade acelerado e de longa duração. Os resultados de estabilidade referente a 06 meses, farão estas formulações potenciais opções de tratamento da doença de Chagas em lactentes e crianças com garantia de precisão de dose.

Palavras-chaves: Benznidazol, doença de Chagas, formulações, crianças e lactentes.

ABSTRACT

American *trypanosomiasis* is a zoonosis caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). There are between 16 to 18 million of infected people in the Americas and over 100 millions are under risk of infection, being considered endemic in the Latin America. Besides vector transmission it is still transmitted through blood, oral and congenital transmission (mother to son). Tablets of Benznidazol 100mg have been administered untimely for children and lactating. The aim of this work is develop a suspension as well as tablets to treat children and lactating with Chagas. Different ways of preparation have been evaluated in different labs, from Benznidazol 100mg tablets generating a large variability of prepared dosages, however preparation through powder spraying, adjusted by weight, resuspended in water, and administered by hypodermic syringe showed a lower variation. The physical - chemical characterization was performed as well as solid state study for the benznidazol raw material. The crystals showed a low solubility in water, showed no polymorphes and composed of fine particles. The solubility study performed for the benznidazol have defined the medium of solution under "sink condition" and showed that gastric fluid + sodium laurilsulfate 1% was selected. After 30 days from the forced degradation study for benznidazol, it had degraded into peroxide solution 3%. It showed also to be sensitive to light. A method was developed and validated to be significant for stability study. The developed formulations were benznidazol suspension at 2% and benznidazol in tablets at 12,5 mg obtained from qualitative and quantitative planning of excipients following the quality control parameters. Formulations are still under accelerated stability and long term studies. Stability obtained results after 6 months, will indicate that these formulations can be potential alternatives for treatment of Chagas in children and lactates at guaranteed accuracy dosages.

Key Words: Benznidazol, Chagas disease, formulation, children and lactants.

LISTA DE FIGURAS

ITEM	TÍTULO	PÁGINA
4.	REVISÃO DA LITERATURA	13
01	Mapa de distribuição da doença de Chagas, exclusiva no Hemisfério americano	14
02	Ciclo evolutivo da doença de Chagas	16
03	Sinal de Romaña	18
04	Complicações crônicas da doença de Chagas	20
5.	AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES EXTEMPORÂNEAS DE BENZNIDAZOL USADAS PARA O TRATAMENTO PEDIÁTRICO DA DOENÇA DE CHAGAS	29
01	Mapa da distribuição geográfica da transmissão vetorial do <i>Triatoma infestans</i> na América Latina	30
02	Avaliação de formulações extemporâneas do benznidazol de 100 mg	35
6.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DO ESTADO SÓLIDO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL	39
01	Estrutura química do benznidazol	41
02	Foto ilustrativa das matérias-primas de benznidazol lotes 15772 e 15986	46
03	Resultados da microscopia óptica para o padrão de benznidazol e os dois lotes de matérias-primas 15772 e 15986	46
04	Microscopia Eletrônica de Varredura para as matérias-primas de benznidazol lotes 15772 e 15986	47
05	Curvas de DSC para o benznidazol ($\beta = 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	50
06	Determinação da pureza por DSC para o lote de benznidazol 15772	51
07	Resultados da difração de raios X para diferentes lotes de benznidazol matéria-prima fabricados pela Roche®	52
08	Espectro de FT-IR do padrão de benznidazol 07-1051/000 Roche	53
09	Volume compactado de benznidazol matéria-prima lotes 15772 e 15986	54
10	Granulometria por peneiras do benznidazol matéria-prima	55
11	Representação gráfica da tabela 06	57
12	Representação gráfica da tabela 07	58
7.	DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DA SUSPENSÃO PEDIÁTRICA DO BENZNIDAZOL	70
01	Etapas do processo de desenvolvimento farmacotécnico	78
8.	ESTUDO DE SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO PARA O BENZNIDAZOL, DROGA POUCO SOLÚVEL UTILIZADA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	100
01	Solubilidade do Benznidazol a 0,5 mg/ml	109
02	Solubilidade do Benznidazol a 1,0 mg/mL	109
03	Interpretação geométrica dos efeitos num planejamento 2^3	112
9.	UM MÉTODO SIMPLES PARA DETERMINAÇÃO DO BENZNIDAZOL E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E VALIDAÇÃO	123
01	a) Cinética fotodegradativa do benznidazol (tabela 01) e b) Cinética fotodegradativa do benznidazol (tabela 02)	131
02	Cromatograma do padrão misto de SQR, na concentração de 12 ppm	132
10.	DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO INDUSTRIAL DO COMPRIMIDO PEDIÁTRICO DE BENZNIDAZOL	151
01	Esquema de fabricação de comprimidos por compressão granulação	155
02	Esquema de fabricação de comprimidos por compressão direta	156
03	Aparato para determinação de ângulo de repouso estático e velocidade de escoamento (dimensões do funil – Ø abertura superior: 11,3 cm; Ø abertura inferior: 1,0 cm; distância do funil (saída) ao papel: 20,0 cm)	158
04	Análise da distribuição granulométrica dos granulados dos três lotes industriais de comprimidos de benznidazol 12,5 mg - pediátrico	164
05	Resultados do perfil de dissolução dos três lotes industriais de comprimidos de benznidazol 12,5 mg - pediátrico	166
06	Três diferentes tipos de acondicionamento primário para estudo de estabilidade	167

LISTA DE TABELAS

ITEM	TÍTULO	PÁGINA
6.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DO ESTADO SÓLIDO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL	39
01	Condições experimentais utilizadas nas análises de benznidazol utilizando soluções de surfactantes Triton X100 e Tween 80 e solução saturada do IFA como meio de dispersão	45
02	Resultados da solubilidade do benznidazol segundo a Farmacopéia Brasileira	48
03	Resultados do percentual de umidade nos lotes de benznidazol 15772 e 15986	48
04	Resultados de fusão obtidos visualmente ^a e por DSC ^b para lotes de matérias-primas do benznidazol e padrão	49
05	Tipos de pós especificados segundo critérios da Farmacopéia Britânica	55
06	Lote 15772, surfactante: Tween 3%, 12 µL, massa: 16,6 mg	57
07	Lote 15986, surfactante: Tween 3%, 12 µL, massa: 20,3 mg	58
7.	DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DA SUSPENSÃO PEDIÁTRICA DO BENZNIDAZOL	70
01	Testando o agente suspensor	79
02	Seleção da concentração do agente viscosificante	80
03	Adição dos agentes conservantes	80
04	Adição dos agentes edulcorantes	81
05	Adição dos flavorizantes	82
06	Manipulação do lote piloto I	82
07	Avaliação dos parâmetros de pH e viscosidade do agente suspensor	87
08	Avaliação dos parâmetros de pH e viscosidade do agente viscosificante (glicerina)	88
09	Avaliação dos parâmetros de pH e viscosidade do agente viscosificante (glicerina + propilenoglicol)	90
10	Formulação final	92
11	Resultados da precisão do método	92
12	Resultados da exatidão do método	93
13	Resultados do controle de qualidade da suspensão de benznidazol 2%, do lote piloto II (tempo zero da estabilidade)	93
14	Resultados do controle de qualidade da suspensão de benznidazol 2%, microbiológico, durante período de administração	100
8.	ESTUDO DE SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO PARA O BENZNIDAZOL, DROGA POUCO SOLÚVEL UTILIZADA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	105
01	Condições de estudo para desenvolvimento do método de dissolução do comprimido do benznidazol 100 mg	110
02	Resultados do desenvolvimento do método de dissolução	111
03	Representação do planejamento fatorial 2 ³	112
04	Coeficientes de contraste para um fatorial 2 ³ . A última coluna contém os valores médios dos percentuais dissolvidos para t (60 minutos) de dissolução	113
05	Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2 ³ da tabela 06	115
06	Resultados do perfil da robustez no desenvolvimento do método de dissolução	116
07	Resultados da precisão intermediária realizada por analistas diferentes em diferentes dias	117
08	Resultados da exatidão do método	117
09	Resultados da robustez para variação de fornecedor de etanol PA	118
10	Resultados da robustez para variação do tempo de sonicação (min)	123
9.	UM MÉTODO SIMPLES PARA DETERMINAÇÃO DO BENZNIDAZOL E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E VALIDAÇÃO	130
01	Cinética degradativa do benznidazol quantificado pelo método de gradiente (acetonitrila:água)	130
02	Cinética degradativa do benznidazol quantificado pelo método isocrático tampão fosfato:acetonitrila (80:20), pH 2,7	130
03	Parâmetros cromatográficos do padrão misto das SQR (2-aminoimidazol sulfato,	132

	2-nitroimidazol, benznidazol e N-benzilcloroacetamida), na concentração de 12 ppm	
04	Resultados da fotodegradação em estado sólido do benznidazol	134
05	Resultados da linearidade do método indicativo para estudo de estabilidade do benznidazol	136
06	Resultados da precisão do método	136
07	Resultados da exatidão do método	137
08	Resultados da robustez para variação de temperatura	138
09	Resultados da robustez para variação de fabricante do sal fosfato	138
10	Resultados da robustez para variação de fluxo	139
10.	DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO INDUSTRIAL DO COMPRIMIDO PEDIÁTRICO DE BENZNIDAZOL	151
01	Planificação qualitativa e quantitativa para o processo de granulação úmida para o benznidazol pediátrico	157
02	Propriedades de fluxo dos granulados obtidos destinados a fabricação de comprimidos de benznidazol 12,5 mg - pediátrico	161
03	Análise da distribuição granulométrica dos granulados obtidos destinados a fabricação de comprimidos de benznidazol 12,5 mg - pediátrico	162
04	Resultados do controle de qualidade dos comprimidos de benznidazol 12,5 mg – pediátrico	162
05	Propriedades de fluxo dos granulados dos três lotes industriais de comprimidos de benznidazol 12,5 mg - pediátrico	163
06	Resultados do controle de qualidade dos comprimidos de benznidazol 12,5 mg – pediátrico – lotes industriais	165
07	Resultados da comparação dos perfis dos lotes pediátricos (12,5 mg) e lote adulto (100mg)	166
08	Resultados da comparação dos perfis dos lotes pediátricos (12,5 mg)	167
09	Resultados do estudo de estabilidade acelerado (EA) e longa duração (LD), referente a 03 meses, para o lote 0912LISo64	168

SUMÁRIO

ITEM	TÍTULO	PÁGINA
	RESUMO	VIII
	ABSTRACT	IX
	LISTA DE FIGURAS	X
	LISTA DE TABELAS	XI
1.	INTRODUÇÃO	01
1.1	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	06
2.	JUSTIFICATIVA	08
3.	OBJETIVO	11
3.1	Objetivo geral	12
3.2	Objetivo específico	12
4.	REVISÃO DA LITERATURA	13
4.1	A TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA	14
4.2	AGENTE ETIOLÓGICO/CICLO EVOLUTIVO	15
4.3	QUADRO CLÍNICO	16
4.3.1	Fase aguda	16
4.3.2	Fase indeterminada	18
4.3.3	Fase crônica	18
4.4	TRATAMENTO	20
4.5	PESQUISAS CIENTÍFICAS UTILIZANDO O BENZNIDAZOL EM CRIANÇAS COM CHAGAS	23
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
5.	AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES EXTEMPORÂNEAS DE BENZNIDAZOL USADAS PARA O TRATAMENTO PEIÁTRICO DA DOENÇA DE CHAGAS	29
5.1	INTRODUÇÃO	30
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	33
5.2.1	Material	33
5.2.2	Metodologia analítica	33
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.4	CONCLUSÕES	37
5.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
6.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DO ESTADO SÓLIDO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL	39
6.1	INTRODUÇÃO	40
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	42
6.2.1	Insumo farmacêutico ativo	42
6.2.2	Descrição	42
6.2.3	Solubilidade	42
6.2.4	Perda por dessecação	42
6.2.5	Faixa de fusão	43
6.2.6	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	43
6.2.7	Difração de raios x de pó (DRX)	43
6.2.8	Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourrier (FT-IR)	44
6.2.9	Densidade aparente e compactada	44
6.2.10	Análise de distribuição granulométrica	44
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.3.1	Descrição	46
6.3.2	Solubilidade	48
6.3.3	Perda por dessecação	48
6.3.4	Faixa de fusão	48
6.3.5	Calorimetria exploratória diferencial DSC)	49
6.3.6	Determinação de pureza do benznidazol por DSC	50
6.3.7	Difração de raio X em pó (DRX)	52
6.3.8	Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourrier (FT-IV)	52
6.3.9	Densidade aparente e compactada	53
6.3.10	Análise de distribuição granulométrica	54

6.4	CONCLUSÕES	59
6.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
Apêndice A	Curvas de DSC para o benznidazol ($\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	62
Apêndice B	Curvas de DSC para o benznidazol ($\beta = 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	63
Apêndice C	Determinação da pureza por DSC do benznidazol lote 15986	64
Apêndice D	Determinação da pureza por DSC do benznidazol padrão Roche	65
Apêndice E	Resultado da difração de raios X para o benznidazol lote 15986	66
Apêndice F	Resultado da difração de raios X para o benznidazol lote 15986	67
Apêndice G	Espectro de FT-IR da matéria-prima de benznidazol lote 15772	68
Apêndice H	Espectro de FT-IR da matéria-prima de benznidazol lote 15986	69
7.	DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DA SUSPENSÃO PEDIÁTRICA DO BENZNIDAZOL	70
7.1	INTRODUÇÃO	71
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	77
7.2.1	Insumos farmacêuticos para farmacotécnica	77
7.2.2	Reagentes analíticos	77
7.2.3	Equipamentos e instrumentos da farmacotécnica	77
7.2.4	Equipamentos e instrumentos analíticos	77
7.2.5	Vidrarias/outros	78
7.2.6	Processo de fabricação	78
7.2.7	Planificação de excipientes	79
7.2.7.1	Testando o agente suspensor	79
7.2.7.2	Testando o agente viscosificante	79
7.2.7.3	Escolha dos conservantes	80
7.2.7.4	Avaliação dos edulcorantes	80
7.2.7.5	Teste do flavorizante	81
7.2.7.6	Adição do antiespumante	82
7.2.9	Metodologia analítica co-validada para suspensão pediátrica	83
7.2.9.1	Método para quantificar a suspensão de benznidazol a 2%	83
7.2.9.2	Parâmetros da co-validação	84
7.2.9.2.1	Especificidade	84
7.2.9.2.2	Linearidade	85
7.2.9.2.3	Precisão	85
7.2.9.2.4	Exatidão	85
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
7.3.1	Desenvolvimento farmacotécnico	86
7.3.2	Co-validação do método indicativo para estudo de estabilidade (MIEE)	91
7.3.3	Estudo de estabilidade	92
7.4	CONCLUSÕES	95
7.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
Apêndice A	Cromatograma da suspensão placebo e do padrão de benznidazol	99
8.	ESTUDO DE SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO PARA O BENZNIDAZOL, DROGA POUCO SOLÚVEL UTILIZADA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	100
8.1	INTRODUÇÃO	101
8.2	MATERIAL E MÉTODOS	103
8.2.1	Materiais (reagentes e meios)	103
8.2.2	Equipamentos e Instrumentos	103
8.2.3	Vidrarias/ Outros	103
8.2.4	Estudo de solubilidade em potenciais meios de dissolução em “condição sink”	104
8.2.5	Dissolução	104
8.2.5.1	Desenvolvimento do método de dissolução e validação	104
8.2.5.2	Quantificação do teor dissolvido e validação	105
8.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
8.3.1	Estudo de solubilidade em potenciais meios de dissolução em “condição sink”	107
8.3.2	Dissolução	109
8.3.3	Validação	114
8.3.3.1	Especificidade	114

8.3.3.2	Precisão	114
8.3.3.3	Robustez	114
8.3.3.4	Validação do método para quantificação	115
8.3.3.4.1	Linearidade	115
8.3.3.4.2	Precisão	116
8.3.3.4.3	Exatidão	117
8.3.3.4.4	Robustez	117
8.4	CONCLUSÕES	119
8.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
Apêndice A	Gráfico referente a regressão linear e distribuição dos resíduos	122
9.	UM MÉTODO SIMPLES PARA DETERMINAÇÃO DO BENZNIDAZOL E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E VALIDAÇÃO	123
9.1	INTRODUÇÃO	124
9.2	MATERIAL E MÉTODOS	125
9.2.1	Amostra e substância química de referência	125
9.2.2	Reagentes	125
9.2.3	Equipamentos	125
9.2.4	Vidrarias/Outros	126
9.2.5	Condições cromatográficas do método validado	126
9.2.6	Soluções-estoque dos padrões (SQR)	126
9.2.7	Soluções amostras para validação	126
9.2.8	Estudos de degradação forçada	126
9.2.9	Desenvolvimento do método cromatográfico indicativo para estudo de estabilidade (MIEE)	127
9.2.10	Validação do método cromatográfico indicativo para estudo de estabilidade (MIEE)	128
9.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
9.3.1	Validação do método indicativo para estudo de estabilidade (MIEE)	131
9.3.1.1	Especificidade	132
9.3.1.1.1	Comportamento do benznidazol frente aos estudos de degradação forçada	133
9.3.1.2	Seletividade	135
9.3.1.3	Linearidade	135
9.3.1.4	Precisão	136
9.3.1.5	Exatidão	137
9.3.1.6	Robustez	137
9.4	CONCLUSÕES	140
9.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
Apêndice A	Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise ácida (HCl 0,1M), no tempo zero	142
Apêndice B	Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise ácida (HCl 0,1M), no tempo de 30 dias	143
Apêndice C	Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise ácida (HCl 1,0M), no tempo zero	144
Apêndice D	Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise ácida (HCl 1,0M), no tempo de 30 dias	145
Apêndice E	Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise alcalina (NaOH 0,1M), no tempo zero	146
Apêndice F	Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise alcalina (NaOH 0,1M), no tempo de 30 dias	147
Apêndice G	Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em peróxido a 3%, no tempo zero	148
Apêndice H	Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em peróxido a 3%, no tempo de 30 dias	149
Apêndice I	Gráfico representativo da análise espectral das SQR	150
10.	DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO INDUSTRIAL DO COMPRIMIDO PEDIÁTRICO DE BENZNIDAZOL	151
10.1	INTRODUÇÃO	152
10.2	MATERIAL E MÉTODOS	154

10.2.1	Materiais	154
10.2.2	Reagentes analíticos	154
10.2.3	Equipamentos e Instrumentos farmacotécnica	154
10.2.4	Equipamentos e Instrumentos analíticos	154
10.2.5	Vidrarias/Outros	155
10.2.6	Processo de fabricação	155
10.2.7	Planejamento das formulações	156
10.2.8	Caracterização do fluxo de pós	157
10.2.9	Densidade aparente e compactada	158
10.2.10	Análise de distribuição granulométrica	158
10.2.11	Controle de qualidade	159
10.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	160
10.4	CONCLUSÕES	169
10.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170
Apêndice A	Tabela de resultados do estudo de estabilidade acelerado (EA) e de longa duração (LD), referente a 3 meses para o lote 1001LISo65	172
Apêndice B	Tabela de resultados do estudo de estabilidade acelerado (EA) e de longa duração (LD), referente a 3 meses para o lote 1002LISo66	173

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A revolução da saúde dos últimos 30 anos produziu substanciais ganhos em termos de expectativa de vida e avanços sem precedentes na medicina, mas deixou, de diferentes modos, a maior parte da população mundial à margem do interesse de mercado (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2001).

As populações dos países em desenvolvimento, cerca de 80% da população mundial, respondem por apenas 20% das vendas mundiais de medicamentos. Para essas pessoas, o desequilíbrio entre suas necessidades e a disponibilidade de medicamentos é fatal (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2001).

Quando não há opções de tratamento, ou quando as opções existentes são inadequadas, uma doença pode ser considerada “negligenciada” ou até “extremamente negligenciada” em alguns casos. Alguns exemplos de doenças negligenciadas são a malária, a tuberculose, a tripanossomíase humana africana (doença do sono), a tripanossomíase humana sul-americana (doença de Chagas), a úlcera Buruli, a dengue, a leishmaniose, a lepra, a filaríose linfática e a esquistossomose. Todas, salvo as duas primeiras, podem ser considerados doenças extremamente negligenciadas. A negligência é resultado de falhas do mercado e da política pública. É necessário desenvolver estratégias para tratar especificamente as doenças negligenciadas e extremamente negligenciadas (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2001).

Diversas pesquisas científicas relacionadas à doença de Chagas e à sua quimioterapia têm sido publicadas em periódicos nacionais e internacionais (URBINA, 2001; 2002; URBINA & DOCAMPO, 2003, CASTRO, 2006; GUEDES, 2006). O interesse em realizar tais pesquisas científicas tem crescido significativamente no Brasil e em países vizinhos em razão do grande número de pessoas infectadas, aproximadamente 10 milhões, das quais 90% vivem em países em desenvolvimento (SOARES SOBRINHO, 2007).

Em 1967, foi introduzida na terapêutica uma classe de fármacos mais eficazes para o tratamento da doença de Chagas, os nitrofuranos (BOCK, 1969). Entre estes, o nifurtimox revelou-se o mais efetivo. Em 1972, outro fármaco foi introduzido na terapêutica, este, um derivado 2-nitroimidazólico denominado de benznidazol, apresentou-se ainda mais eficaz para o tratamento proposto (SCHOFIELD, 2006).

Desde a década de 1980, o nifurtimox teve a sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul. Isso se deu em razão da resistência apresentada pelas cepas e, sobretudo, pelo desinteresse do laboratório farmacêutico em continuar a produção de um medicamento não lucrativo (COURA, 2002).

A ação do benznidazol não envolve danos oxidativos. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, portanto pode ser pelo estresse redutivo, envolvendo a modificação covalente das macromoléculas em intermediários nitroreduzidos, ou por outras interações de nitroredução com os componentes do parasito (URBINA, 2003).

O benznidazol apresenta atividade significativa na fase aguda, com curas parasitológicas de até 80% em pacientes tratados, sendo esta cura definida como um resultado negativo para todos os testes parasitológicos e sorológicos. Sua eficácia pode variar de acordo com a área geográfica, provavelmente em consequência das diferenças na susceptibilidade ao fármaco entre diferentes cepas do *T. cruzi* (COURA, 1997). Entretanto, o uso deste fármaco no tratamento da fase crônica é controverso. Os efeitos colaterais indesejáveis são o seu inconveniente principal. No tratamento com benznidazol, as manifestações cutâneas são as mais notórias (hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas, edema generalizado, febre, linfadenopatia, dor articular e muscular) (CASTRO, 2006).

O benznidazol é totalmente absorvido por via digestiva. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 2 a 4 horas, o tempo de meia-vida de eliminação plasmática é de 12 horas e seus metabólitos são eliminados rapidamente pela urina e pelas fezes (LAFEPE, 2006). Sua dose diária é de 5 a 7,5 mg/kg de peso corporal, devendo ser dividida em duas ou três tomadas. O tratamento deve ser mantido por 30 a 60 dias consecutivos, durante a fase aguda, e por 60 dias durante a fase crônica. Crianças com menos de 40 kg podem receber 7,5 mg/kg de peso corporal, durante 60 dias (OPAS, 1999; CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005).

No primeiro semestre de 2001, as 20 empresas farmacêuticas de maior faturamento bruto em todo o mundo foram objeto de uma pesquisa sobre suas atividades recentes de desenvolvimento de medicamentos. Mesmo demonstrando alguma atividade envolvendo doenças negligenciadas, a

pesquisa indicou que o investimento do setor privado neste campo era mínimo. Nos últimos cinco anos, nenhuma das empresas pesquisadas lançou no mercado alguma droga para qualquer das doenças extremamente negligenciadas incluídas no estudo (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2001).

A eliminação da diferença nas taxas de mortalidade provavelmente continuará sendo uma meta difícil de atingir, porque os esforços em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) não visam muitas das doenças transmissíveis que afligem os países em desenvolvimento. Uma análise do desenvolvimento de drogas ao longo dos últimos 25 anos revela que apenas 15 novas drogas foram indicadas para doenças tropicais e tuberculose. Essas doenças afetam primordialmente as populações pobres e respondem por 12% da carga global das doenças. Em comparação, 179 novas drogas foram desenvolvidas para doenças cardiovasculares, que representam 11% da carga total de doenças (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2001).

A dependência pesada de uma indústria multinacional e altamente competitiva de drogas para gerar novos medicamentos deixou o desenvolvimento de drogas que podem salvar vidas ao sabor das forças da economia de mercado. Atualmente, o poder de compra é a principal força na definição das agendas de prioridades de pesquisa, o que significa que as necessidades de saúde das populações pobres não vem sendo atendidas (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2001).

Esta falha não recai exclusivamente sobre os ombros do setor privado. Os governos têm a responsabilidade final de assegurar o atendimento das necessidades básicas de saúde das pessoas. Eles têm a responsabilidade de tomar as ações apropriadas quando as forças de mercado deixam de atender tais necessidades (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2001).

A busca por uma terapia medicamentosa adequada ao tratamento da doença de Chagas continua a ser um desafio para muitos pesquisadores desde a descoberta da moléstia em 1909. Um século se passou, diversas moléculas foram sintetizadas e estudadas. Pesquisas promissoras apontam novas moléculas com atividade terapêutica anti-*Trypanosoma cruzi* e baixos efeitos tóxicos, entretanto ainda há um grande caminho a ser percorrido para que a comunidade científica e as indústrias farmacêuticas tornem disponíveis no mercado consumidor novos medicamentos seguros e eficazes. Cabe ainda

ressaltar a possibilidade de uma melhor vetorização do princípio ativo atualmente utilizado no combate à doença de Chagas, o benznidazol, de modo que sejam oferecidas aos pacientes alternativas mais eficazes, seguras e adequadas ao tratamento da doença.

Assim, o Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM)/UFPE e o Laboratório Farmacêutico de Pernambuco “Governador Miguel Arraes” (LAFEPE) vêm contribuindo para a pesquisa e o desenvolvimento de sistemas de vetorização, como as dispersões sólidas, comprimido de liberação prolongada, além de formas pediátricas do comprimido e da suspensão de benznidazol, com o fim de ampliar as alternativas terapêuticas para o combate à doença de Chagas. Esta pesquisa é um dos passos para disponibilização de um melhor tratamento, também deve ser considerado que as apresentações, são propostas inéditas e garantirão uma maior segurança à terapia já utilizada.

As formulações pediátricas foram parte ativa da participação da DNDi (sigla em inglês, *Drugs for Neglected Diseases Initiative*) neste projeto, com contribuições técnico-científica e financeira.

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOCK, M.; GONERT, R.; HABERKORN, A.. Studies with Bay 2502 on animals. *Bol Chil Parasitol.*, v. 24, p. 13-19, 1969.

CASTRO, J.A.; DE MECCA, M.M.; BARTEL, L.C.. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*, v. 25, p. 471-479, 2006.

COURA, J.R.; ABREU, L.L.; WILLCOX, H.P.F.; PETANA, W.. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 30, p. 139-144, 1997.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L.. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v. 97, p. 3-24, 2002.

CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 38 (supl. III), 30 p., 2005.

GUEDES, P.M.M.; FIETTO, J.L.R.; LANA, M.; BAHIA, M.T.. Advances in Chagas disease chemotherapy. *Anti-Infect Agents Med Chem.*, v. 5, p. 175-186, 2006.

LAFEPE. Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco. Bula do LAFEPE Benznidazol, 2006.

MÉDICOS SEM FRONTEIRAS. Milhões de Pessoas não têm acesso a Medicamentos, Rio de Janeiro, 2001.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE - Organização Mundial de Saúde. Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas. Conclusiones de reunión de especialistas. OPC/HCP/HCT/140/99, Rio de Janeiro, 32 p., 1998. *In: Revista de Patologia Tropical*, v. 28, p. 247-279, 1999.

SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R.. The future of chagas disease control. *Trends Parasitol.*, v. 22, p. 583-588, 2006.

SOARES SOBRINHO, J.L.; MEDEIROS, F.P.M.; LA ROCA, M.F.; SILVA, E.R.; LIMA, L.N.A.; ROLIM NETO, P.J.. Delineamento de alternativas terapêuticas para tratamento da doença de Chagas. *Revista de Patologia Tropical*, v. 36, nº 2, p. 103-118, 2007.

URBINA, J.A.. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin Infect Dis.*, v. 14, p. 733–741, 2001.

URBINA, J.A.. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des.*, v. 8, p. 287–295, 2002.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R.. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.*, v. 19, p. 495-501, 2003.

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As doenças negligenciadas tais como leishmaniose, doença do sono, doença de Chagas e malária têm impacto devastador sobre a humanidade. São doenças tropicais e infecciosas. Contudo, estas doenças têm sido progressivamente marginalizadas nas decisões dos programas de pesquisa entre o público e o privado, essencialmente porque as populações são pobres e não oferecem retorno lucrativo as indústrias farmacêuticas para investir em pesquisa e desenvolvimento.

Na doença de Chagas merecem importância sanitária as vias de transmissão vetorial, transfusional e transplacentária e por transplante de órgãos. Por quaisquer das vias que se tenha adquirido a infecção, a mesma apresenta sucessivamente, em geral, uma fase aguda (aparente ou inaparente) e uma fase crônica (indeterminada assintomática, ou sintomática tardia cardíaca e/ou digestiva). É importante o seguimento clínico dos infectados, por longo período, para conhecer a história natural desta enfermidade, também é importante o seguimento prolongado em pacientes que tenham recebido quimioterapia tripanocida.

Nos anos 1982 e 1983 não existiam recomendações sobre o tratamento em chagásicos crônicos e a experiência em adultos mostrava que estes, pós-tratamento, continuavam sorologicamente positivos. Em 1983, as Normas em Argentina indicavam que a infecção chagásica só tinha possibilidade de cura quando se fazia o tratamento antiparasitário específico no início da mesma (fase aguda). Porém, nos recém-nascidos (RN) com infecção transplacentária tem-se observado que o tratamento produz negatificação sorológica e parasitológica, ainda nos tratamentos iniciados após os dois anos de ter sido diagnosticada a infecção, já superada a fase aguda.

Publicações científicas citam ainda que crianças infectadas negativaram sua sorologia após tratamento antiparasitário específico, e confirmam que a probabilidade de *cura* é maior quanto menor é a idade do paciente tratado. Não há formulação pediátrica para realização destes tratamentos, estes são realizados a partir do comprimido de benznidazol 100 mg.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 16 a 18 milhões de pessoas são portadoras da doença de Chagas. Estima-se, atualmente, que 5%

da população, no Brasil, constituem-se de doentes, representando um número aproximado de 8 milhões de chagásicos. Segundo o Ministério da Saúde o número de internações pela doença de Chagas vem decrescendo devido à melhoria nas condições habitacionais.

No entanto, apesar deste contexto encontrado no Brasil, outros países da América Latina, como Bolívia, Argentina, Venezuela apresentam números ainda em crescimento, principalmente pela transmissão congênita e através da transfusão sanguínea. Além disso, com as emigrações para os Estados Unidos e Europa já se identifica a doença de Chagas nestes outros continentes.

Neste cenário social e político o LAFEPE juntamente com o LTM/UFPE propõe o desenvolvimento de formas farmacêuticas à base de benznidazol para tratamento da doença de Chagas infantil.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de formas farmacêuticas pediátricas (suspensão e comprimido) à base de benznidazol para tratamento da doença de Chagas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a variabilidade das preparações extemporâneas a partir do comprimido de benznidazol 100 mg administrados em crianças;
- Estudar a caracterização físico-química e o estado sólido do benznidazol (insumo farmacêutico ativo – IFA) para proposta de desenvolvimento de outras formas farmacêuticas (comprimido e suspensão pediátrica), proporcionando a transferência de tecnologia do farmoquímico com qualidade e segurança;
- Desenvolver a forma farmacêutica líquida, suspensão de benznidazol a 2%;
- Desenvolver a forma farmacêutica sólida, comprimido de benznidazol 12,5 mg;
- Desenvolver e validar método espectrofotométrico para dissolução da forma farmacêutica sólida;
- Definir um estudo comparativo de perfil de dissolução frente ao medicamento desenvolvido;
- Definir e otimizar o processo de fabricação dos produtos desenvolvidos em escala industrial (transposição: bancada – piloto – industrial);
- Desenvolver e validar método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para estudo de estabilidade, realização ensaios de degradação forçada do ativo, suspensão e comprimido;
- Realizar o estudo de estabilidade nos modelos acelerado e longa duração, segundo a RE nº 1/2005 (ANVISA) para seleção do acondicionamento primário e definição da composição para as diferentes formas farmacêuticas propostas.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 A TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA

A tripanossomíase americana é uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Segundo a Organização Mundial de Saúde existem 16 a 18 milhões de pessoas infectadas nas Américas (WHO, 1991), com mais de 100 milhões expostas ao risco de infecção (WHO, 1997), desde o México, ao norte, até a Argentina e Chile, ao sul (SOSA ESTANI, 1998). Na Argentina, há aproximadamente 2,3 milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi*. Todavia, como a enfermidade enzoótica, a tripanossomíase americana tem uma difusão mais ampla que a infecção humana. É endêmica na América Latina (COURA, 2002).



Figura 01: Mapa de distribuição da doença de Chagas, exclusiva no Hemisfério americano

Fonte: <http://www.ipec.fiocruz.br/pepes/dc/dc.html>

A maior parte dos casos de infecções dos seres humanos, ou de outros vertebrados, é produzida pelo contato da pele ou de mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos contaminados por *T. cruzi*: os triatomas. Apesar de haver mais de 100 espécies de triatomas, somente uma dezena de espécies tem importância epidemiológica como origem regular de infecção humana (SCHOFIEL, 1987; WHO, 1991).

A doença é transmitida pelo vetor triatomíneo, via transfusão e via transplacentária. O curso da infecção inclui a fase aguda (que compreende até seis meses após a infecção), a fase indeterminada (sem sintomas) e a fase

crônica, na qual 30% dos pacientes apresentam evidências clínicas de doenças do coração ou megavísceras (SOSA ESTANI, 1998).

4.2 AGENTE ETIOLÓGICO/CICLO EVOLUTIVO

É provável que, em diferentes tempos e por diferentes ramos, entre os insetos hemípteros da família *Reduviidae*, os hematófagos tenham evoluído dos predadores. Esses hematófagos, com a probóscida especializada para a sucção sanguínea, foram agrupados na subfamília *Triatominae*, onde estão os vetores do *T. cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (BRENER, 2000).

Os elementos vetores, isto é, que fazem o elo entre o reservatório ou mesmo um animal suscetível e o novo hospedeiro, são artrópodes alados, hematófagos (MALTA, 1996).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando formas tripomastigotas e epimastigotas eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor, são inoculadas na pele ou mucosas do vertebrado. A forma tripomastigota pode potencialmente penetrar em qualquer tipo celular encontrado no local e aí se desenvolver, exceto em neutrófilos e eosinófilos. Por sua vez, as formas epimastigotas são fagocitadas no local e rapidamente digeridas (BRENER, 2000).

Logo após a penetração na célula, a forma tripomastigota pode ser encontrada no interior de um vacúolo, chamado de vacúolo parasitóforo. Imediatamente, inicia-se um processo de transformação para a forma amastigota e, parece que, simultaneamente, a destruição da membrana do vacúolo. Após algum tempo, a forma amastigota encontra-se livre, em contato direto com as estruturas citoplasmáticas da célula do hospedeiro. Cerca de 35 horas, inicia-se um processo de divisão celular binária, que prossegue por vários dias. O tempo de geração é de aproximadamente 14 dias. Após cerca de 5 dias, inicia-se um processo sincrônico de transformação das formas amastigotas em tripomastigotas, passando por um estágio intermediário. Logo adquirem um flagelo, e com movimento intenso promovem a ruptura da célula. Assim, podem infectar outras células, atingirem a corrente circulatória e distribuir-se por todo o organismo (BRENER, 2000).

O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado tem início quando o sangue de animais infectados é ingerido durante o repasto

sanguíneo. Ao chegar ao estômago, a forma tripomastigota se transforma gradualmente em formas arredondadas, algumas com um longo flagelo colado ao corpo e outras com um curto flagelo, chamadas de esferomastigotas. Em seguida, os parasitos migram para o intestino, onde se multiplicam como formas epimastigotas, o que pode ser observado cerca de 25 horas após repasto sanguíneo. Posteriormente, migram para a parte mais posterior do intestino, atingindo o reto, e transformam-se em tripomastigotas, que são eliminados junto com as fezes e urina do triatomíneo (BRENER, 2000). Concluindo-se o ciclo.

A reação inflamatória gerada pela presença do parasita, desencadeia um processo de tentativa de regeneração – fibrose, mais freqüentes no miocárdio e no sistema nervoso. Desenvolve-se a resposta imune do hospedeiro. Os pacientes que sobrevivem à fase aguda da doença (90% dos casos) têm seus sintomas atenuados e entram em um período de latência após um tempo médio de 2 a 4 meses. A transmissão da doença ocorre principalmente pelo vetor (80 a 90%), transfusão sanguínea (5 a 20%) e congênita (0,5 a 8%) (COURA, 2002).

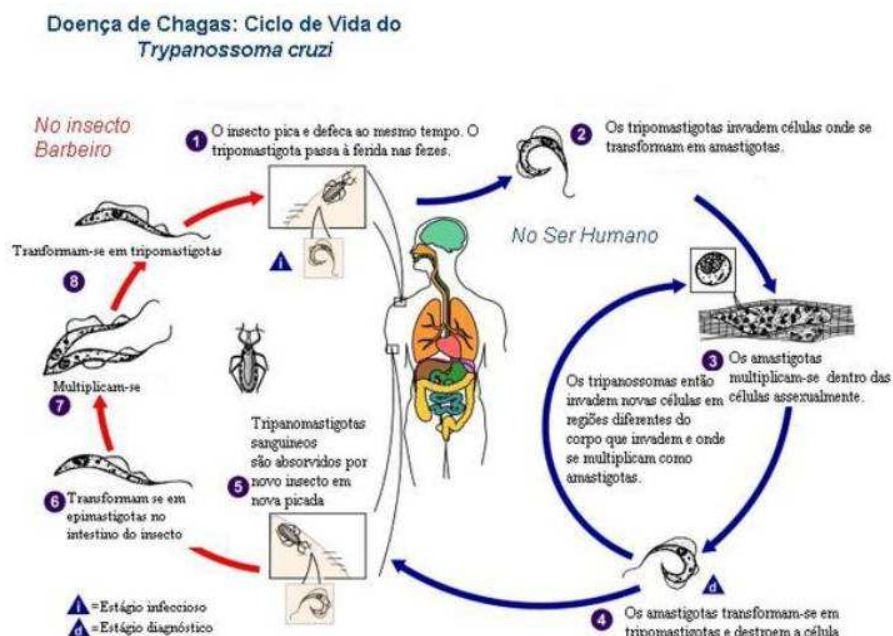


Figura 02: Ciclo evolutivo da doença de Chagas

Fonte: <http://www.arikah.net>

4.3 QUADRO CLÍNICO

4.3.1 Fase aguda

A fase aguda da doença de Chagas compreende os fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros meses de infecção (dois a quatro) e, do ponto de vista laboratorial, delimita-se, imprecisamente, pela demonstração do parasito no sangue por meio de exame indireto (LARANJA, 1953).

O período de incubação, de acordo com as observações feitas no homem e em animais de laboratório, varia entre 4 e 10 dias, tempo necessário para o desenvolvimento de uma ou duas gerações de parasitos, respectivamente (BRENER, 2000).

Na maioria das vezes, o período inicial da infecção não é identificado, uma vez que existe um flagrante contraste entre a elevada prevalência de casos crônicos e a pequena incidência de casos agudos. Ocorre que, com frequência, o quadro clínico é oligossomático, principalmente em adultos, não sendo valorizado pelo paciente, que deixa de procurar recursos médicos e, se os procura, a hipótese diagnóstica não é lembrada (BRENER, 2000).

As maiores casuísticas sobre a fase aguda mostram predomínio absoluto dos casos na primeira década de vida, especialmente do primeiro ao quinto ano (BRENER, 2000).

Clinicamente, a infecção chagásica se inicia com um conjunto de manifestações, variáveis em frequência e intensidade, formadas pelo sinal de porta de entrada da infecção, sintomas gerais e alterações sistêmicas. A porta de entrada da infecção pode ser aparente ou inaparente. Quando aparente, pode ser ocular (sinal de Romana) na figura 03 ou cutânea (chagoma de inoculação). Como sintoma geral e de aparecimento precoce destaca-se a febre, geralmente pouco elevada, acompanhada de mal-estar geral, cefaléia, astenia e hiporexia. As manifestações de comprometimento cardíaco são as de uma miocardite difusa, de intensidade não encontrada em nenhuma outra doença humana, geralmente acompanhada de pericardite serosa e, às vezes, de certo grau de endocardite (BRENER, 2000).



Figura 03: Sinal de Romaña
Fonte: <http://www.ipec.fiocruz.br/pepes/>

4.3.2 Fase indeterminada

O portador da forma indeterminada da doença de Chagas caracteriza-se classicamente por apresentar sorologia e/ou xenodiagnóstico positivo para a doença, na ausência de manifestações clínicas, quer sejam cardíacas, digestivas ou nervosas, assim como pela ausência de alterações eletrocardiográficas e radiológicas do coração e do tubo digestivo (MALTA, 1996).

Nesta fase da doença, encontram-se àqueles que tiveram a fase aguda caracterizada clínica e laboratorialmente e nos quais as manifestações desapareceram. Naqueles com forma inaparente, admite-se que a forma indeterminada corresponderia ao período que medeia entre a primeira infecção e o aparecimento das manifestações na fase crônica (MALTA, 1996).

Sendo assim, a importância da forma indeterminada da doença de Chagas é primordialmente epidemiológica: estima-se que cerca de 50% dos infectados chagásicos apresentem essa forma de doença. Embora reconhecendo que o prognóstico destes pacientes seja favorável, sabe-se que 2 a 5% desses indivíduos podem evoluir, a cada ano, para formas determinadas da doença (MALTA, 1996).

4.3.3 Fase crônica

A fase digestiva da doença de Chagas tem como base fisiopatológica as alterações da motilidade do tubo digestivo, do esôfago ao cólon, decorrentes da destruição das células nervosas dos plexos intramurais, que ocorre principalmente no período inicial da infecção chagásica. Inclui também o

comprometimento da vesícula biliar, do hepatocolédoco e das glândulas salivares (MALTA, 1996).

Na Argentina e no Chile, esta forma digestiva é mais comum que a cardíaca, sendo infrequente nos países situados acima da linha equatorial. O Brasil é o país com maior prevalência de megaesôfago chagásico, em particular na região central em áreas dos estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo. No Nordeste, é em Pernambuco que se observa a maior frequência de megaesôfago e megacólon (MALTA, 1996).

A forma nervosa da doença de Chagas foi pouco evidenciada por estudiosos. A agressão ao sistema nervoso central ou periférico poderá ocorrer tanto na fase aguda como na crônica da doença. A fase aguda é caracterizada por um estado infeccioso onde a febre está presente, estando também registrada a presença de convulsões, tendo um quadro geral de meningoencefalite. São processos inflamatórios multifocais, ao nível do sistema nervoso central, constituídos por conglomerados de formas amastigotas do *T.cruzi* (MALTA, 1996).

A forma nervosa crônica da doença de Chagas, negada por vários pesquisadores e considerada impossível de diagnóstico por outros, vem, nos últimos anos, evidenciando-se como uma entidade nosológica bem definida, possível de ser diagnosticada e avaliada (MALTA, 1996).

Assim, Collares-Moreira (1925) apresentou o estudo de 10 casos humanos da forma nervosa crônica da doença, tecendo numerosos comentários relativos às alterações da motricidade, da coordenação, do psiquismo e de manifestações de natureza convulsiva (MALTA, 1996).

Romaña (1947) descreveu os quadros clínicos de três pacientes chagásicos crônicos, oligofrênicos, com paresias espásticas semelhantes na sua opinião, às descrições clássicas de Carlos Chagas. Mello e Mello estudaram um caso de hemiplegia espástica infantil, em paciente comprovadamente chagásica.

A cardiopatia chagásica crônica constitui forma clínica tardia da infecção pelo *T. cruzi* resultando de dano no miocárdio progressivo conseqüente à incessante miocardite fibrosante. Em torno de 30% dos indivíduos soropositivos desenvolvem alguma forma de expressão de doença crônica cardíaca, e em

cerca de 30% desses, as manifestações clínicas serão significativas, associando-se à morbidade e mortalidade (BRENER, 2000).



Figura 04: Complicações crônicas da doença de Chagas

Fonte: <http://www.ipec.fiocruz.br/pepes/dc/dc.html>

4.4 TRATAMENTO

Os primeiros compostos experimentalmente testados para o tratamento da doença de Chagas, logo após sua descoberta por Carlos Chagas em 1909, foram fucsina, cloreto de mercúrio e o tartarato de potássio antimonial empregados experimentalmente por Mayer e Rocha Lima (1912, 1914) e todos, sem resultados efetivos. Até a publicação do “Manual de Doenças Tropicais e Infecciosas” de Carlos Chagas e Evandro Chagas (1935) “não havia tratamento específico para a tripanosomíase americana. Drogas com atividade tripanomicida tinham sido testadas por grande número de pesquisadores, mas sem sucesso”, afirmavam os autores (COURA, 2000).

O tratamento etiológico da doença de Chagas foi iniciado em 1930 por Salvador Mazza, que usava um derivado de quinolina (Bayer 7602 – Cruzon – UK) (SOSA ESTANI, 1998). Foi considerado por Brener (1968), que os compostos testados entre 1912 e 1962, tinham um efeito supressivo da parasitemia, mas não curava. O benznidazol é indicado na fase aguda de infecções do *T. cruzi* recente, em crianças menores que três anos (COURA, 2000).

Segundo os requerimentos da Organização Mundial de Saúde (OMS) a droga ideal para o tratamento da doença de Chagas deve contemplar o seguinte: i) cura parasitológica da fase aguda e crônica; ii) efeito em dose única ou poucas doses; iii) acessível ao paciente, em outras palavras, com baixo

custo; iv) sem efeitos colaterais ou teratogênicos; v) sem necessidade de hospitalização para tratamento; vi) não induzir a resistência (COURA, 2000).

Desde o fim da década de 1960 e começo dos anos 70, duas drogas foram usadas para o tratamento da doença de Chagas: nifurtimox e benznidazol (COURA, 2000).

O benznidazol é um 2-nitroimidazol [N-benzil-2-nitroimidazol acetamida, atualmente é registrado e também comercializado na forma de comprimido de 100 mg pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco “Governador Miguel Arraes” (LAFEPE). Este foi desenvolvido pela Roche®.

Seu mecanismo de ação envolve ligação covalente ou outras interações de intermediários de nitroredução com os componentes do parasito, ou ligações do DNA, lipídeos e proteínas (COURA, 2000).

A farmacocinética de dose única, realizada em 06 voluntários sadios, após administração de 01 comprimido de benznidazol de 100 mg, resultou em uma rápida absorção, com níveis de picos plasmáticos de 2,2 a 2,8 µg/mL após 3-4 horas. Foi verificado pequena variação interindividual e a forma da curva indicou que a cinética tem um modelo de um único compartimento. O tempo de meia-vida de eliminação médio foi de 12 horas. A biodisponibilidade relativa comparando a administração oral e a administração de uma solução de benznidazol foi em média de 91,7% (RAAFLAUB, 1979).

A toxicidade do benznidazol é referenciada baseando-se na incidência de reações adversas durante o período de tratamento. Pontes (2010) publicou que dos 32 pacientes em tratamento com o benznidazol, apenas quatro (12,5%) não apresentaram reações adversas, contra 28 (87,5%) que apresentaram algum tipo de reação adversa em algum momento do tratamento, 25% tiveram o tratamento suspenso e 75% dos pacientes finalizaram o tratamento. Foram identificados, 20 tipos diferentes de reações adversas. Os sintomas relatados com maior frequência pelos pacientes foram pruridos em (50%), parestesia (43,8%), astenia (37,5%), *rash* cutânea (31,3%) e descamação da pele (25%). O sistema dermatológico foi o mais afetado correspondendo a 35% dos sintomas, seguido pelo sistema nervoso central e periférico com 22% dos relatos de sintomas.

Os resultados obtidos do tratamento com o benznidazol varia de acordo com a fase da doença de Chagas, o período de tratamento e a dose, a idade e

a origem geográfica dos pacientes. Bons resultados têm sido obtidos na fase aguda, em infecções crônicas recentes (em crianças abaixo de 12 anos), infecções congênitas e em acidentes laboratoriais. Para o tratamento da fase aguda e casos congênitos é recomendado de 5 a 7,5 mg/Kg/dia de benznidazol durante 30 a 60 dias (OPAS/OMS, 1999). Para infecções crônicas recentes (crianças abaixo de 12 anos) ou indivíduos infectados nos últimos 10 anos, o tratamento deve ser feito com 5 mg/Kg/dia de benznidazol durante 30 a 60 dias. No caso de infecção acidental, o tratamento deve ser iniciado imediatamente e finalizado somente após 10 a 15 dias consecutivos. Em casos de infecção crônica sem manifestação clínica ou com manifestações cardíacas ou digestivas brandas, o tratamento deve durar 60 a 90 dias, de acordo com a tolerância à droga, com o objetivo de prevenir ou reduzir a evolução da doença de Chagas para formas mais severas, um fato que não é definitivamente comprovado (COURA, 2000).

Nos anos 1982 e 1983 não existiam recomendações sobre o tratamento em chagásicos crônicos e a experiência em adultos mostrava que estes, pós-tratamento, continuavam sorologicamente positivo. Em 1983, as Normas na Argentina indicavam que a infecção chagásica só tinha possibilidade de cura quando se fazia o tratamento antiparasitário específico no início da fase aguda. Porém, nos recém-nascidos (RN) com infecção transplacentária tem-se notado que o tratamento produz negatificação sorológica e parasitológica, mesmo nos tratamentos iniciados após dois anos de ter sido diagnosticada a infecção, já superada a fase aguda (STREIGER, 2004).

Entre as décadas de 1970 e 1980, na Argentina, começaram os estudos epidemiológicos transversais e longitudinais sobre a infecção chagásica em amostragem em adultos (setores laborais, grávidas) e de crianças (ao ingressar na escola, recém-nascidos de mãe chagásica e filhos – não recém-nascidos - de mãe infectada). Num grupo de crianças se fez tratamento antiparasitário específico. Em 1993, apresentaram-se os primeiros resultados à quimioterapia específica em crianças com infecção chagásica que não estavam no período agudo. Estes, mostraram que 63% das crianças infectadas negativaram sua sorologia três anos e meio após ter finalizado o tratamento específico, administrado entre 30 e 60 dias, e que quanto menor era a idade da criança, mais cedo se obtinham esses resultados (STREIGER, 2004).

Foi a partir deste trabalho, que outros estudos em crianças foram realizados com publicações e resultados similares. Isto levou a fazer modificações nas normas de atenção ao infectado chagásico na Argentina e por consenso de especialistas sobre as doses recomendadas dos fármacos no Brasil (ARGENTINA, 1993; ARGENTINA, 1998; AMARO NETO, 1999; SOSA ESTANI, 1999; WHO, 2002).

4.3 PESQUISAS CIENTÍFICAS UTILIZANDO O BENZNIDAZOL EM CRIANÇAS CHAGÁSICAS

Sosa Estani (1998) publicou um estudo, o qual avaliava a eficácia e tolerância do tratamento específico em crianças na fase indeterminada da infecção por *Trypanosoma cruzi*.

- As crianças foram tratadas com benznidazol na dose de 5 mg/Kg/dia durante 60 dias e acompanhadas durante 48 meses. As crianças tratadas mostraram uma diminuição significativa no anticorpos contra o *T. cruzi*. Após 04 anos de acompanhamento, 62% das crianças tratadas foram soro-negativas para o *T. cruzi*. O xenodiagnóstico após 48 meses de acompanhamento foi positivo para 4,7% das crianças tratadas pelo benznidazol. Estes resultados mostraram a tolerância e eficácia do benznidazol contra *T. cruzi* em crianças soropositivas com idade entre 6 e 12 anos.

Altchech (2003) apresentou em um trabalho científico, resultados valiosos demonstrando que 97% dos recém-nascidos são curados, quando tratados nos primeiros meses de vida. Neste estudo, relataram que vários trabalhos citam que 2-7% dos recém-nascidos de mães infectadas adquirem o parasito na gravidez.

- Todos os pacientes completaram o tratamento com o benznidazol (5-8 mg/Kg diariamente), em duas a três doses diárias durante 60 dias. Estes tiveram sua sorologia negativa em diferentes períodos após o tratamento. O critério para identificar a negatificação pós-tratamento, diz que o indivíduo tratado não deve possuir parasitos, nem restos de antígenos que estimulem o sistema imune. O momento desta negatificação está relacionado com o tempo de evolução da infecção

prévia ao tratamento. Os recém-nascidos em fase aguda (vetorial ou transplacentária) negativam a sorologia entre 2 e 12 meses pós-tratamento.

- O artigo também cita que a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere o tratamento a todos os indivíduos com enfermidade de Chagas, independente do estado da infecção.

Marques (2003) realizou um estudo conduzido em Santa Maria – RS durante o período de 1997 a 2000, para determinar a eficácia e a segurança do benznidazol no tratamento de 48 crianças (com idade média de 10,2 anos) com doença de Chagas indeterminada.

- Todos os pacientes foram tratados com benznidazol (5-10 mg/Kg diariamente) e acompanhados por 24 meses. Durante o acompanhamento, os efeitos tóxicos foram analisados através de exames hematológicos, exames das funções hepática e renal e avaliação clínica. Após dois anos, 18,75% dos pacientes tratados foram soro-negativos. Dois pacientes haviam descontinuado o tratamento, devido aos efeitos colaterais, que cessaram após suspensão do tratamento. Menores efeitos colaterais foram relatados por menos de 60% dos pacientes, nenhuma toxicidade foi detectada.
- Foi concluído que 60 dias de tratamento com o benznidazol foi efetivo e bem tolerado no tratamento de infecções do *T. cruzi* em pacientes soropositivos com idade abaixo de 18 anos.

Streiger (2004) publicou que durante a realização de um estudo longitudinal na Argentina, em crianças com doença de Chagas crônica, foi identificado o seguinte cenário:

- Os antecedentes epidemiológicos mostravam que as crianças passaram por processos de migração, habitavam moradias precárias e tinham mães soropositivas. Em 81% das crianças, não foi identificada a ocorrência de transfusão sanguínea. Já para 65% destas, houve exposição a mais de um fator de risco. Em 68% das crianças, suas mães apresentaram sorologia positiva para doença de Chagas.

- Para 74% das crianças o tratamento recebido foi ambulatorial supervisionado e 51% destas, foram acompanhadas por mais de 04 anos.
- Os dados obtidos confirmaram que a probabilidade de cura é maior quanto menor é a idade do paciente tratado. Para crianças tratadas entre 01 e 06 anos, a estimativa para o tempo de desaparecimento dos anticorpos anti-*T. cruzi*, foi levantado pela mediana de 3 anos e 6 meses; já para àquelas com idade entre 07 e 14 anos, foi de 08 anos.
- Pode-se concluir baseando-se nesta, e em outras experiências, que o tratamento específico disponível, ainda que distante do ideal, confere benefícios concretos para as pessoas de pouca idade infectadas pelo *T. cruzi*.

4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTCHECH, J.; CORRAL, R.; BIANCARDI, M.A; FREILIJ, H..
Anticuerpos anti-F2/3 como marcador de curacion em niños com
infeccion congênita por *Trypanosoma cruzi*. *Medicina*, v. 63, p. 37-40,
2003.

AMARO NETO, V. Etiological treatment of infection by *Trypanosoma cruzi*. *Editorial Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 41, p. 211-13, 1999.

ARGENTINA. Ministerio de la Salud y Acción Social. Manual para la
Atención del paciente chagásico. Secretaria de Programas de Salud.
ANLIS.CENIDE. Instituto Nacional de Parasitologia Dr. Mario Fatale
Chaben. Servicio Nacional de Chagas. Córdoba: 1998.

ARGENTINA. Ministerio de la Salud y Acción Social. Normas para
Atención Médica del infectado chagásico. COFESA: 1993.

BRENER, Z; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M.. *Trypanosoma cruzi* e
Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara, 2ª edição, cap. 13, p.
23, 2000.

COLLARES-MOREIRA, J.V.. *A forma nervosa da moléstia de Chagas*.
Tese (Doutorado). 1925. Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Rio
de Janeiro, 1925.

COURA, JR.; CASTRO, S.L.. A critical review on Chagas disease
chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 3 - 24, 2002.

LARANJA, F.S.. Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. *In: Brasil
Med.*, v. 10, p. 482-491, 1953.

MALTA, J. Doença de Chagas. São Paulo: Sarvier, v. 04, p. 43, 1996.

MARQUES, R.D.; MARQUES, R.S.; DIAS, P.M.; MARQUES, M.D..
Therapeutic efficacy of benznidazole treatment of children in the
indeterminate phase of Chagas' disease. *Revista Brasileira de Medicina*,
v. 60 , n. 10, p. 755 – 764, 2003.

MELLO, A.; MELLO, N.R.. A forma ervosa crônica da doença de Chagas. *Rev Inst A Lutz.*, v. 15, p. 194 – 199, 1955.

OPAS/OMS. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Conclusiones de una consulta técnica. OPC/HCP/HCT/140/99, 32. *In: Rev Patol Trop.*, v. 28, p. 247-279, 1999.

PONTES, V.M.O.; SOUZA JÚNIOR, A.S.; CRUZ, F.M.T.; COELHO, H. L.L.; DIAS, A.T.N.; COELHO, I.C.B.; OLIVEIRA, M.F.. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 2, p. 182-187, 2010.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W.H.. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Drug Res.*, v. 29, n. 10, 1979.

ROMAÑA, C. Encefalopatias de posible origen esquizotripanosico. *An Inst Med Reg.*, v. 2, n. 1, p. 241-243, 1947.

SCHOFIEL, C.J.; MINTER, D.M.; TONN, R.J.. XX – The Triatomine bugs: biology and control. Geneva: World Health Organization. Document WHO/VBC, p. 87-941, 1987.

SOSA ESTANI, S.; SEGURA, E.L.. Tratamiento de la infección por *Trypanosoma cruzi* en fase indeterminada. Experiencia y normatización actual en la Argentina. *Revista Medicina (Buenos Aires)*, v. 59, p. 166-170, 1999.

SOSA-ESTANI, S. *et al.* Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas's disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59, n. 4, p. 526 – 529, 1998.

STREIGER, M.L. *et al.* Estudo longitudinal e quimioterapia específica em crianças, com doença de Chagas crônica, residentes em área de baixa endemicidade da República Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 5, p. 365 – 375, 2004.

WHO. World Health Organization. Control of Chagas' Disease. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series 905. Geneva: 2002.

WHO. World Health Organization. Chagas disease. Thirteenth Programme Report UNDP-TDR. Geneve: 1997.

WHO. World Health Organization. Control of Chagas's Disease.WHO Technical Report Series 811, Geneve: 1991.

**5. AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES
“EXTEMPORÂNEAS” DE BENZNIDAZOL USADAS
PARA O TRATAMENTO PEDIÁTRICO DA DOENÇA DE
CHAGAS**

5. AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES “EXTEMPORÂNEAS” DE BENZNIDAZOL USADAS PARA O TRATAMENTO PEDIÁTRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

5.1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é transmitido primariamente pelo vetor, transfusão sanguínea e durante a gravidez, acometendo pessoas em toda a América Latina (figura 01). Um progresso notável tem sido observado nos últimos 15 anos no controle da transmissão vetorial através do *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e também já se encontra consolidado, em alguns países, o controle da transmissão por transfusão sanguínea do *T. cruzi*. É fato também que o controle da transmissão congênita assim como o diagnóstico etiológico e tratamento da população jovem estão sendo ampliados largamente (PAHO, 2002).



Figura 01: Mapa da distribuição geográfica da transmissão vetorial do *Triatoma infestans* na América Latina

Fonte: PAHO/WHO, Program on Communicable Diseases

Disponibilizar uma forma de dosagem especial de medicamentos é essencial quando estes são administrados a lactentes e crianças. Alguns fármacos que estes pacientes necessitam não estão disponíveis comercialmente na sua forma de dosagem adequada. Estas são preparadas extemporaneamente e individualmente para o paciente pediátrico. As propriedades físicas e químicas devem ser consideradas neste caso. Contudo, faltam os estudos de estabilidade, biodisponibilidade, farmacocinética, farmacodinâmica, eficácia e tolerabilidade (NAHATA, 2008).

A necessidade de tais dados vai continuar, porque é improvável que todas as drogas aprovadas para os adultos também seja indicado simultaneamente para administração em lactentes e crianças. Apresentações e publicações sobre formulações de drogas estáveis irão oferecer oportunidades para os pacientes pediátricos receberem os medicamentos em doses desejadas com mais eficácia e segurança (NAHATA, 1999).

Centenas de diferentes formulações podem ser preparadas dependendo da situação, seja em uma farmácia de hospital, seja em um lar, acompanhado de profissional ou pelo responsável (NAHATA, 2008).

Só recentemente o problema dos medicamentos não-licenciados ou padronizados para crianças começou a receber a atenção das autoridades sanitárias, mesmo em países desenvolvidos. Nesse sentido, nos EUA, medidas regulatórias da Food and Drug Administration vêm buscando, desde a década de 90, com sucesso parcial e questionado, motivar economicamente a indústria farmacêutica a suprir as carências de medicamentos necessários e adequados para uso em crianças (COSTA, 2009b).

Por sua vez, a European Medicines Agency (EMA) estabeleceu no início de 2007 um conjunto de medidas envolvendo uma regulação específica para o registro de medicamentos de uso na infância e incentivos à pesquisa clínica e ao desenvolvimento de medicamentos de uso pediátrico. No âmbito do Reino Unido, também tem sido adotada pelas autoridades sanitárias uma política específica envolvendo medidas regulatórias, estruturação de uma rede de pesquisa sobre medicamentos para crianças e desenvolvimento de um formulário terapêutico especializado (*British National Formulary for Children*, BNFC) (COSTA, 2009b).

Já em termos globais, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou, em 2007, a primeira lista de medicamentos essenciais para crianças, acompanhada de um levantamento das necessidades de pesquisa nessa área, e de uma campanha cujo slogan, *Make Medicine Child Size*, chama a atenção mundial para essa questão (COSTA, 2009b).

No que se refere ao Brasil, o país ainda não tem uma regulação específica para registro e uso de medicamentos em crianças, como também carece de uma política de estímulo à pesquisa clínica em pediatria (COSTA, 2009b).

Aqui, alguns estudos evidenciam a relevância do problema, particularmente no contexto hospitalar, onde o uso de medicamentos não licenciados ou não padronizados para crianças, é uma realidade (COSTA, 2009a).

As iniciativas que vêm sendo desenvolvidas nos Estados Unidos, Europa e Austrália para aumentar a disponibilidade de medicamentos desenvolvidos para crianças são importantes, porém seu impacto na prática clínica ainda é muito limitado (COSTA, 2009a).

No que se refere à carência de formulações apropriadas para uso pediátrico, a prescrição de adaptações de forma ou formulação específica para adultos ou para crianças de outro subgrupo etário, traz riscos de inexatidão da dose, contaminação durante a manipulação, perda de estabilidade, incompatibilidades e interações. A existência de formas farmacêuticas apropriadas facilita a administração e o cumprimento dos tratamentos e evita perdas desnecessárias, reduzindo os custos em saúde (COSTA, 2009a).

Uma formulação ideal teria facilidade de preparo pelo farmacêutico e de administração pela enfermagem, concentração e volume suficientes para obtenção da medida ou da dosagem necessária, sabor agradável e dados científicos que respaldassem o preparo e a determinação do prazo de validade (COSTA, 2009a).

Preparações líquidas são as mais adequadas para uso em crianças, devido à facilidade de ajuste das doses e das características organolépticas, bem como pela facilidade na deglutição e administração. Entretanto, essa não é a realidade da pediatria, dada a carência de formas líquidas, o que se verifica, mais frequentemente, é a adaptação de formas farmacêuticas sólidas para líquidas e a prescrição de formulações magistrais (COSTA, 2009a).

A única formulação em uso para o tratamento da doença de Chagas, é o benznidazol comprimido 100 mg (BZN), que necessita de ajustes de posologia para administração na grande maioria da população pediátrica.

Esta etapa da pesquisa tem como objetivo avaliar a variabilidade do teor de benznidazol nas preparações “extemporâneas” atualmente utilizadas por serviços e programas de controle da doença de Chagas no tratamento de crianças em toda a América Latina.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material

Foram utilizados os comprimidos de benznidazol 100 mg, fabricados no LAFEPE[®], lote 08041722, ora inteiro, ora macerados com auxílio de gral e pistilo e, ora fracionados, estes com auxílio de um “cortador de comprimidos”.

5.2.2 Metodologia analítica (SILVA, 2007)

Reagentes

Água purificada por osmose reversa e acetonitrila grau HPLC JT Baker[®].

Equipamentos e instrumentos

Sistema de cromatografia líquida Merck[®] Elite LaChrom, composto por bomba L-2130, amostrador L-2200, forno L-2300 e detector diode array L-2455

Purificador Osmose reversa Milli-Q Gradiente Millipore[®]

Lavadora ultra-sônica Unique[®]

Balança Shimadzu[®] AW 220, máximo de 220 g

Condições Cromatográficas:

Fase Estacionária	C18 Lichrospher [®] , 125 x 4,6 mm RP-18, 5µm
Fase Móvel.....	água ultra-pura : acetonitrila (50:50)
Fluxo.....	1,0mL/min
Detector.....	316 nm
Temperatura do forno.....	25 °C
Volume de Injeção.....	20 microlitros

Preparação da Fase Móvel:

A fase móvel foi obtida realizando a filtração dos componentes à vácuo e em seguida, misturando-os nesta proporção que se segue: água ultra-pura : acetonitrila (50:50).

Preparação da Solução Padrão:

Foi pesado o equivalente a 50 mg do padrão de benznidazol e transferido para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionado 35 mL de acetonitrila, sonicado por 15 minutos e, em seguida, completado o volume com o mesmo solvente.

Foi transferido, volumetricamente, 5 mL do filtrado para um balão volumétrico de 50 mL, diluído com a fase móvel e homogeneizado, obtendo uma concentração de 100 ppm. Filtrado em membrana 0,45 µm.

Preparação da Solução Amostra:

Avaliaram-se 10 amostras de cada uma das seguintes formulações extemporâneas preparadas pelos Programas de Chagas da América Latina:

- 1) Frações de 1/8 (12,5 mg) de benznidazol e 1/4 (25 mg) de benznidazol;
- 2) Comprimido de benznidazol inteiro, ressuspendidos em água (10 mL), administrado (1,25 mL) com seringa;
- 3) Comprimido de benznidazol macerado, ressuspensão em 10, 20 e 100 mL de água, administrado com seringa (1,25; 2,5 e 12,5 mL);
- 4) Comprimido inteiro macerado, pesado e transferido para envelopes (12,5 mg).

As amostras foram preparadas conforme padrão e as diluições ajustadas para a concentração final de 100 ppm. Filtrado em membrana 0,45 µm.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que os comprimidos macerados, ressuspensos e administrados em seringa apresentaram-se mais uniformes, com teor de benznidazol entre 82,87 – 135,03 % (média 111,04 % e CV 13,83 %).

Já os comprimidos inteiros dissolvidos em água apresentaram grande variabilidade no teor de benznidazol (entre 131,73 - 287,56 % e CV 30,97 %).

As frações de 1/4 e 1/8 de comprimido de benznidazol apresentaram teor entre 96,97 – 104,37 % (média 101,47 % e CV 2,38 %), 60,63 – 124,61 % (média 98,83 % e CV > 23,82 %), respectivamente.

As formulações maceradas/pesadas/envelopes apresentaram teor entre 93,95 – 102,90% (média 97,20 % e CV 2,75 %).

Estes resultados estão representados na figura 02.

É relevante destacar que todos os fragmentos também foram avaliados em relação ao peso médio, segundo a Farmacopéia Brasileira (1998). Já a uniformidade de conteúdo foi considerada a especificação da USP 30 (2007), que recomenda um CV inferior a 6%, com faixa de variação entre 85 a 115 %.

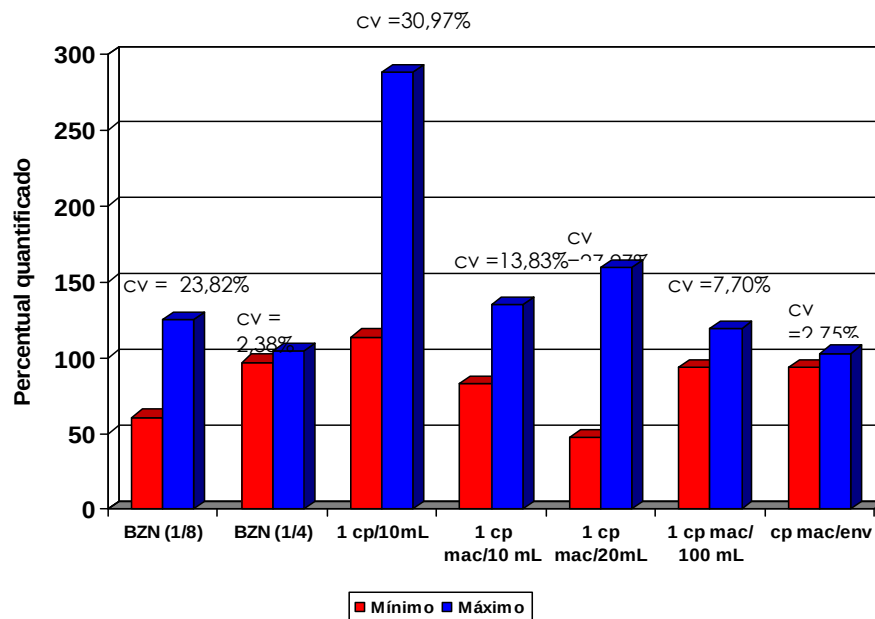


Figura 02: Avaliação de preparações extemporâneas do benznidazol 100 mg

Estes resultados obtidos para o tratamento da doença de Chagas demonstram semelhança com a situação encontrada para o tratamento de crianças com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A carência de formulações pediátricas apropriada e a utilização das formas farmacêuticas existentes para adulto e suas adaptações recomendadas para administração do tratamento em crianças por peso, justificaram o estudo publicado por Kayitarea (2009) que propôs e analisou a alteração da forma farmacêutica do comprimido da associação de lamivudina e zidovudina em uma forma retangular com sulcos ou ranhuras, os quais permitiram fracioná-lo em 08 partes iguais e consequentemente garantir maior uniformidade na dose administrada.

Assim, como foi a proposta para tratamento das crianças com SIDA, este estudo justifica a necessidade do desenvolvimento da formulação pediátrica à base de benznidazol para o tratamento de crianças e lactentes com a doença de Chagas.

5.4. CONCLUSÕES

As formas de administração de benznidazol, atualmente em uso para crianças, apresentam grande variabilidade, com potencial para sub e sobre-dosagem.

Entre as formas de administração disponíveis nos Programas que tratam a doença de Chagas em crianças e lactentes, a forma definida como comprimidos macerados, ressuspendidos em água e administrados com seringa foi a que apresentou menor variação dentre todas as propostas de fracionamento analisadas.

Visando o tratamento em crianças, com segurança, qualidade e eficácia foi proposto o desenvolvimento de uma formulação pediátrica de benznidazol através da parceria entre o LAFEPE/UFPE e a DNDi.

5. 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, P.Q.; LIMA, J.E.S.; COELHO, H.L.L.. Prescrição e preparo de medicamentos sem formulação adequada para crianças: um estudo de base hospitalar. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v.45, n.1, p. 57-66, 2009a.

COSTA, P.Q.; REY, L.C.; COELHO, H.L.L.. Carência de preparações medicamentosas para uso em crianças no Brasil. *J. Pediatr.*, v.85, n.3, p. 229-235, 2009b.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, *Métodos Gerais*. São Paulo: Atheneu, 4^a edição, 1998.

KAYITAREA, E.; VERVAET, C.; NTAWUKULILYAYO, J.D.; SEMINEGA, B.; BORTEL, V.; REMON, J.P.. Development of fixed dose combination tablets containing zidovudine and lamivudine for paediatric applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 370, p. 41–46, 2009.

NAHATA, M.C.; ALLEN JR, L.V.. Extemporaneous drug formulations. *Clinical Therapeutics*, v. 30, n. 11, p. 2112-2119, 2008.

NAHATA, M. C. Lack of pediatric drug formulations. *Pediatrics*, v.104, n.3, p.607-609, 1999.

PAHO. Organización Panamericana de la Salud. *El control de la enfermedad de Chagas em los países del Cono Sur de América: Hisotia de uma iniciativa internacional*, 1991-2001. Disponível em : <<http://www.paho.org/Spanish>>, Acesso em 13.01.2010.

SILVA, A.L.M.; SOARES SOBRINHO, J.L.; SILVA, R.M.F.; LIMA, L.G.; ROLIM NETO, P.J.. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de benznidazol para doença de Chagas. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1163 – 1166, 2007.

USP. Uniformity of dosage units <905>. The United States Pharmacopoeia. 30th. Ed.; Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007.

6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DO ESTADO SÓLIDO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL

6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DO ESTADO SÓLIDO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL

6.1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e constitui o maior problema de saúde pública para as nações em desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), é estimado que 20 milhões de pessoas estão infectadas com este parasito e que outras 40 milhões estão em risco de adquirir a doença (OMS, 2002) (LAMAS, 2006). A doença de Chagas é endêmica na América Latina (COURA, 2002). Esta doença tem modificado o seu perfil epidemiológico a partir da diminuição da transmissão vetorial e dos fenômenos de migração de indivíduos infectados para as cidades grandes (ALTECH, 2003).

Na fase aguda, recente ou congênita da doença, as drogas disponíveis para o tratamento são: o nifurtimox (3-metil-4-[(5-nitrofurfurilideno)amino]tiomorfolina-1,1-dioxida e o benznidazol (BZN) (N-benzil-2-nitroimidazolilacetamida). As formas quimioterápicas para o tratamento da doença de Chagas estão na forma farmacêutica sólida e estas associadas às desvantagens da administração oral de um fármaco de baixa solubilidade (LAMAS, 2006).

O conhecimento das propriedades físico-químicas dos fármacos é fator indispensável durante o desenvolvimento de medicamentos. O planejamento racional de uma forma farmacêutica deve, portanto, iniciar com a caracterização do princípio ativo em questão, de modo a otimizar parâmetros de qualidade da forma farmacêutica final (RODRIGUES, 2005).

Sob esta perspectiva de desenvolvimento racional, acrescida do interesse e parceria entre o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco “Governador Miguel Arraes” (LAFEPE[®]) e a *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) foi proposto o desenvolvimento de uma forma farmacêutica contendo o ativo benznidazol para o tratamento de crianças com a doença de Chagas. Fez parte deste objetivo o estudo de caracterização deste fármaco desenvolvido e produzido pela Roche[®], através de técnicas convencionais (faixa de fusão, granulometria por peneiras, microscopia óptica) e modernas (calorimetria exploratória diferencial, granulometria a laser,

microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X), visto que é iminente a necessidade de melhor caracterizar e aprimorar as especificações farmacopéicas, o que também garantirá a transferência de tecnologia da rota de síntese e manutenção da qualidade do comprimido adulto já produzido pelo LAFEPE® e da nova forma farmacêutica pediátrica, além de corroborar para todas as pesquisas conduzidas com o fármaco benznidazol (figura 01).

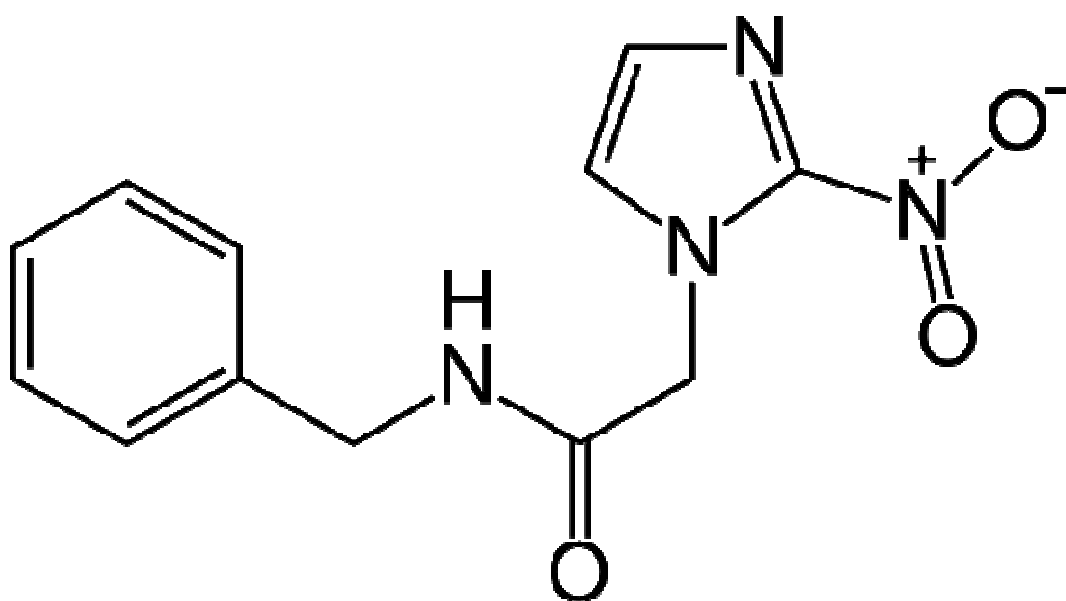


Figura 01: Estrutura química do benznidazol

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Insumo farmacêutico ativo:

Amostras de Benznidazol (BZN), matéria-prima e padrão, fornecidos pelo LAFEPE[®], lotes: 15772, 15986 e padrão do benznidazol 07-1051/000 (BS05041005), todos fabricados pela Roche[®].

6.2.2 Descrição

As matérias-primas foram visualizadas a olho nu, sobre uma placa de Petri, para verificação do aspecto e da cor no laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento do LAFEPE e fotografadas (NERY, 2008).

A microscopia óptica (MO) foi realizada no Laboratório de Estudos do Estado Sólido da Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos-Fiocruz, o material foi preparado a seco, utilizando um microscópio Olympus modelo BX 50.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi realizada no laboratório de microscopia e microanálise do CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste) para avaliação do tamanho e forma dos cristais. As análises foram realizadas em um microscópio FEI, modelo Quanta 200F, com as seguintes condições de operação: voltagem de aceleração 20 kV, baixo vácuo (0.5 torr), emissor FEG. As amostras foram espalhadas sobre fita de carbono, sem metalização. O modo de aquisição de imagem foi elétrons secundários (SEI).

6.2.3 Solubilidade

A solubilidade, segundo Farmacopéia Brasileira (2002), foi realizada para os lotes de matérias-primas 15772 e 15986 utilizando os seguintes solventes: água purificada por osmose reversa, clorofórmio, dimetilsilfóxido, hexano, metanol, acetona, isopropanol, glicerina, éter, etanol, N,N-dimetilformamida, acetato de etila, diclorometano, NaOH 0,1M e HCl 0,1M.

6.2.4 Perda por dessecação

A umidade foi determinada nos dois lotes de matéria-prima (15772 e 15986), em uma balança Mettler Toledo HB43 que utiliza a tecnologia de aquecimento por halogêneo. A massa utilizada foi de aproximadamente 1,0 g para cada replicata. Para cada lote foram realizadas três determinações. A Farmacopéia Brasileira especifica uma perda por dessecação menor que 0,5% para o benznidazol.

6.2.5 Faixa de fusão

A determinação da faixa de fusão das matérias-primas (n=3) foi realizada seguindo método geral V 2.2., da Farmacopéia Brasileira, no fusiômetro da Eletrothermal 9300.

Também foi determinada a faixa de fusão e a pureza do benznidazol por calorimetria exploratória diferencial (DSC), sendo que com n=03 para as matérias-primas e um n=02 para o padrão. Esta análise foi realizada no Laboratório de Estudos do Estado Sólido da Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos-Fiocruz.

6.2.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Foi realizada no Laboratório de Estudos do Estado Sólido da Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos-Fiocruz. Nas análises preliminares de DSC, cerca de 1,5 a 3,0 mg de BZN padrão Roche 071051-000 e matérias-primas 15772 e 15986 foram pesadas, analiticamente, e separadamente transferidas para cadinhos de alumínio com tampas perfuradas. Estas foram submetidas a três faixas de aquecimento: 5 °C/min; 10 °C/min e 20 °C/min. As análises ocorreram sob pressão atmosférica e com atmosfera inerte (nitrogênio seco N₂), com vazão de 80 mL/min, entre 25 a 240°C. Para determinação de pureza (Van't Hoff), as faixas de aquecimento foram: 0,4°C/min, 0,5°C/min e 0,6°C/min, as demais condições foram mantidas.

6.2.7 Difração de raios X pó (DRX)

Esta análise foi realizada no Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP). As análises de DRX foram realizadas em um equipamento de difração de raios-X de pó, Rigaku, modelo Ultima, operando com corrente de 20mA, sob tensão de 40kV e utilizando radiação K-alfa do cobre. As amostras foram

colocadas em lâminas de vidro escavadas e analisadas sem tratamento prévio. A difração de raios X foi realizada percorrendo a região entre $2\theta = 2^\circ$ e $2\theta = 60^\circ$.

6.2.8 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Foi realizada no Laboratório de Estudos do Estado Sólido da Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos-Fiocruz. O equipamento utilizado foi da Nicolet modelo Nexus 670. A FT-IR foi feita por reflectância difusa utilizando KBr como diluente.

6.2.9 Densidade aparente e compactada

As densidades aparentes dos sistemas particulados foram determinadas, indiretamente, através das medidas de seus volumes aparentes (CASTRO, 2003).

Foi determinada para os lotes de matéria-prima 15772 e 15986. Pesaram-se analiticamente, 20 g da matéria-prima ($n=3$) e transferiu-se para a proveta calibrada de 100 mL do equipamento Tap density, Varian®. Esta massa foi medida volumetricamente e a razão foi o resultado da densidade aparente. Após sucessivas compactações, a razão entre a massa (g) e o volume ocupado pelo pó compactado (mL), resultou na determinação da densidade (d) compactada, conforme equação abaixo. O estudo foi realizado no laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento do LAFEPE.

$$d = m(g)/v(mL)$$

6.2.10 Análise de distribuição granulométrica

No laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento do LAFEPE, para os lotes 15772 e 15986 foram realizadas três (03) pesagens analíticas, com massa de 50,0 g. Esta massa foi transferida para o agitador de peneiras Tipo Magnético, marca Bertel e passada pelas malhas (600; 425; 250; 150 e 75 μm).

No laboratório de microscopia e microanálise do CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), foram realizadas análises de distribuição de tamanho de partícula por granulometria a laser em via úmida para os lotes 15772 e 15986 de benznidazol com objetivo de comparar as técnicas e em paralelo, desenvolver um método reprodutivo para determinação

do tamanho de partícula do benznidazol. Foi utilizado um analisador de distribuição de tamanho de partícula Microtrac, modelo S3500. Equipamento em acordo com a norma ISO 13320-1 para Análise de Tamanho de Partícula por Métodos de Difração de Laser.

O desenvolvimento da metodologia foi realizado utilizando solução saturada do benznidazol como meio dispersante soluções aquosas a 3% de surfactantes (Triton X100 e Tween 80) para auxiliar na dispersão.

As análises satisfatórias devem apresentar residuais – RMS inferiores ou da ordem de 1%. A diminuição do fator de carregamento (obscurecimento) com o tempo é indício de que está ocorrendo dissolução da amostra.

A influência do tempo de análise foi considerada na realização dos experimentos.

Segue, na tabela 01, as condições experimentais testadas.

Tabela 01. Condições experimentais utilizadas nas análises de benznidazol utilizando soluções de surfactantes Triton X100 e Tween 80 e solução saturada do IFA como meio de dispersão

Lote	Surfactante	Volume de solução de surfactante*	Massa (mg)	Amostra
15772	Triton X 100	6 µL	8,4	01
			16,7	02
		12 µL	8,7	03
			17,6	04
	Tween 80	6 µL	8,9	05
			16,9	06
		12 µL	8,8	07
			16,6	08
15986	Triton X 100	6 µL	9,3	09
			19,6	10
		12 µL	9,5	11
			22,0	12
	Tween 80	6 µL	9,8	13
			19,7	14
		12 µL	9,7	15
			20,3	16

* solução aquosa, 3,0%

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Descrição

A análise macroscópica para os dois lotes de benznidazol 15772 e 15986 (figura 02) apresentou-se como pó branco, levemente amarelado com tendência a formar aglomerações, atendendo a especificação da monografia deste insumo publicada na Farmacopéia Brasileira.

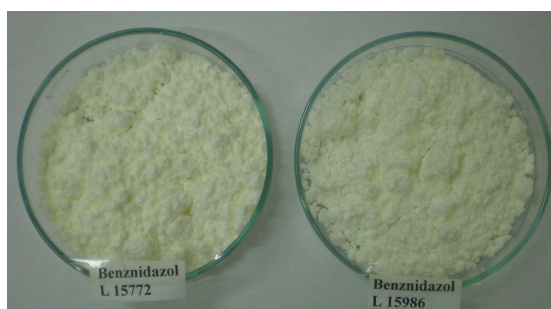


Figura 02: Foto ilustrativa das matérias-primas do benznidazol lotes 15772 e 15986.

A microscopia óptica obtida para o padrão de benznidazol e as matérias-primas lotes 15772 e 15986 está ilustrada na figura 03. As matérias-primas apresentaram cristais semelhantes entre si, mas os cristais apresentados no padrão tinham coloração levemente amarelados.

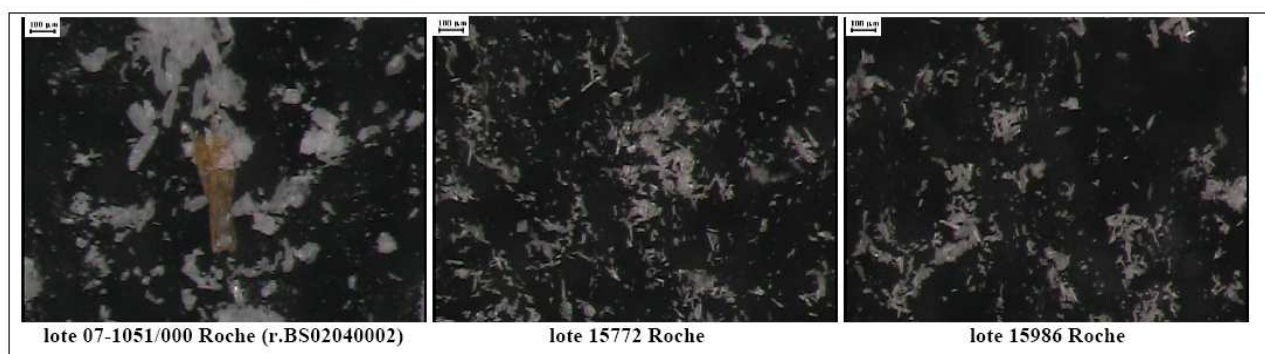


Figura 03: Resultados da Microscopia Óptica para o padrão de benznidazol e os dois lotes de matéria-prima 15772 e 15986.

A microscopia eletrônica de varredura do benznidazol matéria-prima para os lotes 15772 e 15986 está apresentada na figura 04. Os dois diferentes lotes apresentaram cristais grandes que se assemelham entre si, em relação ao padrão.

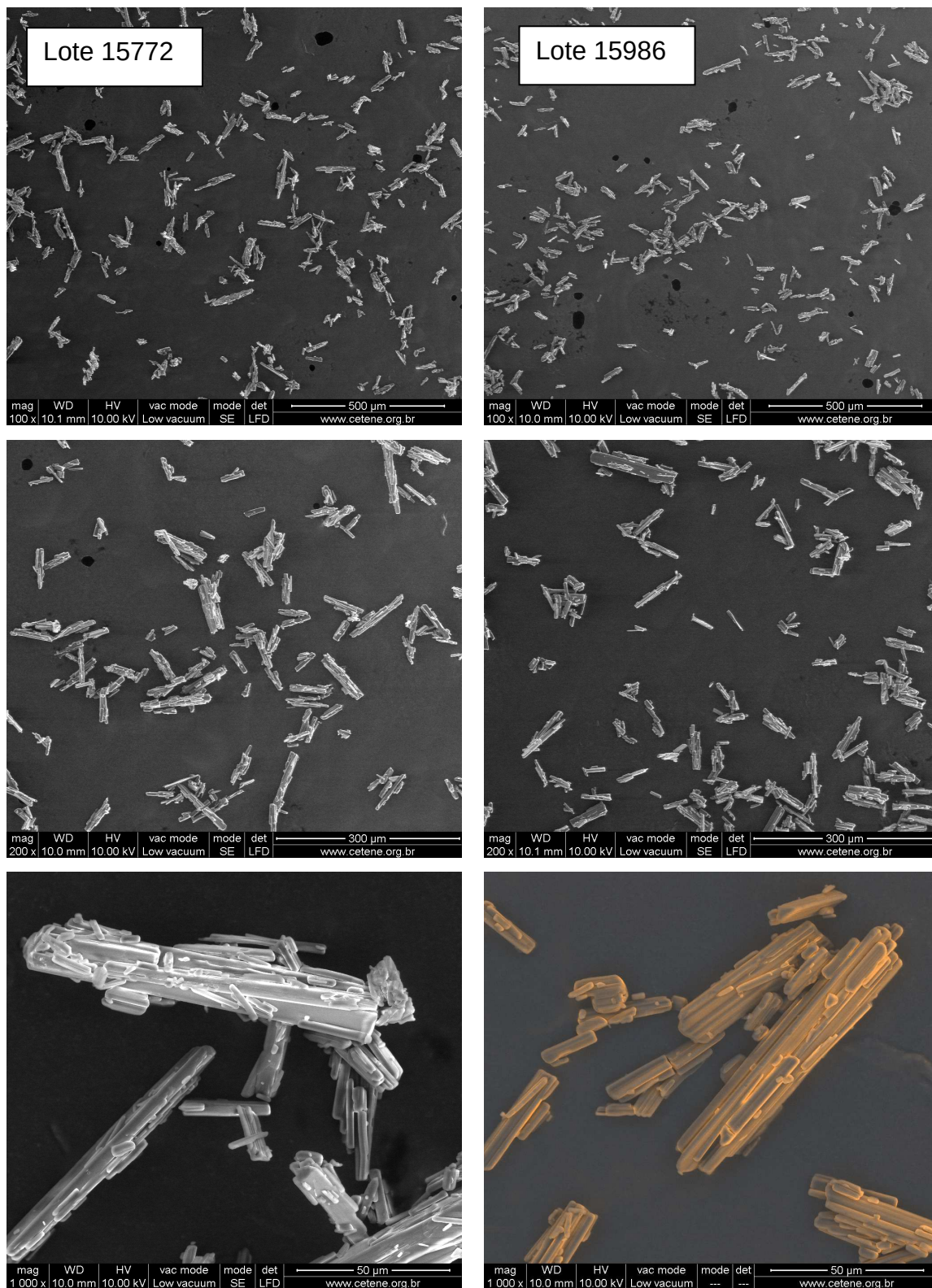


Figura 04: Microscopia Eletrônica de Varredura para as matérias-primas de benznidazol lotes 15772 e 15986, nos aumentos de 100x, 200x e 1000x, respectivamente.

6.3.2 Solubilidade

A matéria-prima do benznidazol lote LAFEPE® 15772 e 15986 foram aprovadas, neste parâmetro, segundo a especificação de solubilidade exigido pela Farmacopéia Brasileira (tabela 02).

Tabela 02: Resultados de solubilidade para o benznidazol segundo Farmacopéia Brasileira

Solvente	Resultados
Clorofórmio	muito pouco solúvel
Dimetilsulfóxido	muito solúvel
Hexano	solúvel
Metanol	ligeiramente solúvel
Acetona	pouco solúvel
Isopropanol	muito pouco solúvel
Glicerina	muito pouco solúvel
Éter	praticamente insolúvel
Etanol	ligeiramente solúvel
N,N – dimetilformamida	facilmente solúvel
Acetato de etila	ligeiramente solúvel
Diclorometano	ligeiramente solúvel
NaOH 0,1 M pH 13,14	muito pouco solúvel
HCl 0,1 N pH 0,56	muito pouco solúvel
Água purificada	muito pouco solúvel

6.3.3 Perda por dessecação

A perda por dessecação especificada na Farmacopéia Brasileira deve ser inferior a 0,5%. Os resultados em percentual da umidade para os dois diferentes lotes de benznidazol matéria-prima seguem abaixo na tabela 03.

Tabela 03. Resultados do percentual de umidade nos lotes de benznidazol 15772 e 15986

Lotes de Benznidazol	%
15772	0,23
15986	0,26

Os resultados demonstram que os lotes se apresentam atendendo a especificação farmacopéica.

6.3.4 Faixa de fusão

A faixa de fusão especificada na Farmacopéia Brasileira está entre 188 a 190°C. Os resultados das faixas de fusão encontradas para os dois lotes de benznidazol matéria-prima e seu padrão, estão descritos na tabela 04.

Tabela 04. Resultados de fusão obtidos visualmente^a e por DSC^b para lotes de matérias-primas do benznidazol e padrão

Lotes de Benznidazol	Faixa de fusão ^a (°C)	Massa ^b (mg)	Entalpia ^b (J/g)	T onset ^b (°C)	Pico de fusão ^b (°C)
15772	189,95	2,3180	141,65	189,59	189,80
15986	189,10	1,9220	142,01	189,71	189,80
07-1051/000	190,0	1,5290	146,42	188,72	189,40

^aobtido visualmente pelo método de capilar; ^bcondições: cadinhos de alumínio com tampas perfuradas, submetidas a taxa de aquecimento 0,4; 0,5 e 0,6 °C/min, com pressão atmosférica com fluxo de gás de nitrogênio seco (N₂), com vazão de 80 mL/min, (média dos resultados).

Os valores obtidos estão dentro da faixa especificada pela Farmacopéia Brasileira.

6.3.5 Calorimetria exploratória diferencial

A análise térmica constitui um conjunto de técnicas com as quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida em função da temperatura e/ou tempo enquanto a substância é submetida a um programa controlado de aquecimento e/ou resfriamento, sob atmosfera previamente definida. As técnicas termoanalíticas vem sendo amplamente utilizadas na indústria farmacêutica, principalmente por serem alternativas rápidas e seguras para controle de qualidade de fármacos e produtos acabados, encontrando também aplicabilidade na orientação do desenvolvimento de novas formulações (RODRIGUES, 2008).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi utilizada na caracterização e na identificação do benznidazol. Estudos demonstram que esta aplicação é bastante utilizada tanto para identificar e caracterizar, como para acompanhar a estabilidade e decomposição térmica de inúmeros fármacos. As técnicas termoanalíticas são relativamente simples e também utilizadas para estudos de intermediários de sínteses e produtos, principalmente quando se tem amostras suspeitas. (SCHNITZLER, 2001).

Nas análises de DSC, as amostras de benznidazol não sofreram alterações nos seus perfis energéticos, quando submetidas a três taxas de aquecimento, conforme exposto na figura abaixo 05 e nos Apêndices A e B.

Tanto as curvas referentes a SQR, como as das matérias-primas foi observado um único evento endotérmico, o qual se refere a fusão do benznidazol, que acontece próximo a 190°C. Foi verificado que após a fusão a linha de base retornou ao patamar inicial entre 195 a 200°C, nas diferentes taxas de aquecimento. Não foi observado nenhum evento exotérmico.

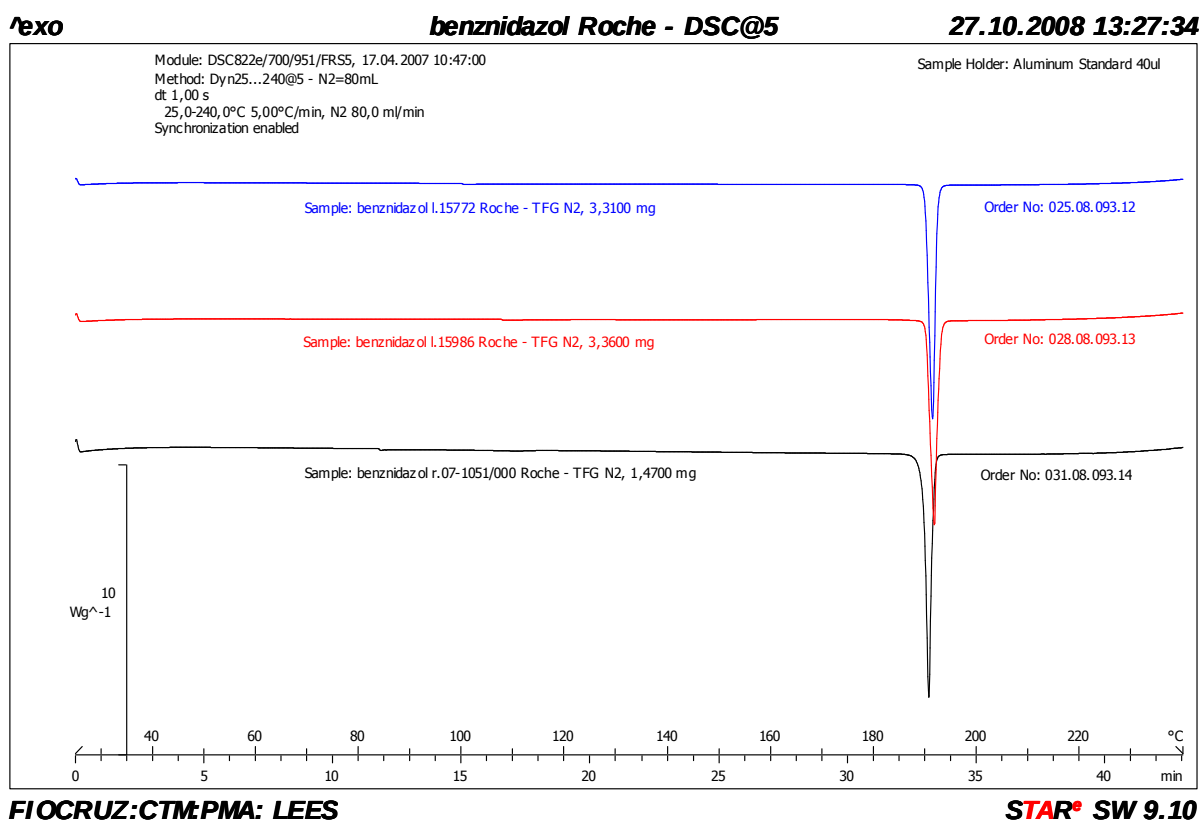


Figura 05: Curvas de DSC para o benznidazol ($\beta = 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

6.3.6 Determinação de pureza do benznidazol por DSC

A determinação do ponto de fusão por métodos calorimétricos vem sendo bastante empregada como método de avaliação do grau de pureza de fármacos. Através da DSC pode-se determinar a faixa de fusão de uma substância baseando-se na equação de Van't Hoff é possível determinar a fração molar de impurezas contidas no material.

A determinação da pureza por DSC é explicado 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.

O evento da fusão corresponde à processo endotérmico da curva de DSC que se afasta da linha de base, retornando posteriormente a mesma (RODRIGUES, 2005).

A figura 06 apresenta o endoterma de fusão do benznidazol para o lote 15772, nas razões de aquecimento 0,4°C; 0,5°C e 0,6°C/min de $189,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Nestas mesmas condições, o lote 15986 (Apêndice C) apresentou fusão em $189,8 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. O padrão de benznidazol lote 07-1051/000 (Apêndice D) nas razões de aquecimento 0,4°C; 0,5°C/min, apresentou temperatura de fusão de $189,4 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Considerando que as três amostras satisfizeram os requisitos mínimos preconizados pela teoria de Van't Hoff para determinação de pureza por DSC, foi possível utilizar a metodologia da American Society for Testing and Materials (ASTM928/03). A pureza das referidas amostras por DSC foi:

- benznidazol lote 15772 = $(99,92 \pm 0,07)$ mol % (n = 3; S = 0,006)
- benznidazol lote 15986 = $(99,93 \pm 0,03)$ mol % (n = 3; S = 0,008)
- benznidazol lote 07-1051/000 = $(99,19 \pm 0,57)$ mol % (n = 2; S = 0,008)

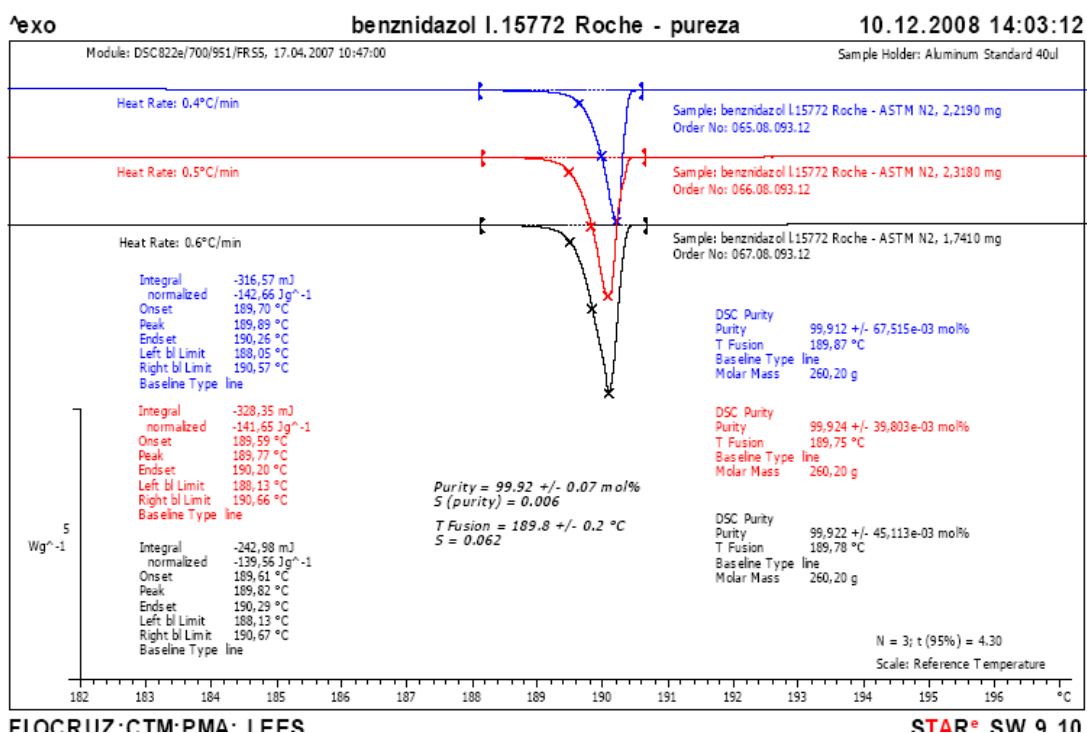


Figura 06: Determinação da pureza do benznidazol por DSC para o 15772

6.3.7 Difração de raios X pó (DRX)

A difratometria de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos. A principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de compostos cristalinos, sejam eles inorgânicos ou orgânicos.

Os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos (elétrons), ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada substância cristalina, da mesma forma que o padrão difratométrico por ela gerado (equivalente a uma impressão digital).

O resultado de DRX demonstra que o lote 15772 (figura 07) possui a mesma estrutura cristalina que o lote 15986 e o padrão de benznidazol Roche, respectivamente, Apêndices E e F, devido estes entre si apresentarem picos de difração com as mesmas distâncias interplanares (12,3 Å; 8,28 Å; 5,30 Å; 5,78 Å; 3,53 Å). O conjunto de picos que se repetem entre as amostras e o padrão de referência possibilita a afirmação que amostras e padrão apresentam a mesma pureza.

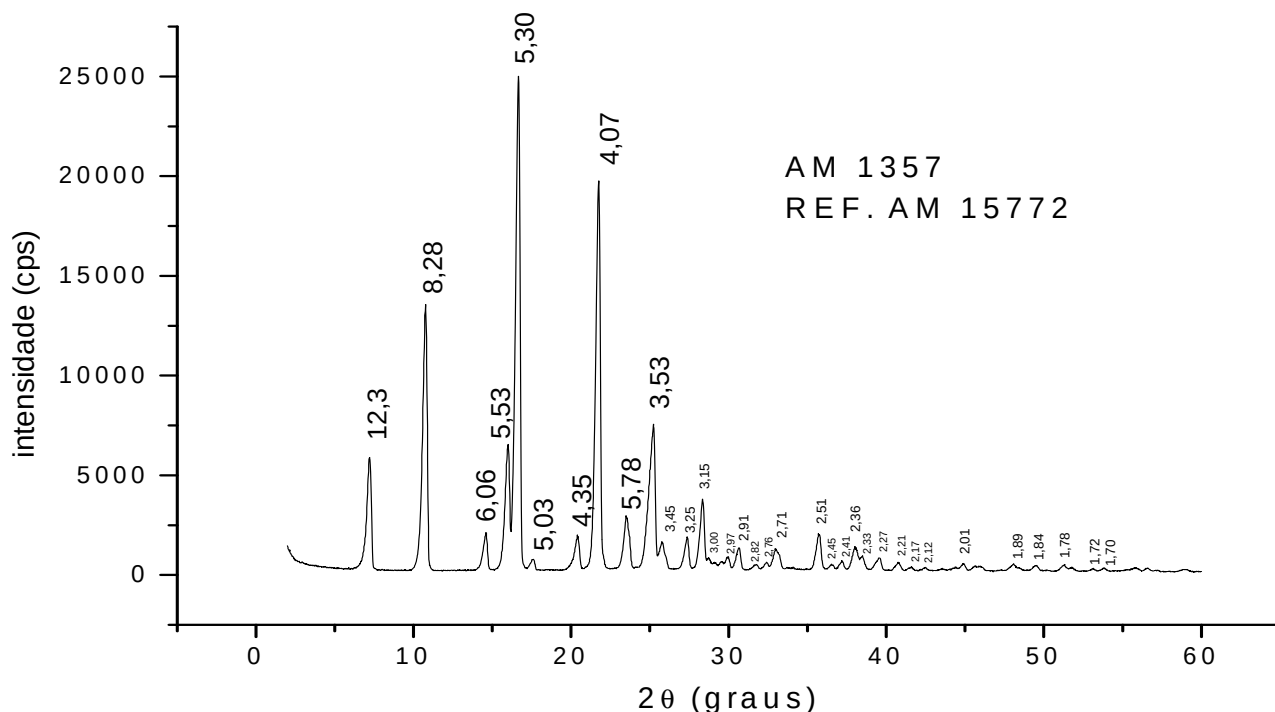


Figura 07: Resultados da difração de raios X para diferentes lotes de benznidazol matéria-prima fabricados pela Roche®

6.3.8 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Método de identificação dos compostos orgânicos por excelência, tem a capacidade de diferenciar substâncias com pequenas diferenças estruturais, com exceção dos isômeros ópticos. Assim, fatores como polimorfos, hidratos e solvatos podem originar diferenças no espectro de infravermelho (DONATO, 2008).

O espectro do padrão de benznidazol (figura 08) identifica que tanto para o padrão como para os dois lotes de matéria-prima do benznidazol (Apêndices G e H) há bandas entre 3500 a 3070 cm^{-1} , referentes ao grupo funcional N-H, já próximo 3030 cm^{-1} , bandas referente ao C-H do anel aromático, entre 1700 a 1630 cm^{-1} , ao grupo funcional C=O de amidas, na faixa entre 1340 a 1250 cm^{-1} , a ligação C-N dos aromáticos; e, entre 770 a 690 cm^{-1} , bandas que caracterizam a presença do anel aromático.

Estes resultados demonstram que o espectro da SQR do Benznidazol (07-1051/000) possui bandas de absorção características, que foram também encontradas nos espectros das matérias-primas, dos lotes 15772 e 15986. Sendo mais uma análise para confirmação da identificação do benznidazol.

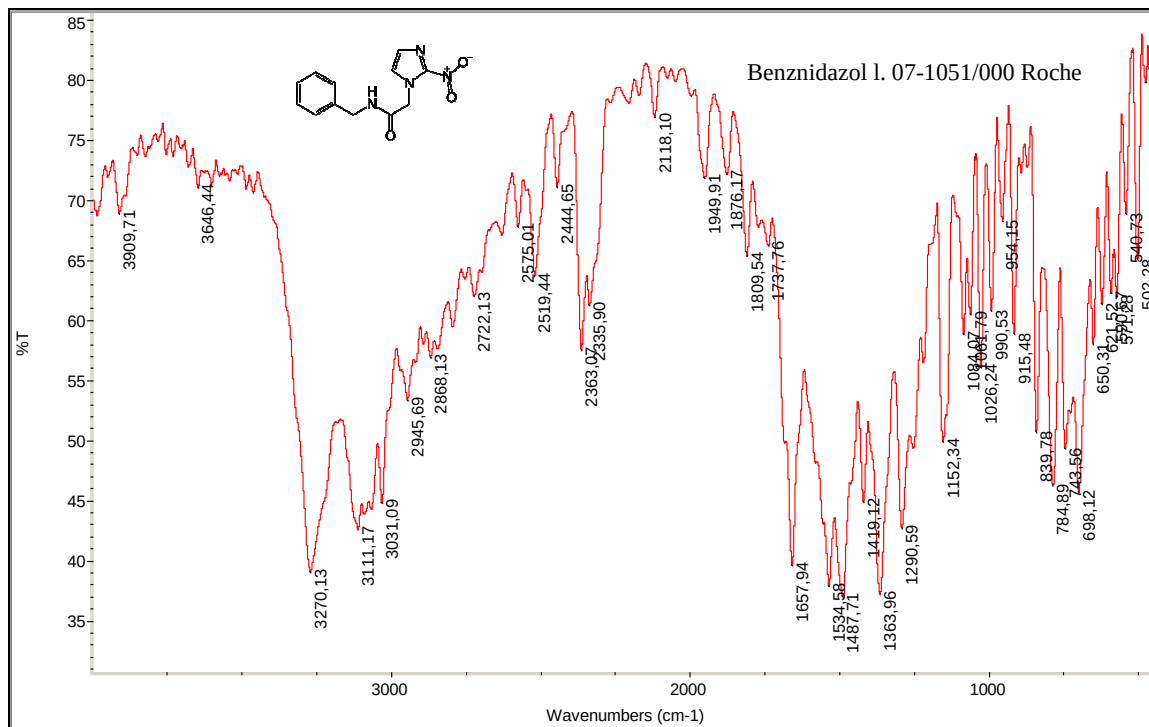


Figura 08: Espectro de FT-IR do padrão de benznidazol 07-1051/000 Roche

6.3.9 Densidade aparente e compactada

A densidade aparente (dap) de um pó é dependente do empacotamento das partículas e modifica-se à medida que o pó compacta-se. Um pó compactado é àquele que tem maior resisitência ao fluxo, um maior estado de equilíbrio e um arranjo de empacotamento invariável (AULTON, 2005).

O processo de compactação de pós e granulados resulta de uma sequência de eventos que se inicia pelo rearranjo das partículas e aumento da densidade aparente do leito de partículas, seguida de uma deformação elástica. Quando o limite elástico do pó é superado, ocorre uma deformação plástica e/ou destrutiva, originando novas ligações e consolidando o compacto (CURY, 2007).

A figura 09 abaixo representa graficamente a média do volume ocupado pela massa de 20g dos dois diferentes lotes de benznidazol matéria-prima (15772 e 15986), mediante diferentes números de compactações.

Para o lote 15772, tem-se que a densidade aparente (dap) foi de 0,28 g/mL e a densidade compactada (dcp) de 0,48 g/mL, e, para o lote 15986, a dap foi de 0,21 g/mL e a dcp de 0,36 g/mL. Estes resultados apresentam mais um parâmetro informativo da caracterização do insumo farmacêutico ativo benznidazol e permite seu acompanhamento no desenvolvimento farmacotécnico industrial das formas farmacêuticas propostas.

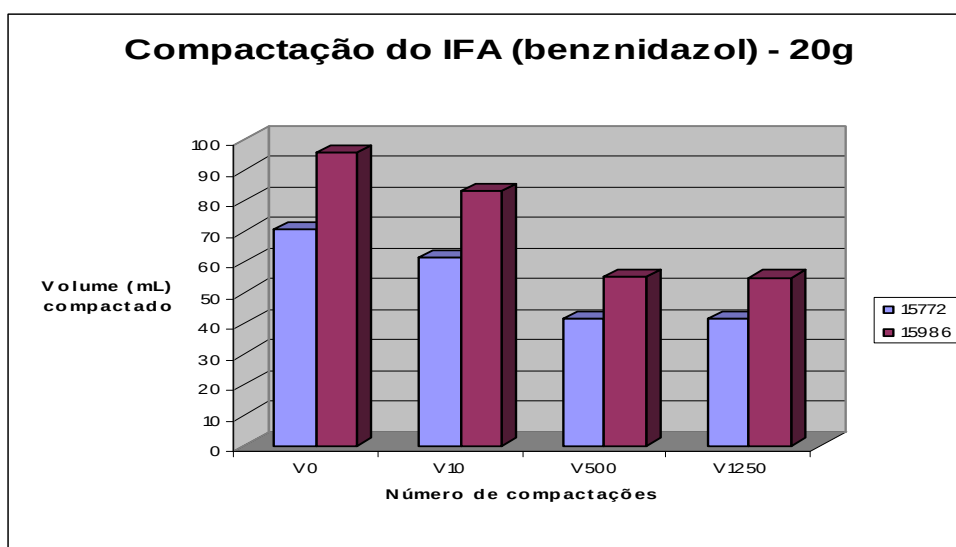


Figura 09: Volume compactado de benznidazol matéria-prima lotes 15772 e 15986

6.3.10 Análise de distribuição granulométrica

A seleção do método de análise do tamanho de partícula pode ser limitada pelos instrumentos previamente existentes em um laboratório, contudo, sempre que possível, as limitações de escolha do método deveriam ser determinadas pelas propriedades das partículas do pó e pelo tipo de informação que se procura sobre a distribuição (AULTON, 2005).

Na figura 10, está apresentado o resultado da distribuição de partículas utilizando o método de peneiras. Os padrões para pós descritos nas farmacopéias preconizam o “qualitativo” de grosseiro ou de fino, que é diferenciado e expresso pelo tamanho de abertura de malha do tamis utilizado (AULTON, 2005).

A Farmacopéia Britânica descreve a seguinte classificação (tabela 05).

Tabela 05: Tipos de pós especificados segundo os critérios da Farmacopéia Britânica

Descrição do tipo de pó	Diâmetro do tamis maior (µm)
Grosso	1700
Moderadamente grosso	710
Moderadamente fino	355
Fino	180
Muito fino	125

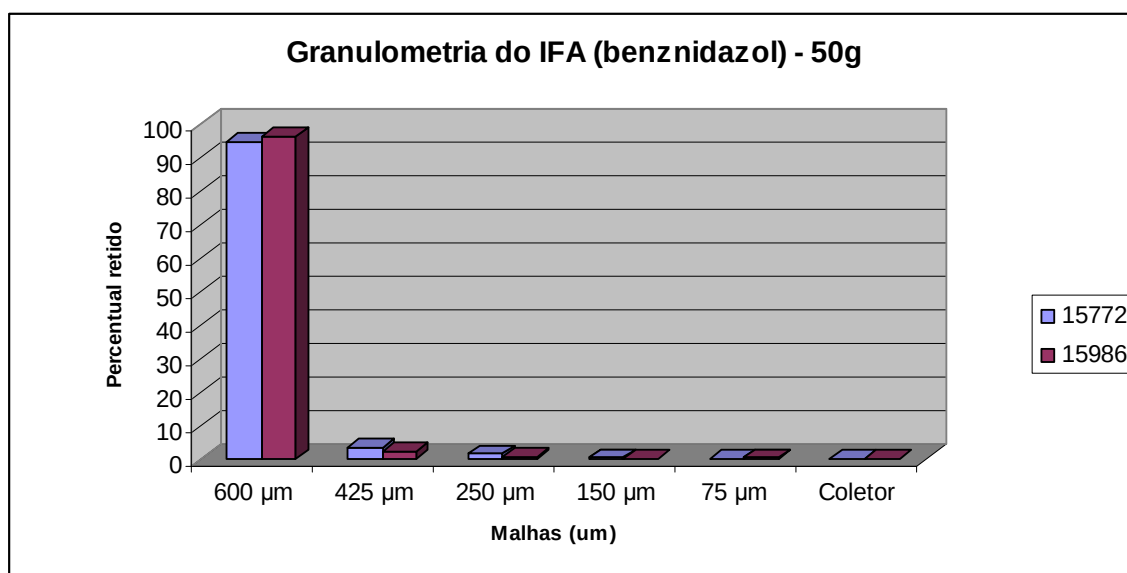


Figura 10: Granulometria por peneiras do benznidazol matéria-prima

Os resultados acima apresentaram que por este método o benznidazol matéria-prima estaria classificado como um pó moderadamente grosso a fino,

pois para o lote 15772, aproximadamente 94% das partículas ficaram retidas na malha acima 600 μm , e, menos que 0,5% destas foram menores que 150 μm . Resultado semelhante foi observado para o lote 15986, no qual, cerca de 96% das partículas foram retidas na malha de 600 μm e pouco mais que 0,5% foram menores que 150 μm . No entanto, durante o ensaio foi verificado aglomeração do pó, enquanto ocorria a vibração das peneiras, sendo esse um motivo visual para questionamento dos resultados. Outro método foi sugerido para avaliar o tamanho de partículas, o de granulometria a laser, o que se justifica já que o tamanho de partícula é uma variável que deverá ser acompanhada na transferência da rota de síntese entre os farmoquímicos e sendo também crítico para o perfil de dissolução e velocidade de sedimentação pois o desenvolvimento farmacotécnico proposto trata-se do desenvolvimento de uma formulação sólida (comprimido) e de uma líquida (suspensão).

Considerando o desenvolvimento do método para determinação do tamanho de partícula por granulometria a laser, abaixo segue uma análise comparativa dos resultados obtidos sintetizados nas tabelas 06 e 07, com seus respectivos gráficos (figuras 11 e 12), os quais permitiram inferir que as análises realizadas utilizando solução saturada do benznidazol e solução de surfactante (Triton X100 ou Tween 80) apresentaram residuais abaixo de 1% e que os dois surfactantes utilizados apresentaram resultados semelhantes e satisfatórios nas análises. Como regra, foi observado que a população de partículas maiores tende a aumentar com o passar do tempo decorrido entre a amostragem e a aquisição dos dados. Entretanto, este efeito não é expressivo nos primeiros 5 minutos.

Para todas as condições estudadas, verificou-se diminuição no fator de carregamento com o tempo, sendo sugerido que estaria ocorrendo a dissolução do benznidazol. Assim, é recomendado que as análises sejam realizadas imediatamente após a amostragem. Outro fato observado é que a diminuição no valor do fator de carregamento é maior para as análises realizadas com menor massa de benznidazol, sendo recomendado trabalhar com maior quantidade de amostra (~20 mg). Por fim, foi verificado também que medidas realizadas com tempo de 12 minutos ou superiores apresentaram indícios de aglomeração da amostra.

Para a matéria-prima benznidazol fica definido que a distribuição do tamanho de partícula deve seguir a metodologia por granulometria a laser e não utilizar a metodologia por peneiras, devido os resultados serem divergentes, pois mantendo a classificação da Farmacopéia Britânica o pó seria classificado como um pó muito fino.

Tabela 06: Lote 15772, surfactante: Tween 3%, 12 µL, massa: 16,6 mg

Intervalo entre medida (minutos)		0	3	6	9
Percentuais (µm)	D 10	6.44	6.34	6.35	6.45
	D 20	10.15	10.11	10.19	10.45
	D 30	13.19	13.32	13.51	13.94
	D 40	16.32	16.67	17.00	17.63
	D 50	19.98	20.53	20.99	21.86
	D 60	24.50	25.22	25.88	26.98
	D 70	30.21	31.08	31.84	33.35
	D 80	38.24	39.14	39.86	41.91
	D 90	52.95	53.52	54.01	58.12
	D 95	72.85	72.43	72.78	83.93
Pico principal (µm)		19.98	20.53	20.99	21.86
Fator de carregamento		0.0484	0.0352	0.0282	0.0239
Residuais – RMS (%)		0.541	0.569	0.557	0.496

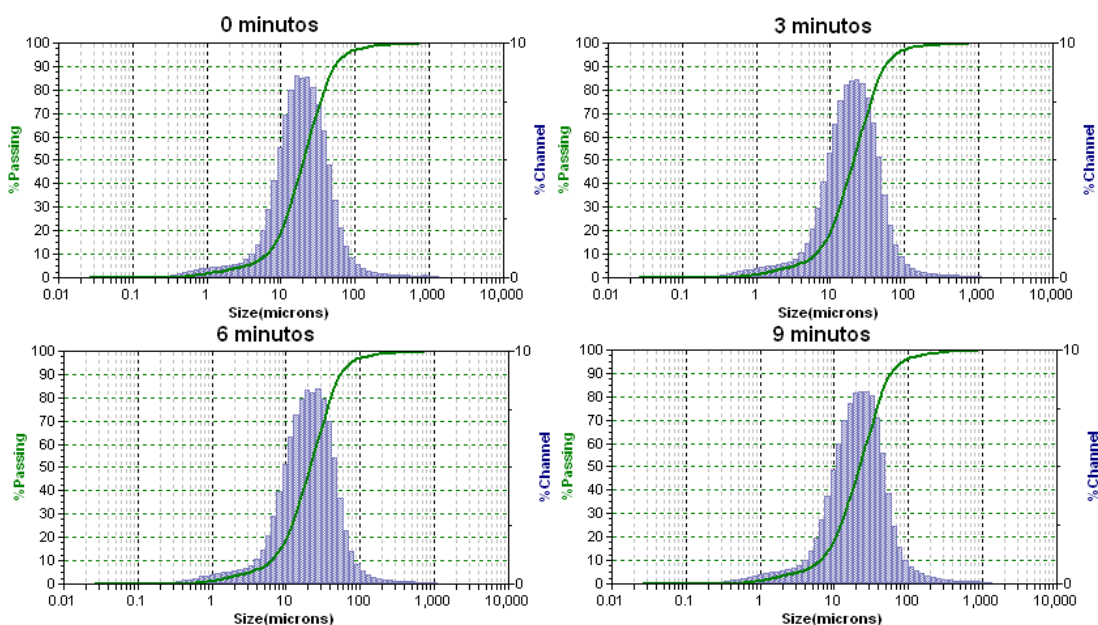


Figura 11: Representação gráfica da tabela 06

Tabela 07: Lote 15986, surfactante: Tween 3%, 12 µL, massa: 20,3 mg

Intervalo entre medida (minutos)		0	3	6	9
Percentuais (µm)	D 10	6.89	6.80	6.63	6.53
	D 20	10.64	10.56	10.36	10.28
	D 30	13.62	13.59	13.36	13.32
	D 40	16.67	16.70	16.44	16.43
	D 50	20.21	20.33	20.02	20.04
	D 60	24.54	24.81	24.38	24.45
	D 70	30.00	30.52	29.81	29.89
	D 80	37.65	38.49	37.23	37.26
	D 90	51.50	52.96	50.14	50.03
	D 95	69.87	72.29	66.46	66.31
Pico principal (µm)		20.21	20.33	20.02	20.04
Fator de carregamento		0.0554	0.0534	0.0461	0.0414
Residuais – RMS (%)		0.544	0.569	0.594	0.587

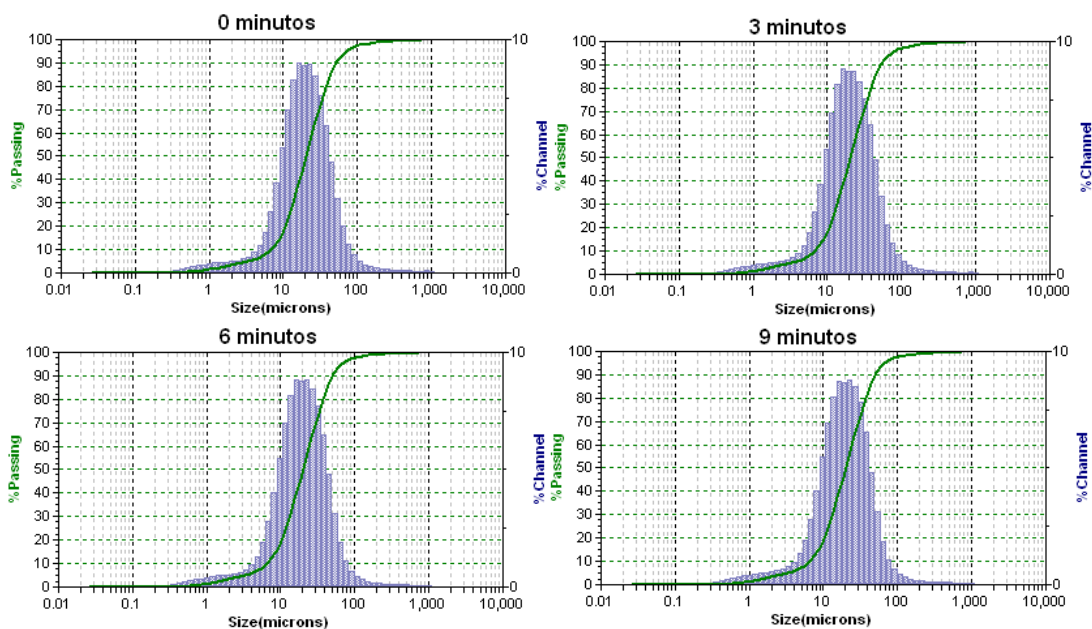


Figura 12: Representação gráfica da tabela 07

6.4 CONCLUSÕES

Os dois lotes (15772 e 15986) benznidazol matéria-prima fabricados pela Roche® apresentaram-se atendendo as especificações farmacopéicas para os parâmetros de descrição, solubilidade, perda por dessecação e faixa de fusão.

As outras técnicas (difração de raio X, calorimetria exploratória diferencial, densidade aparente e compactada, distribuição granulométrica, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) utilizadas com objetivo de incrementar a caracterização do benznidazol, visto que sua rota de síntese passará por uma transferência de tecnologia definiram a carta de identidade deste insumo farmacêutico ativo, o que vem assegurar ensaios que garantirão a qualidade da reprodução dos novos lotes sintetizados, não comprometendo a fabricação do medicamento LAFEPE Benznidazol 100 mg, já registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), nem das formulações propostas desenvolvidas nesta pesquisa.

Foram definidos ensaios e especificações que podem ser incluídas numa revisão de monografia da Farmacopéia Brasileira, principalmente àqueles referentes a distribuição granulométrica.

Por fim, foi confirmado que o benznidazol matéria-prima teve o mesmo comportamento químico da Substância Química de Referência (07-1051/00) da Roche®.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALTECH, Jaime *et al*, Anticuerpos anti-F2/3 como marcador de curacion em niños con infeccion congenita por Trypanosoma cruzi. *Medicina*, v. 63, p. 37-40, 2003.

AULTON, M.E.. Delineamento de Formas Farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed Editora, 2ª ed., 2005.

CASTRO, A.D.; VICENTE, J.A.; MOURÃO, S.C.; BUENO, J.H.F.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D.. Effect of maize starch concentration on *in vitro* acetaminophen release from tablets. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 3, 2003.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L.. A Critical review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

CURY, B.S.F.; BUENO, J.H.F.; SILVA JÚNIOR, N.P.; CASTRO, A.D.; GREMIÃO, M.P.D.. Influência das propriedades de granulados de lactose nas características físicas dos comprimidos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n.1, p. 85-92, 2007.

DONATO, Eliane Maria. *Lopinavir/Ritonavir cápsulas: perfil de dissolução in vitro baseado nos dados in vivo, estudos de estabilidade térmica e metodologia analítica*. 2008. 260f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Atheneu, 4ª edição, 2002.

LAMAS, M.C.; VILLAGGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALOMÓN, C.J.. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 307, n. 2, p. 239-243, 2006.

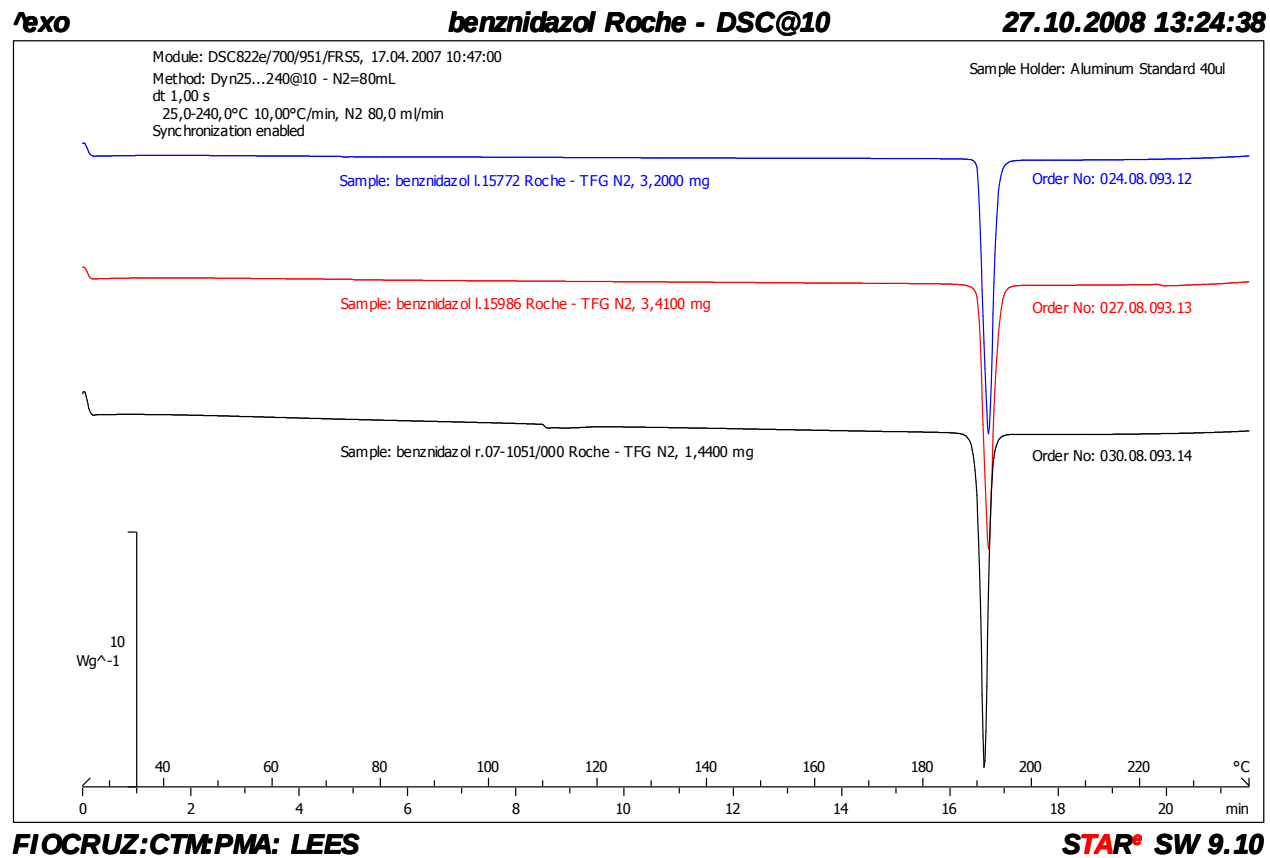
NERY, C.G.C.; PIRES, M.A.S.; PIANETTI, G.A.; VIANNA-SOARES, C.D.. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, n. 1, p. 61-73, jan/mar., 2008.

OMS (Organização Mundial de Saúde). Controle da Doença de Chagas. *Tech. Rep. Series* 905, p. 1-109, 2002.

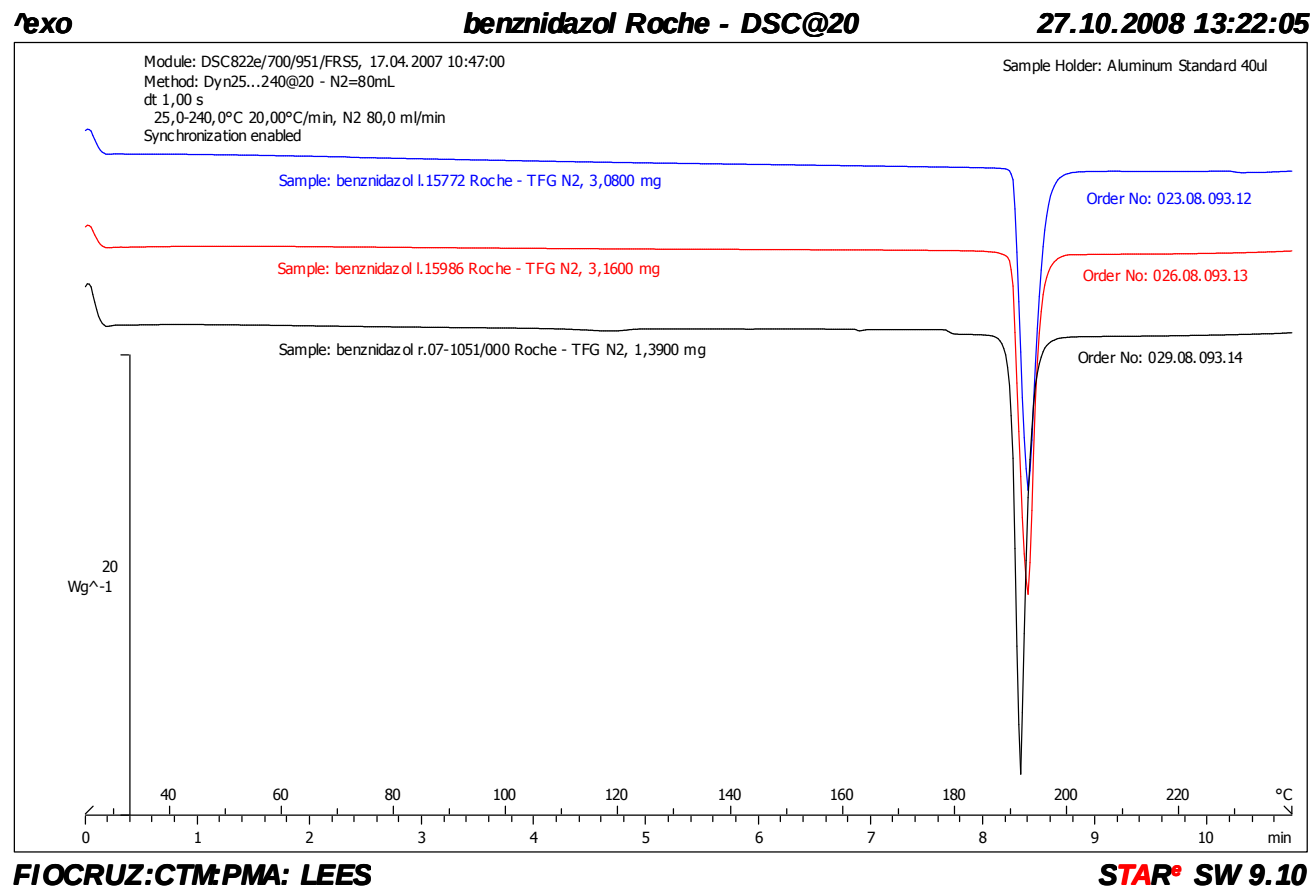
RODRIGUES, P.O.; MAZON, T.F.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R.. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). *Acta Farma Bonaerense*, v. 24, n. 3, p. 383-387, 2005.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.O.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R.. Caraterização termoanalítica e estudo do perfil de dissolução de comprimidos contendo metronidazol. *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 27, n. 4, p. 528-534, 2008.

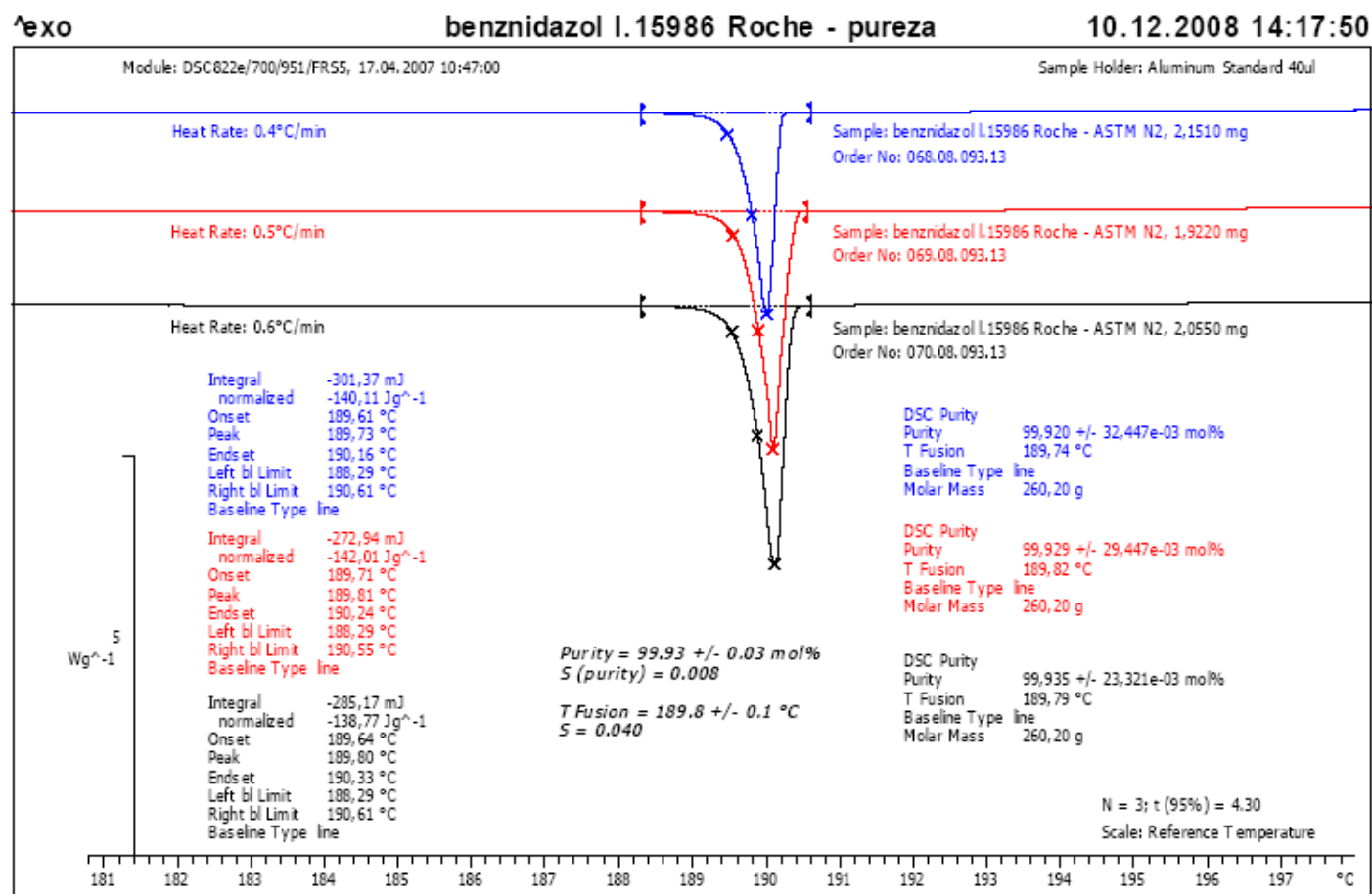
SCHNITZLER, E.; CARVALHO-FILHO, M.A.S.; STADLER, C.C.; VOLPATO, A.M.. Application of differential scanning calorimetry (DSC) in the thermal characterization of dexamethasone acetate, excipients and dexamethasone cream. *Ecl. Quím.*, v. 26, 2001.



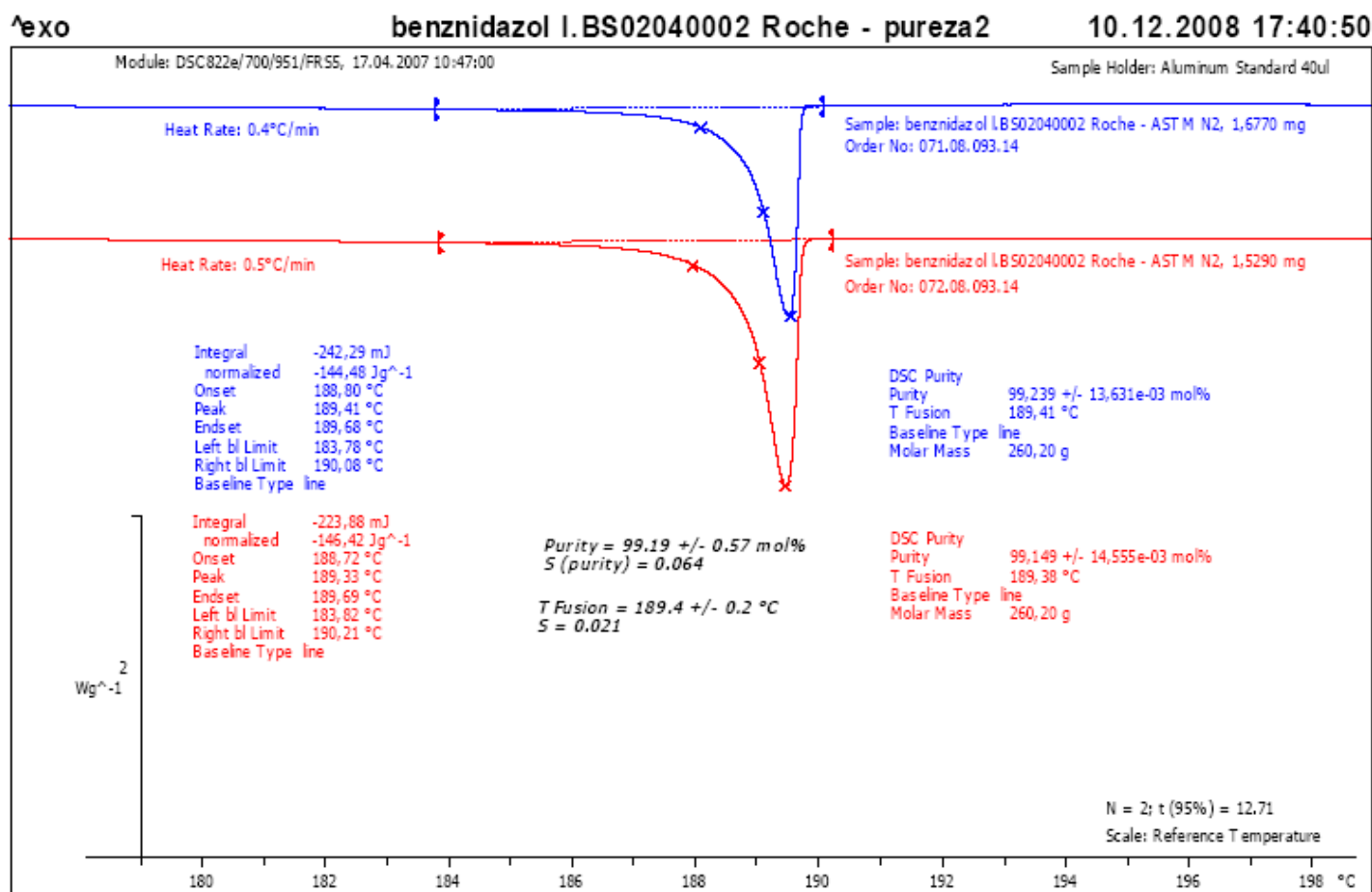
Apêndice A: Curvas de DSC para o benznidazol ($\beta = 10$ °C/min)



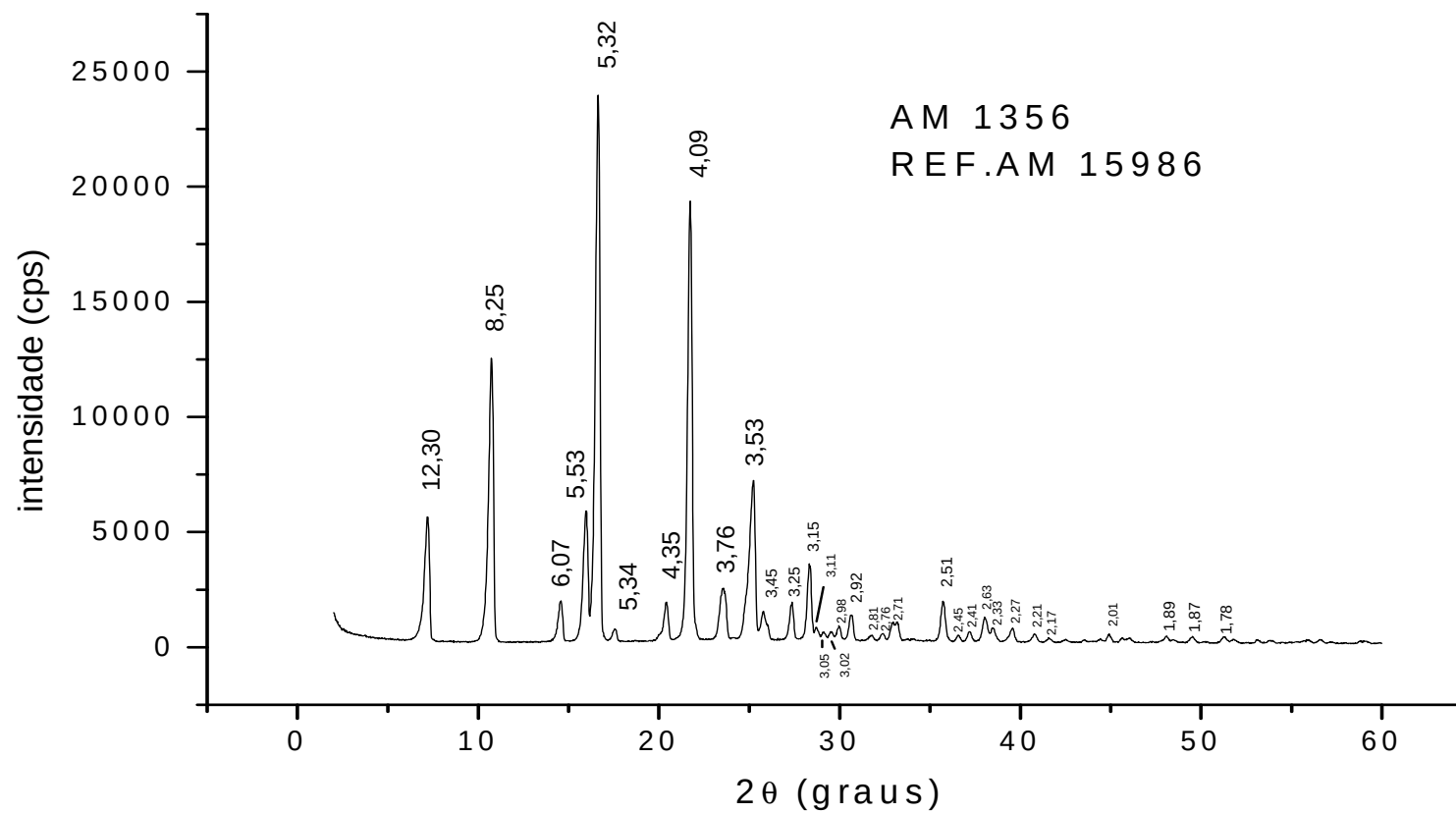
Apêndice B: Curvas de DSC para o benznidazol ($\beta = 20$ °C/min)



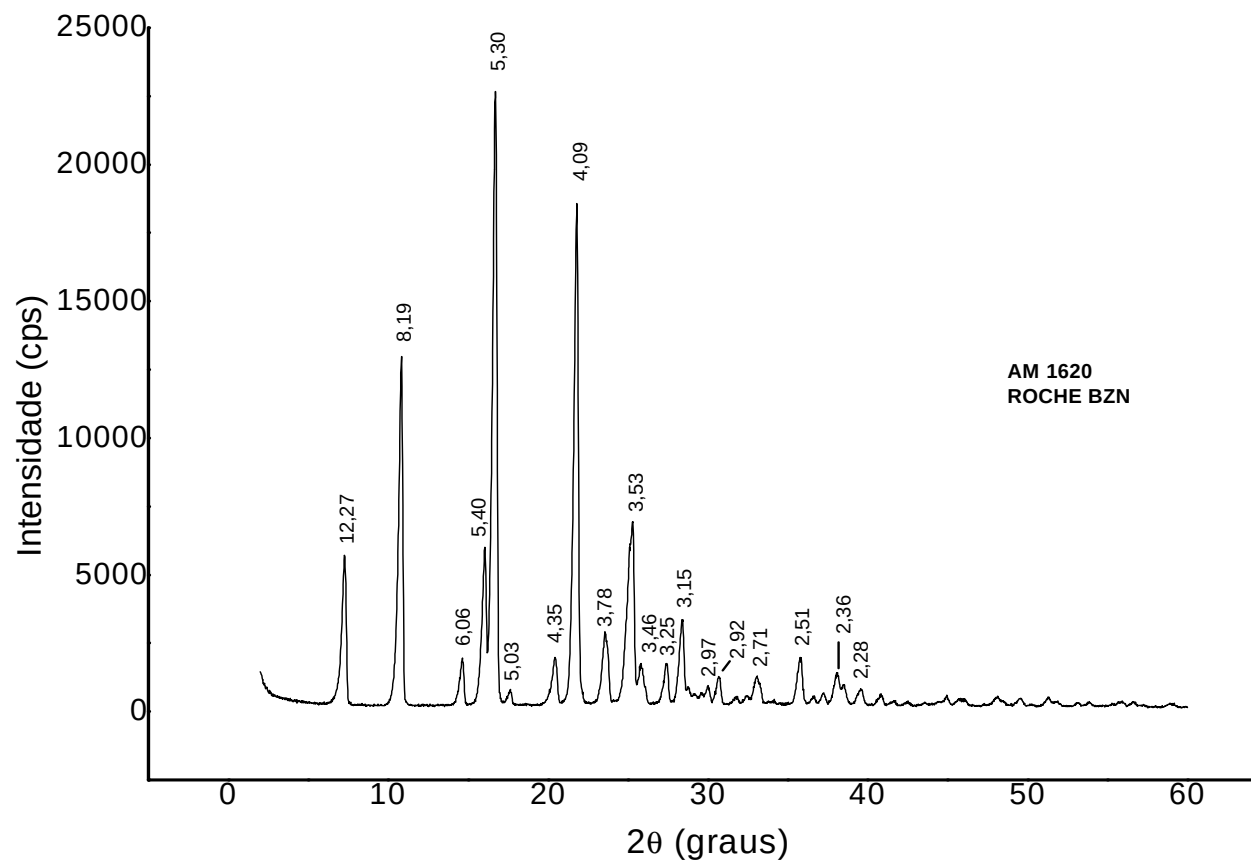
Apêndice C: Determinação da pureza por DSC do benznidazol lote 15986



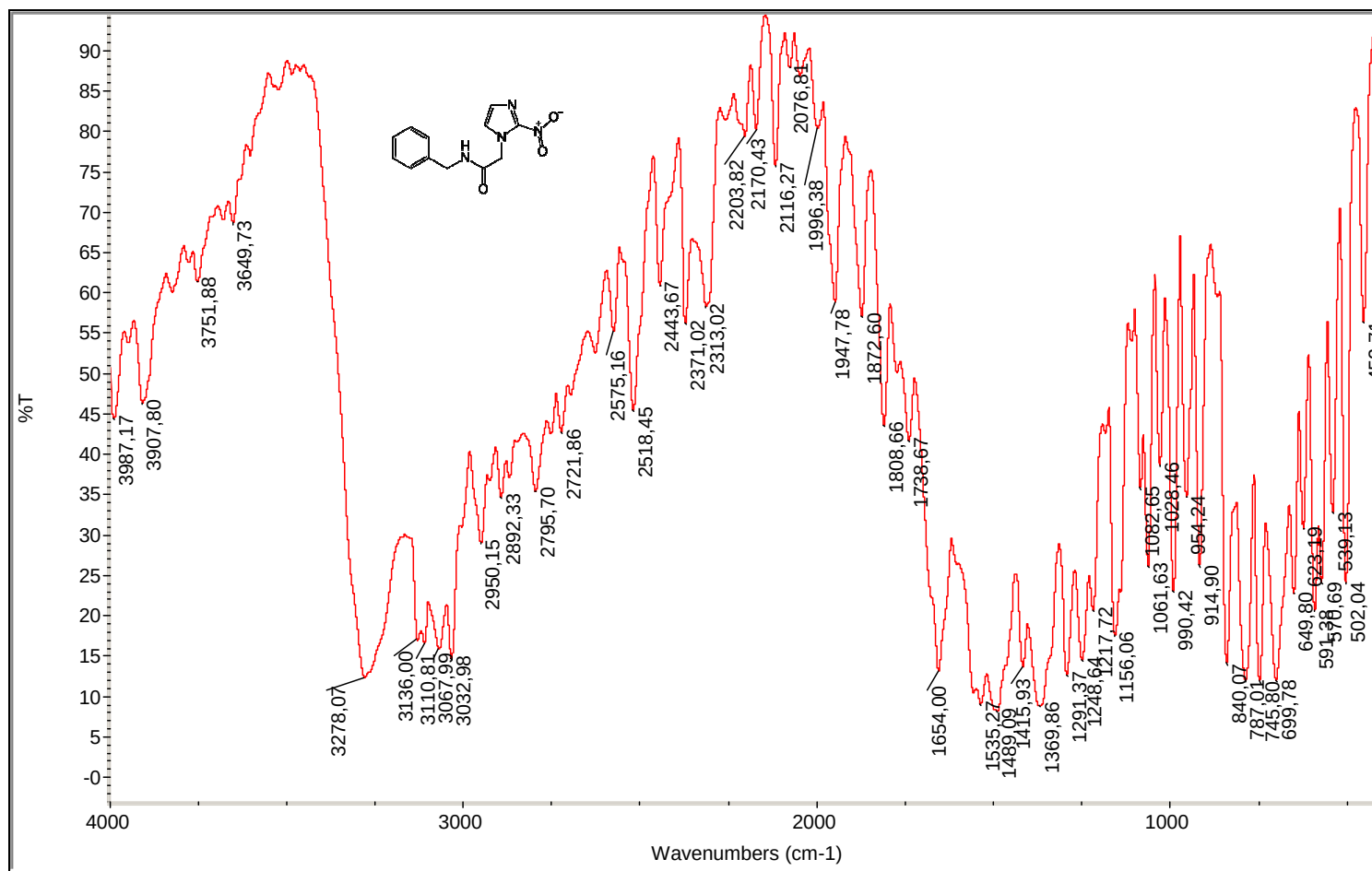
Apêndice D: Determinação da pureza por DSC do benznidazol padrão Roche



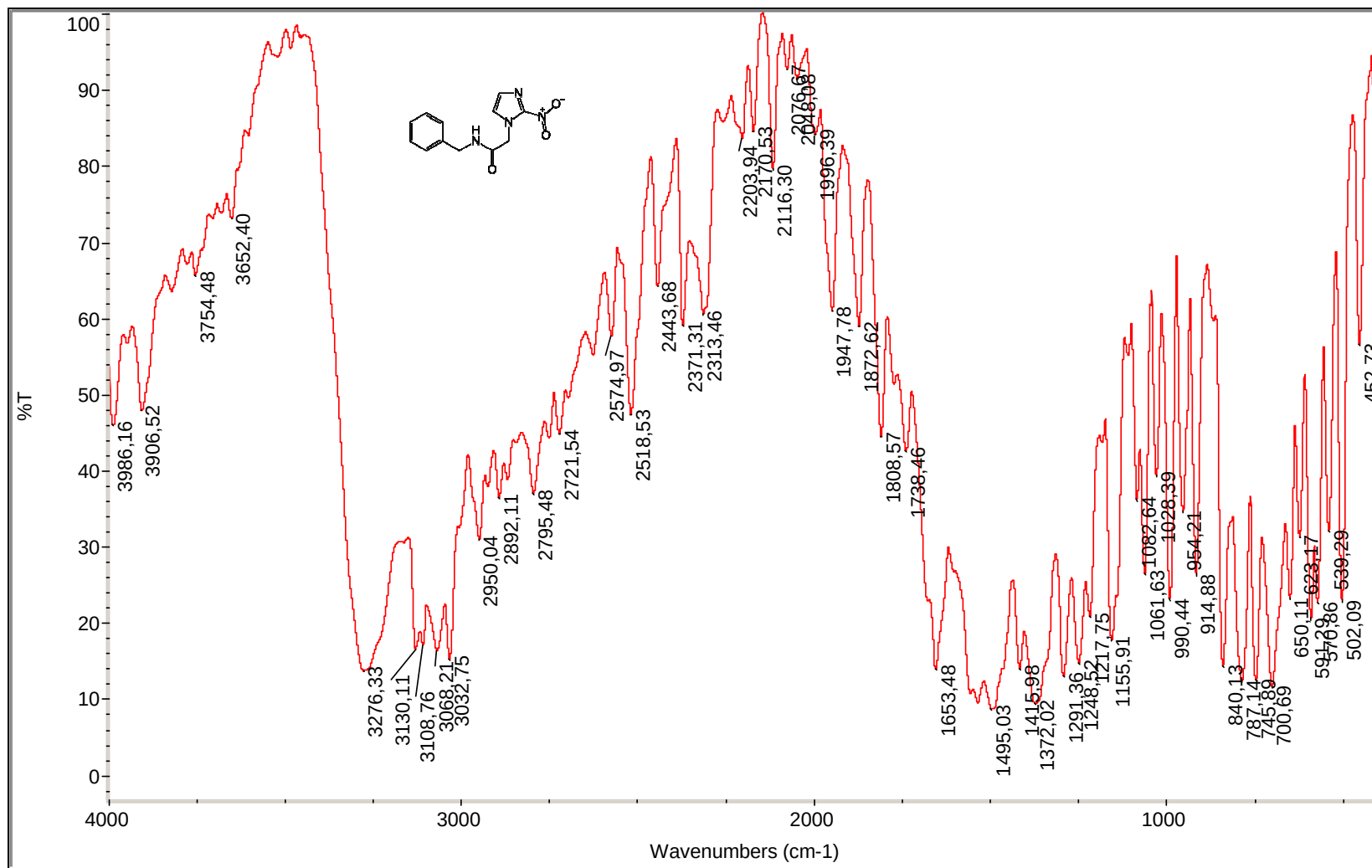
Apêndice E: Resultado da difração de raios X para o benznidazol lote 15986



Apêndice F: Resultado da difração de raios X para o benznidazol lote 15986



Apêndice G: Espectro de FT-IR da matéria-prima de benznidazol lote 15772



Apêndice H: Espectro de FT-IR da matéria-prima de benznidazol lote 15986

7. DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DA SUSPENSÃO PEDIÁTRICA DO BENZNIDAZOL

7. DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DA SUSPENSÃO PEDIÁTRICA DO BENZNIDAZOL

7.1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É a maior causa de morbidade e mortalidade na América Latina (SOSA ESTANI, 2009). Portanto, causa um grande impacto na saúde pública, apesar do controle do vetor com inseticidas ter sido bem sucedido em alguns países (LORCA, 2002).

Fatores sócio-econômicos que prevaleceram nas últimas três décadas na América Latina produziram a migração em larga escala da população rural para as áreas periurbanas, o que deu origem a “urbanização do parasitismo” e que trouxe como consequência novas modalidades de transmissão tais como a forma congênita da doença além dos casos relacionados a transfusão sanguínea, as quais acontecem sem a presença do vetor (NEGRETTE, 2005; SOSA ESTANI, 2009).

A infecção de Chagas congênita se baseia nos registros hospitalares que são detectados a partir dos casos sintomáticos, os quais apresentam febre, edema, linfadenopatia, anemia, hepatoesplenomegalia e cardiomegalia. É recomendado que os casos assintomáticos também sejam acompanhados. Os fatores de risco desta transmissão são pouco compreendidos (NEGRETTE, 2005).

O tratamento específico com o benznidazol 5-7 mg/Kg/dia durante 60 dias é efetivo em crianças com a infecção por *T. cruzi* (ANDRADE, 1996; SOSA ESTANI, 1998; NEGRETTE, 2005) pois elimina o parasito, comprovado pelo progressivo declínio dos anticorpos. A detecção precoce e tratamento é uma questão relevante de saúde pública, visto que este procedimento conduz a cura dos infectados e que acima de 30% das crianças infectadas não tratadas progridem para a doença de Chagas crônica (NEGRETTE, 2005).

A falta de formulações desenvolvidas para as crianças deixa 40% da população mundial em risco, expondo-as a reações adversas, subdoses terapêuticas, abandono ao tratamento, além de não proporcionar o acesso a novos medicamentos. As grandes indústrias farmacêuticas aos olhos do público, ignoraram o mercado pediátrico por considerá-lo pequeno, assim como também consideram que o desenvolvimento de medicamentos pediátricos é muito problemático (MILNE, 2008).

Segundo Gupta e cols (2006), no desenvolvimento de produtos é relevante considerar a composição, os componentes e o processo de fabricação. Em seguida, o produto terá que comprovar sua estabilidade a longo prazo.

O desenvolvimento de medicamentos pediátricos é um desafio, que já foi reconhecido pela Iniciativa Européia de Formulação Pediátrica (EuPFI, sigla em inglês) (CRAM, 2009). As formulações orais para administração pediátrica durante o seu desenvolvimento tem que manter associados a relação entre determinação da dosagem terapêutica com o peso do paciente, sendo também importante a definição dos caracteres organolépticos. As propriedades organolépticas e físico-químicas do ativo, tais como solubilidade, estabilidade química e sabor podem ser utilizadas para selecionar qual forma farmacêutica será proposta (STRICKLEY, 2008).

Um destes desafios está relacionado a conseguir mascarar o sabor do fármaco quando formulado durante o desenvolvimento do medicamento pediátrico para administração oral (CRAM, 2009). Matsui (2007) cita que a palatabilidade nos medicamentos orais é crucial para manter a adesão ao tratamento.

Há 17 diferentes formas farmacêuticas para administração oral pediátrica, como a solução, xarope, suspensão, comprimido, comprimido sulcado e mastigável, de desintegração oral, assim como àquelas para serem manipuladas como pó para suspensão, comprimido para suspensão, até

cápsula contendo a mistura para ser administrado juntamente a comidas ou bebidas (STRICKLEY, 2008).

Recentemente, tem-se aumentado o desenvolvimento das formulações pediátricas com incentivos regulatórios (STRICKLEY, 2008).

Os fármacos raramente são administrados isoladamente. A alta potência e a baixa dosagem da maioria destes, atualmente utilizados, praticamente excluem qualquer possibilidade de que se possa obter a dose adequada e segura sem que seja processado em uma forma farmacêutica. Assim, os fármacos fazem parte de uma formulação combinada com um ou mais excipientes com funções variadas e específicas (ANSEL, 2005).

O formulador deve considerar o uso de técnicas de otimização para alcançar a melhor concepção do produto. Os métodos utilizados no desenvolvimento de uma formulação, por tentativa e erro, não possibilitam ao formulador perceber a proximidade que uma dada formulação está daquela considerada ótima, e sem um modelo para definir as relações entre as variáveis da formulação e da produção, e os níveis e valores para a qualidade das propriedades do produto não é possível tomar decisões quanto à definição dos objetivos a atingir. E como resultado dos vários objetivos em confronto que se podem identificar na concepção de uma suspensão farmacêutica, a formulação e a produção deste devem ser objeto de uma otimização matemática (LACHMAN, 2001).

Dando continuidade à pesquisa, foi proposto o desenvolvimento de uma suspensão contendo o benznidazol.

Assim, a formulação deve apresentar boa flexibilidade para as quantidades a serem medidas, ou seja, medidas com exatidão, considerando a variedade de peso, desde neonatos a crianças na primeira infância, além de possuir embalagem com capacidade para atender ao longo período de tratamento.

Vários excipientes foram propostos. Excipientes como a carboximetilcelulose sódica (CMC) é largamente utilizada para formulações tópicas e orais, com o objetivo principal de incrementar a viscosidade da preparação. As soluções aquosas viscosas obtidas são usadas para veicular

pós suspensos. Para a Farmacopéia Americana 28, a carboximetilcelulose sódica é um sal sódico de um policarboximetil éter de celulose, com peso molecular de 90000 a 700000. Em soluções aquosas são estáveis a pH entre 2-10. A concentração recomendada varia entre 0,1 a 1,0%, na função como agente suspensor (ROWE, 2006).

Já a Tabulose SC[®] é uma forma coloidal da celulose microcristalina comumente conhecida como celulose gel. É usada principalmente como agente suspensor, isolado ou em combinação com outros derivados de celulose. Esta combinação incrementa a estabilidade e a compatibilidade da dispersão polimérica. Apresentam-se como suas principais características, dentre outras: hidratação rápida com viscosidade equilibrada, estabilidade com pH entre 5-11, estabilidade em faixas largas de temperatura, após a dispersão, outros líquidos hidrossolúveis podem ser adicionados sem floculação (TABULOSE SC, 2008).

A glicerina é largamente utilizada nas formulações farmacêuticas oral, tópica, otológica, oftálmica e parenteral. Sendo que sua utilização na forma farmacêutica para administração oral pode contribuir como solvente, edulcorante, conservante e viscosificante. Para desenvolver estas funções deve estar presente na formulação em uma concentração inferior a 30% (ROWE, 2006).

O propilenoglicol é utilizado como solvente e conservante em formulações para administração parenteral e não-parenteral. Desenvolvendo a função de conservante deve variar a concentração entre 15 a 30% e como co-solvente entre 10 a 25% (ROWE, 2006).

Os parabenos são ésteres do ácido p-hidroxibenzóico e são comumente utilizados como conservantes em medicamentos, cosméticos e alimentos. São utilizados comumente quatro compostos: o metil, etil, propil e butilparabeno. A sua solubilidade decresce quando aumenta a cadeia alquila, sua potencialidade antimicrobiana aumenta com o aumento da cadeia, por exemplo, o butilparabeno é mais eficiente contra o *Aspergillus fumigatus* que o propilparabeno. A associação de dois ou mais parabenos, tornou-se prática comum, com isto, a ação antimicrobiana aumenta. A concentração mais comum é de 0,1% de metilparabeno e de 0,02% de propilparabeno (ANSEL, 2005; SONI, 2005). Segundo o Rowe (2006) para soluções e suspensões

recomenda-se uma faixa entre 0,015 a 0,2% e para o propilparabeno entre 0,01 a 0,02%.

O uso de edulcorante é recomendado na concentração de 0,075 a 0,6% para a sacarina sódica. É também citado que o poder edulcorante do ciclamato de sódio é cerca de 30 vezes maior que o da sacarose e este ainda é incrementado quando em combinação com a sacarina (ROWE, 2006).

Na literatura, há várias citações a respeito de utilização dos edulcorantes ciclamato e sacarina, na proporção de 2:1. O sucesso da sacarina pode ser atribuído a alguns fatores: preço cerca de 20 vezes menor que a sacarose, não é metabolizado pelo organismo, não afeta os dentes, é estável e tem ampla faixa de aplicações. Já o ciclamato possui a vantagem particular de reduzir o gosto amargo residual da sacarina, quando associado a ela, e também não é metabolizado (CARDELLO, 2001).

Os agentes flavorizantes são excipientes utilizados com a finalidade de realçar o sabor dos medicamentos. Geralmente, são segredos industriais. Podem ser naturais e artificiais e sendo as reações adversas raras devido a mínima concentração presente nas formulações (BALBANI, 2006).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação pediátrica líquida para administração oral em neonatos e crianças.

Baseando-se em discussões técnicas com a presença de “experts” no tratamento da doença de Chagas em neonatos e crianças e também utilizando informações extrapoladas das preparações extemporâneas utilizadas nestes tratamentos publicadas em artigos científicos, foi definida a concentração da suspensão a 2% considerando argumentações de Malta (1996), que citou que a dose pediátrica pode ser de 10 mg/Kg/dia no início do tratamento (mais ou menos 15 dias), depois passar a 5 mg/Kg/dia até 60 dias.

Foi considerando o peso médio de um neonato (3,0 Kg), que diariamente teriam que ser administrado 30 mg, ou 1,50 mL da suspensão a 2% de benznidazol. Durante 15 dias, corresponderiam a 22,50 mL. Nos 45 dias seguintes do tratamento, por dia, seriam administrados 15,0 mg, ou 0,75 mL, totalizando 33,75 mL da suspensão, ao fim de 45 dias de tratamento. Este neonato, consumiria 56,25 mL do frasco de suspensão de benznidazol 2%, proposto para ter volume nominal de 100 mL. Para uma criança de 10 Kg, esta

consumiria 187,5 mL do produto acabado. A esta criança, seria disponibilizado dois frascos para tratamento completo.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Insumos farmacêuticos para farmacotécnica

Benznidazol, carboximetilcelulose (600 a 1200), Tabulose[®] (carboximetilcelulose+celulose microcristalina), glicerina, propilenoglicol, propilparabeno, metilparabeno, ciclamato, sacarina, aroma de banana, chocolate branco, baunilha, abacaxi, silicone anti-espumante.

Todos os produtos foram previamente analisados e aprovados pelo controle de qualidade do LAFEPE.

7.2.2 Reagentes analíticos

Água purificada por osmose reversa, cloreto de sódio (NaCl) Merck[®], lauril sulfato de sódio Vetec[®], ácido clorídrico (HCl) Carlo Erba[®], fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) Carlo Erba[®], acetonitrila grau HPLC JT Baker[®].

7.2.3 Equipamentos e instrumentos da farmacotécnica

Balança semi-analítica (Marte – modelo A500) e Filizola

Aagitador mecânico (Fisatom 713D)

Moinho coloidal (Meteor Mod 132M).

7.2.4 Equipamentos e Instrumentos analíticos

Balança Shimadzu[®] AW 220, máximo de 220 g

Phmetro Tecnal[®] modelo Tec-3MP

Viscosímetro: Modelo DV-I Brookfield

Purificador Osmose reversa Milli-Q Gradiente Millipore[®]

Lavadora ultra-sônica Unique[®]

Espectrofotômetro Varian[®] Cary 50 Probe

Sistema de cromatografia Shimadzu: CLASS VP (Shimadzu®), degaseificador Membrana Degasser, bombas LK-10 ADVP, autoinjeter SIL-10 ADVP, detector SPD-10 AVP, controlador SCL-10 AVP, forno CTO-10 ASVP.

Sistema de cromatografia líquida Merck® Elite LaChrom, composto por bomba L-2130, amostrador L-2200, forno L-2300 e detector diode array L-2455

Câmaras climáticas Fanem Mod 345 (150 e 270 L) e Mecalor 1200 L

7.2.5 Vidrarias/Outros

Volumétricas calibradas e graduadas

Papel de filtro Inlab®

Unidade filtrante Millex Millipore® (0,22 µm)

7.2.6 Processo de fabricação

Foram desenvolvidos lotes de bancada, utilizando recipiente adequado para a capacidade definida, ou seja, não ultrapassando 60 a 80% da capacidade nominal.

Os excipientes foram adicionados a um volume de água purificada (60% do total) e dispersos ou solubilizados a uma velocidade de 600 rpm em agitador mecânico.

Após preparação do meio dispersante, foi adicionado o ativo, aos poucos, a uma velocidade de 1200 rpm. Em seguida, a suspensão foi passada por moinho coloidal. De volta ao agitador, o produto manipulado, foi agitado por 1 hora, com o objetivo de dispersar a espuma originada no processo anterior, foi completado o volume final com a água purificada.

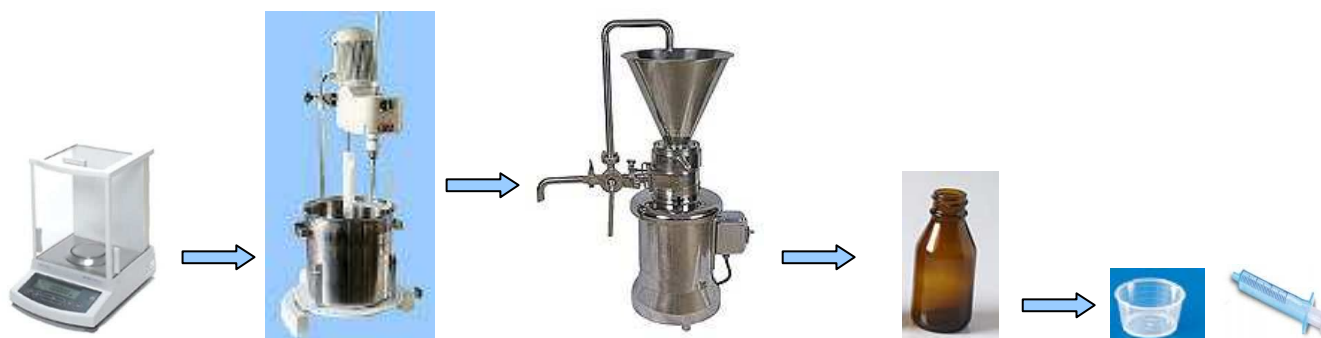


Figura 01: Etapas do processo de desenvolvimento farmacotécnico

7.2.7 Planificação de excipientes

Antes de ser iniciado o desenvolvimento farmacotécnico, o ativo benznidazol foi caracterizado. Em seguida, foi micronizado para garantir o tamanho de partícula recomendado para suspensão, inferior a 50 µm.

Em seguida, foi proposto avaliar através da manipulação de lotes de bancada (LB) as modificações dos excipientes considerando uma planificação qualitativa e quantitativa.

7.2.7.1 Testando o agente suspensor

O estudo foi iniciado com o teste para avaliar o agente suspensor (tabela 01). Duas opções foram testadas: a carboximetilcelulose, com faixa de viscosidade entre 600 a 1200 cP, já consolidada no mercado, e a Tabulose® (mistura de celulose microcristalina co-processada com carboximetilcelulose) que são ativados por agitação, hidratando-se rapidamente e formando suspensões estáveis ao calor e pH.

Tabela 01: Testando o agente suspensor

Insumos	LB 1	LB 2	LB 3	LB 4	LB 5
	(%)				
Benznidazol	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
CMC (600-1200)	0,5	1,0	2,0	-	-
Tabulose®	-	-	-	1,0	2,0
Água purificada qsp	100 mL				

7.2.7.2 Testando o agente viscosificante

Como agente viscosificante foi proposto avaliar na formulação a glicerina, nas concentrações de 20 e 30% e o propilenoglicol, nas concentrações de 15% e 25%. Foram testadas nas formulações com os agentes suspensores CMC a 1% e Tabulose® a 2%, sendo o resultado final aferido conforme observações da altura do sedimento em proveta de 250 mL e aparência final do sedimento e sobrenadante.

Tabela 02: Seleção da concentração do agente viscosificante

Insumos	LB 6	LB 7	LB 8	LB 9	LB 10	LB 11	LB 12	LB 13
	(%)							
Benznidazol	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
CMC (600-1200)	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0	-	-
Tabulose®	-	-	2,0	2,0	-	-	2,0	2,0
Glicerina	20,0	30,0	20,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Propilenoglicol	-	-	-	-	15,0	25,0	15,0	25,0
Água purificada qsp	100 mL							

7.2.7.3 Escolha dos conservantes

Após seleção preliminar dos excipientes mais críticos (agente suspensor e agente viscosificante), foram propostos para conservação da suspensão oral de benznidazol, os conservantes metilparabeno e propilparabeno em associação, na proporção 9:1, nas concentrações de 0,18 e 0,02%, respectivamente, conforme formulação da tabela 03.

Tabela 03: Adição dos agentes conservantes

Insumos	LB 14 (%)
Benznidazol	2,0
Tabulose®	2,0
Glicerina	30,0
Propilenoglicol	15,0
Metilparabeno (Nipagin®)	0,18
Propilparabeno (Nipazol®)	0,02
Água purificada qsp	200,0 mL

7.2.7.4 Avaliação de edulcorantes

A proposta para o teste de seleção dos edulcorantes foi realizado seguindo o procedimento descrito abaixo:

Separou-se 03 porções de 50 mL do lote de bancada 14 e se adicionou o ciclamato sódico, nas concentrações 0,2; 0,6; 1,2% e a sacarina sódica nas concentrações 0,1; 0,3; 0,6%, respectivamente, mantendo a proporção 2:1 de ciclamato/sacarina para cada teste (tabela 04). Cerca de 50 mL restante foi a formulação controle. A avaliação final foi organoléptica, sendo selecionado entre os voluntários uma formulação que mais agradasse ao paladar.

Tabela 04: Adição dos agentes edulcorantes

Insumos	Sacarina	Ciclamato
	%	
Benznidazol	2,0	
Tabulose®	2,0	
Glicerina	30,0	
Propilenoglicol	15,0	
Metilparabeno	0,18	
Propilparabeno	0,02	
1ª proposta (I)	0,1	0,2
2ª proposta (II)	0,3	0,6
3ª proposta (III)	0,6	1,2
Água purificada qsp	50 mL	

* Cada porção de 50 mL do LB 14.

7.2.7.5 Teste do flavorizante

Para a suspensão do benznidazol após seleção dos edulcorantes, com o objetivo de melhorar as características organolépticas e promover a aceitação pelos pacientes pediátricos foi submetida ao teste do flavorizante.

Foram selecionados 04 diferentes aromas: chocolate branco, banana, baunilha e abacaxi.

Um teste preliminar foi realizado nas porções de 50 mL já contendo os edulcorantes. Porções menores, cerca de 10 mL cada, foi acrescida dos aromas individualmente, conforme tabela 05.

Posteriormente, a opção selecionada pelos voluntários foi reproduzida, originando o LB 15, contendo as concentrações de 0,1 e 0,2%, de ciclamato e sacarina, respectivamente, além do melhor flavorizante (tabela 06).

A avaliação final foi também organoléptica, selecionando uma formulação que melhor associasse o sabor doce com o aroma atrativo a crianças.

Tabela 05: Adição dos flavorizantes

Insumos	LB 14
	%
Benznidazol	2,0
Tabulose®	2,0
Glicerina	30,0
Propilenoglicol	15,0
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Sacarina	0,1
Ciclamato	0,2
Aroma de chocolate branco	0,5
Aroma de banana	
Aroma de baunilha	
Aroma de abacaxi	
Água purificada qsp	10,0 mL

Tabela 06: Manipulação do Lote-piloto I

Insumos	LP I (%)
Benznidazol	2,0
Tabulose®	2,0
Glicerina	30,0
Propilenoglicol	15,0
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Sacarina	0,1
Ciclamato	0,2
Aroma de banana	0,5
Silicone anti-espumante	0,1
Água purificada qsp	2000,0 mL

7.2.7.6 Adição do antiespumante

Finalizado esta etapa seletiva, no lote-piloto I (tabela 06) foi adicionado um antiespumante (silicone), na concentração de 0,1%, que auxiliou na redução de espuma formada após passagem da formulação pelo moinho coloidal.

7.2.8 Controle de qualidade

A etapa de planificação foi acompanhada seguindo os parâmetros de pH e viscosidade. Também foram observadas as características de sedimentação,

o aspecto do sedimento (se compactado ou frouxo) e do sobrenadante (se límpido ou turvo). O teor foi avaliado seguindo a metodologia de Silva (2007).

A formulação final desenvolvida (lote piloto II) será acompanhada em estabilidade, segundo Resolução - RE nº 1 (BRASIL, 2005), a determinação do seu teor seguiu o método indicativo para estudo de estabilidade, co-validado para suspensão. Em paralelo, outro estudo foi realizado, apenas, em relação ao controle microbiológico. A suspensão de benznidazol a 2%, nos tempos (zero, 15 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias), foi analisada, pois, diariamente, este frasco contendo a suspensão foi aberto em ambiente não controlado durante 30 minutos, com o objetivo de simular o tempo de tratamento e sua exposição no ambiente domiciliar.

7.2.9 Metodologia analítica co-validada para suspensão pediátrica

7.2.9.1 Método para quantificar a suspensão de benznidazol a 2% em estudo de estabilidade acelerada e de longa duração

Condições Cromatográficas:

Fase estacionária: Phenomenex Luna 5 µm C18 (2), 100 Å, 250 x 4,6 mm

Fase móvel: tampão fosfato/acetonitrila (80:20), pH 2,7, isocrático

Fluxo: 1 mL/min

Detector: DAD (200 a 400 nm), com dois canais fixos 210 nm e 316 nm

Temperatura: 40 °C

Volume de injeção: 40 µL

Preparação da Fase Móvel: isocrático

Foram pesados 6,8 g de diidrogeno fosfato de potássio. O sal foi dissolvido em 800 mL de água ultra pura e acrescentados 200 mL de acetonitrila e ajustado o pH para 2,7 com ácido fosfórico 85%. Em seguida, esta fase móvel foi filtrada à vácuo.

Preparação da Solução Padrão:

Foi pesado analiticamente 10 mg da Substância Química de Referência (SQR) benznidazol, em triplicata. Estas foram diluídas com 10 mL de acetonitrila, sonicadas por 5 minutos e aferidas a 50 mL com água ultra-pura. A concentração final da solução-estoque foi de 200 ppm. Estas foram acondicionadas a uma temperatura entre 2 a 8 °C. A cada análise foi diluído 1 mL para balão volumétrico de 10 mL, o qual foi aferido com a solução diluente 1:4 (acetonitrila:água ultra-pura). Filtrado em membrana 0,45µm. A concentração final foi de 20 ppm.

Preparação da Solução Amostra:

Foi transferido 10 mL da amostra (equivalente a 200 mg de benznidazol) para um balão volumétrico de 100 mL. Foi adicionado 50 mL de acetonitrila, sonificado por 15 minutos e, em seguida, ajustado o volume com água ultra-pura. Filtrado através de papel de filtro. A concentração desta diluição foi de 2000 ppm de benznidazol.

Foi transferido, volumetricamente, 1 mL do filtrado para um balão volumétrico de 100 mL, diluído com a solução diluente (1:4 – acetonitrila:água ultra-pura), obtendo uma concentração de 20 ppm. Filtrado em membrana 0,45µm.

7.2.9.2 Parâmetros de co-validação

É necessário registrar que este método foi desenvolvido e validado como método indicativo para estudo de estabilidade e, posteriormente, validado para o benznidazol matéria-prima e as respectivas formulações desenvolvidas neste trabalho.

7.2.9.2.1 Especificidade

A especificidade do método para a suspensão foi realizada analisando uma formulação placebo da suspensão desenvolvida, esta apresentando a seguinte composição: Tabulose[®], propilenoglicol, glicerina, sacarina, ciclamato, sacarina, metilparabeno, propilparabeno, silicone anti-espumante, aroma de banana e água purificada. Foi realizada com n=6.

7.2.9.2.2 Linearidade

Foram seguidas as mesmas concentrações da faixa de linearidade já determinada para a matéria-prima (4, 8, 12, 16, 20 e 40 ppm), que foram tratadas por Análise de Variância.

Neste caso, da co-validação para a suspensão, cada análise foi acompanhada por uma curva controle.

7.2.9.2.3 Precisão

Com a formulação da suspensão de benznidazol 2% lote-piloto II, a precisão foi determinada em diferentes dias por diferentes analistas. Foi realizada com $n=6$ para a concentração média correspondente a 20 ppm. O tratamento estatístico realizado foi o teste *t de Student*.

7.2.9.2.4 Exatidão

Com a formulação da suspensão de benznidazol 2% lote-piloto II, a exatidão foi determinada em 03 diferentes concentrações (16 ppm, 20 ppm e 40 ppm), com $n=3$.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Desenvolvimento farmacotécnico

Muitas drogas são comumente utilizadas em crianças sem nunca terem sido estudadas seguindo os rigorosos critérios científicos. Embora, estes medicamentos sejam prescritos na pediatria, eles são considerados “off-label”, pois não tem em seus registros a indicação para administração em crianças (MILNE, 2008).

A Academia Americana de Pediatria fez considerações em 1998 que as formulações devem ser adequadas com a faixa etária, serem de fácil administração e com precisão de dose. A população de pacientes pediátricos se divide em 06 pequenos grupos: prematuros, a termo, lactentes e crianças pequenas, crianças em idade pré-escolar, crianças em idade escolar e adolescentes, o que orienta o desenvolvimento das formulações por faixa etária, tornando um desafio técnico que consome um longo tempo (MILNE, 2008).

A seleção dos excipientes (componentes inertes) requer grande cuidado, pois as crianças têm reações adversas a conservantes, corantes e agentes flavorizantes que rotineiramente são utilizados nas formulações adultas (MILNE, 2008).

A planificação foi iniciada pelo agente suspensor, pois no caso das suspensões a viscosidade do sistema é o objetivo desejável. É realizada a partir da incorporação ao sistema de polímeros como metilcelulose, carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, álcool polivinílico entre outros, que são utilizados com bastante frequência, pois visa a estabilidade física das partículas em suspensão, além de adequar a viscosidade (CHACRA, 1994).

Os primeiros 05 lotes de bancada (LB) foram realizados com o intuito de selecionar o agente suspensor.

Uma vez que a redispersibilidade é uma das considerações mais importantes para a aceitabilidade da suspensão e, que o sedimento formado deve ser facilmente redisperso sob moderada agitação para originar um sedimento homogêneo, a medição do volume de sedimentação e a facilidade com que a redispersão ocorre são duas das técnicas comuns para avaliação das suspensões (PATEL, 2001).

Dentre as formulações testadas com o CMC a 0,5; 1,0 e 2,0 % foram obtidos os seguintes resultados: o LB 1 apresentou sedimento logo após a manipulação de 52 mL, e de 28 mL, após 48 horas, estando com sobrenadante turvo e sem partículas maiores em suspensão. O LB 2 não sedimentou logo após a manipulação, porém, após 48 horas, estava com 52 mL de sedimento, e por fim, o LB 3 não foi possível avaliá-lo, pois durante o processo de manipulação foi observado sua gelificação.

A combinação binária (ativo+agente suspensor – CMC) que permaneceu sendo avaliada neste estudo foi àquela que continha a concentração de CMC a 1,0 %, ou seja, o LB 2.

As formulações realizadas com 1,0 e 2,0% de Tabulose SC[®], respectivamente, os LB 4 e LB 5, foi observado que o LB 4, sedimentou logo após a manipulação, 125 mL e após 48 h, já havia um sedimento que correspondia a 88 mL, com sobrenadante turvo e algumas finas partículas em suspensão. O LB 5, apresentou-se sem sedimento após a manipulação e assim se manteve durante uma semana, sendo selecionado, para dar continuidade ao estudo.

Uma outra avaliação realizada que corroborou na seleção do LB 2 foi realizada através da técnica de análise reológica, utilizando o viscosímetro, pois esta possibilita avaliar o comportamento e o tipo do veículo sob as características estruturais das partículas para efeitos comparativos (PATEL, 2001). Os resultados apresentados para as formulações com a Tabulose SC[®] confirmaram a baixa viscosidade do sistema, porém com estabilidade de sedimentação. Em paralelo, foi avaliado o pH das preparações, considerando que os agentes suspensores em estudo exigem faixa de pH ideal para garantir a estabilidade física do sistema.

Tabela 07: Avaliação dos parâmetros de pH e viscosidade na avaliação do agente suspensor

Lote de bancada (LB)	pH	Viscosidade (cP)
1	6,77	425
2	7,10	785
3	7,10	1052
4	6,63	122
5	6,49	235

Para avaliação do agente viscosificante (glicerina) foi feito um planejamento de $2^2 = 4$, sendo manipulados 04 lotes de bancada (LB).

Foi observado que uma melhor aparência na suspensão foi obtida com a adição da glicerina, ou seja, molhando as partículas em suspensão, estabilizando a preparação. No LB 7, também se observou uma melhor característica no sedimento, mais frouxo, podendo atribuir a função co-solvente da glicerina também a redução da resistência a viscosidade na preparação.

Tabela 08: Avaliação dos parâmetros de pH e viscosidade na avaliação do agente viscosificante (glicerina)

Lote de bancada (LB)	pH	Viscosidade (cP)
6	6,25	68
7	6,27	82
8	6,87	364
9	6,42	508

Após a adição do propilenoglicol observou-se que este manteve as características de volume de sedimento e sobrenadante já observadas anteriormente, no entanto, proporcionou uma melhor reologia do líquido, sendo selecionada a concentração mínima testada (15%). Os resultados, referentes a pH e viscosidade, estão na tabela 09.

Tabela 09: Avaliação dos parâmetros de pH e viscosidade na avaliação do agente viscosificante (glicerina+propilenoglicol)

Lote de bancada (LB)	pH	Viscosidade (cP)
10	6,28	98
11	6,34	94
12	6,60	1010
13	6,83	1680

As suspensões com veículo aquoso, geralmente, são acrescidas de conservantes.

Os conservantes são substâncias incorporadas aos produtos farmacêuticos e cosméticos de múltiplas doses, tendo como finalidade evitar a proliferação microbiana e conseqüentemente manter a estabilidade, conservando-os livre de deteriorações. Eles podem ter atividade bactericida ou fungicida (RAMOS, 2010).

O primeiro aspecto a ser considerado na escolha do conservante é a regulamentação do uso de substâncias de ação conservante permitida. A lista de conservantes permitidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) consta na Resolução de Diretoria Colegiada de 162 de 11 de setembro de 2001.

Balbani em 2006 publicou um estudo, no qual os parabenos aparecem em formulações líquidas com mais frequência que outros conservantes. O metilparabeno corresponde a 45,2% das formulações pesquisadas, o propilparabeno em 35,6%, o benzoato de sódio em 32,8% e o metabissulfito de sódio em apenas 11,0%.

Os conservantes foram adicionados na proporção de 9:1 de metiparabeno e propilparabeno. Sua eficácia será medida durante a estabilidade da suspensão, avaliando os parâmetros de controle microbiológico, como contagem microbiana e ausência de patógenos.

Romanowsky e Schueller (2005) relataram que a contaminação de um produto pode ocorrer durante a produção, proveniente de matérias-primas ou dos equipamentos, após a produção, proveniente de contato com recipientes de estocagem ou material de acondicionamento sujo e durante sua utilização pelo consumidor. Assim, frascos a temperatura ambiente foram expostos simulando a administração e também serão avaliados microbiologicamente.

Muitas qualidades do produto, tais como, o sabor e a aparência não podem ser medidas quantitativamente. No entanto, devem ser avaliadas e consideradas visto que o desempenho satisfatório do medicamento frente ao paciente, ou seja, a sua aceitabilidade está diretamente relacionada a esta seleção (LACHMAN, 2001).

As preparações líquidas e mastigáveis, geralmente, são desagradáveis quanto ao paladar, sendo necessário, às vezes, combinar diferentes edulcorantes em um mesmo produto, a fim de superar este inconveniente. Para a indústria farmacêutica o edulcorante mais utilizado é a sacarose (açúcar), e seus substitutos artificiais (sacarina sódica, ciclamato de sódio e aspartame) (BALBANI, 2006).

A proporção selecionada neste estudo, referente aos edulcorantes ciclamato e sacarina foi realizada a partir da opção de voluntários não

treinados, os quais optaram pela formulação contendo 0,2% de ciclamato e 0,1% de sacarina (LB 14 – I), estes justificaram esta escolha registrando que as outras formulações apresentaram-se com acentuado sabor doce e residual amargo. Os resultados de pH e viscosidade desta formulação foram, respectivamente, 6,63 e 958 cP.

Outra definição qualitativa foi seguida para a escolha do agente flavorizante, também a partir de voluntários não treinados, sendo os mesmos da etapa anterior, porém em dias diferentes, indicaram que suas preferências foram para o “flavor” de chocolate branco e de banana. No entanto, foi sugerido reduzir a concentração, considerando que o tratamento é longo (60 dias) e poderia ser uma característica compromettesse a adesão ao tratamento pelas crianças.

Assim, foi finalizado esta etapa que antecede o estudo de estabilidade, partindo do princípio que o desenvolvimento do medicamento só estará concluído após a seleção da embalagem, que será definida após a conclusão da estabilidade e posterior transposição. Abaixo na tabela 10, está descrita a formulação que foi produzida para acompanhamento em estudo de estabilidade, porém foi verificado que na etapa de passagem da preparação em moinho coloidal, houve excesso de espuma, sendo proposto a adição do agente anti-espumante.

Tabela 10: Formulação final

Insumos	Lote Piloto I (%)
Benznidazol	2,0
Celulose microcristalina + carboximetilcelulose sódica (Tabulose®)	2,0
Glicerina	30,0
Propilenoglicol	15,0
Metilparabeno (Nipagin®)	0,18
Propilparabeno (Nipazol®)	0,02
Sacarina sódica	0,1
Ciclamato sódico	0,2
Aroma de banana	0,4
Silicone antiespumante (Simeticona®)	0,1
Água purificada qsp	200,0 mL

O principal uso de simeticona® como excipiente é como agente anti-espumante durante a fabricação de medicamentos. É recomendado, no Rowe (2006), a concentração entre 1 a 50 ppm. O pH desta formulação foi 7,05 e a viscosidade de 985 cP.

O doseamento da suspensão de benznidazol 2% foi realizado, apenas, no LP I, por cromatografia líquida de alta eficiência, segundo Silva (2007), sendo obtido um teor de 95,10%.

No entanto, o método utilizado é para determinação do teor em rotina fabril, para o acompanhamento da suspensão em estabilidade, será utilizado o método desenvolvido indicativo para estudo de estabilidade que foi co-validado para suspensão.

7.3.2 Co-validação do método indicativo para estudo de estabilidade (MIEE)

O método foi co-validado segundo os parâmetros de linearidade, especificidade e precisão conforme a RE nº 899 (BRASIL, 2003) e o Guia da ICH (1995), a partir do método indicativo para estudo de estabilidade da matéria-prima desenvolvido e validado neste trabalho.

A mesma linearidade preparada para validação do método para quantificação da matéria-prima foi utilizada para as formulações farmacêuticas desenvolvidas, a partir das soluções-estoque para cada SQR (nitroimidazol, benznidazol e benzilcloroacetamida), três curvas autênticas e mistas, nas concentrações 4; 8; 12; 16; 20 e 40 ppm foram obtidas.

A especificidade do método foi avaliada através da injeção de amostras de formulação placebo.

Cada parâmetro da validação foi acompanhado por curva controle preparada a partir da solução-estoque, diariamente, nas concentrações de 16, 20 ppm e 40 ppm contendo os padrões de aminoimidazol sulfato, 2-nitroimidazol, benznidazol e N-benzilcloroacetamida.

Os resultados demonstraram a especificidade do método para os excipientes que compõem a formulação, conforme cromatograma (Apêndice A) visto que no tempo de retenção definido para o benznidazol não há interferência dos componentes da formulação.

Também para a precisão da determinação do teor de benznidazol na suspensão. Conforme resultados apresentados na tabela 11. Este é considerado com repetitividade e precisão entre dias e analistas.

Tabela 11: Resultados da precisão do método

Amostras	Repetitividade	Precisão	
	Analista 1	Dia1 Analista1	Dia2 Analista2
	Concentração (ppm)		
1	98,96	104,67	103,73
2	101,87	102,82	102,42
3	97,38	101,26	101,71
4	96,30	100,73	105,55
5	96,09	101,53	100,39
6	93,21	100,54	101,40
Média	97,30	101,93	102,53
CV (%)	3,01	1,54	1,80

Estatisticamente, para a repetitividade foi apresentado como resultado um CV inferior a 5% e a precisão intermediária após aplicação do teste “t Student”, apresentou t calculado 0,611 e este foi menor que o t tabelado 2,228, com 95% de confiança. Portanto, pode ser concluído que o método em estudo é preciso.

Os resultados para a exatidão do método foi comprovado, conforme tabela 12, em três níveis de concentração, um mínimo, um médio e um máximo.

Tabela 12: Resultados da exatidão do método

Amostras	16 ppm (80,00%)	20 ppm (100,00%)	40 ppm (200,00%)
1	76,83	98,96	195,56
2	77,02	101,87	195,17
3	76,43	97,38	194,65
Média	76,76	99,40	194,91
CV (%)	0,39	2,29	0,23
Exatidão (%)	95,95	99,40	97,45

7.3.3 Estudo de estabilidade

O lote piloto II foi manipulado para 08 litros e acondicionado em frascos de vidro âmbar contendo 100 mL cada, submetidos ao estudo de estabilidade, segundo a RE nº 01 (BRASIL, 2005).

Os parâmetros de controle de qualidade foram avaliados, como: descrição, pH, viscosidade, densidade, teor, contagem microbiológica e contagem de patógenos (tabela 13), os quais serão especificados no estudo de estabilidade e, também tempo/velocidade de sedimentação.

Tabela 13: Resultado do controle de qualidade da suspensão de benznidazol 2% do lote piloto II (tempo zero de estabilidade)

Parâmetros	Resultados
Descrição	Suspensão cor branco amarelado, aroma de banana, isento de partículas estranhas
pH	6,75
Viscosidade	160 rpm
Densidade	1,088 g/mL
Teor (90 a 110%) – CLAE/MIEE	99,40%
Fungos e leveduras	< 10 UFC/mL
Bactérias aeróbios	< 10 UFC/mL
Patógenos	Ausência

Outra avaliação para acompanhar a estabilidade da suspensão durante o tempo de tratamento foi realizada como controle microbiológico de exposição, seguem resultados na tabela 14.

Tabela 14: Resultado do controle de qualidade da suspensão de benznidazol 2% microbiológico durante período de administração

Parâmetros	Resultados		
	T _{ZERO} dias	T ₁₅ DIAS	T ₃₀ DIAS
Fungos e leveduras	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
Bactérias aeróbias	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
Patógenos	Ausência	Ausência	Ausência

É relevante destacar que o acompanhamento do lote piloto II em proveta graduada para avaliar tempo de sedimentação, confirmou o resultado já encontrado em lote de bancada, pois após 30 dias não houve sedimentação. Este resultado implica em uma maior uniformidade das partículas do

benznidazol em suspensão, não proporcionando formação de “caking”.

7.4. CONCLUSÕES

O desenvolvimento farmacotécnico para a forma farmacêutica suspensão propôs uma concentração de benznidazol que permitirá a administração com ajuste posológico por peso, conforme é recomendado pelas agências regulatórias internacionais e diversos comitês de “experts” em pediatria, proporcionando maior segurança ao tratamento e consequentemente mais eficácia, sem riscos de sub ou sobredoses.

Os caracteres organolépticos foram obtidos para melhorar a adesão ao tratamento.

Foi co-validada uma metodologia indicativa para estudo de estabilidade, a qual está sendo utilizada para acompanhamento do estudo de estabilidade da suspensão em embalagem de frasco de vidro âmbar.

7.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.S.; ZICKER, F.; OLIVEIRA, R.; SILVA, S.A., Luquetti, A.; L., TRAVASSOS, I.A.; ANDRADE, S.; ANDRADE, J.G., MARTELLI, C.. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early infection. *The Lancet*, v. 348, n. 9039, p. 1407-1413, 1996.

ANSEL, H.C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. New York: Lippincott Williams & Wilkins, Eight Edition, 2005.

BALBANI, A.P.S.; STELZER, L.B.; MONTOVANI, J.C.. Pharmaceutical excipients and the information on drug labels. *Rev Bras Otorrinolaringol*, v.72, n. 3, p. 400-406, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 899 de 29.05.2003, DOU de 02.06.2003. *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 01, de 29.07.2005, DOU 1º.08.2005. *Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade*, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº 162, de 11.09.2001. DOU de 12.09.2001. *Lista de Substâncias de Ação Conservante para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes*. 2001.

CARDELLO, H.M.A.B.; SILVA, M.A.A.P.; DAMÁSIO, M.H. Avaliação tempo-intensidade de doçura e amargor de aspartame e ciclamato/sacarina em equivalência a sacarose em altas concentrações. *CEPPA*. v.19, n. 2, p. 391-410, 2001.

CHACRA, N.A.B.. *Suspensão oftálmica de dexametasona e polimixina B: formulação e avaliação da eficácia antimicrobiana de conservantes*. 1994. 169f. Dissertação (Mestrado). Universidade do Estado de São Paulo - USP, São Paulo, 1994.

CRAM, A.; BREITKREUTZ, J.; DESSET-BRÈTHES, S.; NUNN, T.; TULEU, C.. Challenges of developing palatable oral paediatric formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 365, p. 1-3, 2009.

FLORENCE, Alexander T.. Neglected diseases, neglected technologies, neglected patients? *International Journal of Pharmaceutics*, v. 350, p. 1-2, 2008.

GUPTA, E.; BARENDT, D.M.; YAMASHITA, E.; LENTZ, K.A.; HARMSZE, A.M.; SHAH, V.P.; DRESSMAN, J.B., LIPPER, R.A. Review of global regulations concerning biowaivers for immediate release solid oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, p. 315 – 324, 2006.

ICH. *Draft guidelines on validation of analytical procedures: definitions and terminology*, Federal Register, v. 60, 11260. Switzerland. 1995.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L.. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbekian, 2001.

LORCA, M.. La enfermedad de Chagas congênita, transfusional y otras vías em el contexto de la interrupción de la transmisión vectorial. *Rev Pat Trop.*, v.31, p. 86-89, 2002.

MALTA, J.. Doença de Chagas. São Paulo: Sarvier, 1996. 202p.

MATSUI, D.. Current issues in paediatric medication adherence. *Paediatr. Drugs*, v. 9, p. 283-288, 2007.

MILNE, C.P.; BRUSS, J.B.. The economics of pediatric formulation development for off-patent drugs. *Clinical Therapeutics*, v. 30, n. 11, p. 2133-2145, 2008.

NEGRETTE, O.S.; MORA, M.C.; BASOMBRÍO, M.A.. High Prevalence of Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection and Family Clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics*, v. 115, n. 6, p. 668 – 672, 2005.

PATEL, N.K.; KENNON, L.; LEVINSON, R.S.. Suspensões. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANING, J.L.. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica, Lisboa: Calouste Gulbekian, v. II, p. 819 – 854, 2001.

RAMOS, Selma Verônica Vieira. *Validação da metodologia analítica aplicada ao controle de qualidade microbiológico de formas farmacêuticas líquidas e determinação da eficácia dos conservantes*. 2010. 164f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, 2010.

ROMANOWSKI, P.; SCHUELLER, R.. Emerging technologies and the future of cosmetic science. *Cosmet. Toiletries*, v. 120, p. 67-74, 2005.

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

SILVA, A.L.M.; SOARES SOBRINHO, J.L.; SILVA, R.M.F.; LIMA, L.G.; ROLIM NETO, P.J.. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de benznidazol para doença de Chagas. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1163 – 1166, 2007.

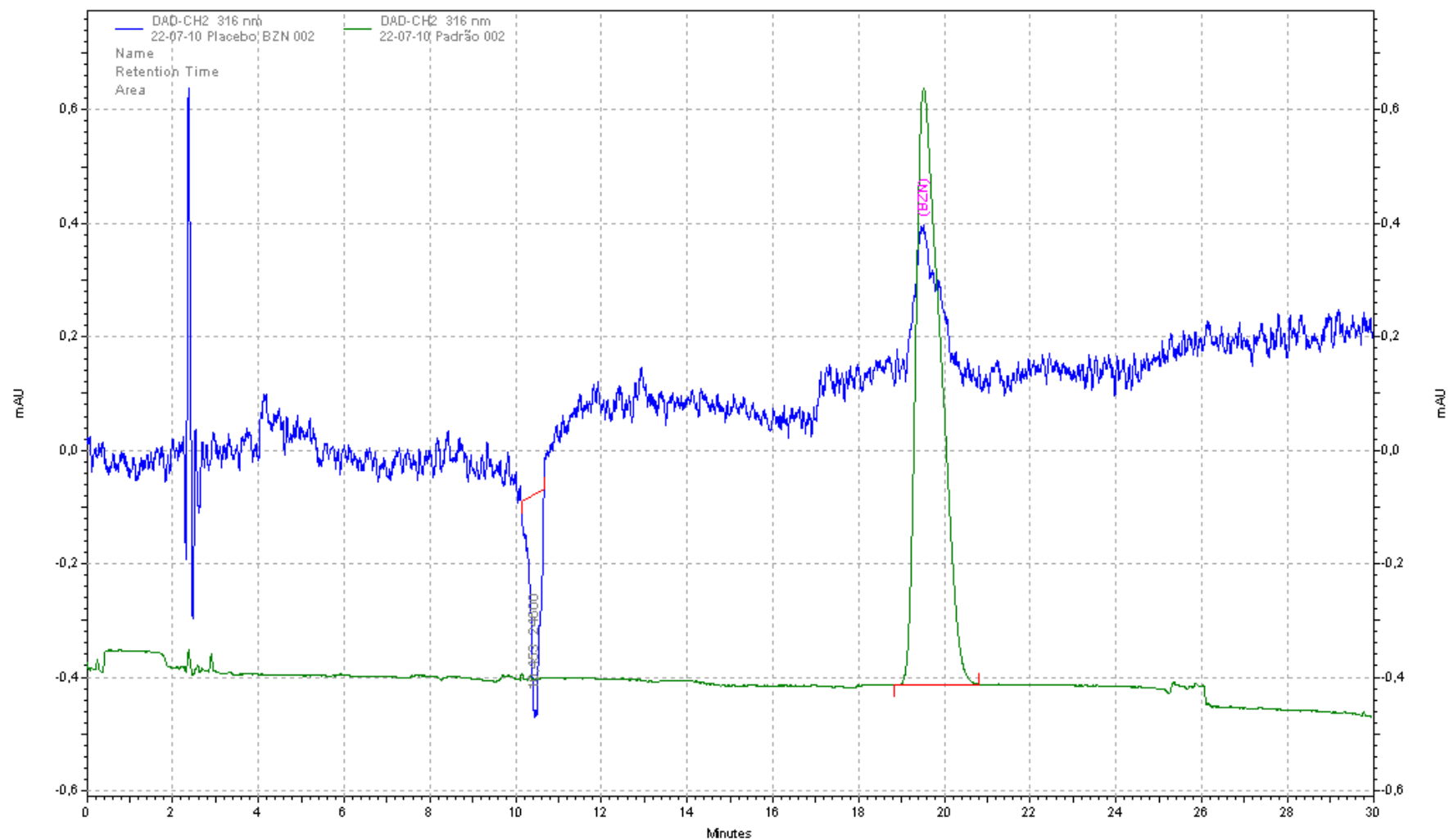
SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of ρ -hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chem. Toxicol.*, New York, v. 43, p. 985-1015, 2005.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA E.L.; RUIZ, A.M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B.M.; YAMPOTIS, C.. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 59, p. 526-529, 1998.

SOSA-ESTANI, S.; CURA, E.; VELÁSQUEZ, E.; YAMPOTIS, C.; SEGURA, E.L.. Etiological treatment of young women infected with *Trypanosoma cruzi*, and prevention of congenital transmission. *Rev Bras Med Trop.*, Uberaba, v.42, n.5, 2009.

STRICKLEY, R. G.; IWATA, Q.; WU, S.; DAHL, T. C.. Pediatric drugs - a review of commercially available oral formulations. *J Pharm Sci*, v. 97, p. 1731-1774, 2008.

TABULOSE SC. Disponível em: <http://www.blanver.com.br/viscotel.htm>. Acesso em 22/12/2008.



Apêndice A: Cromatograma da suspensão placebo e do padrão de benznidazol, no comprimento de onda 316 nm

8. ESTUDO DE SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO PARA O BENZNIDAZOL, FÁRMACO POUCO SOLÚVEL

8. ESTUDO DE SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO PARA O BENZNIDAZOL, FÁRMACO POUCO SOLÚVEL

8.1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é o maior problema de saúde pública do Brasil. O tratamento disponível utiliza a via oral e uma de suas desvantagens é o fato do benznidazol ser pouco solúvel (LAMAS, 2006).

O sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) é usado para classificar um grupo de fármacos segundo as suas características de solubilidade e de permeabilidade. As substâncias Classe II são pouco solúveis mas altamente permeáveis, e sua biodisponibilidade é limitada pela taxa de dissolução. A taxa de dissolução pode ser acelerada por melhoria nas características de molhabilidade do pó (PURVIS, 2007).

Considerando o modelo de dissolução de Noyes-Whitney que mostra que fatores como a difusão do fármaco, a solubilidade no trato gastrointestinal, a área superficial umedecida pelos fluidos intestinais e a própria hidrodinâmica do trato gastrointestinal, influenciam a determinação da taxa de dissolução *in vivo*, associados ainda à forma cristalina e à solubilidade aquosa, além da presença dos tensoativos nativos (HORTER, 2001).

Em geral, o teste de dissolução de ponto único não caracteriza completamente a dosagem da forma farmacêutica e portanto, o perfil de dissolução e o perfil de dissolução comparativo é recomendado recentemente pelas Agências Regulatórias. Para mudanças após aprovação como (i) *scale up*, (ii) local de fabricação, (iii) componente e composição, (iv) mudança de equipamento e processo, uma comparação entre os perfis de dissolução antes da mudança e após a mudança é recomendado no “Scale-up and Post-Approval Changes Guidance for Immediate Release Products (SUPAC-IR)” (SHAH, 1998).

Para orientar o comportamento do ativo e consequentemente da forma farmacêutica desenvolvida, *in vivo*, foi realizada a determinação da solubilidade em potenciais meios utilizados nos estudos de dissolução, buscando-se entender a relação entre as propriedades físico-químicas da substância ativa e todos os parâmetros fisiológicos relevantes mimetizados nas condições

descritas do teste de dissolução (SUNESSEN, 2005). Neste caso, foi utilizado o planejamento fatorial dos fatores que poderiam influenciar na determinação do percentual dissolvido de benznidazol na forma farmacêutica comprimido na concentração de 100 mg condicionando a extrapolação destes resultados ao que se poderá observar no estudo planejado para determinação da farmacocinética para o produto em desenvolvimento que é o comprimido pediátrico de benznidazol na concentração de 12,5 mg.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Materiais (reagentes e meios)

Amostra de Benznidazol (BZN), matéria-prima fornecidos pelo LAFEPE[®], lote: 15772 e comprimidos de benznidazol 100 mg, lote 08041722, fabricados pelo LAFEPE[®].

Preparação do suco gástrico simulado Roche[®]: 66 mL de HCl concentrado e 20g de NaCl para 10 L de água purificada.

Meios testados: água purificada, suco gástrico simulado (SGS - Roche[®]), ácido clorídrico 0,1M, lauril sulfato de sódio 0,5%; 0,75% e 1,0% (p/v), SGS + lauril sulfato de sódio 0,5%; 0,75% e 1,0% (p/v), TWEEN[®] 80 0,5% (p/v).

8.2.2 Equipamentos e Instrumentos:

Balança Shimadzu[®] AW 220, máximo de 220 g, calibrada

Phmetro Tecnal[®] modelo Tec-3MP, calibrado

Purificador Osmose reversa Milli-Q Gradiente Millipore[®]

Lavadora ultra-sônica Unique[®]

Espectrofotômetro Varian[®] Cary 50 Probe, qualificado

Dissoluteste Varian[®] - Vankel 7010 com amostrador automático VK 8000, qualificado

Sistema de cromatografia líquida Merck[®] Elite LaChrom, composto por bomba L-2130, amostrador L-2200, forno L-2300 e detector diode array L-2455, qualificado.

Sistema de agitação da Fisatom[®], com reservatórios com capacidade para 5,5 mL, possuindo temperatura controlada a $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

8.2.3 Vidrarias/ Outros

Volumétricas calibradas e graduadas

Papel de filtro Inlab[®]

Unidade filtrante Millex Millipore® (0,22 µm)

8.2.4 Estudo de solubilidade em “potenciais meios de dissolução” em “condição sink”

Para o estudo de meios de dissolução, sob “condição sink” foram estudados composições que simulassem o pH do trato gastrointestinal e que sendo o benznidazol um fármaco de baixa solubilidade (classe II), também permitesse uma melhor solubilidade diminuindo a tensão superficial.

Foram testados os seguintes meios potenciais: água purificada (pH 5,94), suco gástrico simulado (SGS) Roche (pH 1,35), HCl 0,1M (pH 1,29), SGS + 0,5% de lauril sulfato de sódio (LSS) p/v (pH 1,41) , 0,5% LSS p/v (pH 8,13), SGS + 0,75% LSS p/v (pH 1,32) , 0,75% LSS p/v (pH 8,08), SGS + 1% LSS p/v (pH 1,33) , 1% LSS p/v (pH 8,75), 0,5% Tween 80 v/v. As amostras (n=03) foram preparadas numa concentração de 0,5 mg/mL (5 vezes a concentração de 100 mg do comprimido adulto em dissolução), transferidas para reservatórios de capacidade 5,5 mL e agitadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram filtradas, em membrana de 0,22 µm, transferidas para balão volumétrico e quantificadas por CLAE (SILVA, 2007).

Para os meios que o BZN foi quantificado com teor dissolvido acima de 90% (SGS + 0,75% LSS, 0,75% LSS, SGS + 1% LSS, 1% LSS), este ensaio foi repetido com a concentração de 1mg/mL, além dos meios controles (água purificada e suco gástrico simulado (SGS) Roche).

8.2.5 Dissolução

8.2.5.1 Desenvolvimento do método de dissolução e validação

Comprimidos de 100 mg do benznidazol LAFEPE® (lote 08041722) foram pesados analiticamente. Em seguida, foram realizados perfis de dissolução no dissoluteste Vankel® 7010 e amostras (7 mL) foram coletadas após 7; 15; 30; 60; 90 e 120 minutos de ensaio, sem reposição de meio, nas condições ilustradas na tabela 1. O objetivo do estudo foi variar todos os parâmetros controláveis como meio (variável qualitativa), com o volume do meio e a rotação das pás (variáveis quantitativas) e medir as respostas nos

tempos de 60 minutos e 120 minutos, quantificando o percentual dissolvido, comparando-os com a especificação atualmente seguida que é 60% e 80%, respectivamente.

O teor dissolvido foi quantificado através de método por espectrofotometria no Cary 50 Probe, UV-VIS da Varian®. A metodologia para determinação do teor dissolvido foi validada, baseando-se na RE nº 899, ANVISA (2003), que considera a dissolução um teste de performance, classificando-o na categoria III, sendo necessário a avaliação da precisão e especificidade, esta última, realizada com comprimidos placebo. Um outro parâmetro que foi avaliado foi a robustez do ensaio no que diz respeito ao meio de dissolução durante o estudo de desenvolvimento, onde foi utilizado lotes diferentes do fabricante lauril sulfato de sódio e diferentes fabricantes deste tensoativo.

Tabela 01: Condições de estudo para desenvolvimento do método de dissolução do comprimido do benznidazol 100 mg

Meio	Volume (mL)		Rotação (rpm)		
	1000	500	100	75	50
	LSS 1% + SGS LSS 0,75% + SGS				

8.2.5.2 Quantificação do teor dissolvido e validação

A determinação do teor dissolvido de BZN foi realizada através do espectrofotômetro no comprimento de onda 324 nm. A solução padrão foi preparada pesando-se analiticamente 10 mg de benznidazol e transferindo para um balão volumétrico de 50 mL e adicionando-se 40 mL de etanol PA, levado ao ultrassom e sonicado por 15 minutos. Foi realizada a aferição com o mesmo solvente. Uma alíquota de 3 mL foi transferida para um outro balão volumétrico de 50 mL e completado volume com o meio de dissolução em estudo selecionado (SGS + LSS 1%). Obteve-se uma concentração final de 12 ppm. Este método foi validado para os comprimidos de benznidazol, seguindo a RE 899 (2003), da ANVISA.

A especificidade foi verificada através da avaliação do ensaio de dissolução de comprimidos placebo.

A linearidade foi avaliada a partir de 03 soluções-mãe autênticas, estas foram preparadas pesando-se analiticamente 20 mg de benznidazol e transferindo para um balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se etanol PA, em seguida sonicada por 15 minutos. Após este tempo as amostras foram aferidas com etanol até o volume final. Cada solução-mãe originou uma curva de linearidade, sendo a segunda diluição aferida com o meio de dissolução (SGS + LSS 1%). As concentrações obtidas foram as seguintes: 2; 4; 8; 12; 16 e 20 ppm. As três curvas foram tratadas por Análise de Variância (ANOVA). Foi obtida uma equação de reta, verificado se a curva havia sido linear e também estava ajustada.

A precisão intermediária foi realizada por analistas diferentes em diferentes dias, preparadas para obtenção do ponto médio (12 ppm) em sextuplicata. O tratamento estatístico foi “*t Student*” com 95% de confiança.

A exatidão foi preparada considerando as seguintes concentrações: 8 ppm (66,67%), 12 ppm (100,00%) e 16 ppm (133,33%), com n=6. Foi observada a capacidade de recuperação do método, para a especificação de 90 a 110%.

Para a robustez foram estudados diferentes fabricantes do etanol (marcas Carlo Erba e FMaia), que estatisticamente tiveram os resultados tratados pelo teste “*t Student*” e diferentes tempos de sonicação (10, 15 e 20 minutos) tratados por Análise de Variância (ANOVA), as amostras foram preparadas na concentração final de 12 ppm, cada nível de variação com seis replicatas.

Para avaliar os parâmetros da validação do método de quantificação, em paralelo, foi preparada uma curva controle nas concentrações de 8; 12 e 16 ppm.

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.3.1 Estudo de solubilidade em “potenciais meios de dissolução” em “condição sink”

O equilíbrio da concentração do fármaco em ambos os lados da camada do tubo gastrointestinal em um reduzido período de tempo foi denominado condição *sink*, onde o fármaco é absorvido instantaneamente no momento em que ocorre a dissolução *in vivo*, não existe aumento de concentração, favorecendo o gradiente de concentração sobre a velocidade de dissolução. Portanto, em condições *in vivo*, não existe um aumento de concentração, daí, não ocorre o efeito retardador do gradiente de concentração sobre a velocidade de dissolução.

Se tal condição for mantida, diz-se que o teste de dissolução é conduzido sob condições *sink*, significando ausência da influência do gradiente de concentração. Entretanto, a manutenção desta condição nem sempre é obrigatória, mesmo para fármacos de baixa hidrossolubilidade (AIACHE, 1997).

No estudo de solubilidade com diferentes propostas de meio, com resultados ilustrados na figura 01 para a concentração de 0,5 mg/mL (ensaio preliminar) de benznidazol, foi observado que na água purificada, suco gástrico simulado e HCl 0,1M o percentual dissolvido foi próximo a 65%, ou 0,325 mg/mL e para os meios preparados com os tensoativos lauril sulfato de sódio (aniônico) e Tween 80 (não iônico) na concentração de 0,5%, o lauril dissolveu em torno de 85% ou 0,425 mg/mL, o que correspondeu a aproximadamente 10% a mais que o Tween 80, demonstrando a atuação destes tensoativos na molhabilidade do pó, reduzindo a tensão superficial e aumentando a sua solubilidade.

Porém, o Tween 80 apresentou menor percentual dissolvido comparado ao lauril sulfato de sódio na mesma concentração, o que pode estar associado a dissolução do fármaco em si, que na realidade é o resultado da liberação e da difusão do fármaco. A este respeito, a difusão das espécies dissolvidas (molécula do fármaco e complexo micela-fármaco) tem papel fundamental. A difusão do complexo micela-fármaco é várias vezes menor do que do fármaco sozinho, e a mudança na taxa de dissolução é o aprimoramento da solubilidade

e o declínio do efeito de difusão. Além disso, o peso molecular maior do Tween 80 e o peso das micelas agregadas também maior quando comparado ao lauril sulfato de sódio, resultam numa baixa difusão do complexo fármaco-micela e por isso uma redução na taxa de dissolução (SONI, 2008).

Em seguida, o lauril sulfato de sódio foi associado ao suco gástrico simulado em diferentes concentrações (0,5%; 0,75% e 1,0%), com o objetivo de incrementar este percentual dissolvido. Os resultados apresentaram que nas diferentes concentrações do tensoativo (LSS) a melhor solubilidade foi proporcional ao aumento da concentração, de acordo com Baptista (2007) e que o lauril sulfato de sódio 0,5% quando associado ao suco gástrico simulado permaneceu dissolvendo próximo a 80%, não havendo diferença entre a presença ou ausência do suco gástrico simulado em relação ao percentual dissolvido. Já os meios à base de lauril sulfato de sódio a 0,75% e a 1,0% atingiram mais de 90% ou 0,450 mg/mL de dissolução, isolados e associados ao suco gástrico simulado.

Os resultados acima, levaram ao planejamento de um outro ensaio, com o dobro da concentração estudada (1,0 mg/mL de benznidazol), ou seja, 10 vezes a concentração praticada no ensaio de dissolução para o produto LAFEPE® Benznidazol 100 mg, o que também assegurou uma saturação.

Os meios estudados foram àqueles que apresentaram percentual dissolvido no ensaio anterior acima de 90%, além do indicado pela Roche® na transferência de tecnologia (SGS) e a água purificada, estes dois últimos como controle, conforme mostra a figura 02.

Os resultados confirmaram que tanto o lauril sulfato de sódio associado ao suco gástrico simulado quanto ele isolado apresentaram resultados de solubilidade semelhantes, mas que a concentração do lauril proporciona resultados de solubilidade distintos entre si, considerando a suspensão de 1 mg/mL de benznidazol.

Obteve-se também o indicativo que houve saturação, pois ao contrário da concentração anterior (0,5 mg/mL) não foi atingido o percentual total dissolvido, e sim, apenas, em torno de 60% ou 0,6 mg/mL para o maior concentração de lauril (1,0%), independente de ele estar ou não associado ao SGS e para o LSS a 0,75%, foi de aproximadamente 45%, apenas, dissolvido.

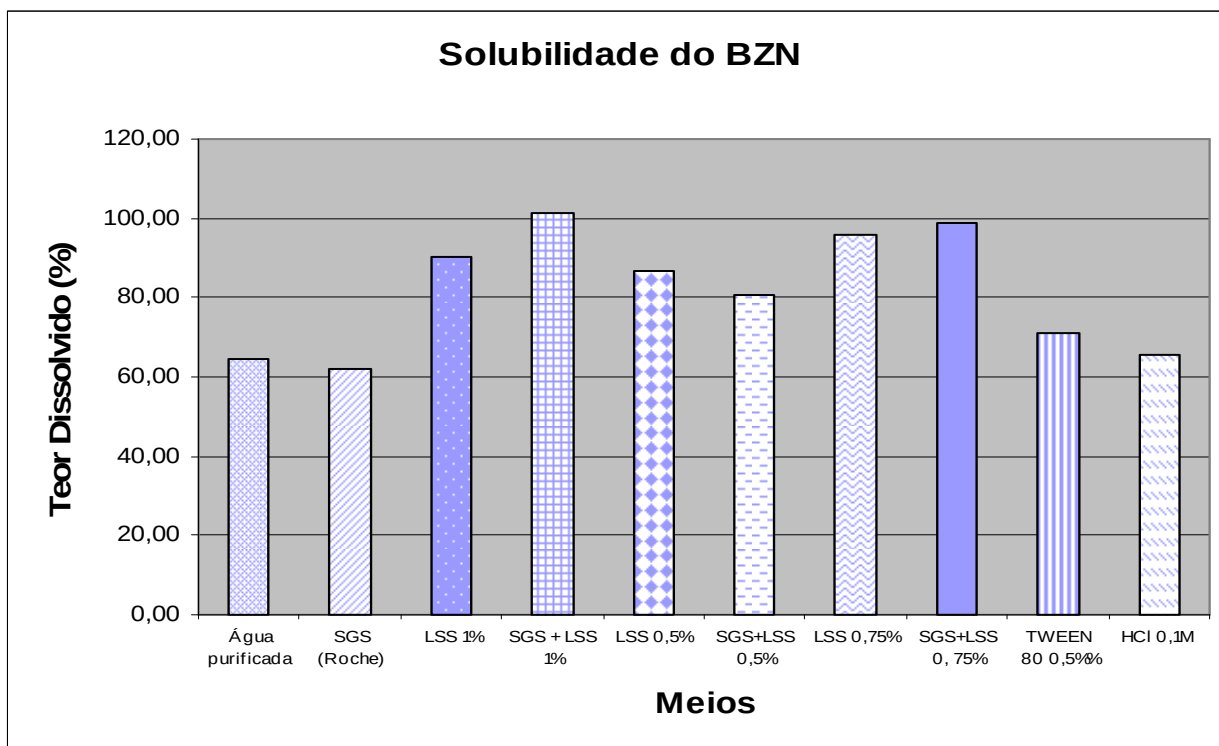


Figura 01: Solubilidade do Benznidazol a 0,5 mg/mL (SGS-suco gástrico simulado; LSS-lauril sulfato de sódio; HCl – ácido clorídrico)

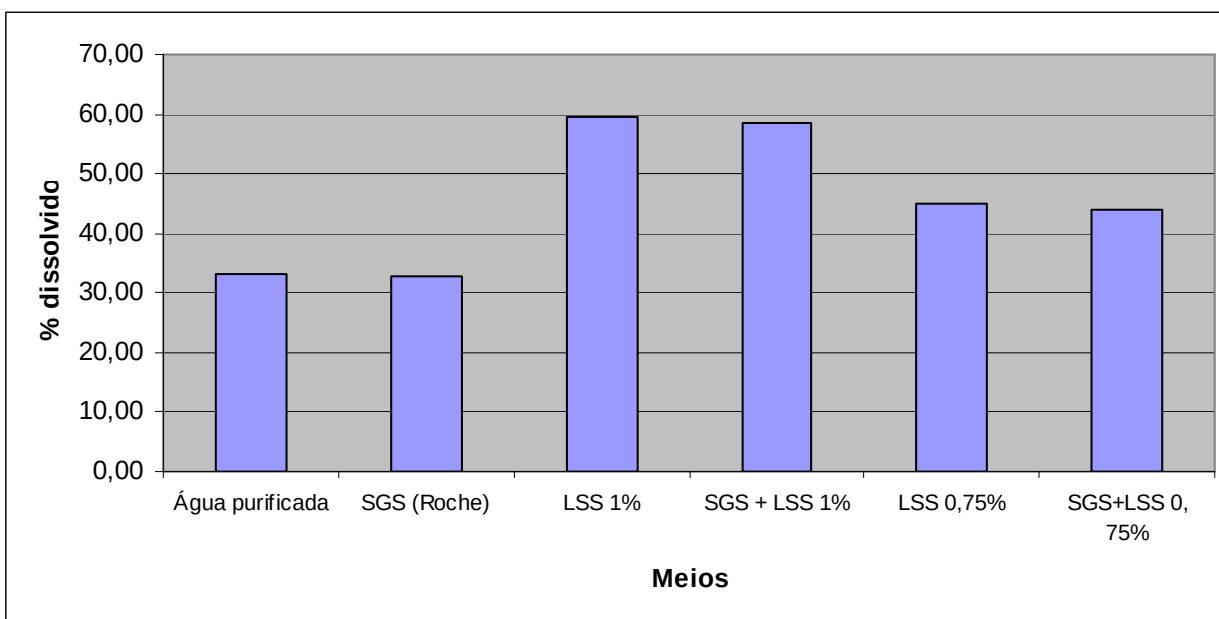


Figura 2: Solubilidade do Benznidazol a 1,0 mg/mL (SGS-suco gástrico simulado; LSS-lauril sulfato de sódio)

8.3.2 Dissolução

Diante dos resultados indicativos de solubilidade, o estudo foi encaminhado para os ensaios de dissolução do comprimido de benznidazol 100 mg fabricado pelo LAFEPE. A presença do suco gástrico simulado foi mantida como meio de dissolução e se acrescentou o lauril sulfato de sódio, pois o sal proporciona ao meio com tensoativo um poder tamponante simulando o pH do trato gástrico, o que justifica este comportamento do benznidazol, em se tratando de uma base fraca (pKa 4,4) (não publicado) e com pH em solução aquosa de 5,5, conforme especificação da Farmacopéia Brasileira. Para ativos bases fracas, a medida que o pH aumenta a extensão de ionização é reduzida e a quantidade dissolvida diminui (SARKAR, 2008).

Na tabela 02, estão apresentados os resultados dos perfis de dissolução nas diferentes condições avaliadas. Foram avaliados os resultados para o menor nível de rotação (50 rpm) e observado que independente da composição do meio e do volume deste, os percentuais dissolvidos não atenderam o mínimo preconizado nos tempos de 60 e 120 minutos.

Tabela 02: Resultados do desenvolvimento do método de dissolução

Rotação	Meio	Tempos de coleta					
		7	15	30	60	90	120
100 rpm	LSS 1% + SGS						
	500	40,28	56,04	71,04	83,72	88,48	90,76
	1000	45,33	64,68	80,57	92,37	96,95	98,98
100 rpm	LSS 0,75% + SGS						
	500	40,33	57,35	73,8	85,29	91,42	89,63
	1000	38,16	57,31	73,71	87,29	91,4	93,83
75 rpm	LSS 1% + SGS						
	500	40,74	57,01	74,12	87,35	96,13	99,96
	1000	42,53	61,48	77,46	89,23	93,71	96,31
75 rpm	LSS 0,75% + SGS						
	500	36,49	53,18	71,33	84,26	91,23	94,56
	1000	39,54	56,58	73,89	84,84	90,62	93,63
50 rpm	LSS 1% + SGS						
	500	15,23	24,69	33,56	46,19	53,6	56,51
	1000	19,86	34,59	51,75	70,42	78,18	81,88
50 rpm	LSS 0,75% + SGS						
	500	13,51	23,44	32,72	45,11	50,3	56,39
	1000	21,31	35,56	49,16	63,42	72,33	78,15

Outra avaliação confirmou o comportamento da dissolução dependente do pH do meio, pois resultados dos comprimidos em tampão fosfato pH 6,8 (USP 30), volume de meio de 1000 mL e rotação de 75 rpm, após 60 e 120 minutos, apresentaram valores de 72,57% e 85,10%, cerca de 10% inferior àqueles meios que contém o SGS (pH ácido).

Sendo assim, para medir a influência dos fatores na resposta de interesse (percentual dissolvido) foi realizado um planejamento fatorial 2^3 (8 ensaios), numa ordem aleatória e com $n=4$. A tabela 03 representa os fatores e níveis estudados neste planejamento.

Tabela 03: Representação do planejamento fatorial 2^3

Fatores	(+)	(-)
Meio (1)	LSS 1,00% + SGS	LSS 0,75% + SGS
Rotação (2)	100 rpm	75 rpm
Volume (3)	1000 mL	500 mL

É claro que grandes diferenças de perfis de dissolução entre os meios, como acontece com fármacos de classe II, devem ser consideradas com bastante cuidado, visto que a dissolução é o passo limitante da absorção e geralmente é possível estabelecer uma correlação *in vitro* – *in vivo*. Contudo, é relevante destacar que meios padrões de compêndios não simulam as condições fisiológicas, assim correlações com estes meios são raramente possíveis (GALIA, 1998).

Neste estudo foram avaliados os três efeitos principais 1 (meio), 2 (rotação) e 3 (volume), três interações de dois fatores, 12, 13 e 23, além do efeito da interação dos três fatores 123.

Os cálculos foram realizados através do Programa Computacional Statistic versão 6.1. Os resultados seguem abaixo com a ilustração da construção do cubo na figura 03e nas tabelas 04 e 05.

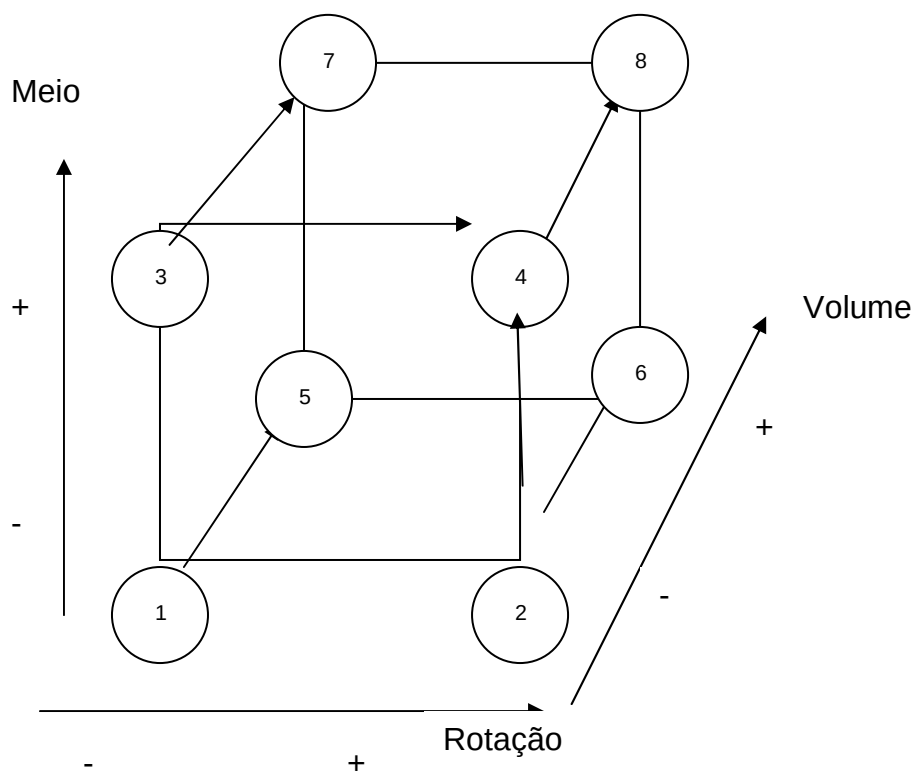


Figura 03: Interpretação geométrica dos efeitos num planejamento 2^3 .

Tabela 04: Coeficientes de contraste para um fatorial 2^3 .

Média	1	2	3	12	13	23	123	*Média (%)
+	-	-	-	+	+	+	-	84,26
+	-	+	-	-	+	-	+	85,29
+	+	-	-	-	-	+	+	87,34
+	+	+	-	+	-	-	-	83,72
+	-	-	+	+	-	-	+	84,84
+	-	+	+	-	-	+	-	87,29
+	+	-	+	-	+	-	-	89,23
+	+	+	+	+	+	+	+	92,37

* A última coluna contém os valores médios dos percentuais dissolvidos para t (60 minutos) de dissolução

Tabela 05: Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 da tabela 06.

Tempo	60 minutos ^a	120 minutos ^b
Efeitos principais		
Média	86,79	94,43
(1) meio	2,74	4,13
(2) rotação	0,75	-2,27
(3) volume	3,27	1,42
Interações de dois fatores		
12	-0,99	-0,99
13	1,99	0,86
23	2,05	4,79
Interação de três fatores		
123	1,33	1,15

^aO erro padrão é 0,64 para cada efeito com 24 graus de liberdade.

^bO erro padrão é 1,43 para cada efeito com 24 graus de liberdade.

Conforme apresentado na tabela 05, para 60 minutos, o tipo de meio exerce um efeito significativo, assim como o volume deste, ou seja, modificar para a maior concentração de LSS (1%) e para o maior volume (1000 mL) tem efeito significativo quando isolados e interagindo entre si. O mesmo não acontece para a modificação quantitativa da rotação. Porém, a rotação maior (100 rpm) interagem com o maior volume. Por fim, os três fatores, nos seus níveis positivos (+), apresentam interações com efeito significativo.

Para o tempo referente a 120 minutos, o único efeito principal significativo foi para o meio, já para a interação dos dois fatores foi visto que a rotação e o volume interagem.

Sendo assim, a seleção das condições de dissolução definidas para validação foram baseadas no tempo de 60 minutos, visto que foi neste tempo verificada a maior influência das condições em análises.

As condições selecionadas para dar continuidade aos estudos foi o meio contendo 1% LSS + SGS, em um volume de 1000 mL, com uma rotação de 75 rpm, considerando que a rotação só apresentou efeito significativo quando

associado ao volume e não isolada, este mesmo resultado foi também observado na variável do tempo, quando a coleta aconteceu a 120 minutos.

8.3.3 Validação

8.3.3.1 Especificidade

A especificidade de um método representa a sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir na sua determinação numa mistura mais complexa (USP, 2007).

Os resultados da especificidade foram obtidos após acompanhamento do perfil de dissolução de 08 comprimidos placebo de benznidazol, durante 120 minutos. Foi observado que houve uma quantificação constante de aproximadamente 1 ppm para todos os tempos analíticos, sendo este valor insignificante, demonstrando a especificidade da metodologia de dissolução.

8.3.3.2 Precisão

Para determinação da precisão entre dias foi considerado os resultados de dias diferentes entre os diferentes lotes do mesmo fabricante de laurilsulfato de sódio e este se apresentou preciso, conforme mostrado anteriormente.

8.3.3.4 Robustez

Segundo a RE nº 899 (BRASIL, 2003), a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

Foi visto durante todo o estudo que a composição do meio exerce um efeito significativo aos percentuais dissolvidos dos comprimidos de benznidazol 100 mg. Desse modo, foram estudados na robustez a preparação do meio com lotes diferentes do mesmo fornecedor e com fornecedores diferentes de lauril

sulfato de sódio com $n=4$. O tratamento estatístico foi o teste *t Student*, com 95% de confiança.

Tabela 06: Resultados do perfil da robustez no desenvolvimento do método de dissolução

	LSS 1% + SGS	Tempos de coleta					
		7	15	30	60	90	120
75 rpm	1000 mL	42,53	61,48	77,46	89,23	93,71	96,31
		42,99	59,95	73,69	87,93	90,73	92,88
		40,00	57,31	72,94	84,84	88,43	91,47

Para os diferentes lotes de LSS do fabricante Vetec (L 0806072 e L 0902322) o t calculado para 60 e 120 minutos foi 0,6788 e 1,3798 e menores que o t tabelado 2,7764 e 3,1824. Portanto, com 95% de confiança, pode-se afirmar que não há diferença estatisticamente significativa entre os percentuais dissolvidos nos tempos de 60 e 120 minutos para os dois diferentes lotes testados do mesmo fabricante de LSS Vetec.

Porém, houve diferença entre os fornecedores testados (Vetec e Nuclear). No entanto, foram diferenças estatísticas, mas que analisadas do ponto de vista analítico de controle de qualidade os produtos estavam aprovados atendendo às especificações previamente determinadas para ambos os tempos de coleta da dissolução.

Mesmo assim, é sugerido que ao se trocar o fornecedor do lauril sulfato de sódio este seja sempre avaliado.

8.3.3.4 Validação do método para quantificação

O método de quantificação a ser utilizado na avaliação deve cumprir com os parâmetros de validação (MALESUIK, 2006). Seguindo a RE nº 899 (BRASIL, 2003), todos os parâmetros referentes à categoria I foram avaliados.

8.3.3.4.1 Linearidade

A linearidade é a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa (BARROS NETO, 2001).

Segundo Brittain (2008), a linearidade do método corresponde à habilidade do mesmo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação, sendo que, a linearidade está relacionada com a variação da inclinação da reta de regressão.

O resultado médio dos pontos das três curvas de linearidade foram tratados estatisticamente pelo método dos mínimos quadrados obtendo-se a equação da reta ($y = 0,030961(\pm 0,000851) - 0,00973 (\pm 0,010329)$), não havendo falta de ajuste, conforme ilustrado no gráfico (Apêndice A).

A análise da regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação (R^2) muito próximo a unidade foi de 0,99732, demonstrando que há correlação linear entre as unidades X e Y, o que significa que 99,73% da variação total em torno da média é explicada pela regressão, restando cerca de 0,27% para ser explicado pelos resíduos, representado no gráfico (Anexo A).

Também foi calculado considerando as equações citadas na RE 899 (2003) os limites de quantificação e detecção, respectivamente, o LQ 0,1426 ppm e o LD 0,0941ppm.

8.3.3.4.2 Precisão

Os resultados da precisão estão descritos na tabela 07 e estes se apresentam com CV inferior a 5%, em diferentes dias para diferentes analistas.

Tabela 07: Resultados da precisão intermediária realizada por analistas diferentes em diferentes dias

Analistas	1/1º dia	2/2º dia
Amostra	Conc (ppm)	Conc (ppm)
1	12,08	11,93
2	11,87	11,94
3	11,87	12,04
4	11,83	12,32
5	11,91	12,06
6	11,90	12,64
Média	11,91	12,16
CV (%)	0,75	2,26

Os resultados estatísticos demonstraram que as variâncias foram equivalentes para o teste F e que com 95% de confiança o t calculado foi de

2,07 e, portanto, menor que o t tabelado de 2,23, podendo ser afirmado que o método é preciso.

8.3.3.4.3 Exatidão

Na tabela 08, dispõem-se os resultados experimentais da recuperação, com os respectivos CV (%), para três diferentes concentrações: 8 ppm (66,67%), 12 ppm (100%) e 16 ppm (133,33%).

Foi considerado o intervalo de 90 a 110% de recuperação para cada concentração, mesmo intervalo atribuído para o doseamento do fármaco. Foi demonstrado pelos resultados obtidos que o método é exato.

Tabela 08: Resultados da exatidão do método

Amostra	8 ppm	12 ppm	16 ppm
1	7,83	11,57	14,43
2	7,67	11,23	14,67
3	7,75	10,82	14,75
4	7,84	10,93	14,33
5	7,82	11,04	14,64
6	7,81	10,83	14,52
Média	7,79	11,07	14,56
CV (%)	0,86	2,60	1,10

8.3.3.4.4 Robustez

Conforme demonstrado na tabela abaixo 09, as concentrações foram obtidas por curva-controle para este parâmetro e após tratamento estatístico pelo teste “t Student” foi obtido um t calculado (2,20) menor que o t tabelado (2,22) com 95% de confiança. Assim, para esse nível de variação, o método foi considerado robusto.

Tabela 09: Resultados da robustez para variação de fornecedor de etanol PA

Fornecedor de Etanol PA	Carlo Erba	FMaia
Amostra	Conc (ppm)	Conc (ppm)
1	13,01	12,34
2	12,34	12,71
3	12,05	12,96
4	12,28	12,75
5	12,23	12,59
6	12,25	13,10
Média	12,36	12,74
CV (%)	2,66	2,09

Outra variação deliberada considerada no estudo foi o tempo de sonicação. Na tabela 10 estão os resultados.

Tabela 10: Resultados da robustez para variação do tempo de sonicação (min)

Amostra	Tempo de sonicação		
	10 min	15 min	20 min
	Conc (ppm)	Conc (ppm)	Conc (ppm)
1	13,01	12,34	12,17
2	12,34	12,71	11,89
3	12,05	12,96	12,44
4	12,28	12,75	13,06
5	12,23	12,59	12,86
6	12,25	13,10	12,62
Média	12,36	12,74	12,51
CV (%)	2,66	2,09	3,45

Para o tempo de sonicação que foi avaliado por interferir diretamente na extração do ativo da forma farmacêutica, foi obtido como resultado a Análise de Variância (ANOVA) com 95% de confiança, que o F calculado (1,82) menor que o F tabelado (3,68). Demonstrando que o método é robusto para estes três níveis de variação.

8.4 CONCLUSÕES

No estudo de solubilidade, sob “condição sink”, os meios selecionados foram: lauril sulfato de sódio (1%) + suco gástrico simulado e laurilsulfato de sódio (0,75%) + suco gástrico simulado.

Estes dois meios foram conduzidos ao desenvolvimento do método de dissolução, por planejamento fatorial, medindo as influências dos fatores (composição do meio, volume e rotação).

Foi verificado que o tipo de meio e o volume são os fatores principais que mais interferem no percentual dissolvidos dos comprimidos de benznidazol 100 mg.

O meio selecionado para o estudo comparativo entre o comprimido de 100 mg e comprimido pediátrico (12,5 mg) em desenvolvimento foi com laurilsulfato de sódio 1% + suco gástrico simulado, com um volume de 1000 mL e uma rotação de 75 rpm.

O método para dissolução foi validado seguindo a RE 899, 2003, da ANVISA.

O método para quantificação do percentual dissolvido também foi validado, seguindo a RE 899 (BRASIL, 2003) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

8.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIACHE, J.M.; AOYAGI, N.; BLUME, H.; DRESSMAN, J.; FRIEDEL, H.D.; GRADY, L.T.; KRISTENSEN, H.; LANGENBUCHER, F.; LEESON, L.; LESKO, L.; LIMBERG, J.; MCGILVERAY, I.; MÖLLER, H.; QURESHI, S.; SHAH, V.P.; SIEWERT, M.; SÜVERKRÜP, R.; WALTERSSON, J.O.; WHITEMAN, D.; WIRBITZKI, E.. FIP Guidelines for dissolution testing of solid oral products. *Dissol Technol.*, Liberty, v. 4, n. 4, p. 5 – 14, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, publicada em DOU em 02 de junho de 2003, *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*, 2003.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E.. *Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas: Editora da Unicamp – SP, 2001.

BAPTISTA, E.B.; VOLPATO, N.M.. Efeito do pH e da presença de tensoativos no meio de dissolução na correlação *in vivo/in vitro* de comprimidos de glibenclamida não bioequivalentes. *Revista Bras Farm.*, v. 88, n. 3, p. 107-112, 2007.

BRITTAİN, H.G.. Validação de Métodos Analíticos Não-cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, v. 2, p. 4 – 9, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª edição, 177 a 177-2, 2002.

GALIA, E.; NICOLAIDES, E.; HORTER, D.; LOBENBERG, R.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J.B.. Evaluation of various dissolution media for predictiv *in vivo* performance of class I and class II drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 5, p. 698-705, 1998.

HORTER, D.; DRESSMAN, J.B.. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, p. 75-87, 2001.

LAMAS, M.C.; VILLAGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALÓMON, C.J.. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanomicide drug benznidazole. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 307, p. 239 – 243, 2006.

MALESUIK, M.D.; CARDOSO, S.G.; LANZANOVA, F.A.; BAJERSKI, L.; DORIGONI, E.. Desenvolvimento de teste de dissolução e estudo comparativo de comprimidos e cápsulas magistrais contendo anlopino. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 27, n. 1, p. 37 – 49, 2006.

PURVIS, T.; MATTUCI, M.E.; CRIPS, M.T.; JOHNSTON, K.P.; WILLIAMS, R.O.. Rapidly dissolving repaglinide powders produced by the ultra-rapid freezing process. *AAPS Pharm SciTech*; v. 8, n. 3, Article 58, 2007 (<http://www.aapspharmscitech.org>).

SARKAR, M.; PERUMAL, O.P.; PANCHAGNULA, R.. Solid-state characterization of Nevirapine. *Research Papers – Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 70, n. 5, p. 619 – 630, 2008.

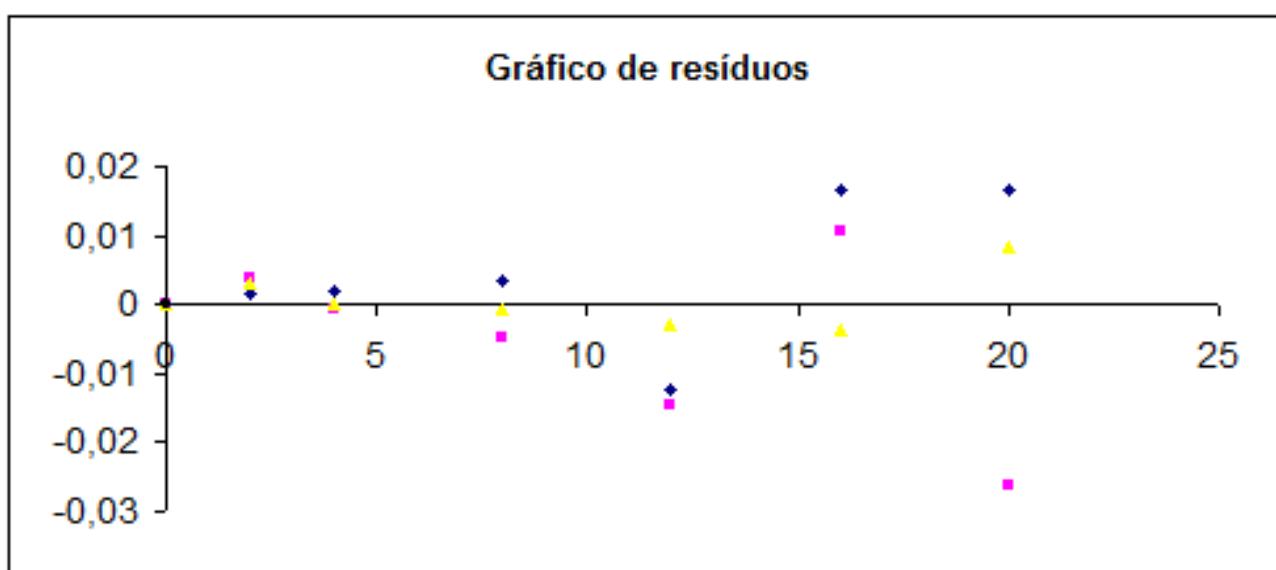
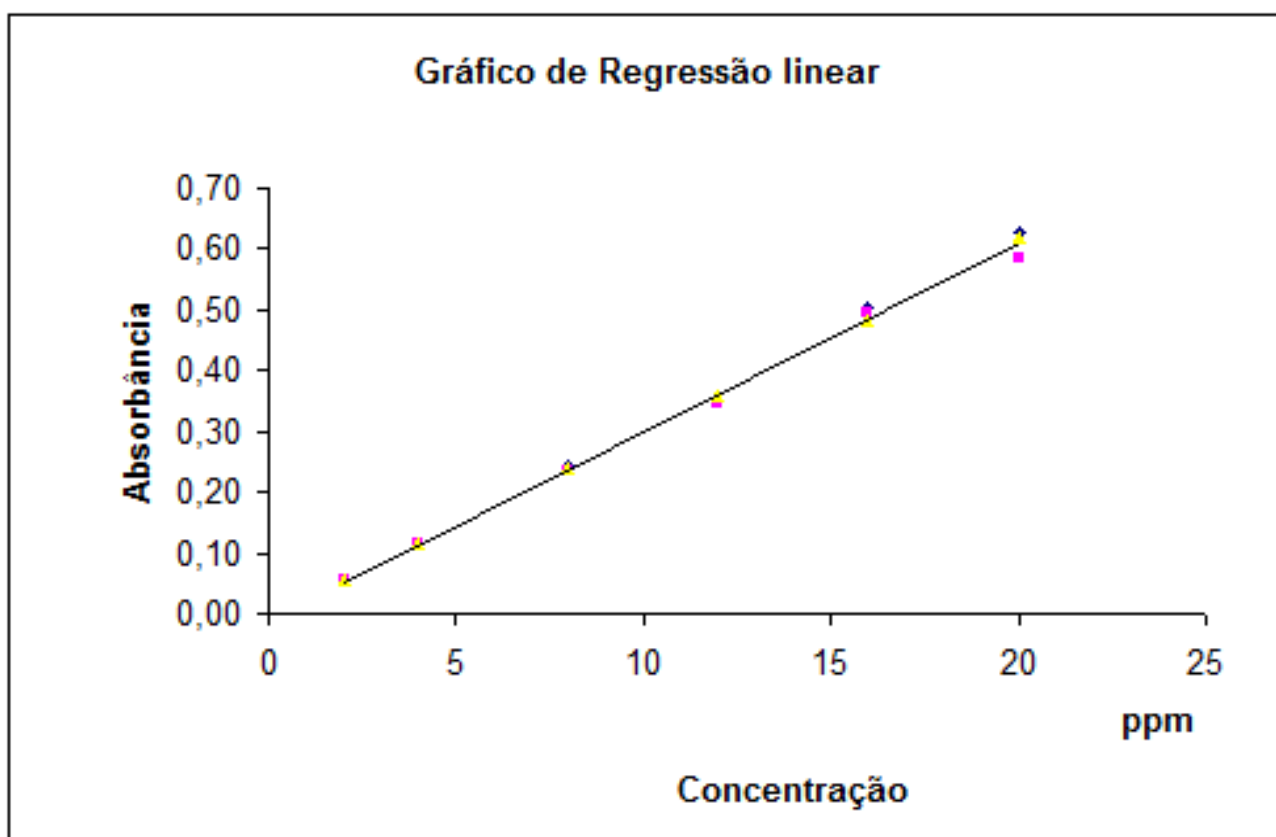
SHAH, V.P.; TSONG, Y.; SATHE, P.; LIU, J-P.. *In vitro* dissolution profile comparison – statistics and analysis of the similarity factor, f2. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 6, p. 889 – 896, 1998.

SILVA, A.L.M.; SOARES SOBRINHO, J.L.; SILVA, R.M.F.; LIMA, L.G.; ROLIM NETO, P.J.. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de benznidazol para doença de Chagas. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1163 – 1166, 2007.

SONI, T.; NAGDA, C.; GANDHI, T.; CHOTAI, N.P.. Development of discrimination method for dissolution of aceclofenac marketed formulations. *Dissolution Technologies*, p. 31 – 35, 2008.

SUNESSEN, V.H.; PEDERSEN, B.L.; KRISTENSEN, H.G.; MÜLLERTZ, A.. *In vivo in vitro* correlations for a poorly soluble drug, danazol, using the flow-through dissolution method with biorelevant dissolution media. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 24, p. 305-313, 2005.

UNITED STATES PHAMACOPEIA - USP, 30th, 580, 2007.



Apêndice A: Gráfico referente a regressão linear e distribuição dos resíduos.

**9. UM MÉTODO SIMPLES PARA DETERMINAÇÃO DO
BENZNIDAZOL E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E
VALIDAÇÃO**

9. UM MÉTODO SIMPLES PARA DETERMINAÇÃO DO BENZNIDAZOL E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E VALIDAÇÃO

9.1 INTRODUÇÃO

O Benznidazol (N-benzil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida) é um dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas aguda (LAMAS, 2006).

Não consta em compêndios oficiais um método para quantificação de teor deste insumo farmacêutico ativo por cromatografia líquida de alta eficiência que permita avaliar substâncias relacionadas e potenciais impurezas de síntese. Corroborando com este contexto, também não se encontram descrito na literatura científica estudos de degradação deste ativo.

Sendo assim, avaliando as exigências atuais que preconizam o desenvolvimento e validação de métodos indicativos de estabilidade conforme os guias da ICH (International Conference Harmonization), este estudo será conduzido com o objetivo de avaliar a degradação forçada sob a influência das condições hidrolítica, oxidativa, térmica e fotolítica, conforme citado por Bansal (2007).

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a análise quantitativa de misturas e possibilita verificar possíveis produtos de degradação, sendo, portanto, amplamente utilizado no controle de qualidade de fármaco e medicamentos. Segundo Watson (2005), a combinação CLAE monitorada pela detecção ultravioleta origina métodos precisos, exatos e específicos, sendo o método de escolha para este propósito.

O uso do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) permite calcular a pureza dos picos cromatográficos, fator importante a ser considerado, pois um pico cromatográfico, aparentemente de apenas um componente, pode ser correspondente a mais de um composto. Assim, o uso do DAD, é de fundamental importância na validação de métodos por CLAE, pois permite inferir que um determinado pico cromatográfico refere-se àquela substância, sem interferentes (DONATO, 2008).

9.2 MATERIAL E MÉTODOS

9.2.1 Amostra e substância química de referência

A amostra degradada foi a matéria-prima de benznidazol lote 15772 e lote 15986.

As substâncias químicas de referências (SQR) foram: o padrão do benznidazol 07-1051/000 (BS05041005), o padrão de 2-aminoimidazol sulfato, o padrão do 2-nitroimidazol (RO-05-9129/001) e o padrão da N-benzilcloroacetamida (RO-13-0047/000), todos fabricados na Basileia, pela Roche[®].

9.2.2 Reagentes

Foram utilizados água purificada por osmose reversa, fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) Carlo Erba[®], acetonitrila grau HPLC JT Baker[®], ácido clorídrico (HCl) Carlo Erba[®], hidróxido de sódio (NaOH) Nuclear[®], Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) Cromato Produtos Químicos[®].

9.2.3 Equipamentos

Balança Shimadzu[®] AW 220, máximo de 220 g, calibrada

Phmetro Tecnal[®] modelo Tec-3MP, calibrado

Purificador Osmose reversa Milli-Q Gradiente Millipore[®]

Lavadora ultra-sônica Unique[®]

Sistema de cromatografia líquida Merck[®] Elite LaChrom, composto por bomba L-2130, amostrador L-2200, forno L-2300 e detector diode array L-2455, qualificado. Software ezchrom Elite.

Câmara de fotoestabilidade – Nova Ética[®] – Modelo 424/CF

Estufa Fanem[®] – a 60° ± 2°C

9.2.4 Vidrarias/Outros

Volumétricas calibradas e graduadas

Papel de filtro Inlab[®]

Unidade filtrante Millex Millipore[®] (0,22 µm)

9.2.5 Condições cromatográficas do método validado

Fase estacionária: Phenomenex Luna 5 µm C18 (2), 100 Å, 250 x 4,6 mm

Fase móvel: tampão fosfato/acetonitrila (80:20), pH 2,7, isocrático

Fluxo: 1 mL/min

Detector: DAD (200 a 400 nm), com dois canais fixos 210 nm e 316 nm

Temperatura: 40 °C

Volume de injeção: 40 µL

9.2.6 Soluções-estoque dos padrões (SQR)

Foram pesadas analiticamente 10 mg de cada SQR, em triplicata. Estas foram diluídas com 10 mL de acetonitrila, sonicadas por 5 minutos e aferidas para 50 mL com água ultra-pura.

A concentração final de cada solução-estoque foi de 0,2 mg/mL. Estas foram acondicionadas a uma temperatura entre 2 a 8 °C.

9.2.7 Soluções amostras para validação

Foram pesadas analiticamente 10 mg de matéria-prima de benznidazol, lote 15772, previamente secundarizada, em sextuplicata, pela SQR do benznidazol Roche, apresentando teor de 99,95%. Estas foram diluídas com 10 mL de acetonitrila, sonicadas por 5 minutos e aferidas para 50 mL com água ultra-pura. A concentração final de cada solução amostra foi de 200 ppm. Em seguida, esta foi diluída volumetricamente, 3 mL, para balão volumétrico de 50 mL, sendo aferida com solução diluente (acetonitrila:água/1:4).

A concentração final de quantificação foi 12 ppm.

9.2.8 Estudos de degradação forçada

Os estudos de degradação hidrolítica foram conduzidos com a matéria-prima do benznidazol lote 15772 utilizando HCl 0,1M, HCl 1,0M, NaOH 0,1M e NaOH 1,0M a temperatura ambiente, protegidos da luz, durante 30 dias.

A degradação oxidativa foi conduzida utilizando uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a temperatura ambiente, durante 30 dias.

A degradação térmica foi conduzida em estufa (calor seco) a 60 °C, também durante 30 dias. A matéria-prima utilizada foi dos lotes 15772 e 15986, esta foi distribuída, em quantidade suficiente, em uma placa de Petri, de modo que se observasse uma espessura de 1 mm de pó.

O estudo fotolítico procedeu com a distribuição em uma placa de Petri de aproximadamente 1 mm de pó, do benznidazol lote 15772, submetido a exposição de 1,2 milhões de lux.horas + 200 watt.horas/m² (UV) (ICH).

Para a preparação das soluções-amostras, foi pesado analiticamente 100 mg de matéria-prima, transferidas para balão volumétrico de capacidade de 50 mL, solubilizadas em 25 mL de acetonitrila, sonicadas por 10 minutos. Por fim, aferidas com a solução de degradação em estudo (HCl 0,1M, HCl 1,0M, NaOH 0,1M, NaOH 1,0M e 3% H_2O_2). Para cada tempo de análise (tempo zero, 24 horas, 72 horas, 07 dias, 15 dias e 30 dias), 01 mL foi volumetricamente transferido para balão volumétrico de 10 mL e este aferido com solução diluente (acetonitrila:água; 1:4). Filtrado em filtro 0,22 µm. Analisado por CLAE, com concentração final de 200 ppm.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas autênticas.

Mesmo procedimento de diluição foi realizado para os pós submetidos a degradação fotolítica e a degradação térmica.

9.2.9 Desenvolvimento do método cromatográfico indicativo para estudo de estabilidade (MIEE)

O desenvolvimento do método indicativo para estudo de estabilidade foi realizado, inicialmente, a partir de soluções de benznidazol fotodegradadas, comparando diferentes proporções de fase móvel composta por acetonitrila:água, eluindo no modo isocrático e de gradiente.

Estes resultados preliminares foram então comparados com o método do fabricante do benznidazol (Roche), o qual quantificava impurezas

relacionadas da rota de síntese, utilizando uma fase móvel composta por 80% de tampão fosfato e 20% de acetonitrila, acidificada a pH 2,7.

Após seleção da fase móvel, as condições cromatográficas foram otimizadas após testes realizados em diferentes fases estacionárias (MN e Phenomenex Luna 5 µm C18 (2), 100 Å, 250 x 4,6 mm).

Este método otimizado foi utilizado no estudo preliminar de degradação forçada.

9.2.10 Validação do método cromatográfico indicativo para estudo de estabilidade (MIEE)

O método otimizado foi validado avaliando os parâmetros de linearidade, exatidão, especificidade, seletividade, robustez e sistema de adequação conforme a RE nº 899 (BRASIL, 2003) e o Guia da ICH (1995).

Foram avaliados os parâmetros de resolução, eficiência da coluna, assimetria e fator de capacidade (USP, 2007).

Para determinação da linearidade, foram preparadas, a partir das soluções-estoque para cada SQR (nitroimidazol, benznidazol e benzilcloroacetamida), três curvas autênticas e mistas, nas concentrações 4; 8; 12; 16; 20 e 40 ppm.

A especificidade do método foi avaliada através do fator de resolução e tempo de retenção relativo existente na construção da curva de linearidade com as impurezas relacionadas de síntese (nitroimidazol e benzilcloroacetamida). Já a seletividade, foi estabelecida através da determinação de pureza de cada pico utilizando o detector de DAD.

A precisão foi realizada em sextuplicata, em dias diferentes, por analistas diferentes. A exatidão foi avaliada, com n=6, nas concentrações de 8; 12 e 16 ppm.

A robustez foi avaliada nas seguintes variáveis, com n=6: fabricante do sal fosfato (Carlo Erba® e Sint®); temperatura (39; 40 e 41°C); estabilidade da solução-estoque (tempo zero e 24 h, em geladeira a 2-8°C); fluxo (0,99; 1,00 e 1,01 mL/min).

Cada parâmetro da validação foi acompanhado por curva controle preparada a partir da solução-estoque, diariamente, nas concentrações de 8;

12 e 16 ppm, contendo os padrões de aminoimidazol sulfato, 2-nitroimidazol, benznidazol e N-benzilcloroacetamida.

9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostras de padrão misto contendo as SQR (2-nitroimidazol, benznidazol e N-benzilcloroacetamida) e a solução de benznidazol fotodegradada por 6 horas foram injetadas para avaliar a resolução dos picos em diferentes sistemas de fases móveis.

O primeiro método proposto utilizou gradiente de acetonitrila:água (0 – 100%), tempo de corrida de 100 minutos; e o segundo, o método isocrático – tampão fosfato:acetonitrila (80:20), pH 2,7, com tempo de corrida de 60 minutos. O resultado da quantificação das mesmas amostras em métodos diferentes estão apresentados nas tabelas 01 e 02.

Tabela 01: Cinética degradativa do benznidazol quantificado pelo método de gradiente (acetonitrila:água)

Amostra	Tempo	% de benznidazol
Matéria-prima BNZ	0	100,00
Solução fotodegradada 1h	1	66,79
Solução fotodegradada 2h	2	41,69
Solução fotodegradada 3h	3	22,99
Solução fotodegradada 4h	4	8,25
Solução fotodegradada 5h	5	8,10
Solução fotodegradada 6h	6	7,96

Tabela 02: Cinética degradativa do benznidazol quantificado pelo método isocrático tampão fosfato:acetonitrila (80:20), pH 2,7

Amostra	Tempo	% de benznidazol
Matéria-prima BNZ	0	100,00
Solução fotodegradada 1h	1	64,86
Solução fotodegradada 2h	2	36,65
Solução fotodegradada 3h	3	16,36
Solução fotodegradada 4h	4	1,21
Solução fotodegradada 5h	5	0,60
Solução fotodegradada 6h	6	0,63

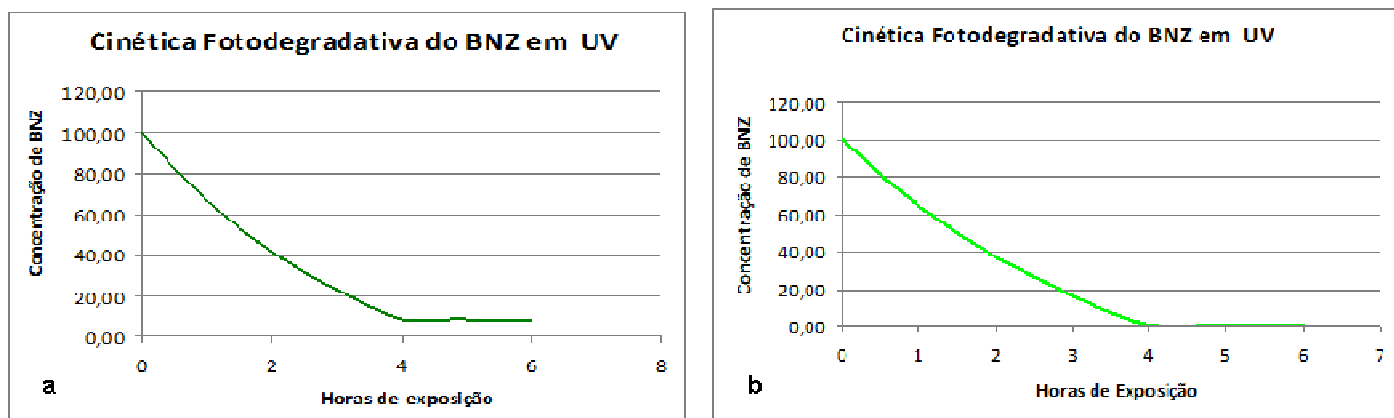


Figura 01: a) Cinética fotodegradativa do benznidazol (tabela 01) e b) Cinética fotodegradativa do benznidazol (tabela 02)

Diante dos resultados acima (tabelas 01 e 02 e figura 01), foi verificado que a mesma amostra fotodegradada apresentava resultados mais seletivos e cromatogramas com melhor resolução para o pico principal do benznidazol quando quantificada pelo método composto pela fase móvel de tampão fosfato: acetonitrila, na proporção (80:20), acidificada com ácido fosfórico 85% a pH 2,7 e tendo como fase estacionária, uma coluna Phenomenex Luna 5 µm C18 (2), 100 A, 250 x 4,6 mm, temperatura do forno a 40°C, fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 40 µL. O detector utilizado neste estudo foi um DAD (200 a 400 nm), com canais fixados nos comprimentos de onda 210 e 316 nm.

9.3.1 Validação do método indicativo para estudo de estabilidade (MIEE)

Segundo a RE nº 899 (BRASIL, 2003), para quantificar produtos de degradação, o método está classificado na Categoria II, ou seja, deve cumprir os parâmetros de validação que seguem: robustez, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, especificidade e seletividade.

Os parâmetros cromatográficos para o método em validação devem ser checados para confirmar que o sistema está trabalhando corretamente durante as análises (HADAD, 2008). Na tabela 03, encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 03: Parâmetros cromatográficos do padrão misto das SQR (2-aminoimidazol sulfato, 2-nitroimidazol, benznidazol e N-benzilcloroacetamida), na concentração de 12 ppm

Substância	TR	TRR	Nº de pratos teóricos	Resolução	Assimetria	Fator de capacidade
2-Aminoimidazol sulfato	2,473	0,118	1910	0,0	1,139	0,066
2-nitroimidazol	3,767	0,18	4230	5,648	1,321	0,624
Benznidazol	20,853	1,00	5593	25,370	1,429	7,988
N-benzilcloroacetamida	24,427	1,17	5581	2,949	1,453	9,528

Tendo em vista os resultados apresentados na tabela 03 e as especificações da USP (2007), o padrão misto considerado no estudo de validação foi composto pelas SQR 2-nitroimidazol, benznidazol e N-benzilcloroacetamida, visto que o 2-aminoimidazol apresentou resultados baixo para o fator de capacidade, provavelmente, devido a este apresentar tempo de retenção (TR), próximo ao volume morto da coluna que foi de $T_{V0} = 2,32$ minutos.

No entanto, foi possível calcular o seu tempo de retenção relativo (TRR) em relação ao benznidazol e também realizar sua análise espectral, relevante para a pesquisa de produtos de degradação, um dos objetivos deste estudo.

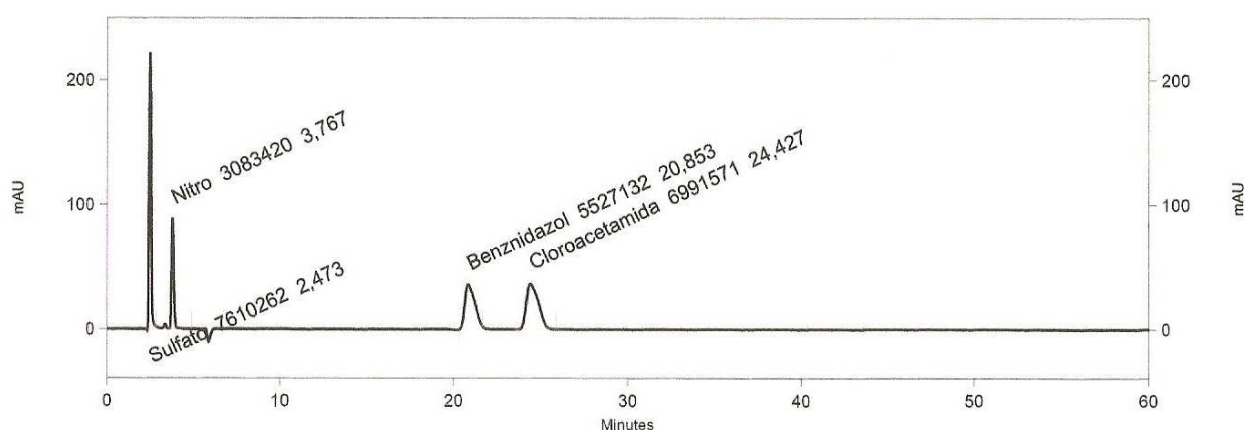


Figura 02: Cromatograma do padrão misto de SQR, na concentração de 12 ppm

9.3.1.1 Especificidade

Nos testes de degradação forçada, os cromatogramas obtidos das soluções de benznidazol, submetidas a diferentes condições de estresse,

foram comparados aos cromatogramas das mesmas soluções não submetidas à degradação e preparadas no momento do teste. O pico de retenção da SQR benznidazol foi identificado pelo tempo de retenção e espectro obtido pelo DAD, este mesmo procedimento foi seguido para avaliar na curva controle as SQR do 2-nitroimidazol e N-benzilcloroacetamida.

Assim, o método se demonstrou específico.

9.3.1.1.1 Comportamento do benznidazol frente aos estudos de degradação forçada

O benznidazol lote 15772 quando submetido a hidrólise ácida (HCl 0,1 M), à temperatura ambiente e protegido da luz, após 30 dias, demonstrou-se estável, porém com redução mínima de 2,89% do teor inicial. Também foi observado nos cromatogramas (Apêndices A e B), que há indicativos de produtos degradados, devido ao aparecimento de picos, nos TR (tempos de retenção) 2,27; 2,53; 2,71; 3,09; 3,37 minutos, no entanto, para estes não foi possível sua identificação.

Para a hidrólise ácida (HCl 1,0 M) foi confirmado um aumento de área referente aos picos detectados nos mesmos TR citados acima, conforme ilustram os cromatogramas (Apêndices C e D), o que resultou em uma redução um pouco maior do pico principal do benznidazol de, aproximadamente, 3,14%.

Comportamento diferente foi verificado quando o insumo farmacêutico ativo benznidazol lote 15772 foi submetido a hidrólise alcalina (NaOH 0,1M e NaOH 1,0M), também fotoprotegido e à temperatura ambiente, pois foi detectado nos TR 2,72 e 4,04 minutos, após 24 h, o aparecimento de picos. Após 03 dias, outro pico foi quantificado referente ao TR 7,04 minutos e o teor de benznidazol foi cerca de 82%. Este continuou decaindo a 67% em 07 dias. O cromatograma referente a 30 dias de acompanhamento do estudo (Apêndice F) reflete que em relação ao percentual de benznidazol ocorreu uma estabilização, pois foi quantificado, aproximadamente, 65% do ativo. É possível também ser verificado a formação de outros picos, em outros TR, quando compara-se com o cromatograma do tempo zero (Apêndice E).

Foi observado que à medida que o teor de benznidazol reduzia, alguns picos apresentavam aumento, quando estes foram comparados entre si nos diferentes dias de análise, podendo indicar que a redução foi devido à

degradação e formação de outros produtos. Da mesma forma que na hidrólise ácida, ainda não podemos identificar estas substâncias.

Resultados não conclusivos foram verificados na maior concentração alcalina (NaOH 1,0M), quando foi analisado o tempo zero, sem repetitividade entre as amostras, não possibilitando o seu tratamento analítico, podendo sugerir que ocorreu uma degradação rápida, que ainda não havia estabilizado.

As amostras submetidas a oxidação do benznidazol lote 15772 utilizando a solução de H_2O_2 a 3,0%, protegida da luz e mantida à temperatura ambiente também não apresentou degradação, até 07 dias de estudo, apresentando cromatograma semelhante ao tempo zero (Apêndice G). Porém, após 30 dias, foi verificado um teor de benznidazol de aproximadamente 90%, sendo observado o aparecimento de picos ao longo do cromatograma (Apêndice H). Esta degradação é prevista na literatura científica, visto que as arilaminas são oxidadas com facilidade e esta oxidação não se limita ao grupo amino, mas pode estender-se ao anel (SOLOMONS, 1996).

A degradação térmica por calor seco foi uma outra condição de estresse avaliada. O pó do benznidazol dos lotes 15772 e 15986 demonstraram estabilidade térmica durante os 30 dias de estudo.

Por fim, foi realizado um estudo preliminar de fotodegradação do benznidazol lote 15772. Os resultados seguem na tabela abaixo.

Tabela 04: Resultados da fotodegradação em estado sólido do benznidazol

Amostra (Lote 15772)	Amostra degradada
1	84,39
2	84,25
3	84,38
Média	84,34
CV (%)	0,087863

O insumo farmacêutico ativo diante destes resultados demonstrou que degradou em torno de 15%, sendo portanto, considerada fotossensível. Também foi observado que a matéria-prima apresentou coloração mais amarelada, mostrando-se também alterada no caráter da descrição, quando comparada com a amostra controle e o padrão de benznidazol.

Outras análises estão em andamento com o objetivo de qualificar e quantificar os potenciais produtos de degradação selecionados pelo método neste estudo validado.

7.3.1.2 Seletividade

Foi verificada com a determinação da pureza dos picos individuais das SQR: aminoimidazol sulfato, 2-nitroimidazol, benznidazol e N-benzilcloroacetamida.

As condições para determinação da pureza, utilizou-se o detector de arranjo diodos (DAD), num intervalo de 200nm a 400nm. A pureza dos picos cromatográficos isolados para as SQR foi de 0,9900. Os resultados obtidos foram com compensação da linha de base, com cálculo do espectro de pureza total sendo realizado a partir da média de 03 pontos.

O Apêndice I ilustra que as SQR foram selecionadas, a partir do cromatograma do padrão e que isoladamente foram extraídos seus espectros. Estes se apresentam puro, ou seja não há co-eluição de outros produtos, o que permite que os cromatogramas das degradações, que apresentem pico com retenção próximo ao destas SQR, possam ter seus espectros também identificados.

9.3.1.3 Linearidade

A linearidade, segundo a RE nº 899 (BRASIL, 2003), é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes.

A linearidade da resposta do detector do HPLC foi avaliada analisando 06 diferentes concentrações (4; 8; 12; 16; 20 e 40 ppm) para cada SQR (2-nitroimidazol, benznidazol e N-benzilcloroacetamida), quantificadas na forma de padrão misto. Segue tabela 05, resumindo os resultados obtidos.

Tabela 05: Resultados da linearidade do método indicativo para estudo de estabilidade do benznidazol

SQR	Equação da reta	R ²	LQ (ppm)
2-nitroimidazol	$y = 253540,2 (\pm 8985,9) + 29518,3 (\pm 182689,3)$	0,9955	0,8071
Benznidazol	$y = 462405,4 (\pm 15383,0) + 221556,3 (\pm 312746,3)$	0,9961	0,1179
N-benzilcloroacetamida	$y = 576944,0 (\pm 11836,79) + 187507,4 (\pm 240649,1)$	0,9985	0,6860

O método foi linear para as três SQR, analisadas sob a forma de padrão misto e analisadas estatisticamente pela ANOVA, com 95% de confiança.

9.3.1.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. Na tabela 06, seguem os resultados da repetitividade e da precisão intermediária.

Tabela 06: Resultados da precisão do método

Amostras	Repetitividade	Precisão	
	Analista 1	Dia1 Analista1	Dia2 Analista2
	Concentração (ppm)		
1	12,13	10,74	11,70
2	12,26	11,58	11,45
3	11,83	11,68	11,19
4	12,27	11,76	11,86
5	12,44	11,58	11,51
6	12,04	11,55	11,72
Média	12,16	11,48	11,57
CV (%)	1,74	3,24	2,06

Estatisticamente, para a repetitividade foi apresentado como resultado um CV inferior a 5% e a precisão intermediária após aplicação do teste “t Student”, apresentou t calculado 0,505 e este foi menor que o t tabelado 2,262, com 95% de confiança. Portanto, pode ser concluído que o método em estudo é preciso.

9.3.1.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

O estudo da exatidão foi conduzido analisando as amostras em triplicata para as concentrações baixa (8 ppm), média (12 ppm) e alta (16 ppm).

A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

Os resultados seguem na tabela 07.

Tabela 07: Resultados da exatidão do método

Amostras	8 ppm (66,67%)	12 ppm (100,00%)	16 ppm (133,33%)
1	8,24	11,90	16,50
2	7,93	12,02	16,28
3	7,87	11,83	16,02
Média	8,01	11,92	16,27
CV (%)	2,46	0,83	1,48
Exatidão	100,18	99,36	101,73

Diante dos resultados apresentados, o método foi considerado exato.

9.3.1.6 Robustez

Após verificação dos parâmetros cromatográficos, foram testadas variações para a temperatura do forno, visto que o método preconiza a programação deste a 40°C, sendo portanto avaliada a variação de $\pm 1^\circ\text{C}$.

Os resultados estão apresentados na tabela 08, os quais foram tratados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA).

Tabela 08: Resultados da robustez para variação de temperatura

Temperatura	39°C	40°C	41°C
Amostras	Concentração (ppm)		
1	12,32	12,31	12,34
2	12,45	12,34	12,35
3	12,04	12,01	12,02
4	12,81	12,79	12,93
5	11,96	11,90	11,85
6	11,85	11,79	11,80
Média	12,24	12,19	12,22
CV (%)	2,94	3,00	3,45

Os resultados estatísticos demonstraram com 95% de confiança por ANOVA que o F calculado de 0,025 foi inferior ao F tabelado de 3,682. Sendo para esta deliberada e pequena variação, considerado robusto.

Outra variação proposta, foi avaliar diferentes fabricantes do sal fosfato utilizado na preparação da fase móvel do método. Os resultados foram tratados por teste “t Student”. Segue tabela 09.

Tabela 09: Resultados da robustez para variação de fabricante do sal fosfato

Fabricante	Synth [®]	Carlo Erba [®]
Amostras	Concentração (ppm)	
1	12,31	13,06
2	12,34	12,09
3	12,01	12,16
4	12,79	12,04
5	11,90	12,12
6	11,79	12,25
Média	12,19	12,29
CV (%)	3,00	3,14

Os resultados demonstraram com 95% de confiança, existindo 5% de possibilidade para erros, que para o teste t presumindo variâncias diferentes, o t calculado foi 0,045, menor que o t tabelado de 2,228, portanto o método foi considerado robusto para estes dois diferentes fabricantes do sal fosfato de potássio.

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 $\pm 0,01$ mL/min.

Tabela 10: Resultados da robustez para variação de fluxo

Fluxo (mL/min)	0,99	1,00	1,01
Amostras	Concentração (ppm)		
1	12,32	12,31	12,40
2	12,31	12,34	12,44
3	11,98	12,01	12,07
4	12,69	12,79	12,83
5	11,84	11,90	11,99
6	11,81	11,79	11,87
Média	12,16	12,19	12,26
CV (%)	2,82	3,00	2,92

O tratamento estatístico utilizado foi ANOVA. Este demonstrou, com 95% de confiança, que o F calculado 0,143 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 com $n=4$ foi verificada, em 24 horas. O tratamento estatístico utilizado foi o teste “t Student”. O resultado apresentou que o t calculado foi 1,080 e o t tabelado foi 2,446, com 95% de confiança, presumindo variâncias equivalentes.

9.4 CONCLUSÕES

O método desenvolvido foi validado seguindo as Boas Práticas de Fabricação e Controle e a Resolução, nº 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003). Ele foi considerado robusto, linear, preciso, exato, específico e seletivo. Este método por ter sido acompanhado de estudos de degradação forçada (estresse), será utilizado como método indicativo para estudo de estabilidade das formulações pediátricas desenvolvidas (suspensão e comprimido).

9.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, publicada em DOU em 02 de junho de 2003, *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*, 2003.

BANSAL, G.; SINGH, M.; JINDAL, K.C.. Forced degradation study on glicazide and application of validated stability-indicating HPLC-UV method in stability testing of glicazide tablets. *Chromatographia*, v. 66, n. 9/10, p. 751 – 755, 2007.

DONATO, ELIANE MARIA.. *Lopinavir/Ritonavir cápsulas: perfil de dissolução in vitro baseado nos dados in vivo, estudos de estabilidade térmica e metodologia analítica*. Tese de Doutorado, 2008. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 2008.

HADAD, G.M.. Validated stability-indicating HPLC method for the determination of dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB) and its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 695 – 703, 2008.

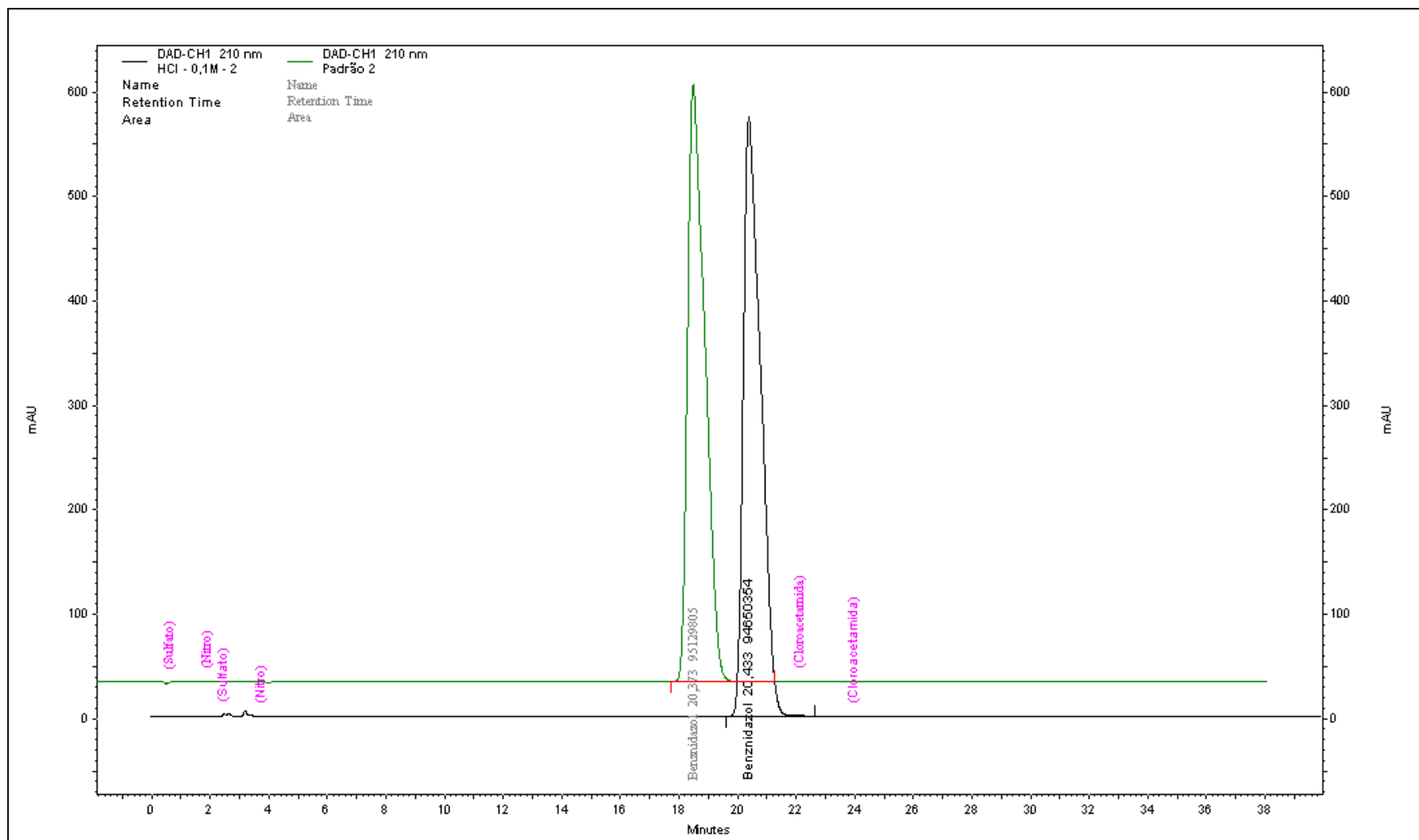
ICH - International Conference on Harmonisation. *Draft guidelines on validation of analytical procedures: definitions and terminology*, Federal Register, v. 60, p. 11260, Switzerland, 1995.

ICH - International Conference on Harmonisation. *Stability testing of new drug substances and products*. Switzerland, 2003.

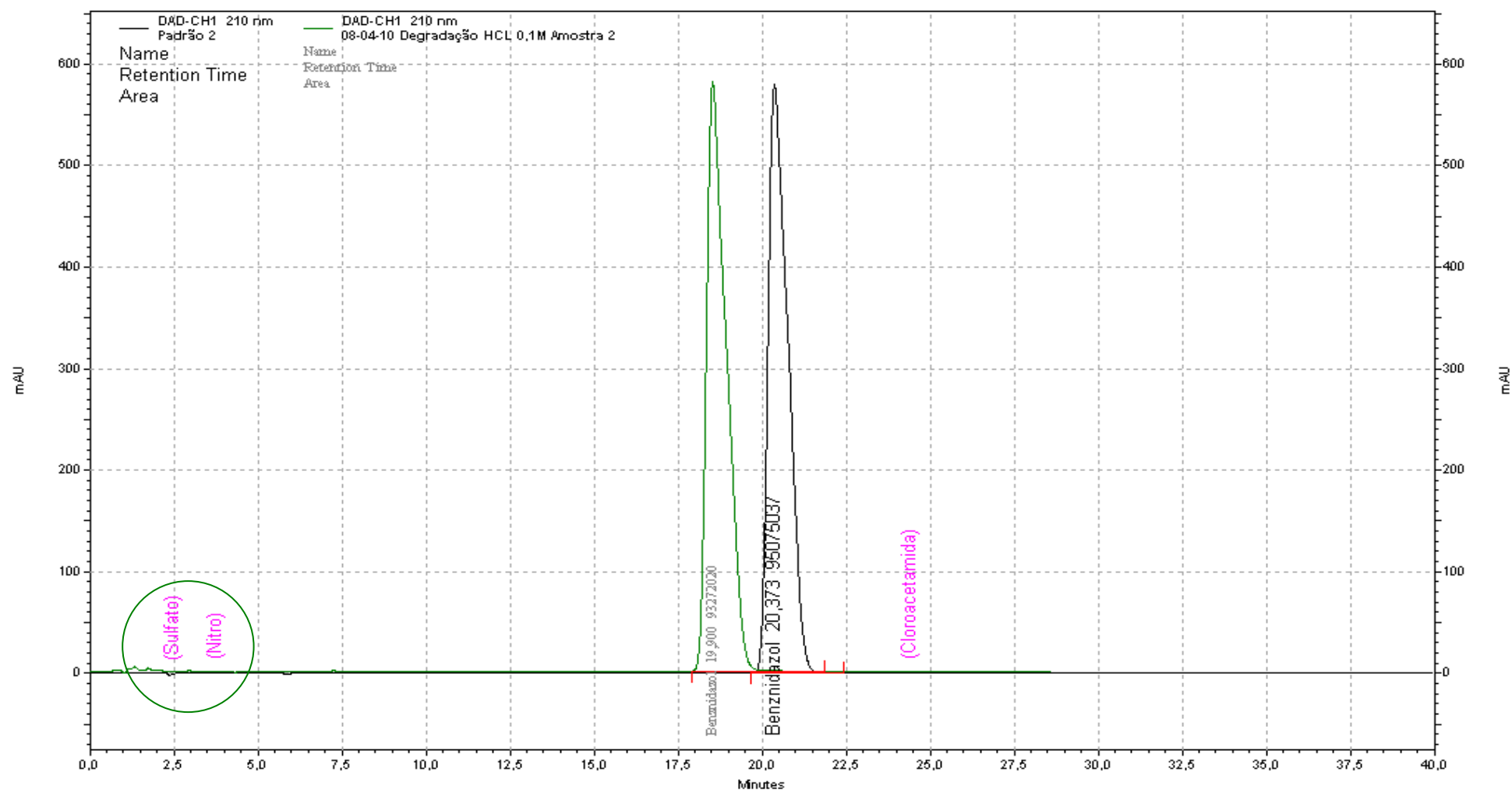
LAMAS, MC.; VILLAGGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALOMÓN, CJ.. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 307, n 2, p. 239-243, 2006.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B.. *Química Orgânica*, v. II, 6ª ed.. São Paulo: Editora LTC., 1996. USP - The United States Pharmacopoeia. *Validation of Compendial Methods <1225>*, 30th Edition; Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007.

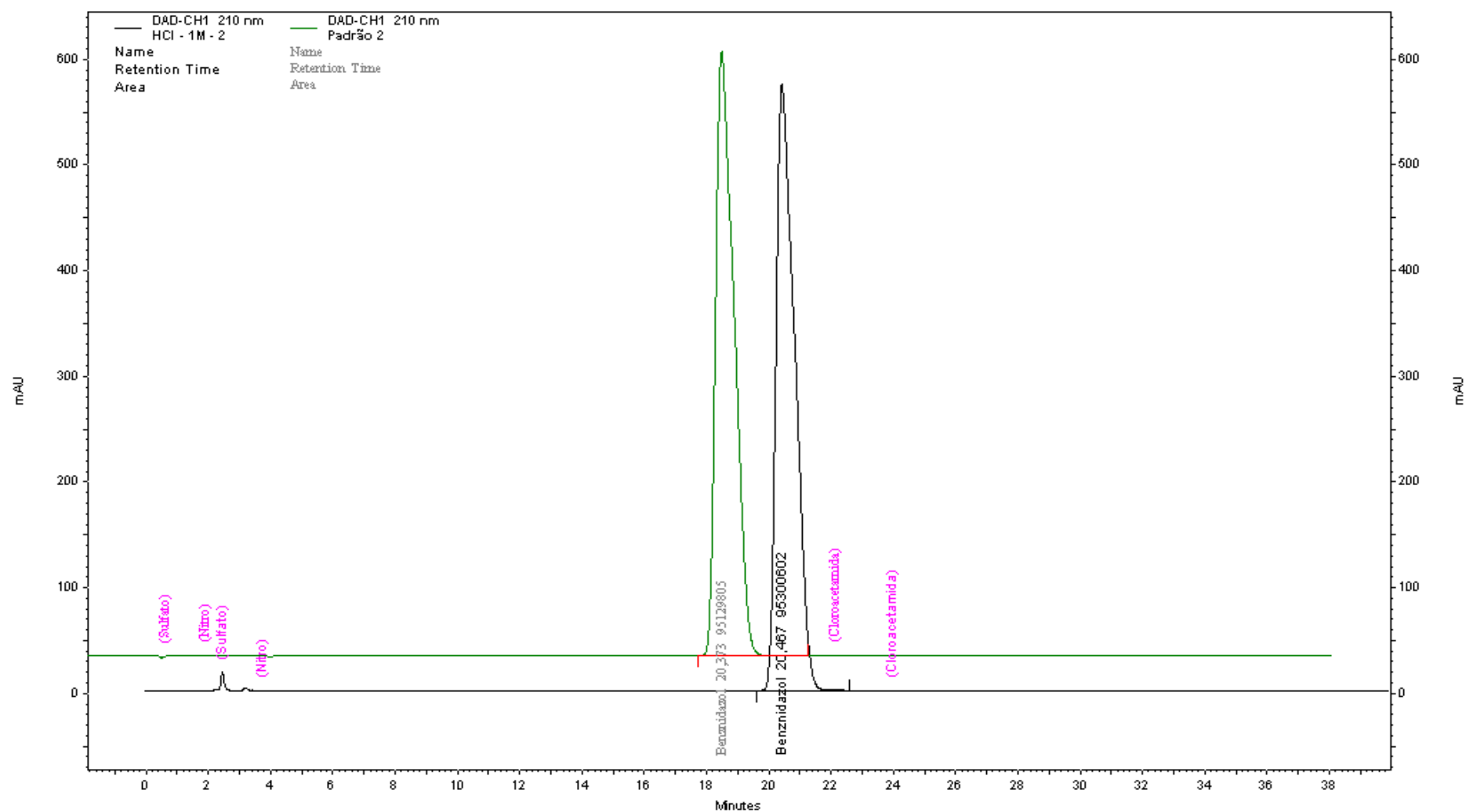
WATSON, D.G.. *Pharmaceutical Analysis. A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. 2th Edition, Edimburgo: Elsevier Churchill Livingstone, p. 221 – 233, 2005.



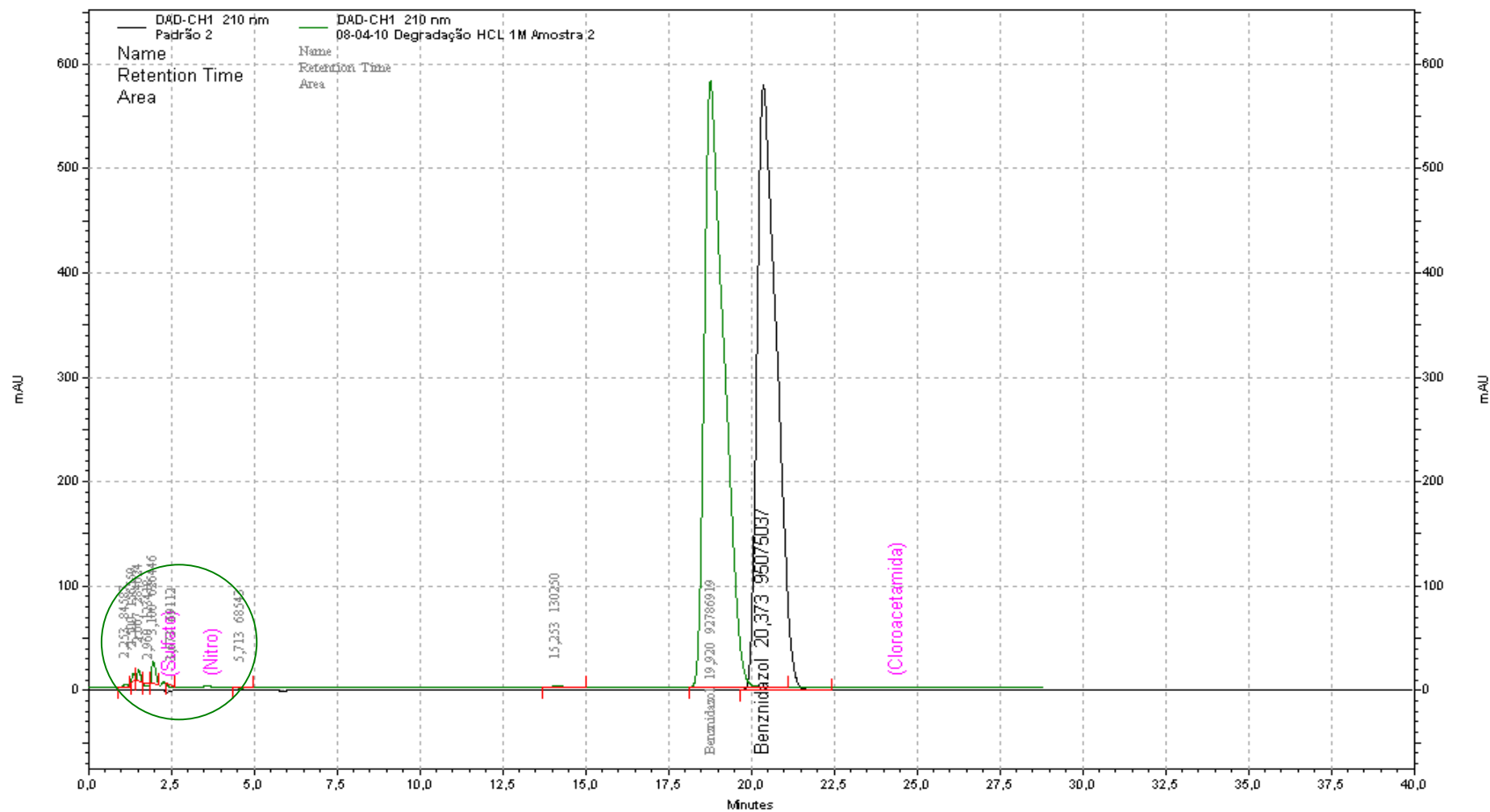
Apêndice A: Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise ácida (HCl 0,1M), no tempo zero, com teor de 99,75 %



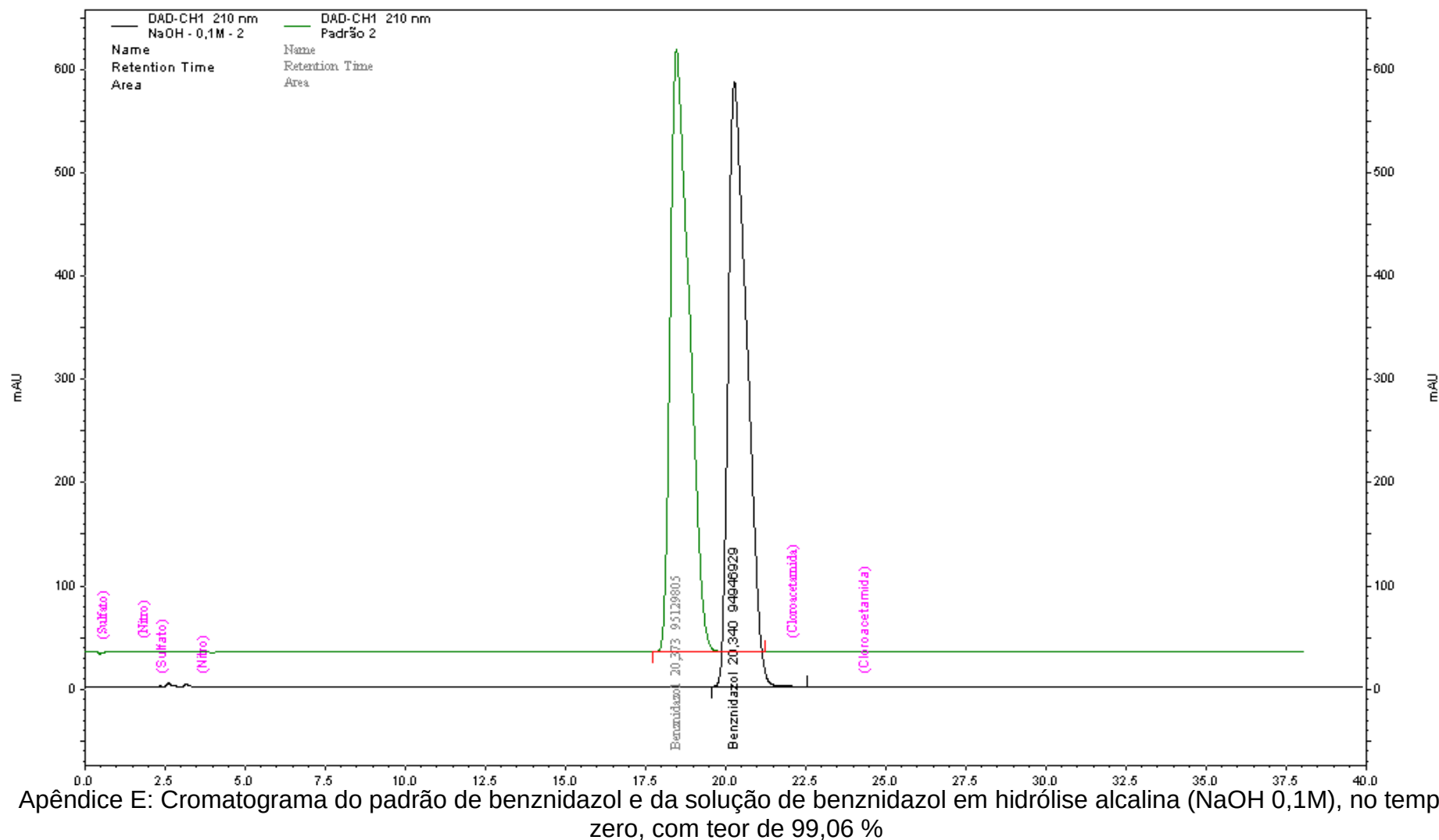
Apêndice B: Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise ácida (HCl 0,1M), no tempo de 30 dias, com teor de 97,38 %

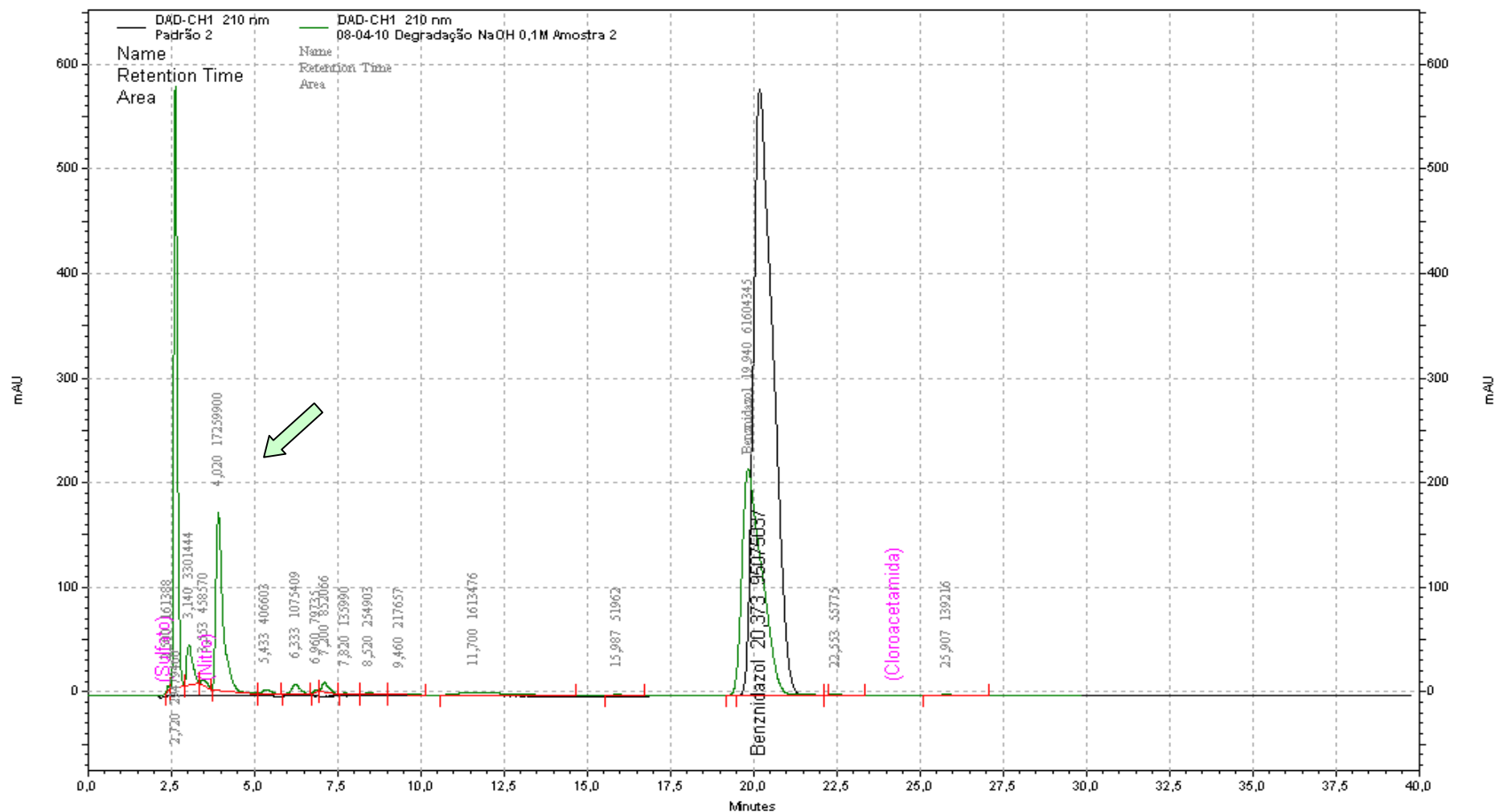


Apêndice C: Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise ácida (HCl 1,0M), no tempo zero, com teor de 99,42 %

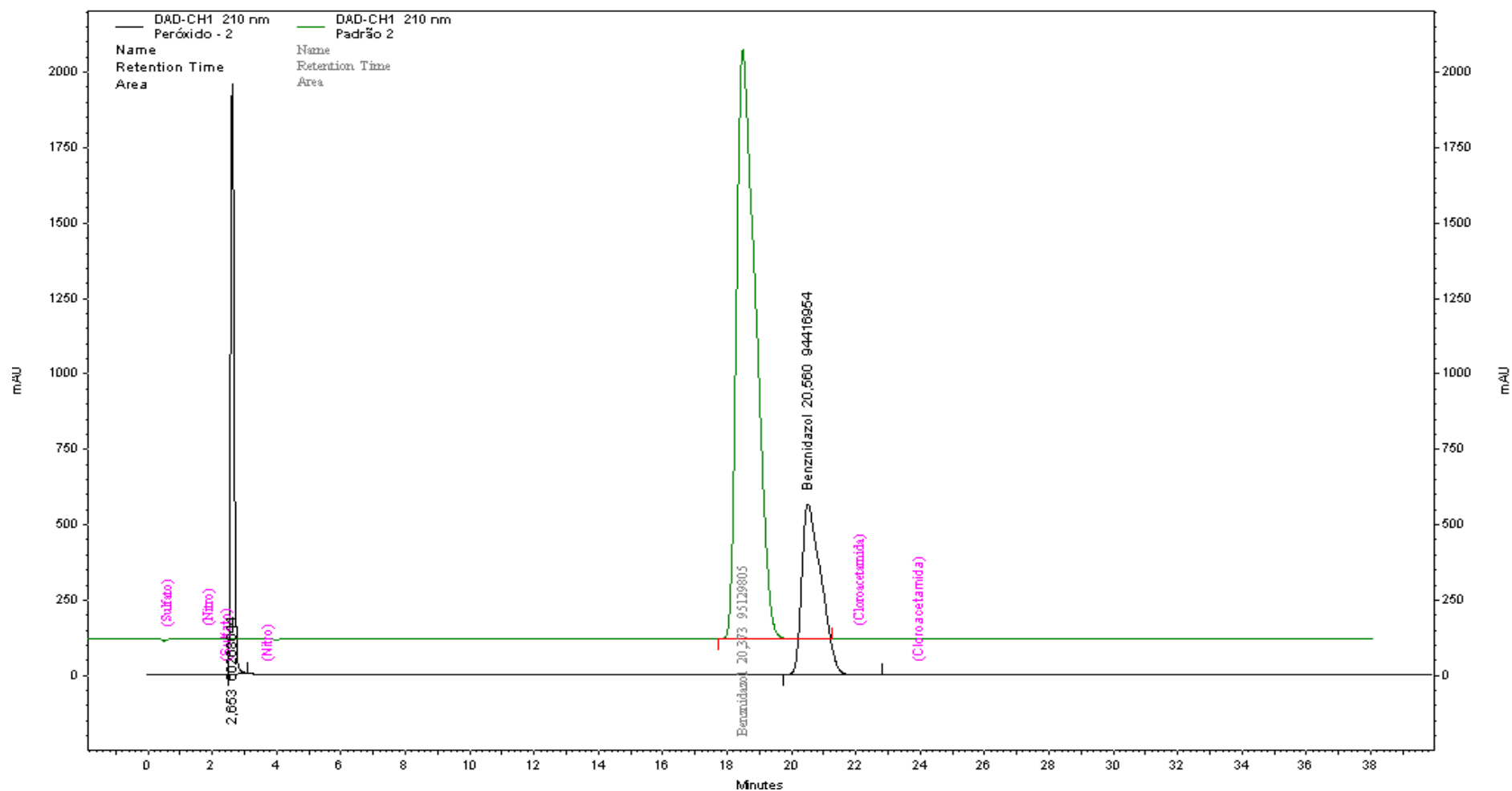


Apêndice D: Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise ácida (HCl 1,0M), no tempo de 30 dias, com teor de 96,86 %

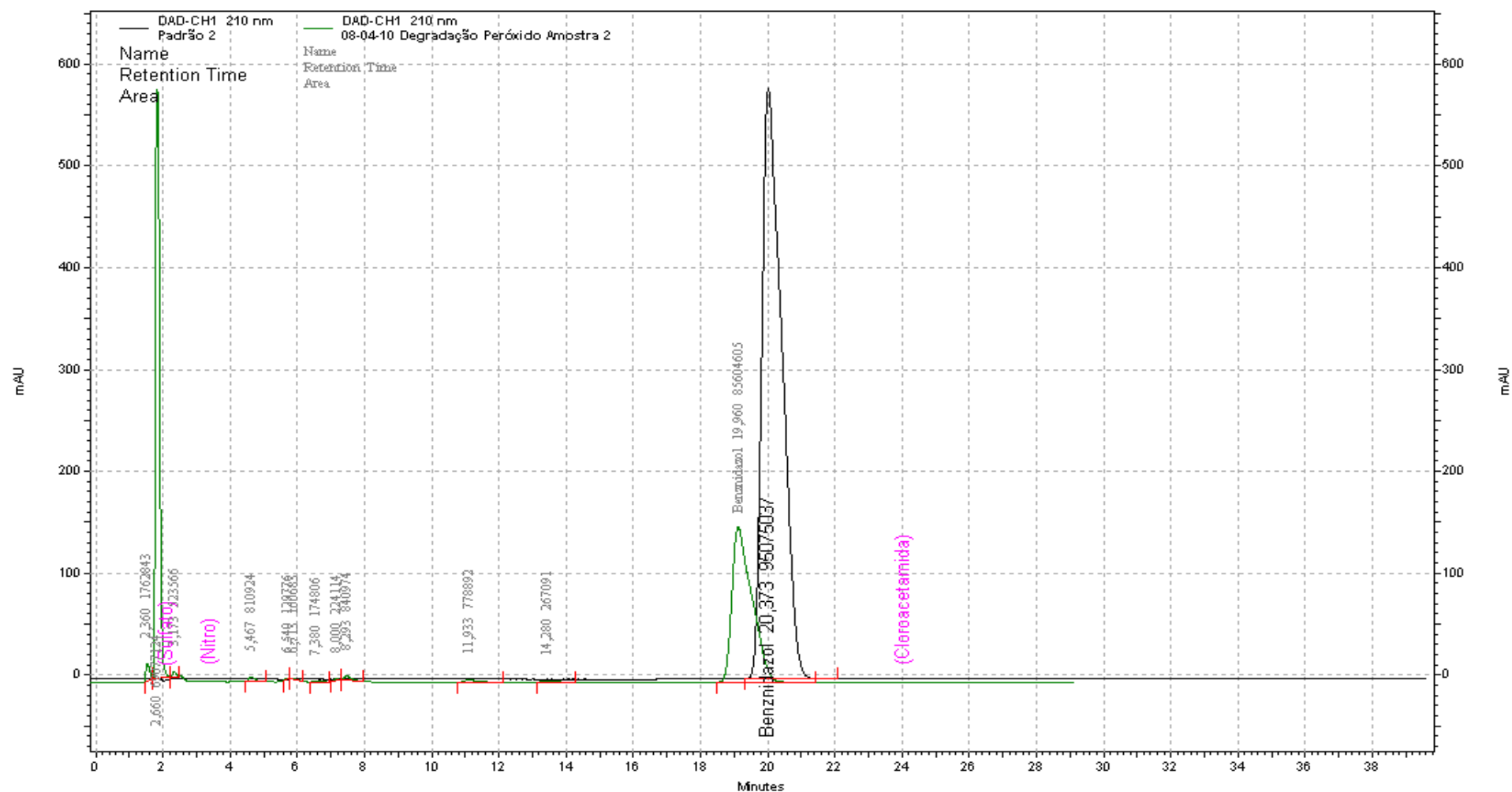




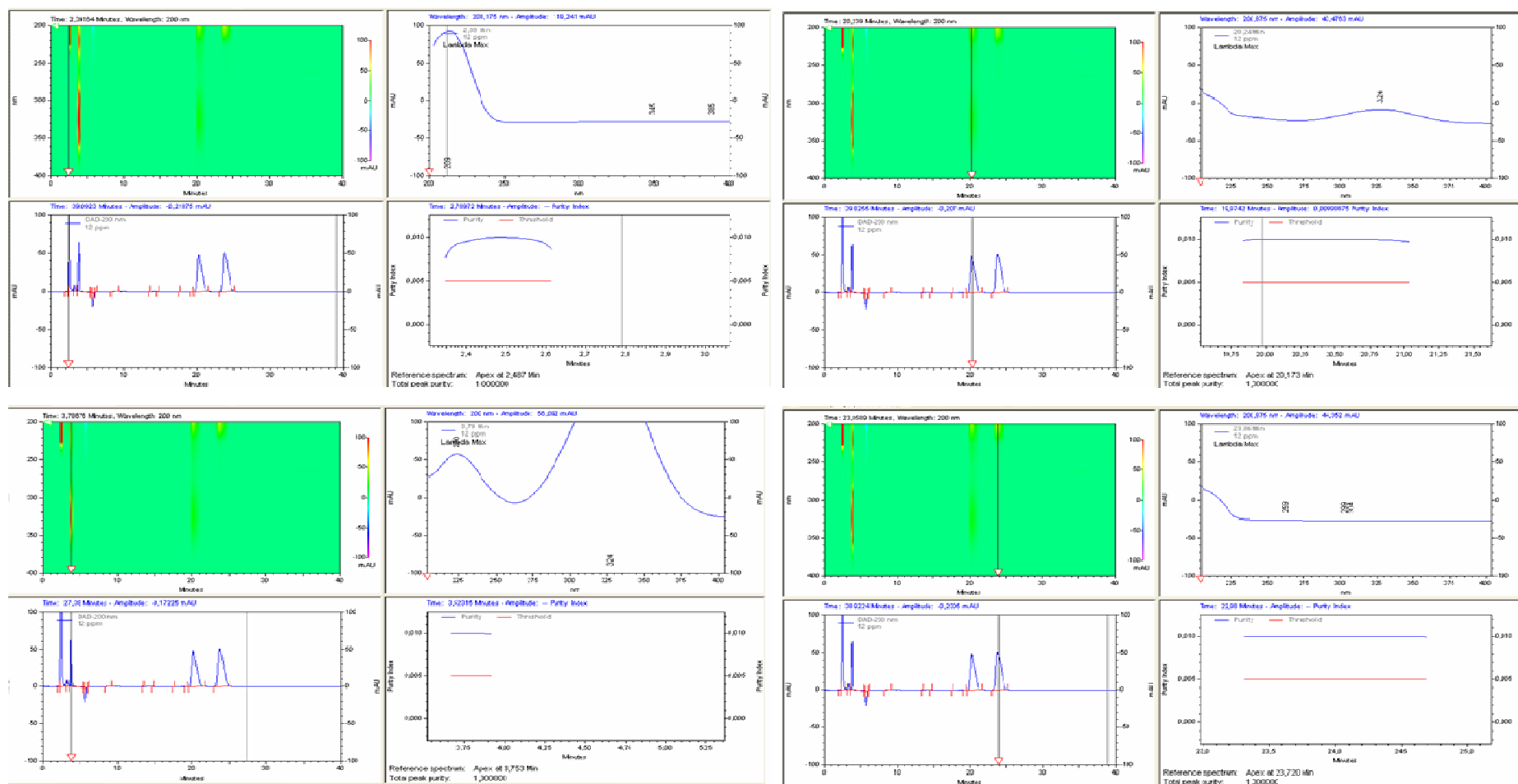
Apêndice F: Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em hidrólise alcalina (NaOH 0,1M), no tempo de 30 dias, com teor de 64,31 %



Apêndice G: Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em peróxido (3%), no tempo zero, com teor de 98,50 %



Apêndice H: Cromatograma do padrão de benznidazol e da solução de benznidazol em peróxido (3%), no tempo de 30 dias, com teor de 89,36 %



Apêndice I: Gráficos representativos da análise espectral das SQR (superior – aminoimidazol sulfato (E) e benznidazol (D) e inferior – 2-nitroimidazol (E) e N-benzilcloroacetamida (D).

10. DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO INDUSTRIAL DO COMPRIMIDO PEDIÁTRICO DE BENZNIDAZOL

10.DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO INDUSTRIAL DO COMPRIMIDO PEDIÁTRICO DE BENZNIDAZOL

10.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos, os programas de controle do vetor no Cone Sul tem reduzido a transmissão pelo *T. infestans* e modificado a epidemiologia da doença de Chagas. Enquanto o foco da transmissão permanece, ligados à pobreza e à variação do habitat do vetor, as formas de transmissão sem a presença do vetor, como oral, transfusão sanguínea e transmissão congênita tem recebido atenção redobrada. Com os relatórios regionais de taxas de soroprevalência em mulheres assintomáticas em idade reprodutiva de 5 – 40%, e taxas de transmissão vertical acima de 12%, a infecção congênita permanece como um importante meio de transmissão para outras gerações (REV DA SOCIEDADE BRASILEIRA, 2003).

Como a maioria das infecções ocorrem na infância, muitos dos tratamentos envolvem crianças, incluindo recém-nascidos que são diagnosticados ao nascer.

Em meados dos anos 90, dois estudos randomizado, duplo-cego, controlado por placebo do benznidazol em crianças entre 6 – 12 anos, com infecção por *T. cruzi* assintomático demonstraram aproximadamente 60% de eficácia, quando avaliado os resultados por conversão da sorologia de positivo para negativo, após 3 – 4 anos do tratamento. Estes dados levaram a uma atualização das diretrizes dos programas na região, com a recomendação para diagnóstico precoce e tratamento das crianças e adolescentes na fase indeterminada (crônica), incluindo a criação de programas de rastreabilidade escolar (ANDRADE, 1996; SOSA ESTANI, 1999).

Este foco de tratamento da população pediátrica não é refletido na disponibilidade de opções de tratamento. O benznidazol, desenvolvido há 30 anos atrás é ainda a principal droga de escolha, e somente está disponível na forma de comprimido “adulto” na concentração de 100 mg; os comprimidos devem ser quebrados em um quarto ou na metade. Assim como em outras drogas para doenças negligenciadas, que são largamente utilizadas na população pediátrica, a necessidade de ajuste posológico e decisão sobre o regime de tratamento, particularmente para crianças jovens, torna-se limitado.

Além disso, os dados de estudos da relação das propriedades farmacocinéticas e efeitos do benznidazol em pediatria não são conclusivos. A dosagem para a população pediátrica tem sido extrapolada baseando-se nos dados dos limites farmacocinéticos disponíveis para pacientes adultos e empiricamente derivados.

Há muito tempo que é demonstrado uma necessidade urgente de uma formulação pediátrica no controle de Chagas. Vários encontros internacionais registraram esta necessidade, como o “Scientific Working Group for Chagas’ Disease of the Research and Training in Tropical Diseases Program of the World Health Organization” (2005) e “WHO-TDR Working Group on Chagas’ Disease” (2007).

Em recente esforço coordenado pela *Pan American Health Organization* (PAHO) em 2006, registrou-se que entre os 21 países endêmicos é estimado que há 7,54 milhões de pessoas infectadas pela doença de Chagas, com 14.385 casos congênitos entre os 55.185 novos casos da doença registrados por ano. No entanto, críticas de “experts” sobre estes dados sinalizam que devem ser números maiores.

Para a definição da concentração do comprimido pediátrico, foram consideradas as seguintes condições: dose recomendada entre 5 – 10 mg/Kg, esquema ideal de um único comprimido/administração (máximo de 02 comprimidos por dia) e se necessário, apenas um único fracionamento. Também, foram compilados dados que demonstraram que a concentração atual de 100 mg, cobre pacientes acima de 20 Kg e a metade deste (50 mg), atende a pacientes entre 10 – 20 Kg. Sendo sugerido a concentração de 12,5 mg, a qual cobrirá largamente a idade infantil/faixa de peso.

Os comprimidos são obtidos através da compactação de sistemas sólidos particulados por aplicação de uma pressão até que o sistema se rearranje e deforme, dando origem a uma massa compacta de forma bem definida (MARSHALL, 2001).

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento farmacotécnico industrial de comprimidos de benznidazol 12,5 mg para tratamento de crianças com a doença de Chagas.

10.2 MATERIAL E MÉTODOS

10.2.1 Materiais

Insumos farmacêuticos para farmacotécnica

Benznidazol, celulose microcristalina 101, amido, lactose malha 200, polivinilpirrolidona (PVP), estearato de magnésio, talco

10.2.2 Reagentes analíticos

Água purificada por osmose reversa, cloreto de sódio (NaCl) Merck[®], lauril sulfato de sódio Vetec[®], ácido clorídrico (HCl) Carlo Erba[®], fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) Carlo Erba[®], acetonitrila grau HPLC JT Baker[®].

10.2.3 Equipamentos e Instrumentos farmacotécnica

Balança OHAUS e Filizola

Misturador Lawes – capacidade 1 Kg e 200 Kg

Misturador Fabbe - capacidade 30 Kg

Malaxadeira Fabbe

Granulador oscilante Lawes (malhas 3 e 2 mm – piloto e malhas 5 e 1,5 mm - industrial)

Estufa Imarvil e Lawes – 30 bandejas

Compressora Lawes – 08 punções e 50 punções

10.2.4 Equipamentos e Instrumentos analíticos

Balança Shimadzu[®] AW 220, máximo de 220 g

Phmetro Tecnal[®] modelo Tec-3MP

Purificador Osmose reversa Milli-Q Gradiente Millipore[®]

Lavadora ultra-sônica Unique[®]

Espectrofotômetro Varian[®] Cary 50 Probe

Dissoluteste Varian® - Vankel 7010 com amostrador automático VK 8000

Sistema de cromatografia líquida Merck® Elite LaChrom, composto por bomba L-2130, amostrador L-2200, forno L-2300 e detector diode array L-2455

Friabilômetro Nova Ética Mod 300

Durômetro Nova Ética 298 DGP

Câmaras climáticas Fanem Mod 345 (150 e 270 L) e Mecalor 1200 L

10.2.5 Vidrarias/Outros

Volumétricas calibradas e graduadas

Papel de filtro Inlab®

Unidade filtrante Millex Millipore® (0,22 µm)

10.2.6 Processo de fabricação

Os comprimidos são obtidos por três processos: granulação úmida, granulação seca e compressão direta. Neste estudo, dois destes foram utilizados, a granulação úmida, seguindo o mesmo processo já utilizado para o comprimido de beznidazol 100 mg (figura 01) e a compressão direta (figura 2).

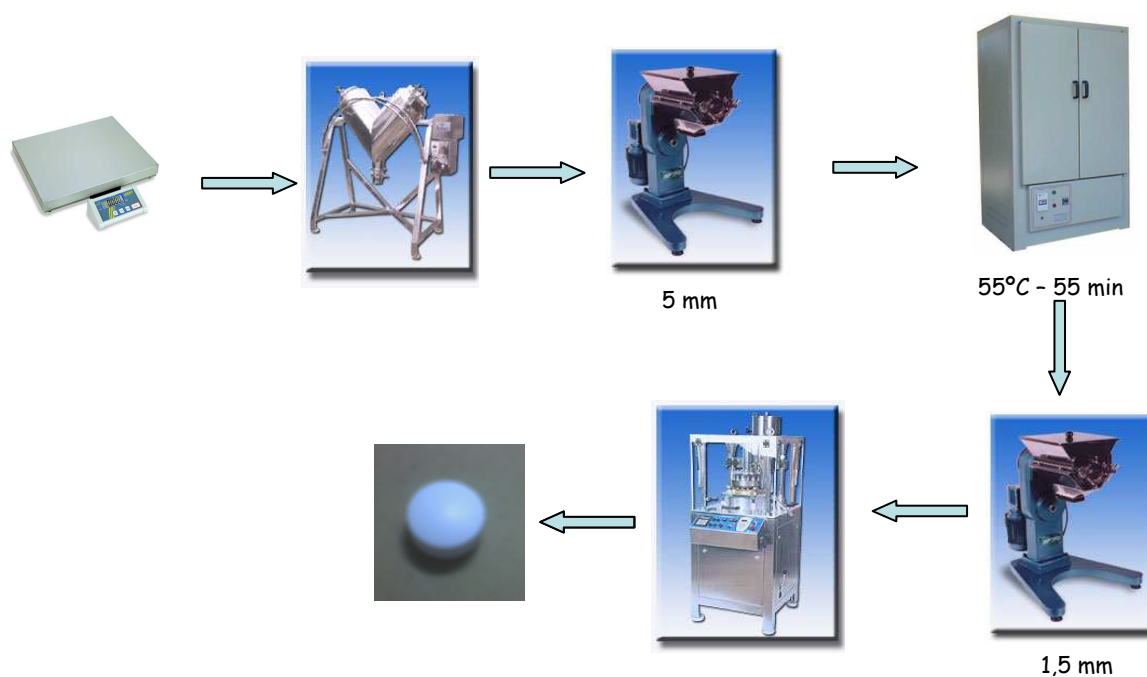


Figura 01: Esquema de fabricação de comprimidos por compressão granulação úmida

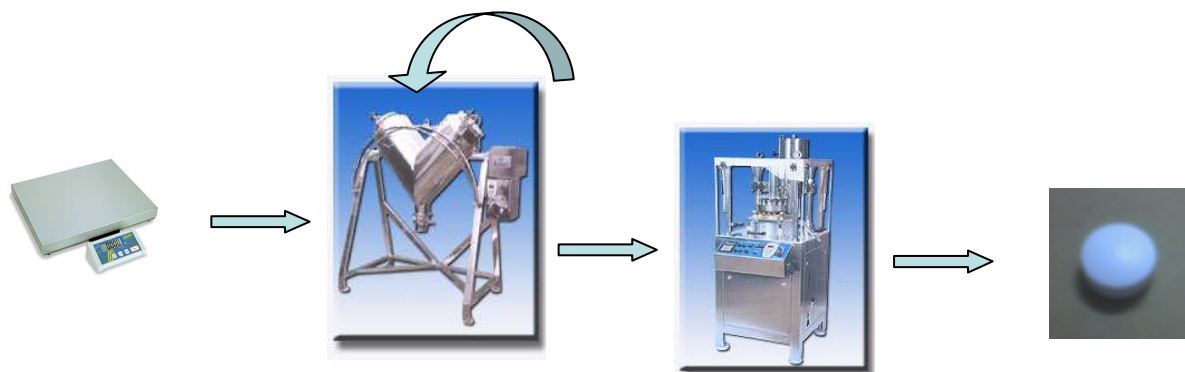


Figura 02: Esquema de fabricação de comprimidos por compressão direta

Como o objetivo do estudo foi utilizar o registro já existente na ANVISA para a concentração de 100 mg, para a realização da inclusão de nova concentração, a de 12,5 mg, segundo a RE nº 893 (BRASIL, 2003), são necessários dentre outras exigências, manter excipientes e processo de fabricação, assim como apresentar para a nova concentração o estudo de estabilidade RE nº1 (BRASIL, 2005) e perfil de dissolução frente à maior concentração RE nº 310 (BRASIL, 2004).

10.2.7 Planejamento das formulações

Para a formulação por granulação úmida, foram manipulados lotes com a mesma composição qualitativa do comprimido adulto de 100 mg e também foram propostas modificações de diluentes e de aglutinante (tabela 01) para avaliação do percentual dissolvido do benznidazol.

Tabela 01: Planificação qualitativa e quantitativa para o processo de granulação úmida para o benznidazol pediátrico

Lotes	0810LBS023	0811LBS026	0812LBS027	0903LBS036	0903LBS037	0904LBS048	0908LPS054
Componentes	%						
Benznidazol	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Amido	51,2	61,2	61,2	20,8	-	20,8	51,2
Lactose malha 200	36,8	26,8	-	67,2	50,0	-	36,8
Celulose 101	-	-	26,8	-	36,0	67,2	-
PVP	-	-	-	-	3,0	-	-
Estearato de Mg	0,4	0,4	0,4	0,4	1,0	0,4	0,4
Talco	1,6	1,6	1,6	1,6	-	1,6	1,6
Tamanho do lote (Kg)	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	10,0

10.2.8 Caracterização do fluxo de pós

Para avaliar as propriedades de fluxo dos granulados, obtidos após o processo de fabricação, foram empregados métodos indiretos (ângulo de repouso, índice de compressibilidade e fator de Hausner) e diretos (velocidade de escoamento) (AULTON, 2005).

A determinação do índice de compressibilidade percentual foi calculado a partir da densidade aparente e compactada, através da relação $IC = \frac{dc - da}{dc} \times 100$, (FIESE, 2001), e do fator de Hausner seguiu os critérios descritos na Farmacopéia Americana (USP 30, 2007). A determinação do ângulo de repouso estático foi realizado conforme método proposto por Prista *et al* (1991), baseado na altura fixa do funil e dimensões, a partir da equação: $\tan \alpha = h/r$. Para obtenção das velocidades de escoamento dos granulados avaliados, utilizou-se o mesmo aparato descrito na figura 03 e, com o auxílio de um cronômetro, determinou-se o tempo de escoamento necessário para todo o granulado escoar através do orifício do funil e repousar na superfície plana.

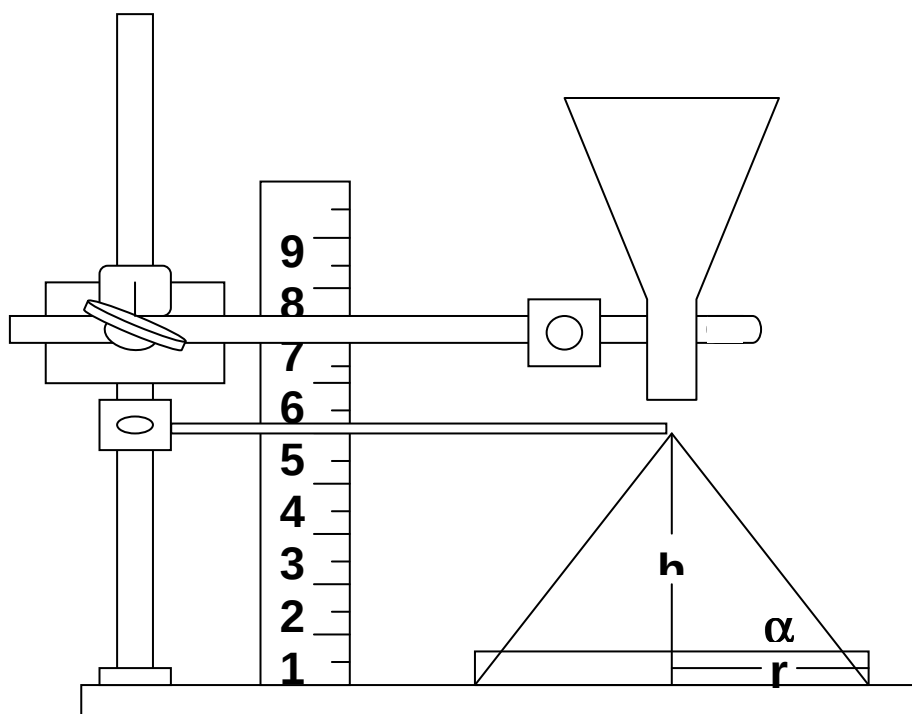


Figura 03: Aparato para determinação de ângulo de repouso estático e velocidade de escoamento (dimensões do funil – Ø abertura superior: 11,3 cm; Ø abertura inferior: 1,0 cm; distância do funil (saída) ao papel: 20,0 cm) (Prista, 1991)

10.2.9 Densidade aparente e compactada

As densidades aparentes dos sistemas particulados foram determinadas, indiretamente, através das medidas de seus volumes aparentes (CASTRO, 2003). Estas foram determinadas para todos os lotes de formulação em estudo. Uma massa definida foi pesada analiticamente com $n=3$ e transferida para a proveta calibrada de 100 mL do equipamento Tap density, Varian[®]. Esta massa foi medida volumetricamente e a razão foi o resultado da densidade aparente (d_a). Após sucessivas compactações, a razão entre a massa (g) e o volume ocupado pelo pó compactado (mL), resultou na determinação da densidade compactada (d_c), conforme as equações abaixo.

$$d_a = m(g)/v_a(\text{mL}) \text{ e } d_c = m(g)/v_c(\text{mL})$$

10.2.10 Análise de distribuição granulométrica

Para todos os lotes em estudo farmacotécnico foram realizadas três (03) pesagens analíticas, com massa (g) previamente definida. Esta massa foi transferida para o agitador de peneiras Tipo Magnético, marca Bertel e passada pelas malhas (600; 425; 250; 150 e 75 μm).

10.2.11 Controle de qualidade

Para avaliar o peso médio, a friabilidade, a dureza e a desintegração de comprimidos foi seguido como referência a Farmacopéia Brasileira (1988). Para analisar a dissolução, uniformidade de conteúdo e teor, foram seguidos os métodos desenvolvidos e validados nesta tese.

10.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na granulação úmida, os pós são transformados em massa úmida, com adição de um aglutinante. Esta é granulada, seca, calibrada e lubrificada antes de ser comprimida. A obtenção do granulado tem como objetivo otimizar as propriedades de fluxo, evitar segregação durante as etapas posteriores do processo, minimizar variações de granulometria de diferentes lotes de matérias-primas, além de reduzir os riscos que o manuseio e inalação de pós finos causam à saúde (LAMOLHA, 2007).

Visto que na formulação para o benznidazol 100 mg, o amido tem diferentes funções, ora atuando como diluente, ora como aglutinante e por fim, como desintegrante, após reprodução do lote 0810LBSo23 foi proposto avaliar a influência do amido como desintegrante, assim o quantitativo da formulação referente ao lote 0812LBSo26 foi fracionado como diluente e com aglutinante, além de ter sido retirado 10% do diluente lactose, e este acrescentado ao amido. Em seguida, foi proposto a substituição do diluente lactose por celulose microcristalina 101, no lote 0812LBSo27; e, no lote 0903LBSo36 foi utilizado o amido como aglutinante (em uma pasta a 12%) e desintegrante. A diferença percentual foi acrescentada a lactose já presente a formulação. Uma outra proposta manipulada foi representado pelo lote 0903LBSo37, o qual apresenta duas alterações, a modificação do agente aglutinante (amido por PVP) e a substituição de um diluente (lactose por celulose 101).

Os resultados da caracterização dos granulados por granulação úmida das formulações acima estão na tabela 02.

Tabela 02: Propriedades de fluxo dos granulados obtidos destinados a fabricação de comprimidos de benznidazol 12,5 mg – pediátrico

Propriedades	Lotes					
	0811LBS026	0812LBS027	0903LBS036	0903LBS037	0904LBS048	0908LPS054
Ângulo de repouso (°)	30,11	29,98	30,55	Infinito	26,49	24,59
Velocidade de escoamento	3'06"	4'08"	3'45"	-	3'43"	2'96"
Densidade aparente (g/mL)	0,52	0,47	0,56	0,36	0,38	0,58
Densidade compactada (g/mL)	0,64	0,88	0,79	0,57	0,50	0,70
Índice de compressibilidade (IC < 15%)	18,75	30,88	29,11	36,84	24,00	17,14
Fator de Hausner (FH < 1,25)	1,23	1,45	1,41	1,58	1,32	1,21

Diante dos resultados, observou-se que os lotes 0812LBS026 e o 0908LPS054 manipulados por granulação úmida para obtenção de comprimidos 12,5 mg de benznidazol e com composição qualitativa idêntica à formulação já registrada na ANVISA para o comprimido de benznidazol 100 mg, apresentaram os melhores resultados, comparando o índice de compressibilidade (IC) e o fator de Hausner (FH).

Carr propôs o índice de compressibilidade que constitui a medida direta da resistência potencial dos arcos ou das pontes de um pó, isto é, da sua estabilidade. Os resultados obtidos caracterizam um granulado com bom fluxo (grânulos triturados com fluxo livre), o qual poderá a ser classificado como excelente, caso se adicione mais lubrificante.

Já *Hausner* constatou que a razão d_c/d_a estava relacionada com o atrito entre as partículas e, como tal, poderia ser utilizado para prever a propriedade de fluxo dos pós. Ele demonstrou que pós de escasso atrito entre as partículas, como é o caso de esferas de tamanho grosseiro, apresentam razões de aproximadamente 1,2, enquanto pós de maior coesividade, de fluxo restrito, como os de formato lamelar, apresentam fator de Hausner superiores a 1,6 (STANIFORTH, 2005).

Outra propriedade avaliada foi a distribuição granulométrica. Foi observado que também neste parâmetro, os lotes 0811LBS026 e 0908LPS054 apresentaram resultados semelhantes de distribuição (tabela 03), confirmando os resultados acima descritos na tabela 02.

Tabela 03: Análise da distribuição granulométrica dos granulados obtidos destinados a fabricação de comprimidos de benznidazol 12,5 mg – pediátrico

Malha (μ m)	Lotes					
	0811LBSo26	0812LBSo27	0903LBSo36	0903LBSo37	0904LBSo48	0908LBSo54
600	59,00	29,08	0,43	7,92	24,51	50,37
425	15,16	12,67	31,49	10,30	15,89	14,90
250	14,14	16,17	18,18	28,00	23,08	11,47
150	4,49	8,30	10,36	25,80	13,00	5,06
75	5,73	10,72	26,09	21,50	14,48	5,04
Coletor	1,48	23,06	13,55	6,48	9,04	13,16

Para todos os lotes foram obtidos comprimidos, no formato redondo, plano, sulcado e diâmetro de 7mm, de cor branco a branco amarelado. Seguem, abaixo, na tabela 04, os resultados de controle de qualidade para os comprimidos benznidazol 12,5 mg, que atenderam as especificações de controle de qualidade.

Tabela 04: Resultados do controle de qualidade dos comprimidos de benznidazol 12,5 mg – pediátrico

Parâmetros	Especificações	Lotes					
		0811LBSo26	0812LBSo27	0903LBSo36	0903LBSo37	0904LBSo48	0908LBSo54
Peso médio	125 mg $\pm$ 7,5%	126,92	127,40	125,84	125,94	124,98	125,70
Friabilidade	Máximo 1,5%	0,30	0,40	0,09	0,05	0,01	0,07
Dureza	Mínimo 3,5 Kgf/cm ²	8,24	8,70	4,99	5,20	4,85	5,73
Desintegração	Até 10 min a 37°C	36"	1'53"	34"	8'29"	2'35"	2'09"
Dissolução	60 minutos (60%)	97,26	97,94	89,28	94,65	104,79	106,29
	120 minutos (80%)	101,69	100,94	91,65	104,07	108,81	107,39
Teor	90 a 110%	105,50	102,85	105,20	102,90	102,75	102,34

Considerando a exigência requerida pela ANVISA para alterações pós-registro e inclusão de concentração (12,5 mg), que tem como uma das obrigações a realização de perfil de dissolução comparando-o com o referência, o comprimido de benznidazol 100 mg e que deveria apresentar F1 (fator de diferença) entre 0 e 15 e F2 (fator de semelhança) entre 50 a 100, conforme a RE nº 310 (BRASIL, 2004), nenhum destes lotes foram aprovados,

o que poderia ser justificado a princípio pela própria relação de proporcionalidade entre as concentrações (100 mg é 08 vezes maior que 12,5 mg), o que justificou o estudo realizado de solubilidade e dissolução.

Além disso, conhecendo a variabilidade inerente ao processo de granulação úmida (composto por pasta de amido) e todas as suas etapas críticas (malaxagem, granulação, secagem e calibração) foi proposta a transposição de escala da última formulação, para um tamanho de lote de 30 Kg, o que corresponde a 240.000 unidades fabricadas e além da realização dos controles em processo para os lotes de bancada e piloto, foram acrescentados os controles em processo para a secagem (determinação de umidade no granulado) e uniformidade de conteúdo nos vértices, antes da malaxagem e após o acréscimo dos lubrificantes.

Foram manipulados três lotes industriais, na Divisão de Sólidos do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), o processo de fabricação utilizou pasta de amido a 15%, com temperatura de secagem na estufa a 50°C.

Abaixo, seguem os resultados dos lotes industriais.

Tabela 05: Propriedades de fluxo dos granulados dos três lotes industriais de comprimidos de benznidazol 12,5 mg – pediátrico

Propriedades	Lotes		
	0912LISo64	1001LISo65	1002LISo66
Densidade aparente (g/mL)	0,63	0,63	0,63
Densidade compactada (g/mL)	0,75	0,77	0,77
Índice de compressibilidade (IC < 15%)	16,00	18,18	18,18
Fator de Hausner (FH < 1,25)	1,19	1,22	1,22

Os resultados obtidos para o comportamento de fluxo dos granulados para os três lotes industriais apresentaram-se reprodutíveis e bastante semelhantes àqueles obtidos para o lote piloto 0908LPSo54 (10 Kg).

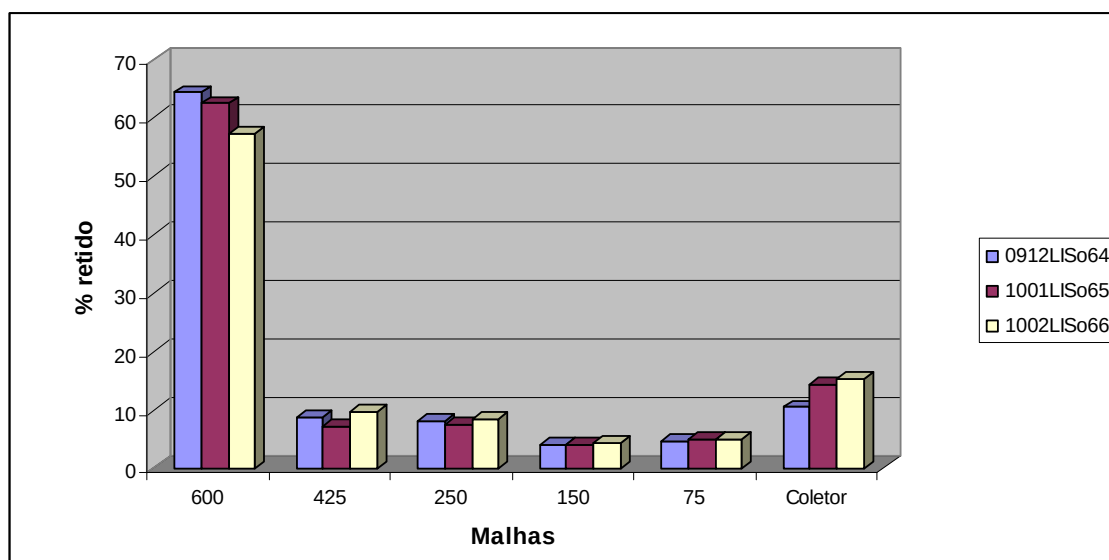


Figura 04: Análise da distribuição granulométrica dos granulados dos três lotes industriais de comprimidos de benznidazol 12,5 mg - pediátrico

A distribuição granulométrica dos lotes industriais (figura 04) apresentou uma maior retenção dos granulados na malha de 600 μm (em média 61,30%), quando comparado com o lote semi-industrial (40,50%). No entanto, aproximadamente o dobro de partículas finas ($< 75 \mu\text{m}$) foram quantificadas no coletor (13,35%) e este valor foi inferior a 20%, o que significa que para uma granulação úmida, estas partículas são suficientes para preenchimento dos espaços deixados pelos granulados mais grossos. Segundo Cury (2007), para produzir comprimidos de pequenas dimensões, caso do benznidazol ($\varnothing 7 \text{ mm}$) é importante a seleção do tamanho de grânulos.

Uma outra forma de medir a reprodutibilidade no processo é observando os resultados de variação de peso médio e dureza, sendo estes parâmetros avaliados a cada 15 minutos durante toda a compressão do lote.

Abaixo seguem os resultados do controle de qualidade dos comprimidos, físico e físico-químicos.

Tabela 06: Resultados do controle de qualidade dos comprimidos de benznidazol 12,5 mg – pediátrico – lotes industriais

Parâmetros	Especificações	Lotes		
		0912LISo64	1001LISo65	1002LISo66
Peso médio	125 mg $\pm$ 7,5%	127,93	126,53	125,13
Friabilidade	Máximo 1,5%	0,06	0,08	0,08
Dureza	Mínimo 3,5 Kg/cm ²	5,62	6,28	7,19
Desintegração	Até 10 min a 37°C	3'06"	2'50"	2'17"
Teor (MIEE)	90 a 110%	100,10	98,12	100,40
Uniformidade de conteúdo	85 a 115%	98,69	98,72	97,60
Umidade	A registrar	2,76	3,79	3,55

Os três lotes atenderam às especificações analíticas.

Por fim, foi realizado o perfil de dissolução, comparativo com o lote referência 08041722 (lote industrial do benznidazol 100 mg) e calculado o F1 e o F2. Uma premissa para realização deste comparativo foi alcançada para a formulação “pediátrica”, pois esta passou a se comportar semelhante ao lote “adulto”, considerando que tanto a formulação do comprimido de 100 mg, quanto a formulação do comprimido de 12,5 mg, não dissolvem mais do que 85% de ativo nos primeiros 15 minutos. Isto foi possível devido ao “ajuste fino” da concentração de pasta de amido (15%) no processo de transposição de escala (10 Kg para 30 Kg). Uma outra elucidação foi obtida, visto que os estudos procederam em meio dissolução que garantia a “condição sink” para a maior concentração (100 mg). Assim foram comparados os resultados dos perfis dos lotes pediátricos ao da formulação adulta, e calculado os fatores F1 e F2, conforme tabela 07.

Tabela 07: Resultados da comparação dos perfis de dissolução entre os lotes pediátricos (12,5 mg) x lote adulto (100 mg)

Lote adulto	Lote pediátrico	F1	F2
08041722	0912LISo64	18,90	43,01
08041722	1001LISo65	12,79	50,29
08041722	1002LISo66	13,02	50,45

Para o lote 0912LISo64 tanto o F1 como o F2 não atende ao especificado para os fatores de diferença e semelhança. Os outros dois lotes atendem, mas é relevante destacar que estão bem próximos aos limites, que são respectivamente, 0 a 15 e 50 a 100.

A figura 05 mostra o perfil de dissolução para os três lotes industriais e a tabela 08, os cálculos de F1 e F2, entre eles demonstram a reprodutibilidade dos lotes.

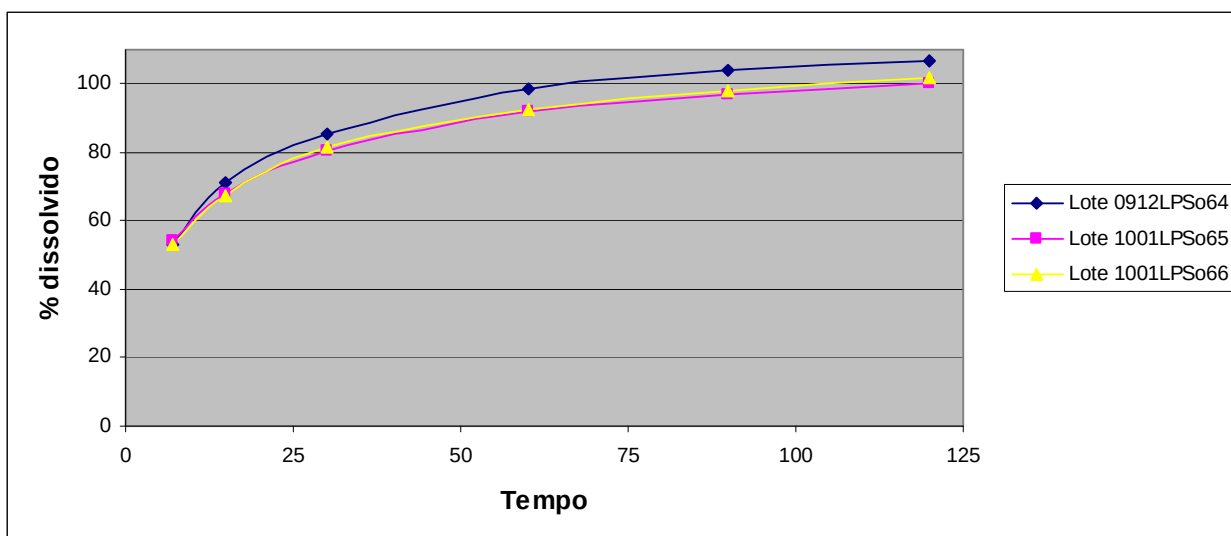


Figura 05: Resultados do perfil de dissolução dos três lotes industriais de comprimidos de benznidazol 12,5 mg – pediátrico

Tabela 08: Resultados da comparação entre os perfis de dissolução dos lotes pediátricos (12,5 mg)

Lote pediátrico	Lote pediátrico	F1	F2
0912LISo64	0912LISo65	6,26	62,10
0912LISo64	1001LISo66	4,55	68,46
0912LISo65	1002LISo66	1,29	90,85

Diante do objetivo maior que é o desenvolvimento de uma formulação pediátrica (12,5 mg), com composição qualitativa e processo de fabricação semelhante ao da formulação já registrada e praticada pelo LAFEPE, os lotes foram acondicionados em PVDC âmbar, frasco de vidro âmbar (controle) e PVC cristal. Todos os lotes foram colocados em estabilidade, segundo a RE nº1 (BRASIL, 2005) da ANVISA (figura 06).



Figura 06: Três diferentes tipos de acondicionamento primário em estudo de estabilidade para os comprimidos desenvolvidos de benznidazol 12,5 mg – pediátrico

Na tabela 09 e apêndices A e B, seguem os resultados referentes ao acompanhamento de estabilidade acelerada e longa duração, os quais demonstram estabilidade físico-química nos três primeiros meses de estudo.

Tabela 09: Resultados do estudo de estabilidade acelerado (EA) e longa duração (LD), referente a 3 meses, para o lote 0912LISo64

Parâmetros	Especificações	Tipo de embalagem					
		PVC cristal		PVDC âmbar		Vidro âmbar	
		EA	LD	EA	LD	EA	LD
Peso médio	125 mg $\pm$ 7,5%	127,00	133,00	124,00	123,00	125,00	125,00
Friabilidade	Máximo 1,5%	0,08	0,07	0,08	0,24	0,08	0,01
Dureza	Mínimo 3,5 Kgf/cm ²	5,18	5,98	5,23	5,66	6,24	6,69
Desintegração	Até 10 min a 37°C	2min23s	2min16s	3 min	1min26s	2min35s	2min3s
Dissolução	60 min - mín 60%	83,85	89,96	89,84	87,07	84,11	92,06
	120 min – mín 80%	91,70	98,66	96,96	95,68	90,84	97,86
Teor (MIEE)	90 a 110%	103,11	99,41	102,08	98,94	103,39	102,81
Uniformidade de conteúdo	85 a 115%	98,15	102,47	100,19	99,88	106,08	101,79

10.4 CONCLUSÕES

Após resultados preliminares de estudo de estabilidade e longa duração, os três lotes industriais se apresentam com estabilidade físico-química. Também se pode concluir que eles foram produzidos com reprodutibilidade de processo fabril.

Sendo assim, ao completar 06 meses dos estudos de estabilidade, a formulação poderá ser encaminhada para o estudo de farmacocinética comparativa em adultos voluntários sadios.

A formulação também será encaminhada ao estudo de farmacocinética populacional em crianças com a doença de Chagas.

Por fim, ao ser registrado, este medicamento irá proporcionar uma terapêutica segura aos inúmeros pacientes de Chagas infantil.

10.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.L., ZICKER F., OLIVEIRA, R.M., ALMEIDA SILVA S., LUQUETTI A., TRAVASSOS, L.R., *et al.* Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, v. 348, n. 9039, p. 1407 – 1413, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº 1. *Guia para realização de estudo de estabilidade de medicamentos*. Publicado no DOU em 1º de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº 310. *Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução*. Publicado em DOU em XX de setembro de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº 893. *Guia para realização de alterações, inclusões e notificações pós-registro de medicamentos*. Publicado em DOU em XX de junho de 2003.

CASTRO, A.D.; VICENTE, J.A.; MOURÃO, S.C.; BUENO, J.H.F.; EVANGELISTA, R.C; GREMIÃO, M.P.D.. Effect of maize starch concentration on *in vitro* acetaminophen release from tablets. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 3, 2003.

Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 6, p. 767 – 771, 2003.

CURY, B.S.F.; BUENO, J.H.F.; SILVA JÚNIOR, N.P.; CASTRO, A.D.; GREMIÃO, M.P.D.. Influência das propriedades de granulados de lactose nas características físicas dos comprimidos. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 1, p. 85 – 92, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. *Métodos Gerais*. São Paulo: Editora Atheneu, 4ª edição, 1988.

FIGESE, E.F.; HAGEN, T.A.. *Pré-formulação*. In: Lachman L.; Lieberman, H.; Kanig, J.L.. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, v. I, p. 295 - 339, 2001.

LAMOLHA, M.A., SERRA, C.H.R.. Avaliação das propriedades de fluxo dos granulados e dissolução dos comprimidos de hidroclorotiazida 50 mg obtidos por granulação úmida. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 3, p. 435 – 446, 2007.

MARSHALL, K.. *Compressão e consolidação de sólidos em pó*. In: Lachman L.; Lieberman, H.; Kanig, J.L.. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, v. I, p. 121 – 124, 2001.

PAHO - Pan American Health Organization. *Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas em Las Américas* – OPS/HDM/CD/425-06 (Circulación restringida), 2006.

PRISTA, L.V.N., ALVES, A.C., MORGADO, R.M.R.. *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica*. Lisboa: Editora fundação Calouste Gulbenkian, 4ª ed., v. 1, p. 591 – 799, 1991.

SOSA ESTANI, S., SEGURA, E.L.. Treatment of Trypanosoma cruzi infecção in the indeterminate phase: experience and current guidelines in Argentina. *Medicina*, v. 59, n. 2, p. 166 – 170, Buenos Aires, 1999.

STANIFORTH, J. *Fluxo de pós*. In: AULTON, M.E.. Delineamento de formas farmacêuticas. Porto Alegre: Editora Artmed, 2ª ed, p. 208 - 220, 2005.

Apêndice A: Tabela de resultados do estudo de estabilidade acelerado (EA) e longa duração (LD), referente a 3 meses, para o lote 1001LISo65

Parâmetros	Especificações	Tipo de embalagem					
		PVC cristal		PVDC âmbar		Vidro âmbar	
		EA	LD	EA	LD	EA	LD
Peso médio	125 mg $\pm$ 7,5%	131,00	129,00	126,00	128,00	126,00	125,00
Friabilidade	Máximo 1,5%	0,15	0,15	0,01	0,07	0,01	0,01
Dureza	Mínimo 3,5 Kg/cm ²	5,44	6,03	6,30	6,04	6,97	7,43
Desintegração	Até 10 min a 37°C	2min43s	2min9s	2min49s	1min28s	1min45s	2min19s
Dissolução	60 min - mín 60%	86,05	87,51	90,65	91,40	86,76	88,63
	120 min – mín 80%	94,14	95,85	99,01	100,05	95,05	96,67
Teor (MIEE)	90 a 110%	100,70	98,29	105,17	100,38	101,17	102,82
Uniformidade de conteúdo	85 a 115%	102,78	103,80	106,83	100,73	103,58	102,74

Apêndice B: Tabela de resultados do estudo de estabilidade acelerado (EA) e longa duração (LD), referente a 3 meses, para o lote 1002LISo66

Parâmetros	Especificações	Tipo de embalagem					
		PVC cristal		PVDC âmbar		Vidro âmbar	
		EA	LD	EA	LD	EA	LD
Peso médio	125 mg $\pm$ 7,5%	126,9	129,8	125,9	125,1	126,7	126,6
Friabilidade	Máximo 1,5%	0,24	0,23	0,32	0,24	0,24	0,08
Dureza	Mínimo 3,5 Kgf/cm ²	5,52	4,90	5,65	5,36	6,32	7,28
Desintegração	Até 10 min a 37°C	49 seg	52 seg	3 min	2 min	2 min	2 min
Dissolução	60 min - mín 60%	86,96	89,56	87,86	84,26	88,11	89,86
	120 min – mín 80%	95,36	99,30	95,15	94,60	96,50	97,39
Teor (MIEE)	90 a 110%	103,81	103,48	104,57	101,34	104,00	102,77
Uniformidade de conteúdo	85 a 115%	102,63	102,18	100,94	102,71	101,59	102,67

