



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

LEANDRO DE ALBUQUERQUE MEDEIROS

DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE CÁPSULAS DE
COLECALCIFEROL DE USO TERAPÊUTICO: UM ESTUDO COMPARATIVO
COM FORMULAÇÕES MAGISTRAIS

Recife

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE CÁPSULAS DE
COLECALCIFEROL DE POTENCIAL NUTRACÊUTICO: UM ESTUDO
COMPARATIVO COM FORMULAÇÕES MAGISTRAIS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Recife
2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Medeiros, Leandro de Albuquerque

Desenvolvimento farmacotécnico de cápsulas de colecalciferol de uso terapêutico: um estudo comparativo com formulações magistrais/ Leandro de Albuquerque Medeiros– Recife: O Autor, 2013.

91 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Pedro José Rolim Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Alimentos funcionais D 2. Deficiência de vitamina 3. Terapêutica I. Rolim Neto, Pedro José (orientador) II. Título**

615.328

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-228



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 26 de fevereiro de 2013.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 26 de fevereiro de 2013, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
(Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof.^a Dr.^a Mônica Felts de La Roca Soares
(Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof.^a Dr.^a Rosali Maria Ferreira da Silva
(Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^a. Dr.^a Lenita Almeida Amaral

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr.^a. Ângela Maria Isidro Farias

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr.^a. Silvia Regina Arruda de Moraes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Dedicado a todas as pessoas que amo: meu pai José Medeiros Filho (*in memoriam*), à minha mãe Marília, minha irmã Rebeca, meu sobrinho Miguel, a toda minha família paterna e materna, aos meus queridos amigos que participaram com apoio e torcida e em especial, pelo companheirismo, carinho e colaboração de Amanda Quintas, os quais são para mim o principal combustível para que eu possa seguir com força e vida nesta jornada.

Dedico também às dificuldades e adversidades da vida, pois sem elas não teríamos razão para crescer, e evoluir.

AGRADECIMENTOS

- Ao **Prof. Pedro Rolim e Profª Larissa Rolim**, pela orientação e apoio em todos os sentidos, para o desenvolvimento deste projeto.
- À **Amanda Quintas**, que pelo companheirismo, paciência e apoio sob todas as formas, foi fundamental na realização deste projeto.
- À **equipe LTM** e em especial, **Lariza Alves, Graziella Marques e Camila Melo, Danilo Fontes, André Nascimento, Cybelly Marques, Ricardo Tadeu, Caio Cesar**, que contribuíram sob as mais diversas formas para a realização do grupo de trabalho.
- À **Profª. Suely Galdino (*in memorian*)** pela idealização, realização e coordenação de forma sublime do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica.
- A **todos os mestres** pelos quais passei em minha trajetória profissional e acadêmica, que transmitiram sob uma forma bastante particular, ensinamentos que perdurarão para toda uma vida.
- À **Farmácia Roval de Manipulação**, que gentilmente concedeu os insumos necessários para realização do projeto e que possibilitou, pelo viés profissional, a realização desta importante etapa da minha vida.
- Ao **Laboratório de Análises de Difração de Raios X**, que possibilitou parte da análise deste trabalho.
- À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste projeto na forma de bolsa de estudo).
- A **todos os demais** que participaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído.”

Confúcio

RESUMO

A hipovitaminose D é um estado de carência nutricional da vitamina D que possui uma prevalência estimada em aproximadamente um bilhão de pessoas em todo o mundo. Há evidências que do ponto de vista de intervenção medicamentosa, o colecalciferol pode exercer efeito preventivo, paliativo e/ou terapêutico, em doenças crônicas não transmissíveis, em monoterapia e com dosagens muito acima das estabelecidas como nutricionais (até 100.000 UI/dose), e nesse contexto, caracterizando como nutracêutico. Pela disponibilidade no mercado nacional com tais especificações farmacêuticas apenas em farmácias de manipulação e pela necessidade de mais estudos clínicos com propósito de avaliar seu potencial nutracêutico, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento farmacotécnico magistral de cápsulas gelatinosas duras com colecalciferol (100.000 UI / dose) e comparar sua qualidade frente a produtos manipulados em farmácias do município do Recife. Foram realizados testes de caracterização física e físico-química do insumo farmacêutico ativo (descrição macroscópica; caracterização térmica e determinação de pureza; obtenção de cinética de degradação não isoterma; caracterização por infravermelho; difração de raios X; microscopia eletrônica de varredura; análise granulométrica; ângulo de repouso e velocidade de escoamento), os quais se apresentaram conforme com especificações farmacopeicas. Em seguida, foi realizado um teste de solubilidade qualiquantitativa para dar fundamentação experimental aos testes de dissolução, no qual foi escolhido como meio de melhor eficiência (pH = 6,8 com lecitina de soja [0,75mM]). Por métodos termogravimétricos, foram realizados testes de compatibilidade fármaco – excipiente e os excipientes qualitativamente escolhidos foram butil-hidroxitolueno, lactose monoidratada e celulose microcristalina. Através do conceito de planejamento fatorial, foram obtidos nove lotes de bancada, os quais tiveram sua composição variada quantitativamente. Os testes de controle de qualidade demonstraram que todos foram aprovados nos testes de umidade, peso médio e desintegração, porém apenas três foram aprovados no teste de doseamento. O desenvolvimento do método de dissolução apresentou-se inviável por espectrofotometria na região do UV-vis, dada a não reprodutibilidade dos resultados obtidos. Apenas um dos lotes das farmácias apresentou doseamento dentro da faixa aceitável. Diante da impossibilidade do desenvolvimento de um método de dissolução, não foi possível a realização desta etapa de controle de qualidade e, portanto, mais estudos são necessários para sua conclusão.

Palavras-chave: Nutracêuticos. Desenvolvimento farmacotécnico. Controle de qualidade. Dissolução.

ABSTRACT

Hypovitaminosis D is a nutritional deficiency state of vitamin D, which has prevalence, estimated at about one billion people around the world. There is evidence that, in a pharmacologic context, the cholecalciferol can exert a preventive, palliative and/or therapeutic effect, in non-transmissible chronic diseases, in doses that exceed that considered as food (up to 100,000 IU/dose), and in this context, characterizing it as nutraceutical. Due to the availability in the Brazilian market with such pharmaceutical specifications, only by compounding pharmacies and the need for more clinical studies with purpose to assess their potential nutraceutical, this study aimed the compounding hard capsules pharmacotechnical development with cholecalciferol (100,000 IU/dose) and compare their quality against the products handled in pharmacies in the city of Recife. Physical and physicochemical characterization tests of drug (macroscopic description; thermal characterization and determination of purity; obtaining kinetics of degradation non isotherm; infrared; characterization x-ray diffraction; scanning electron microscopy particle size analysis; rest angle and flow rate) presented themselves according pharmacopeia specifications. There was conducted a quantitative solubility test to give experimental substantiation of dissolution tests, and the most efficiently medium chosen was with pH 6.8 plus soy lecithin [0, 75 mM]). By thermogravimetrics analysis, tests of drug-excipient compatibility and the excipients qualitatively chosen were butylated hydroxytoluene, lactose and microcrystalline cellulose. Applying the concept of factorial planning, were obtained nine experimental lots, which had its composition varied quantitatively. Quality control tests showed that all lots were approved in testing loss for desiccation, average weight and disintegration, but only four lots were approved by quantification analytical method. The development of the dissolution method was infeasible by spectrophotometry in the UV-vis, given the non-reproducibility of the results obtained. Only one of compounding pharmacies showed quantification within the acceptable range. Faced with the impossibility of developing a method of dissolution, it has not been possible to achieve this stage of quality control and, therefore, further studies are needed for its completion.

Keywords: Nutraceuticals. Pharmacotechnical development. Quality control. Dissolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema das funções extra musculoesqueléticas da vitamina D	28
Figura 2 - Espectro de intervenções terapêuticas que podem afetar a saúde ou doença.	31
Figura 3 – Estrutura química do Colecalciferol.	35
Figura 4 – Cromatogramas obtidos a partir do colecalciferol e seus produtos de degradação	36
Figura 5 – Procedimento padrão de obtenção dos lotes de bancada	48
Figura 6 – Profundidade da coleta das amostras obtidas durante a dissolução, conforme Farmacopeia Brasileira 5ª edição.	52
Figura 7 – Curva DSC do colecalciferol obtida sob razão de aquecimento de 2°C/min e fluxo de nitrogênio de 100 mL/min.	55
Figura 8 – Espectro de absorção no IV-TF da vitamina D ₃	55
Figura 9 – Curvas TG/DTG e DTA da vitamina D obtidas em atmosfera de nitrogênio (50 mL.min ⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ .	57
Figura 10 – Curvas TG da vitamina D obtidas em atmosfera de nitrogênio (50 mL.min ⁻¹) a diferentes razões de aquecimento (5; 7,5; 10; 15 e 20°C.min ⁻¹).	58
Figura 11 – Curvas do logaritmo da razão de aquecimento (logβ) em função do inverso da temperatura (K ⁻¹) da vitamina D.	58
Figura 12 – Gráfico da função G(X) do inverso da temperatura da vitamina D.	59
Figura 13 - Difratograma e eletromicrografia (aumento de x350 e x3380) do pó de vitamina D ₃	60
Figura 14 - Histograma de distribuição granulométrica e curvas de retenção e passagem da vitamina D ₃	61
Figura 15 – Curva de calibração do colecalciferol no meio de dissolução em pH 6,8 + LC 0,75 mM, nas concentrações 1, 2 e 3 µg/mL.	64
Figura 16 – Linearidade do método de quantificação do colecalciferol no meio de dissolução em pH 6,8 + LC 0,75 mM, nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0; 2,25; 2,5; 2,75; 3,0; 3,25 µg/mL.	64
Figura 17 – Curvas DTA da Vitamina D ₃ e suas misturas físicas com excipientes, na proporção 1:1, sob razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de nitrogênio de 100 mL/min.	68
Figura 18 – Curvas DTG da vitamina D ₃ e sua mistura física com BHT (1:1), sob razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de nitrogênio de 100 mL/min	69

Figura 19 – Resultados do controle de qualidade das formas farmacêuticas dos lotes de bancadas e das 3 fórmulas obtidas em farmácias de Manipulação do município do Recife 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de diagnóstico do status da vitamina D	26
Tabela 2 – Meios de dissolução utilizados no desenvolvimento do método de dissolução para o colecalciferol	44
Tabela 3 – Planejamento fatorial completo para desenvolvimento do método de dissolução para o colecalciferol	45
Tabela 4 – Representação dos experimentos realizados para seleção quantitativa dos excipientes na formulação de cápsulas de vitamina D3 100.000 UI, utilizando o planejamento fatorial completo de Montgomery (2001).	46
Tabela 5 – Planejamento para seleção quantitativa de excipientes para obtenção de forma farmacêutica sólida de vitamina D3 100.000 UI.	47
Tabela 6 – Resultados da propriedade de compactação e fluxo da vitamina D ₃	62
Tabela 7 – Meios de dissolução utilizados no desenvolvimento do método de dissolução para o colecalciferol.	63
Tabela 8 – Valores do teste de repetibilidade e parâmetros estatísticos.	65
Tabela 9 - Resultados do teste do desenvolvimento do método de dissolução, expressos em unidades de absorvância em leitura pontual em 265 nm no espectrofotômetro UV-vis	66
Tabela 10 – Temperaturas iniciais de fusão e degradação da vitamina D3 isolada e em mistura física observadas através das curvas DTA, sob razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de 100 mL/min.	68
Tabela 11 – Excipientes selecionados para composição das cápsulas gelatinosas duras de colecalciferol na dose de 100.000 UI	71
Tabela 12 – Lotes de bancada obtidos para cápsulas gelatinosas duras de colecalciferol 100.000 UI	72
Tabela 13 – Doseamento de colecalciferol em 5 comprimidos de cada frasco	75
Tabela 14 – Valores de absorvâncias encontrados para aplicação dos parâmetros de dissolução	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Relação entre regulamentação sanitária e critérios para classificação de produtos à base de vitaminas e minerais.	32
Quadro 2 – Usos terapêuticos do colecalciferol e seus níveis de evidência	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 BIOQUÍMICA DA VITAMINA D	25
3.2 ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS DA VITAMINA D	26
3.2.1 Epidemiologia da Hipovitaminose D	26
3.1.6 Relação da hipovitaminose D com doenças crônicas	27
3.2.3 Vitamina D3 como nutracêutico	29
3.3 COLECALCIFEROL COMO MATÉRIA-PRIMA FARMACÊUTICA	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. COLECALCIFEROL	39
4.2 SOLVENTES	39
4.3 REAGENTES	39
4.4 CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA COLECALCIFEROL	40
4.4.1 Controle de Qualidade do Colecalciferol	40
4.4.1.1 Determinação de pureza	40
4.4.1.2 Identificação molecular por espectrometria de absorção na região do Infravermelho	40
4.4.1.3 Descrição macroscópica	40
4.4.2 Caracterização física e físico-química do colecalciferol	41
4.4.2.1 Caracterização térmica: obtenção do perfil e cinética de degradação	41
4.4.2.2 Difração de raios X	41
4.4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura	41
4.4.2.4 Análise granulométrica	42
4.4.4.5 Determinação do ângulo de repouso e velocidade de escoamento	42
4.4.4.6 Densidade aparente e compactada	42
4.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA O COLECALCIFEROL (MATÉRIA-PRIMA) COM LEITURA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA VISÍVEL	43

4.5.1 Matérias-primas e reagentes	43
4.5.2 Equipamentos e vidrarias	43
4.5.3 Desenvolvimento do método de dissolução	43
4.5.3.1 Solubilidade quali-quantitativa (seleção do meio de dissolução)	43
4.5.3.2 Avaliação da linearidade e repetibilidade para quantificação do colecalciferol no meio de dissolução.	44
4.5.3.3 Seleção dos parâmetros da dissolução	44
4.6 DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E OBTENÇÃO DOS LOTES DE BANCADA	45
4.6.1 Compatibilidade físico-química do colecalciferol frente a excipientes candidatos	45
4.6.2 Seleção qualitativa dos excipientes candidatos à formulação	46
4.6.3 Seleção quantitativa dos excipientes candidatos	46
4.6.4 Obtenção dos lotes de bancada	47
4.7 CONTROLES DE QUALIDADE DOS LOTES DE BANCADA <i>VERSUS</i> FORMULAÇÕES DE MERCADO	48
4.7.1 Determinação do Peso Médio das Cápsulas Manipuladas	48
4.7.2 Determinação do teor de água dos lotes de bancada	Error! Bookmark not defined.
4.7.3 Determinação do tempo médio de desintegração das cápsulas dos lotes de bancada	50
4.7.4 Determinação do teor de colecalciferol dos lotes de bancada <i>versus</i> formulações de mercado	51
4.7.4.1 Verificação da calibração do equipamento:	51
4.7.4.2 Doseamento das formas farmacêuticas	51
4.7.5 Aplicação dos parâmetros de dissolução para as formas farmacêuticas finais	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA COLECALCIFEROL	54
5.1.1 Controle de qualidade do colecalciferol	54
5.1.1.1 Determinação de pureza	54
5.1.1.2 Identificação molecular por espectrometria de absorção na região do Infravermelho	55
5.1.1.3 Descrição macroscópica	56
5.1.2 Caracterização física e físico-química do colecalciferol	56
5.1.2.1 Caracterização térmica: obtenção do perfil e cinética de degradação	56
5.1.2.2 Difração de raios X e Microscopia eletrônica de varredura	59
5.1.2.3 Análise granulométrica	60

5.1.2.4 Determinação das propriedades de fluxo e compactação	62
5.2.2 Desenvolvimento do método de dissolução	63
5.2.2.1 Solubilidade qualiquantitativa (seleção do meio de dissolução)	63
5.2.3.2 Avaliação da linearidade e repetibilidade para quantificação do colecalciferol no meio de dissolução.	64
5.2.3.2 Seleção dos parâmetros da dissolução	65
5.3 DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E OBTENÇÃO DOS LOTES DE BANCADA	67
5.3.1 Compatibilidade físico-química do colecalciferol frente a excipientes candidatos	67
5.3.2 Seleção qualiquantitativa dos excipientes candidatos à formulação	69
5.4 CONTROLE DE QUALIDADE DOS LOTES DE BANCADA versus FORMULAÇÕES DE MERCADO	72
5.4.1 Determinação do peso médio, tempo de desintegração, umidade e teor de colecalciferol dos lotes de bancada (fórmulas-testes) e das fórmulas manipuladas (fórmulas de mercado)	72
5.4.2 Aplicação dos parâmetros de dissolução para as formas farmacêuticas finais	75
6 CONCLUSÕES	78
7 PERSPECTIVAS	80
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a definição de nutracêuticos adotada por publicações científicas e amparada na pela agência sanitária canadense é “um produto isolado ou purificado de alimentos os quais são geralmente comercializados em formas medicinais, não associado usualmente a alimentos, que demonstra ter benefícios fisiológicos ou promover proteção contra doenças crônicas” (CANADA, 1998).

A hipovitaminose D é um estado carencial de vitamina D que tem na suplementação nutricional a principal ferramenta terapêutica, uma vez que medidas tradicionais como o aumento do consumo de alimentos contendo vitamina D3 (colecalfiferol) ou vitamina D2 (ergocalciferol) e a exposição solar, têm se mostrado pouco efetivas na prática clínica para a manutenção do estado nutricional da vitamina D (BANDEIRA et al., 2006). Nos últimos 10 anos, esta vitamina ganhou destaque nas publicações científicas em virtude das evidências da correlação positiva, entre a ocorrência de doenças crônicas (diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas, câncer etc.) e seu estado carencial em diversas populações no mundo (CANTORNA, 2006; SOUBERBIELLE et al., 2010; ZITTERMANN et al., 2012; MUSCOGIURI et al., 2012), fato explicado pela redução da atividade moduladora de receptores fisiológicos de vitamina D, recentemente identificadas em outros tecidos, como células beta-pancreáticas, células nervosas e células imunológicas (IGNJATOVI & MAJKI, 2012).

Considerando então a importância da suplementação nutricional da vitamina D (principalmente na forma de colecalfiferol) com o objetivo de manutenção fisiológica, prevenção e/ou tratamento de doenças crônicas, o colecalfiferol assume portanto, a conotação técnico-científica de nutracêutico, embora não haja definição sanitária no Brasil no momento para esta terminologia. Doses de até 100.000 UI já foram investigadas clinicamente em doenças crônicas, no intuito de compreender o potencial nutracêutico da vitamina D3, seja na prevenção ou no tratamento (HOLICK, 2007; HOLICK, 2011). No Brasil (1998), a vitamina D3 se classifica como alimento/suplemento alimentar (até 800 UI/dose), medicamento isento de prescrição médica (até 2.000 UI/dose) ou medicamento com venda sob prescrição médica (acima de 2.000 UI/dose), porém estas últimas duas categorias são ausentes do mercado nacional, pois as exigências sanitárias são as mesmas para medicamentos alopáticos, encarecendo os custos para registro e autorização, formando uma barreira de entrada para novos produtos industrializados com propósito terapêutico.

Informações disponíveis na literatura sobre os padrões de qualidade da vitamina D3 são insuficientes, visto que as exigências sanitárias específicas para registro de medicamentos não são aplicadas a alimentos/suplementos nutricionais. Além disso, os dados farmacopeicos sobre especificações técnicas do insumo colecalciferol são escassas.

Outra lacuna técnica, de origem sanitária, também ocorre para farmácias de manipulação, uma vez que as regulamentações não exigem análises de controle de qualidade mais rigorosas, como doseamento, desintegração e dissolução *in vitro*.

Assim, este trabalho objetivou o desenvolvimento na forma farmacêutica de cápsula gelatinosa dura contendo colecalciferol como insumo farmacêutico ativo (dose unitária de 100.000 UI) e comparar sua qualidade frente a formulações magistrais, adquiridas em farmácias de manipulação do município de Recife/PE.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver uma formulação com colecalciferol de potencial nutracêutico, na forma farmacêutica de cápsula gelatinosa dura e comparar sua qualidade frente a formulações magistrais., disponíveis em farmácias de manipulação do município de Recife/PE.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo de pré-formulação do colecalciferol (caracterização físico-química; estudo de compatibilidade com excipientes);
- Realizar desenvolvimento farmacotécnico das cápsulas de colecalciferol (planejamento fatorial; produção dos lotes de bancada);
- Desenvolver e comparar os ensaios de controle de qualidade dos produtos-testes e das fórmulas magistrais.

Revisão da literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOQUÍMICA DA VITAMINA D

A vitamina D é classificada como nutriente lipossolúvel, que pode ser obtido por fontes dietéticas, tais como o óleo de fígado de bacalhau, ostras, peixes, ovos, carnes, leite e derivados enriquecidos, além da suplementação nutricional, a qual pode ser feita sob a forma de ergocalciferol, ou vitamina D₂ (obtida pela radiação de fungos) e colecalciferol ou vitamina D₃ (extraída de alimentos ou obtida por síntese química). Apesar da disponibilidade de ambas as formas em suplementos alimentares, foi demonstrado que o colecalciferol é mais efetivo que o ergocalciferol em humanos (Armas, Hollis and Heaney, 2004).

Segundo Arunabh (2003), estima-se que 80% da quantidade ingerida seja incorporada aos quilomícrons e transportada para o sistema linfático, através do duodeno, ocorrendo conjuntamente com a alimentação. Há evidências de que se administrado juntamente com alimentos, este processo ocorre normalmente (Biancuzzo *et al.*, 2010; Tangpricha *et al.*, 2003), porém alterações no metabolismo lipídico (Wortsman *et al.*, 2000) e problemas digestivos (Maqbool and Stallings, 2008) podem contribuir com a redução a absorção de vitaminas lipossolúveis. Apesar disto, a principal forma de obtenção é pela exposição solar, onde a luz ultravioleta tipo B (entre 290 nm e 315 nm) conjuga duplas pontes de hidrogênio nos carbonos C5 e C7, produzindo pré-vitamina D. Uma vez produzida, a pré-vitamina D forma homodímeros em aproximadamente 24 horas, transformando-se em Vitamina D₃, a qual é posteriormente ligada à Proteína Ligante de Vitamina D (DPB) e à albumina, carreando-a para demais tecidos (Premaor and Furlanetto, 2006).

A primeira etapa de metabolização ocorre no fígado, com uma reação de hidroxilação em C 25, transformando-se em calcidiol, a qual é a principal forma de armazenamento da vitamina D no organismo e de mensuração dos níveis plasmáticos, pois tem um tempo meia-vida de 10 a 21 dias (Dawson-Hughes *et al.*, 2005). Posteriormente, ela volta a sofrer nova reação de hidroxilação nos rins, pela ação da calcidiol-1 α -hidroxilase, transformando-se em 1,25-di-hidroxivitamina D, ou calcitriol. Esta nova entidade é considerada a forma ativa da vitamina D, responsável por todos os seus efeitos biológicos (HOLICK, 2007).

3.2 ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS DA VITAMINA D

3.2.1 Epidemiologia da Hipovitaminose D

Conforme as Diretrizes de Avaliação, Tratamento e Prevenção da Deficiência de Vitamina D, da Sociedade Norte-Americana de Endocrinologia (HOLICK *et al.*, 2011), a hipovitaminose D pode ser diagnosticada realizando a dosagem de calcidiol sérico, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Critérios de diagnóstico do status da vitamina D

<i>Status</i>	<i>Níveis séricos de 25(OH)Vit D</i>
Suficiência	30 – 100 ng/mL
Insuficiência	21 – 29 ng/mL
Deficiência leve	15 – 20 ng/mL
Deficiência moderada	10 – 14 ng/mL
Deficiência grave	< 10 ng/mL

Fonte: HOLICK *et al.*, 2011

Este critério de diagnóstico tem sido extensamente discutido e questionado por alguns autores, mas a maioria deles adota este padrão de referência atualmente, pelas variáveis que podem interferir nesta classificação, como método de diagnóstico, relevância clínica e presença de comorbidades relacionadas à hipovitaminose D (Premaor and Furlanetto, 2006).

Estima-se que quase um bilhão de pessoas no mundo têm algum grau de hipovitaminose D, dentre todas as idades e grupos étnicos (HOLICK, 2007; GORDON *et al.*, 2004; LIPS *et al.*, 2006), mesmo em países onde a exposição solar é alta durante maior parte do ano, como os da zona tropical (HOLICK, 2009; PIGNOTTI *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2009; UNGER *et al.*, 2010). Dentre as causas que buscam explicar este fenômeno, estão a (1) pouca exposição à luz solar (uso excessivo de roupas, países de latitude alta, baixa penetração da radiação UVB durante o inverno, uso de fotoprotetores, confinamento em locais onde não ocorre exposição solar); (2) redução da capacidade de síntese de vitamina D pela pele (relacionados com envelhecimento, fototipo, indivíduos negros e asiáticos); (3) doenças que alteram o metabolismo do calcidiol ou calcitriol (fibrose cística, doenças do trato gastrointestinal, hepáticas, renais, imobilização, insuficiência cardíaca) e (4) a baixa disponibilidade de vitamina D nos alimentos (COMINETTU; COZZOLINO, 2009 *apud* COZZOLINO, 2009. p.300).

Holick e colaboradores (2005) mostraram que mais de 50% de mulheres na pós-menopausa em tratamento para osteoporose possuem hipovitaminose D. Em outro estudo,

42% das mulheres norte-americanas entre 15 e 49 anos de idade apresentaram níveis abaixo de 20 ng/mL de calcidiol (NESBY-O'DELL; SCANLON; COGSWELL, 2005). Estudantes, residentes de medicina e profissionais médicos do Hospital de Boston também apresentaram deficiência, mesmo com a ingestão de leite diariamente, consumo de salmão semanalmente e uso de suplementos vitamínicos (TANGPRICHA et al, 2002). Na Europa, achados de hipovitaminose D também foram observados índices de hipovitaminose D significativos (HOLICK, 2006; LIPS, 2001; CHAPUY et al, 1997). Em países localizados na zona tropical ou próximos, como Austrália, Emirados Árabes, Arábia Saudita, Índia, Turquia e Líbano, de 30 a 50% das crianças e adultos apresentam níveis inferiores a 20 ng/mL de 25-hidroxivitamina D (SEDRANI, 1984; MARWAHA et al, 2005; EL-HAJJ FULEIHAN et al; McGRATH et al, 2001; VAN DER MEI et al, 2007).

No Brasil, regiões de menor incidência solar tem apresentado maior incidência da hipovitaminose D. Um estudo realizado em São Paulo mostrou que 91,4% das pacientes selecionadas para um estudo de intervenção com suplementação cálcio e vitamina D3, apresentavam níveis de 25-(OH)-Vitamina D abaixo de 30 ng/mL (Pignotti *et al.*, 2010).

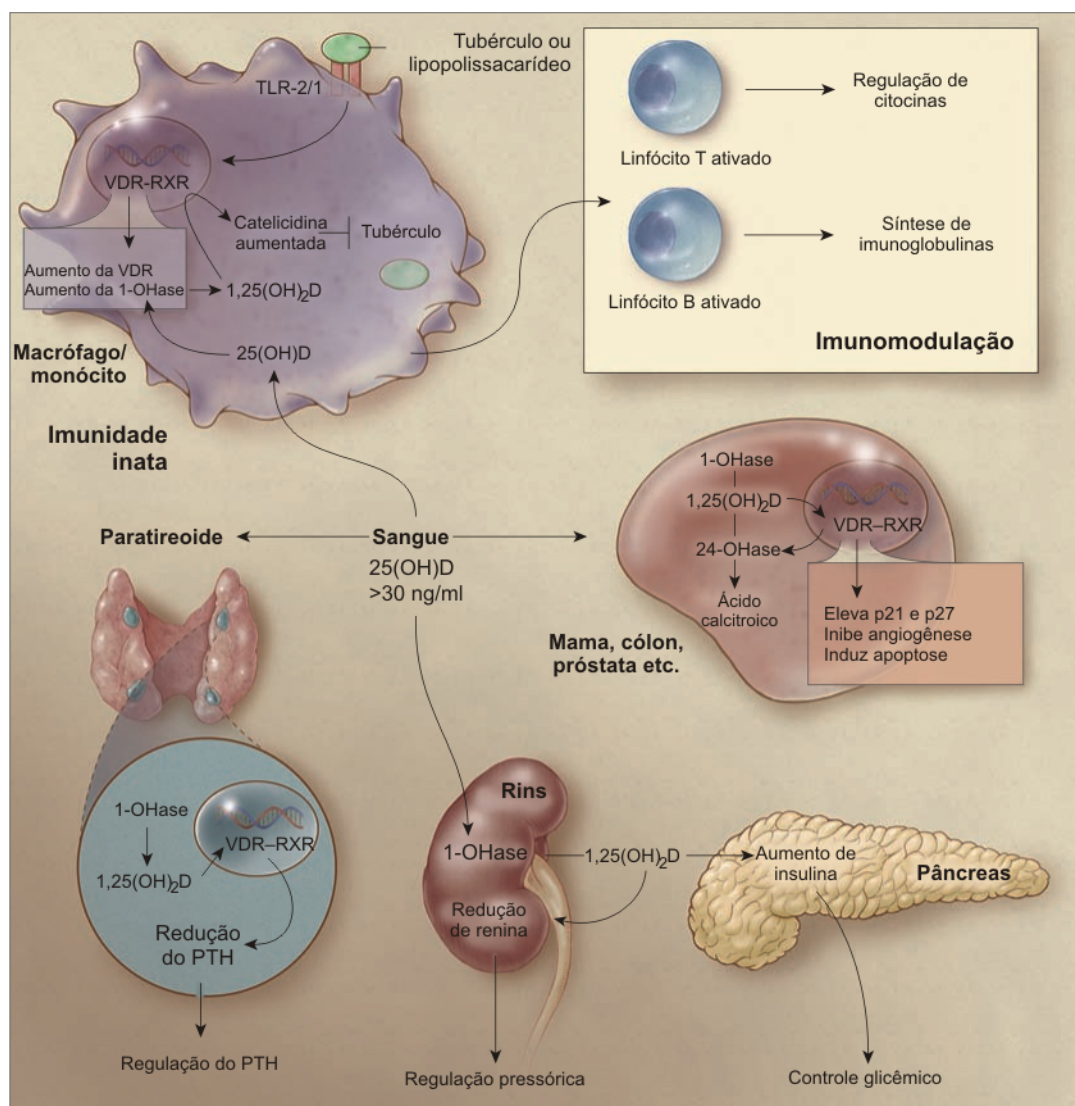
3.1.6 Relação da hipovitaminose D com doenças crônicas

A função primária da Vitamina D é regular os níveis de cálcio e fósforo no organismo, viabilizando a absorção intestinal pela síntese de calbindina, uma proteína ligante de cálcio que é responsável pelo seu transporte pelos canais de cálcios, também estimulados na presença de vitamina D. Também estimula a atividade da fosfatase alcalina (responsável por hidrolisar fosfatos orgânicos) e o sistema de transporte de fosfato dependente de sódio (COMINETTU; COZZOLINO, 2009 *apud* COZZOLINO, 2009. p.304). Este processo garante a absorção adequada destes dois íons, que são indispensáveis para o metabolismo osteomuscular. Na deficiência da vitamina D, ocorre também deficiência da absorção destes micronutrientes, o que está relacionado com doenças osteomusculares, como osteoporose, osteomalácia, raquitismo, elevando o risco de fraturas e quedas (HOLICK *et al.*, 2011).

Todavia, evidências sugerem que a presença de receptores de 1,25-(OH)₂-Vitamina D em outros tecidos, pode exercer um papel importante no controle fisiológico de diversos órgãos e que a hipovitaminose D pode elevar o risco de doenças crônicas (Figura 1). Estudos revelam que populações de maior risco de deficiência de vitamina D, como as de regiões de maior latitude, de baixa ingestão dietética diária, com menor exposição solar diária, estão mais propensas desenvolver diversos tipos de cânceres (próstata, pâncreas, mama, ovários,

cólon e linfomas), doenças autoimunes (osteoartrose, diabetes melito tipo 1, esclerose múltipla, artrite reumatoide), doenças cardiovasculares (hipertensão arterial, insuficiência crônica congestiva), diabetes tipo 2, desordens psiquiátricas (esquizofrenia e depressão), distúrbios intestinais e problemas respiratórios (HOLICK, 2007).

Figura 1 – Esquema das funções extra musculoesqueléticas da vitamina D



Adaptado de: HOLICK, 2007

3.2.3 Vitamina D3 como nutracêutico

O termo nutracêutico, que associa os termos “nutriente” e “farmacêutico”, surgiu em 1989 e foi definido como “alimentos, suplementos alimentares ou alimentos para nutrição enteral (*medical foods*) que podem promover benefícios à saúde, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças” (BROWER, 1998). Ao observar a definição de “alimentos funcionais”, adotado ineditamente no Japão em 1998, a qual consiste em “alimentos naturais ou processados que melhoram a performance fisiológica ou previne ou trata uma doença específica” (JAPAN, 1998), nós podemos identificar uma semelhança em termos de objetivos à saúde de ambas as categorias de produtos. Porém, a diferença fundamental entre alimentos funcionais e nutracêuticos está no aspecto físico do produto, uma vez que o primeiro consiste em produtos com aspecto físico de alimentos ou bebidas, e o segundo apresenta-se em formas farmacêuticas (comprimidos, pós, cápsulas, pastilhas etc.)(LOCKWOOD, 2007).

Grande parte das nações não possui uma definição e legislação sanitária regulatória para o termo “nutracêutico”, com exceção do Canadá, que visando recomendar uma estrutura conceitual para a regulamentação de alegações de saúde para nutracêuticos e alimentos funcionais (CANADA, 1998), propôs uma definição alinhada com as observadas em trabalhos científicos:

“Um nutracêutico é um produto isolado ou purificado de alimentos que geralmente é vendido em formas farmacêuticas, geralmente não associadas aos alimentos. Um nutracêutico demonstra ter um benefício fisiológico ou fornece proteção contra doenças crônicas”.

“Alimento funcional é aparentemente similar, ou pode ser, um alimento convencional e é consumido como parte da alimentação usual e demonstra ter benefícios fisiológicos e/ou reduzir o risco de doenças crônicas por meio de funções nutricionais básicas.”

Com esta compreensão, admite-se que o termo “nutracêutico” envolve um conceito abrangente, envolvendo não somente substâncias químicas nutricionais – proteínas, peptídeos e aminoácidos; carboidratos e fibras; gorduras e ácidos graxos; vitaminas e minerais (BRASIL, 1998; BRASIL, 2006) – mas também compostos bioativos não nutricionais, que apresentam propriedades benéficas e funcionais à saúde, como flavonoides, polifenóis, organossulfurados, prebióticos, probióticos e fosfolipídeos (BRASIL, 2002).

Outra definição adotada e mais comumente citada em artigos científicos e consensos terapêuticos (Brett *et al.*, 2003; Rajasekaran, Sivagnanam e Xavier, 2008; Keservani *et al.*, 2010) foi proposta por Zeisel (1999), na qual a enquadra na categoria de suplemento nutricional e deve conter uma substância com atividade biológica originalmente derivada de

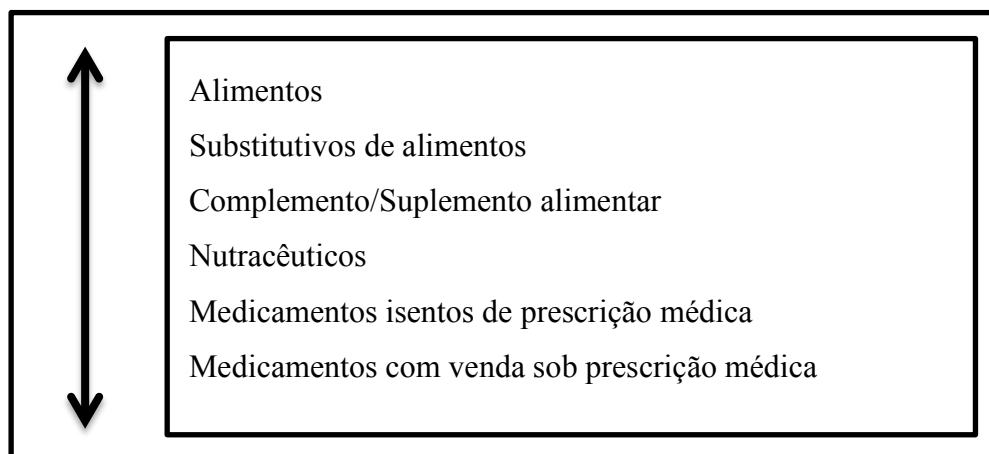
plantas, presente numa matriz não alimentar, cujas dosagens excedem àquelas normalmente encontradas em alimento e que promovam benefícios à saúde.

Um exemplo são os ácidos graxos essenciais ômega 3 ($\omega 3$), que são encontrados em alguns tipos de peixes e crustáceos. Para a redução dos níveis de triglicerídeos entre 20 a 40%, é necessário fazer a ingestão diária de dois a quatro gramas de ácidos graxos $\omega 3$ (Kris-Etherton, Harris & Appel, 2003), que podem ser obtidos pela alimentação com ingestão de 100 a 200 g de atum, 200 a 400 g de salmão, 400 a 800 g de camarão (Natural Standard, 2013). Porém, considerando os hábitos dietéticos ocidentais, esta quantidade pode ser alcançada com mais eficiência com a suplementação dos ácidos graxos $\omega 3$ (em cápsulas), que contém complementando a ingestão diária recomendada para a obtenção deste efeito cardiovascular. Neste caso, com este objetivo terapêutico (redução de triglicerídeos), os ácidos graxos $\omega 3$ passam a ter um efeito não somente nutricional, mas também nutracêutico (Brett *et al.*, 2003).

É evidente a necessidade de uma legislação sanitária sobre os nutracêuticos, pois não visam apenas complementar/suplementar as necessidades da dieta de uma determinada população, mas o destaque se dá pelos efeitos preventivos ou terapêuticos. Além do que, como visto acima, os componentes podem ser nutrientes ou compostos bioativos de plantas classificadas como alimentos (metabólitos secundários). Nos Estados Unidos, os nutracêuticos estão enquadrados como suplementos nutricionais pela *Food and Drug Administration*, com base na Lei de Educação e Saúde em Suplementos Nutricionais – DSHEA (1994), aprovada com o objetivo de promover e ampliar o consumo de suplementos nutricionais pela população, com base em sua segurança e eficácia presumidas, visando melhorar a saúde e qualidade de vida e assim, minimizando os custos elevados de tratamentos de maior complexidade. A DSHEA garantiu também o aumento dos recursos destinados para pesquisas conduzidos pelo Departamento de Medicina Alternativa do Instituto Nacional de Saúde (equivalente ao Ministério da Saúde brasileiro) (UNITED STATES OF AMERICA, 1994).

Um modelo esquemático da Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos (Figura 2), presente no “Guia médico para o uso clínico de suplementos nutricionais e nutracêuticos”, explica o espectro de categorias de produtos para saúde que têm como componentes nutrientes e/ou compostos bioativos, mas numa perspectiva técnico-científica, pois os aspectos regulatórios sobre os nutracêuticos ainda não estão claramente definidos nos Estados Unidos, como mencionado acima (Brett *et al.*, 2003):

Figura 2 - Espectro de intervenções terapêuticas que podem afetar a saúde ou doença.



Fonte: BRETT et al., 2003.

Analisando a legislação brasileira sobre vitaminas, as classificações principais às quais estes produtos podem se encontrar são dois: alimento ou medicamentos (isentos ou não da prescrição médica), não existindo uma categoria sanitária intermediária de nutracêuticos. Como alimento, as vitaminas fazem parte da categoria de suplementos vitamínicos e/ou minerais (ou simplesmente “suplementos”), os quais são destinados para contemplar com estes nutrientes a dieta diária de uma pessoa saudável, em casos onde sua ingestão a partir da alimentação, seja insuficiente ou quando a dieta requerer suplementação. Devem conter um mínimo de 25%, e no máximo até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas e ou minerais (que visa atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupo de pessoas de uma população sadia), na porção diária indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos, nem serem considerados como dieta exclusiva, caracterizando-se como vitaminas isoladas ou associadas entre si, minerais isolados ou associados entre si e por fim, associação de vitaminas com minerais, sendo permitida a inclusão de adjuvantes alimentares ou excipientes descritos em farmacopeias e compêndios oficialmente reconhecidos. Nesta categoria, não são aceitas qualquer tipo de fortificação ou enriquecimento com outros tipos de nutrientes (macronutrientes) não podendo conter substâncias com propriedades terapêuticas, álcool, hormônios, fármacos e derivados de plantas (desde o pó até compostos bioativos isolados). (BRASIL, 1998; BRASIL, 2005).

Caso no mínimo um dos nutrientes contidos na fórmula (dose unitária) ultrapasse seu valor da IDR, o produto passa então a ser regulamentado pela área de medicamentos da ANVISA e é obrigatório seu registro como medicamento. Entretanto, ele pode ser (1) isento de prescrição médica ou (2) necessitar da prescrição médica para sua comercialização, e nesta

discussão, entra o conceito do Nível Máximo de Segurança (NMS), que tem como objetivo estabelecer os limites de dosagens seguras dos nutrientes para a população brasileira (para a automedicação). Assim, produtos em que a dosagem de pelo menos um dos componentes (vitamina/mineral) esteja entre o valor da IDR e NMS, seu registro é enquadrado como medicamento isento de prescrição médica. Caso pelo menos um dos componentes tenha sua dosagem superior ao NMS (e na ausência de um valor de NMS estabelecido para um determinado nutriente no Brasil, ultrapassando a *Tolerable Upper Level Intake* (UL), estabelecida nos Estados Unidos), este produto passa então a ter a categoria de medicamento com venda sob prescrição médica (BRASIL, 1998). O Quadro 1 mostra um modelo de agrupamento destes dispositivos legais e suas principais características:

Quadro 1 – Relação entre regulamentação sanitária e critérios para classificação de produtos à base de vitaminas e minerais.

Regulamentação	RDC 269/2005	Portaria 40/1998	
Classificação sanitária	Alimento	Medicamento	
Categoria sanitária	Suplemento nutricional	Medicamento isento de prescrição médica	Medicamento com venda sob prescrição médica
Limites de dosagens	Dosagem de nutrientes de 25% até 100% da IDR	Dosagem de nutrientes entre IDR e NMS/UL	Dosagem de nutrientes acima do NMS/UL

Após os achados entre a correlação da hipovitaminose D (especialmente a deficiência nutricional) com doenças crônicas, a vitamina D3 sendo utilizada como ferramenta de intervenção terapêutica em estudos clínicos, no intuito de avaliar seu potencial nutracêutico ou medicamentoso e foi até o momento, investigada em 45 doenças/afecções de saúde (NATURAL STANDARD, 2013). O Quadro 2 mostra a relação destas condições e o nível de evidência científica respectivo, quanto à suplementação de vitamina D:

Quadro 2 – Usos terapêuticos do colecalciferol e seus níveis de evidência

Nível de Evidência	Doença/distúrbio
A (evidência positiva forte)	• Hipofosfatemia familiar • Hipofosfatemia relacionada à síndrome de Falconi • Hiperparatireoidismo relacionado à deficiência de vitamina D • Hipocalcemia relacionada à hipoparatiroidismo • Osteomalácia (adultos) • Psoríase • Osteodistrofia • Deficiência de vitamina D
B (evidência positiva)	• Prevenção de quedas • Dores e fraqueza muscular • Osteoporose • Osteodistrofia renal
C (evidência inconsistente)	• Osteomalácia induzida por anticonvulsivantes • Asma • Doenças autoimunes • Aumento da densidade óssea em crianças • Doenças ósseas (relacionadas a doença/transplante renal) • Prevenção do câncer • Doença cardiovascular • Aumento da performance cognitiva • Osteoporose induzida por corticosteroides • Prevenção e tratamento de fraturas • Osteodistrofia hepática • Redução da morbimortalidade na AIDS • Hiperlipidemia • Hipertensão • Imunomodulação • Doença renal crônica • Distúrbios do humor • Redução da mortalidade • Esclerose múltipla • Fortalecimento da musculatura em idosos • Síndrome mielodisplástica • Osteogênese imperfeita • Osteoporose secundária a fibrose cística • Desordem afetiva sazonal • Verrugas senis • Disfunção sexual • Discromias (lesões pigmentadas) • Diabetes tipo 1 • Diabetes tipo 2 • Deficiência de vitamina D (lactante e lactente) • Vitiligo • Ganho de peso (pós-menopausa)
D (evidência negativa)	-
F (evidência negativa forte)	-

Fonte: NATURAL STANDARD, 2013.

As condições associadas a distúrbios do metabolismo ósseo encontram-se bem fundamentadas e a suplementação da vitamina D3 já faz parte de protocolos clínicos na hipofosfatemia,

propôs que meta-análise recente que avaliou o risco de fraturas em populações de idosos em suplementação com vitamina D3, mostrou que apenas dosagens acima de 800 UI apresentou uma redução do risco de fraturas significativa, com redução de risco em 30% para fratura de quadril e 14% para fraturas não vertebrais.

3.3 COLECALCIFEROL COMO MATÉRIA-PRIMA FARMACÊUTICA

Inserido no contexto de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (P, D & I) de novos medicamentos, o processo de caracterização de matérias primas farmacêuticas constitui o primeiro passo, pois fornece subsídios para os critérios de escolha e o uso de artifícios tecnológicos que ajustam características críticas para obtenção do produto final, e permitem o planejamento dos processos adequados para obtenção do mesmo. Além disso, comporta a verificação dos parâmetros físico-químicos da matéria prima, tais como pureza, tamanho de partícula, densidade aparente e compactada e solubilidade aquosa, dentre outros (LACHMAN; LIBERMAN; KANIG, 2001), que devem estar inseridos nos padrões farmacopeicos.

Segundo Rodrigues e colaboradores (2005), o conhecimento de tais propriedades físico-químicas de fármacos é fator indispensável durante o desenvolvimento de medicamentos. Variações na forma sólida de uma matéria prima farmacêutica podem provocar alterações significativas em propriedades físicas e químicas, incluindo características organolépticas, morfologia, estabilidade e taxa de dissolução (BUGAY, 2001). Desta forma, a certificação de que os aspectos físicos e físico-químicos foram mantidos evitam falhas produtivas, reprocessos, desvios de qualidade do produto final, e até perda do lote de produção (SOARES-SOBRINHO, 2010).

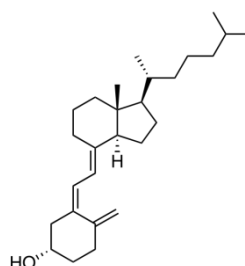
De acordo com (Eitenmiller and Ye, 2008), hormônios, vacinas, medicamentos biológicos e vitaminas lipossolúveis possuem dosagens mensuradas em Unidades Internacionais (UI), no qual consiste em um sistema de medição de uma quantidade de substância, baseada em sua atividade biológica ou efeito, determinado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1949). De acordo com este relatório, cada 1 UI de colecalciferol está contido em 0,025µg. Assim, as apresentações farmacêuticas disponíveis no mercado possuem doses de até 10 µg por unidade posológica (400 UI).

Apesar de as dosagens utilizadas em casos de deficiências moderadas a severas de vitamina D variarem de 50.000 a 100.000 UI, pode-se afirmar que o percentual de colecalciferol presente na forma farmacêutica (2 % de colecalciferol considerando um

comprimido de 60 mg) é insignificante para gerar impactos nas propriedades físicas e físico-químicas da mistura, que terá suas propriedades definidas pelos excipientes empregados (VILLANOVA; SÁ, 2009). Porém, uma vez que será desenvolvido um novo produto farmacêutico que contem uma dose de colecalciferol de propósito nutracêutico ou medicamentoso, sua caracterização deve ser efetuada criteriosamente para obtenção e verificação dos parâmetros de qualidade do insumo (ICH, 2009).

O colecalciferol é uma vitamina lipossolúvel da família dos secosteróis e sua molécula é caracterizada por uma clivagem na ligação 9,10 do anel B do núcleo esteróide (Eitenmiller and Ye, 2008). Possui fórmula estrutural $C_{27}H_{44}O$ (Figura 3), com peso molecular de 384.6 g/mol e ponto de fusão de 84,5 °C (DRUGBANK, 2012). Este insumo encontra-se disponível na forma de pó cristalino branco ou quase branco, facilmente solúvel em álcool e óleos (DRUGBANK, 2012; FARMACOPEIA PORTUGUESA, 7ª edição). Em água, estima-se que sua solubilidade seja em torno de $1,3 \times 10^{-5}$ mg/L, a 25 °C. (PUBCHEM COMPOUND, 2012).

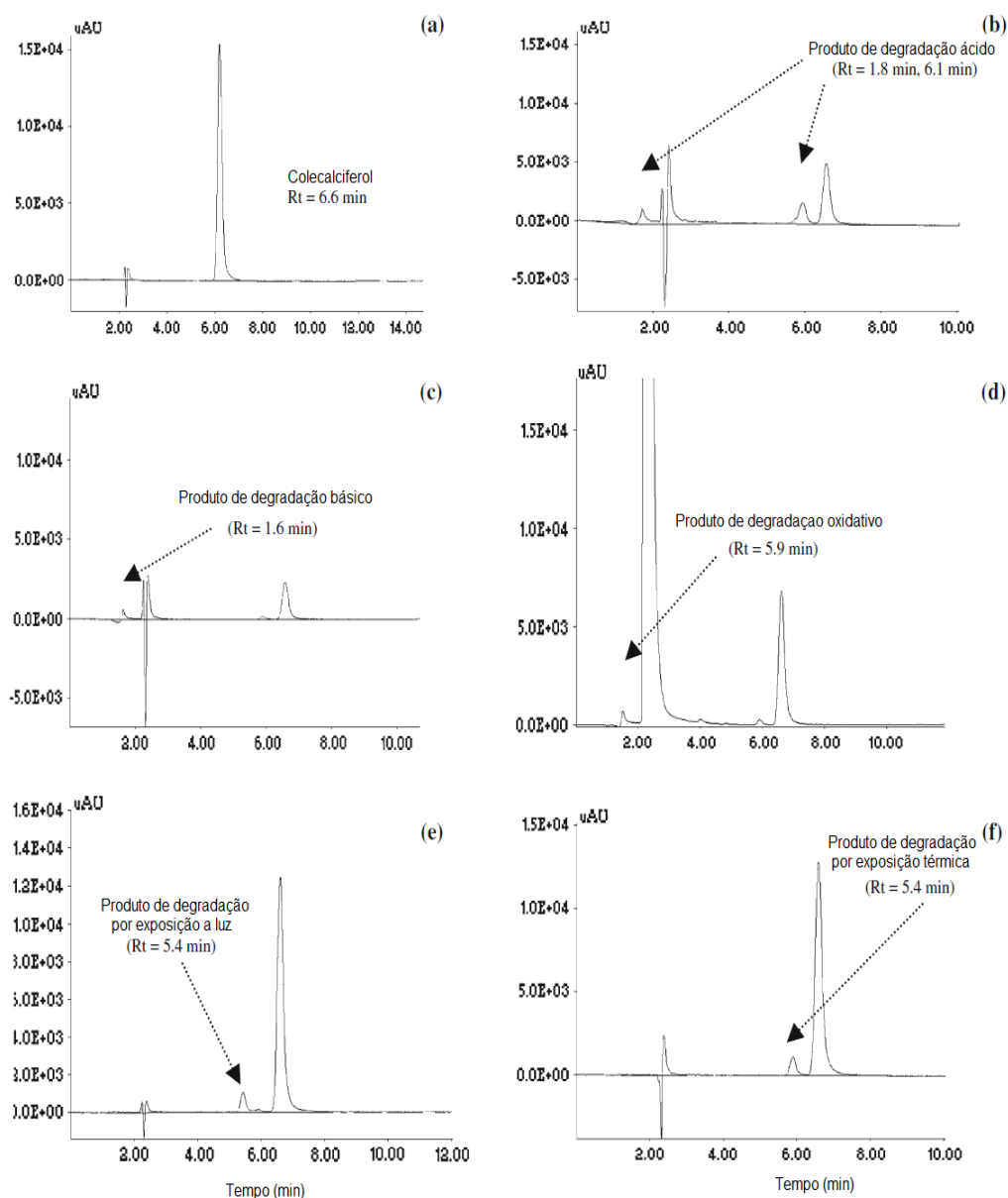
Figura 3 – Estrutura química do Colecalciferol.



Fonte: Koshy; Beyer, 1984.

De acordo com Indyk, LittleJohn e Woollard (1996), a vitamina D partilha da mesma instabilidade química ao estresse térmico que os micronutrientes em geral, através da degradação do composto e formação de produtos de degradação. Adicionalmente, este nutriente apresenta-se muito sensível a radiação ultravioleta, oxigênio e umidade (PETRITZ; TRITTHART; WINTERSTEIGER, 2006). Os trabalhos de Desai e colaboradores (2008) comprovam esta instabilidade e possibilita a verificação de tais produtos de degradação através de CLAE (Figura 4).

Figura 4 – Cromatogramas obtidos a partir do colecalciferol e seus produtos de degradação.



Fonte: Adaptado de Desai et al., 2008. Legenda: a) amostra pura; b) degradação ácida (63,78 %); c) degradação básica (83,50 %); d) degradação oxidativa (53,54 %); e) fotodegradação (13,44 %) e f) degradação térmica (11,82 %).

Na indústria de alimentos, técnicas de secagem mais atualizadas como o *spray-dried* demonstram resultar em menores perdas da vitamina (INDYK; LITTLEJOHN; WOOLLARD, 1996). Apesar disso, outros autores discordam da utilização do *spray dried* para secagem de vitaminas sensíveis. Segundo Petritz, Tritthart e Wintersteiger (2006), esta técnica forma uma matriz porosa que influencia negativamente na estabilidade contra o oxigênio do ar e umidade, além de aumentar os custos e a poluição ambiental, em virtude da

utilização de solventes orgânicos ou água e defendem que a obtenção de comprimidos de colecalciferol deve ocorrer por compressão direta.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLECALCIFEROL

O colecalciferol utilizado foi da Sichuan Yuxin Pharmaceutical, lote 110301, distribuído pela United Pharma Industries®, lote de fracionamento 111035738 e no Brasil, pela distribuidor Pharma Nostra®, lote de fracionamento 4571-11, a qual foi cedido pela Farmácia Roval de Manipulação®. Segundo especificação do laudo de análise, o colecalciferol foi conservado ao abrigo da luz, umidade e em temperatura entre 15 e 30°C.

4.2 SOLVENTES

Os solventes: álcool etílico P.A foram utilizados do fabricante Vetec®, lotes 1007904 e 1002744, respectivamente. A acetonitrila utilizada para compor a fase móvel do estudo de solubilidade quantitativa foi grau analítico, do fabricante Carlo Erba®, lote V9E853259E. A água utilizada nos experimentos foi ultrapura. Os solventes utilizados para preparação de fase móvel e amostras destinados ao estudo de solubilidade quantitativa do colecalciferol foram filtrados em membranas filtrantes de porosidade 0,22 µm Millipore® e de 0,45µm de celulose.

4.3 REAGENTES

As substâncias hidróxido de sódio, fosfato de potássio dibásico, fosfato dissódico monobásico, ácido cítrico, ácido clorídrico, cloreto de sódio e ácido trifluoroacético utilizadas no teste de solubilidade quantitativa foram do fabricante Vetec®.

4.4 CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA COLECALCIFEROL

4.4.1 Controle de Qualidade do Colecalciferol

4.4.1.1 Determinação de pureza

A pureza do colecalciferol foi realizada por meio de um calorímetro da Shimadzu[®], modelo DSC-60, sob razão de aquecimento de 2°C/min e fluxo de nitrogênio de 100 mL.min⁻¹. Este fluxo se faz necessário em virtude da intensa produção de componentes gasosos durante o processo de degradação térmica da vitamina. Apesar de as amostras terem sido acondicionadas em porta-amostras de alumínio hermeticamente fechados, a manutenção deste fluxo se fez necessária para fins de comparação dos resultados com as análises termogravimétricas. A análise foi conduzida com 4 mg ± 0,25 de vitamina D3, em triplicata. O equipamento DSC foi previamente calibrado via ponto de fusão do padrão Índio e Zinco. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS[®] (Therma Analysis) versão 2.20 da Shimadzu[®].

4.4.1.2 Identificação molecular por espectrometria de absorção na região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) da matéria-prima e da substância padrão foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmer[®] (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de selenato de zinco. As amostras foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, na forma sólida. Os espectros foram obtidos com varredura de 4000 a 650 cm⁻¹ em resolução de 4 cm⁻¹.

4.4.1.3 Descrição macroscópica

A matéria prima foi visualizada a olho nu, sobre uma placa de petri para verificação do aspecto e cor, em comparação ao aspecto observado na matéria-prima padrão e nas especificações citadas na Farmacopeia Americana (USP 35, 2012).

4.4.2 Caracterização física e físico-química do colecalciferol

4.4.2.1 Caracterização térmica: obtenção do perfil e cinética de degradação

As curvas TG e DTA, assim como a primeira derivada das curvas TG (DTG), foram empregadas para caracterização térmica do colecalciferol e análise da sua cinética de degradação, utilizando balança Shimadzu®, modelo DTG-60H, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min, numa faixa de temperatura de 25 a 600 °C, empregando-se uma massa de 4 mg (± 0.25). Para a caracterização térmica aplicou-se uma razão de aquecimento de 10 °C/min. Já para a determinação da cinética de degradação, empregaram-se as razões de aquecimento (β) de 5; 7,5; 10; 15 e 20 °C.min⁻¹, tendo seus dados interpretados conforme proposto por Ozawa (1965). A análise dos resultados foi realizada por meio do software TA-60WS® (Therma Analysis) versão 2.20 da Shimadzu®. Previamente, o equipamento foi submetido ao processo de calibração empregando-se amostra de oxalato de cálcio monoidratado com perdas de massa definidas.

4.4.2.2 Difração de raios X

Os difratogramas do colecalciferol foram obtidos no difratômetro SIEMENS (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com anodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo $2^\circ\theta$ de 5°-120° a uma velocidade de digitalização de 0,02°/s. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

4.4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV foi realizada no laboratório de microscopia eletrônica do Departamento de Física da UFPE, para avaliação do tamanho e forma dos cristais de colecalciferol. As amostras foram montadas em fita dupla-face de carbono, e metalizadas com ouro por 15 minutos. As análises foram realizadas em microscópio FEI®, modelo Quanta 200F, com 200kV de voltagem de aceleração, baixo vácuo (0.5torr), emissor FEG e elétrons secundários como modo de aquisição de imagem.

4.4.2.4 Análise granulométrica

A análise granulométrica foi realizada conforme metodologia descrita na farmacopeia brasileira (5ª edição), utilizando quatro tamises (75µm; 150µm; 250µm; 425µm), previamente pesados. Os tamises foram organizados em ordem decrescente em relação ao diâmetro dos orifícios da malha, de cima para baixo. Foram pesados 25 g de colecalciferol, que foram inseridos no primeiro tamis, de malha maior. Este conjunto foi acoplado ao tamisador Bertel®, sendo operado em frequência de 60 rpm por 15 min. Após este período, foram feitas as pesagens dos tamises contendo as frações da matéria prima em cada unidade (P1) e a soma dos pesos em todos os tamises (P2), para obtenção da sua relação percentual, conforme Equação 1:

$$\% \text{ retirada do tamis} = \frac{P1}{P2 \times 100} \quad (1)$$

4.4.4.5 Determinação do ângulo de repouso e velocidade de escoamento

O ângulo de repouso foi determinado de acordo com o método de altura fixa do funil e cone de base variável. Foram deixados escoar 30 g da matéria prima (pó), o mais regularmente possível, em um funil de 8,3 cm de diâmetro superior e 0,7 cm de diâmetro inferior, até formar um cone. O diâmetro (2R) do cone formado foi medido. A tangente do ângulo de repouso foi dada por $TG_a = H/R$, onde a é o ângulo de repouso, H altura e R o raio do cone. Foi calculado o valor médio de três determinações. O tempo de escoamento foi medido em segundos (VIANA et al., 2006).

4.4.4.6 Densidade aparente e compactada

O teste de densidade aparente e compactada do colecalciferol foi realizado utilizando-se um aparato dotado de proveta de 100 mL, fixada em um compactador automático, e 20 g da matéria prima. O equipamento Tap Density (Varian®) promoveu a compactação do pó em movimentos verticais padronizados por 1250 vezes. O volume do colecalciferol ocupado na proveta foi medido antes e após as compactações. A média foi obtida a partir de três determinações (MONTEIRO, 2000). Com estes números, foram calculados os índices de

Hausner (Equação x) e Carr (Equação y), relacionados com a compressibilidade do colecalciferol (AULTON, 2005).

4.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA O COLECALCIFEROL (MATÉRIA-PRIMA) COM LEITURA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA VISÍVEL

4.5.1 Matérias-primas e reagentes

Foram utilizadas as matérias-primas e reagentes: hidróxido de sódio (NaOH); dihidrogeno fosfato de potássio (H_2KPO_4); fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4); ácido cítrico; ácido clorídrico; cloreto de sódio (NaCl); água ultrapurificada obtida por MilliQ Millipore® (Milli-Q® System, Massachusetts, USA); lauril sulfato de sódio (LSS) e lecitina de soja (LC).

4.5.2 Equipamentos e vidrarias

Foram utilizados béqueres graduados e vidrarias volumétricas Satelit® com certificado de calibração por lote. Para execução dos experimentos, foram utilizados Balança Analítica Bioprecisa®, modelo FA2104N, Dissolutor Varian® VK 7010. Para quantificação do colecalciferol, utilizou-se o espectrofotômetro UV-vis B582 Micronal, com leitura pontual em 265 nm, equipado com detector ultravioleta e cubetas de quartzo de seção transversal de 1 cm^2 .

4.5.3 Desenvolvimento do método de dissolução

4.5.3.1 Solubilidade quali-quantitativa (seleção do meio de dissolução)

Com base nas especificações da RDC 31/10 da ANVISA, foram adotados 8 meios de dissolução visando a seleção daquele mais eficiente para dissolução da vitamina D3 (Tabela 2).

Tabela 2 – Meios de dissolução utilizados no desenvolvimento do método de dissolução para o colecalciferol

<i>Meio de Dissolução</i>	<i>pH</i>	<i>LSS (%)</i>	<i>Lecitina (mM)</i>
A	1,2	0	0
B	1,2	0,5	0
C	4,6	0	0
D	4,6	0,5	0
E	4,6	0	0,75
F	6,8	0	0
G	6,8	0,5	0
H	6,8	0	0,75

4.5.3.2 Avaliação da linearidade e repetibilidade para quantificação do colecalciferol no meio de dissolução.

A partir de uma solução concentrada em etanol P.A. (100 µg/mL), foram preparadas oito soluções diluídas com as concentrações 1,0; 1,5; 2,0; 2,25; 2,5; 2,75; 3,0; 3,25 µg/mL, as quais tiveram seus volumes completados com o meio de dissolução (pH 6,8 + LC 0,75 mM).

O quesito linearidade foi avaliado a partir destas a obtenção destas soluções diluídas. Para cada concentração relacionou-se a absorvância obtida em leitura pontual em 265 nm e plotou-se uma reta, onde o eixo “x” corresponde à concentração das amostras e o eixo “y” corresponde a absorvância observada no equipamento. Os dados pertinentes à reta, como o “R” quadrático (r^2), coeficiente de linearidade (b) e o coeficiente angular (a) foram obtidos a partir da utilização do programa Microsoft Excel® 2010.

Para avaliar o quesito repetibilidade, foram verificados os valores das áreas obtidas em seis amostras diluídas, de mesma concentração (2,75 µg/mL). A partir destes valores e utilizando o programa Microsoft Excel® 2010 como ferramenta, foi calculada a média e o desvio padrão dos resultados e o coeficiente de variação (CV%).

4.5.3.3 Seleção dos parâmetros da dissolução

Foram variados três fatores críticos (volume, velocidade de agitação e aparato de dissolução) para a execução do experimento em dois níveis cada, conforme apresenta a Tabela 3. Todas as condições foram realizadas sob temperatura de 37,5 °C, em meio de dissolução pH 6,8 + 0,75 mM de lecitina.

Tabela 3 – Planejamento fatorial completo para desenvolvimento do método de dissolução para o colecalciferol

<i>Volume do Meio (mL)</i>	<i>Aparato</i>		<i>Velocidade de Agitação (RPM)</i>	
	<i>Pá</i>	<i>Cesta</i>	<i>75</i>	<i>100</i>
500	x		x	
500	x			X
500		x	x	
500		x		X
900	x		x	
900	x			X
900		x	x	
900		x		X

As cápsulas de vitamina D3 foram obtidas artesanalmente, a partir da pesagem de 0,25g de uma mistura obtida por diluição geométrica de colecalciferol em mistura de celulose microcristalina/lactose monoidratada (3:7). A diluição final manteve-se em 1:100 (vitamina D3:mistura de excipientes).

4.6 DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E OBTENÇÃO DOS LOTES DE BANCADA

4.6.1 Compatibilidade físico-química do colecalciferol frente a excipientes candidatos

A compatibilidade do colecalciferol frente a excipientes candidatos à confecção das formulações foi realizada por termogravimetria, utilizando balança Shimadzu®, modelo DTG-60H, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min, numa faixa de temperatura de 25 a 600 °C. Foram preparadas misturas físicas na proporção 1:1 da vitamina D3 com os diluentes – amido (Starch 1500®), celulose microcristalina, lactose monoidratada (Flowlac®); desintegrantes – croscamelose sódica, amidoglicolato de sódio e crospovidona; conservante – butilhidroxitolueno (BHT); lubrificante – estearato de magnésio; e agente molhante – lauril sulfato de sódio (LSS). Para as misturas físicas foram pesados 8 mg ± 0,25 de amostra. Os dados foram obtidos por meio do software TA-60WS® (Therma Analysis) versão 2.20 da Shimadzu®.

4.6.2 Seleção qualitativa dos excipientes candidatos à formulação

A seleção qualitativa dos excipientes levou em consideração as necessidades tecnológicas da vitamina D3 para incorporação numa forma farmacêutica sólida, tais como: propriedade de fluxo, solubilidade em água e estabilidade frente às condições hidrolíticas e oxidativas. Apenas os excipientes classificados como compatíveis (*item 4.5.1*) foram considerados neste processo.

4.6.3 Seleção quantitativa dos excipientes candidatos

A seleção das variações percentuais de cada excipiente foi realizada conforme especificações descritas no Handbook de Excipientes Farmacêuticos (2009). O planejamento para obtenção dos lotes teve implementado o Planejamento Fatorial completo de Montgomery (2001) (Tabela 4), pois este modelo estatístico permite inferir sobre cada fator isolado e associado na resposta, com a obtenção reduzida dos lotes de bancada, sem perder a confiabilidade estatística dos resultados.

Tabela 4 – Representação dos experimentos realizados para seleção quantitativa dos excipientes na formulação de cápsulas de vitamina D3 100.000 UI, utilizando o planejamento fatorial completo de Montgomery (2001).

Nº Lote	Croscamelose Sódica (A)	LSS (B)	Aerosil (C)	AB	AC	BC	ABC
1	-	+	-	-	+	-	+
2	-	-	+	+	-	-	+
3	+	-	-	-	-	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	-	+	+	-	-	+	-
6	+	+	-	+	-	-	-
7	+	-	+	-	+	-	-
8	-	-	-	+	+	+	-
9	0	0	0	0	0	0	0

Assim, os lotes obtidos tiveram os excipientes croscamelose sódica, LSS e aerosil testados em três percentuais selecionados dentro do quantitativo especificado para exercer a função requerida na formulação. Os valores percentuais atribuídos (níveis) foram normalizados para +1, 0 e -1, representando os níveis alto, central e baixo, respectivamente (Tabela 5). A interferência de cada fator e o critério de seleção da melhor resposta a ser avaliada foi realizada após a realização dos experimentos de controle de qualidade dos lotes obtidos.

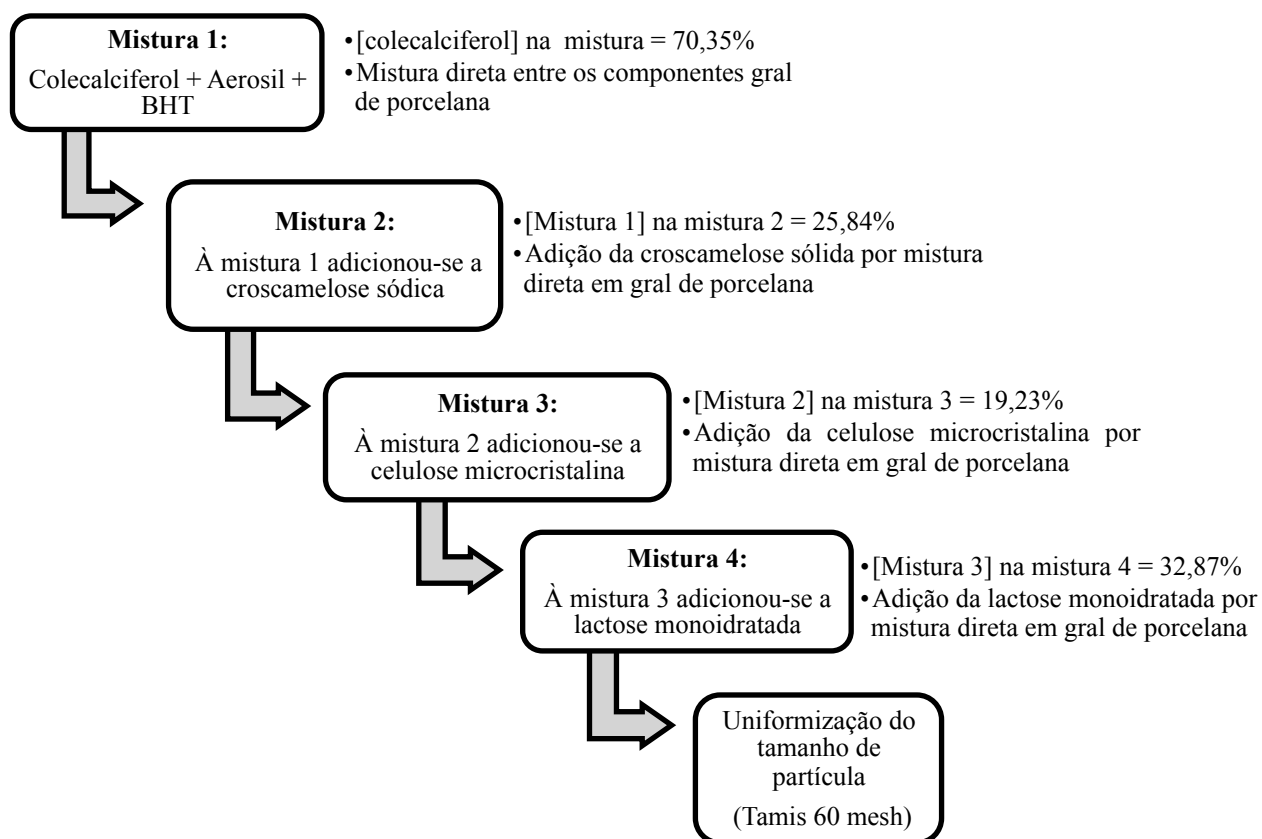
Tabela 5 – Planejamento para seleção quantitativa de excipientes para obtenção de forma farmacêutica sólida de vitamina D3 100.000 UI.

<i>Excipiente</i>	<i>Valores selecionados para teste</i>		
	-	0	+
Croscamelose sódica	10%	15%	25%
LSS	0,5%	1%	2%
Aerosil	0,2%	0,5%	1%
Celulose microcristalina	Valor fixo 30%		
BHT	Valor fixo 0,1 %		
Lactose monoidratada	q.s.p. 100%		

4.6.4 Obtenção dos lotes de bancada

Os nove lotes das formulações desenvolvidas foram obtidos conforme procedimento padrão (Figura 5). Todos os excipientes foram pesados e reservados previamente ao colecalciferol, dada sua característica oxidativa e fotoinstabilidade. As misturas possuíram duração de 1 min. Foi garantido, para cada processo de mistura, que nenhuma das partes apresentava-se inferior a 10%, sendo portanto realizada de forma direta (Aulton, 2005).

Figura 5 – Procedimento padrão de obtenção dos lotes de bancada (Lachman, 2001)



Legenda: *Os valores percentuais seguem uma proporção p/p

As misturas obtidas foram encapsuladas de acordo com o processo magistral, utilizando encapsuladora manual. Foram utilizadas cápsulas nº 03 de coloração vermelha e branca, as quais foram acondicionadas em potes para cápsulas de plástico contendo, para cada lote, um sachê de sílica-gel.

4.7 CONTROLES DE QUALIDADE DOS LOTES DE BANCADA *VERSUS* FORMULAÇÕES DE MERCADO

4.7.1 Determinação do Peso Médio das Cápsulas Manipuladas

A metodologia empregada para o cálculo do peso médio das cápsulas está descrita no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (2011), por ser um método não destrutivo e o mais empregado nas farmácias magistrais da atualidade.

Pesaram-se, individualmente, 10 unidades de cápsulas manipuladas íntegras, e determinou-se o peso médio, em gramas, conforme Equação 2,

$$P_{\text{médio}} = \frac{P_{c1} + P_{c2} + P_{c3} + \dots + P_{c10}}{10} \quad (2)$$

onde $P_{c1}, P_{c2}, P_{c3}, \dots, P_{c10}$ = peso de cada unidade de cápsulas manipuladas.

O limite de variação aceitável para cada cápsula em relação ao peso teórico de cada lote foi de $\pm 10\%$, já que o peso teórico em todos os lotes permanecem em 300 mg.

O cálculo do desvio padrão relativo (DPR) entre os pesos das cápsulas seguiu a Equação 3, onde DP refere-se ao desvio padrão do peso médio, calculado conforme Equação 4. O DP correlaciona o peso de cada unidade de cápsula manipulada ($P_{cáps.i}$) com o número de cápsulas duras manipuladas empregadas na determinação do peso médio (n).

$$DPR = \frac{Dp}{P_{\text{médio}}} \times 100 \quad (3)$$

$$DP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (P_{cáps.i} - P_{\text{médio}})^2}{n - 1}} \quad (4)$$

O peso médio das cápsulas vazias foi determinado conforme Equação 4, porém utilizando 20 unidades de cápsulas vazias. Neste caso, o valor do somatório dos pesos foi dividido por 20. A partir destes valores, foi possível calcular a variação teórica dos conteúdos das cápsulas através da estimativa da quantidade teórica mínima de pó ($Q_{\text{teor.mín}}$) e a quantidade máxima de pó ($Q_{\text{teor.máx.}}$), de acordo com os extremos de pesos obtidos na pesagem das cápsulas (Equações 5 e 6).

$$Q_{\text{teor.mín}} = \frac{P_{\text{cápsulamaisleve}}}{P_{\text{teórico}}} \times 100 \quad (5)$$

$$Q_{\text{teor.máx}} = \frac{P_{\text{cápsulamaispesada}}}{P_{\text{teórico}}} \times 100 \quad (6)$$

Onde $P_{\text{cápsulamaisleve}}$ e $P_{\text{cápsulamaispesada}}$ são o menor e o maior peso individual observado na pesagem das cápsulas manipuladas para determinação do peso médio, respectivamente.

Apenas os lotes cujas quantidades mínimas e máximas calculadas do conteúdo das cápsulas estavam inseridas dentro da faixa de 90-110% das quantidades mínimas e máximas teóricas foram designados como aprovados no peso médio.

4.7.2 Determinação de teor de umidade

O procedimento utilizado seguiu as especificações da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição. O teor de água foi estimado pelo cálculo da perda por dessecação em balança por infravermelho. Após retirar a umidade do equipamento, pesou-se cerca de 1g da mistura de pós, a qual foi distribuída uniformemente no coletor de alumínio. A amostra foi submetida a 105°C por 30 min. O valor percentual da umidade foi fornecido no *display* do próprio aparelho.

4.7.3 Determinação do tempo médio de desintegração das cápsulas dos lotes de bancada

Seis cápsulas de cada lote de bancada foram adicionadas em cada um dos seis tubos da cesta do desintegrador, utilizando como líquido de imersão água, na temperatura de 37,5°C. Dois observadores detectaram a olho nu o tempo da desintegração de cada cápsula, de onde foi extraída a média dos valores, utilizada como tempo médio de desintegração de cada lote. O tempo máximo tolerável para aprovação do lote em relação à desintegração foi estabelecido em 30 min. Todo o procedimento seguiu as especificações do método de desintegração geral da Farmacopéia Brasileira, 5ª edição.

4.7.4 Determinação do teor de colecalciferol dos lotes de bancada *versus* formulações de mercado

O procedimento para determinação do teor de colecalciferol tanto para os lotes de bancada quanto para as formulações de mercado foi realizado conforme Farmacopeia Internacional da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013).

4.7.4.1 Verificação da calibração do equipamento:

Pesaram-se 20 mg de colecalciferol, a qual foi diluída em 100 mL de etanol P.A. Desta solução concentrada retirou-se 5 mL, o qual foi diluído para 100 mL no mesmo solvente, alcançando uma concentração final de 10 µg/mL. A amostra diluída foi rapidamente lida em espectrofotômetro na região do ultravioleta visível, com leitura pontual em 265 nm, obtendo-se absorvância de 0,46 UA.

4.7.4.2 Doseamento das formas farmacêuticas

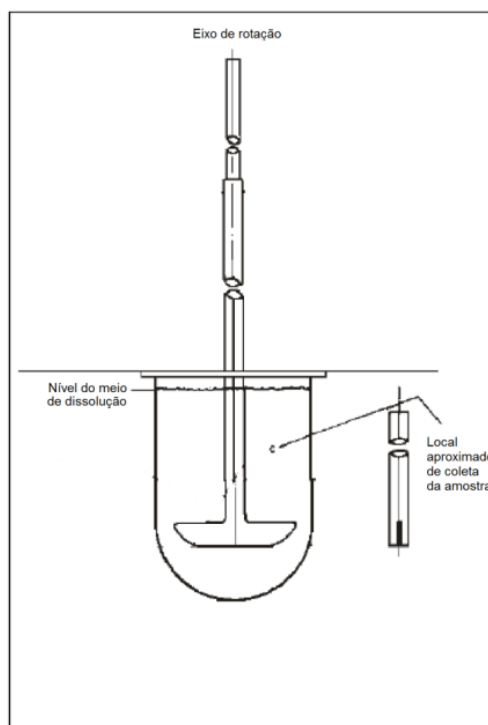
Oito cápsulas de cada lote (20 mg de colecalciferol teórico) tiveram seus conteúdos misturados em 100 mL de etanol P.A. Cada mistura sofreu agitação manual de 10 s, sendo posteriormente deixadas em repouso até completa decantação dos componentes insolúveis no solvente. Uma alíquota de 5 mL foi extraída da fração límpida da mistura, e diluída para 100 mL no mesmo solvente, alcançando uma concentração teórica de 10 µg/mL. A solução diluída foi lida em espectrofotômetro na região do Ultravioleta visível em 265 nm. A concentração das amostras foi calculada de acordo com curva de calibração preparada no dia, utilizando como pontos as concentrações de 6, 8, 10, 12 e 14 µg/mL.

4.7.5 Aplicação dos parâmetros de dissolução para as formas farmacêuticas finais

Foi adicionada a cada cuba do dissolutor contendo 900 mL de meio de dissolução, uma cápsula do lote 05 fixado em âncora de alumínio. O procedimento foi realizado sob temperatura de 37,5 °C e velocidade de agitação de 100 RPM, utilizando o aparato pá. A dosagem de cada cápsula neste volume de meio permitiu a manutenção da condição *sink*. Os pontos de coleta foram 30, 45, 60, 90 e 120 min e foram retirados 6 mL de cada coleta com imediata reposição do meio, no mesmo volume. Uma cuba foi reservada para composição do

branco para leitura no espectrofotômetro, na qual foi inserida uma cápsula gelatinosa dura vazia, de mesma coloração, para anular a interferência do corante na quantificação da vitamina. A altura da coleta das amostras foi estabelecida conforme especificado no método geral de dissolução da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (Figura 6).

Figura 6 – Profundidade da coleta das amostras obtidas durante a dissolução, conforme Farmacopeia Brasileira 5ª edição.



Resultados e discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA COLECALCIFEROL

5.1.1 Controle de qualidade do colecalciferol

5.1.1.1 Determinação de pureza

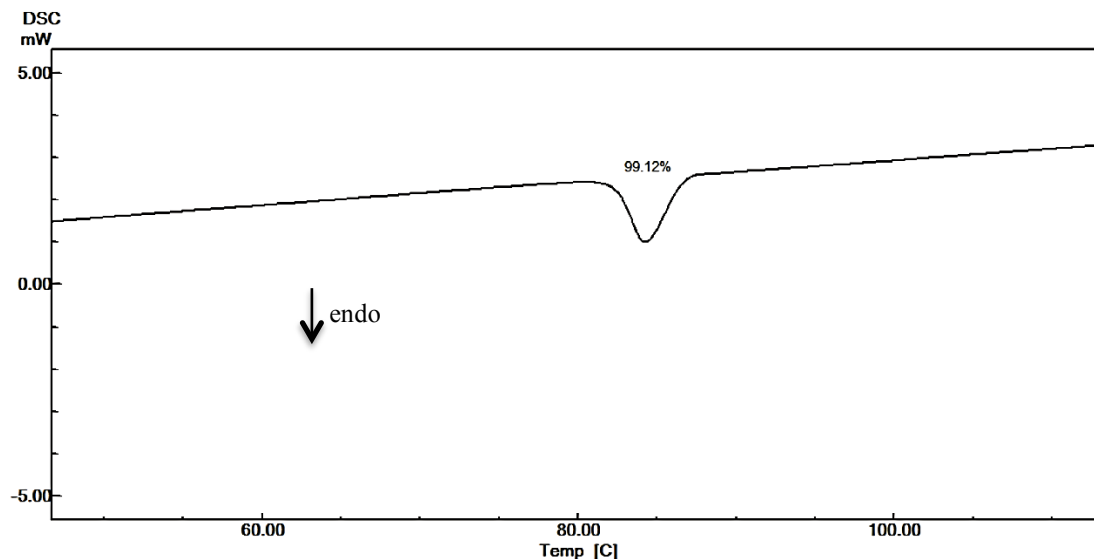
A determinação da pureza de compostos farmacêuticos empregando as técnicas termoanalíticas apresenta-se como uma alternativa muito importante, já que fornece resultados equiparáveis à pureza fornecida por CLAE, sem a necessidade de emprego de padrões (ARAÚJO et al., 2010) e de solventes, como comprovam os trabalhos de Mathkar e colaboradores (2009). Esta análise é possibilitada através da aplicação equação de Van't Hoff (Equação 7), que lineariza o evento de fusão e torna possível a determinação da fração molar das impurezas na amostra (OLIVEIRA, 2011).

$$T_s = T_o - \frac{X^2 R T_o^2}{\Delta H} \cdot \frac{1}{F} \quad (7)$$

Tal equação correlaciona a temperatura de fusão das impurezas no processo de fusão (T_s); a temperatura de fusão do analito 100% puro (em Kelvin) (T_o); a fração molar das impurezas na fase líquida (X^2); o calor de fusão da amostra pura (ΔH); e a constante dos gases ($8.3143 \text{ J K}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$) (R).

Neste sentido, pode-se calcular a pureza da matéria-prima colecalciferol em 99,12%, sendo assim classificada como pura de acordo com os padrões farmacopeicos (Figura 7).

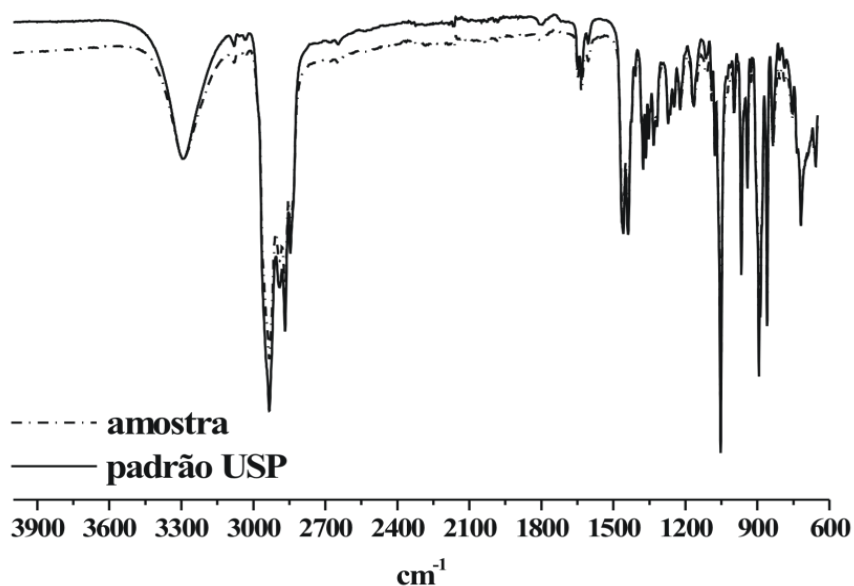
Figura 7 – Curva DSC do colecalciferol obtida sob razão de aquecimento de 2°C/min e fluxo de nitrogênio de 100 mL/min.



5.1.1.2 Identificação molecular por espectrometria de absorção na região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho obtidos da vitamina D₃ e seu respectivo padrão encontram-se sobrepostos e ilustrados na Figura 8.

Figura 8 – Espectro de absorção no IV-TF da vitamina D₃



Os espectros apresentam as seguintes bandas características: 3289 cm⁻¹ (estiramento O-H); 2930, 2867 e 2846 cm⁻¹ (estiramento C-H de alquenos); 1633 cm⁻¹ (estiramento C=C)

de alquenos conjugados); 1077 cm^{-1} (Estiramento C-O de álcool secundário); 893 cm^{-1} (deformação de C-H fora do plano referente a alquenos); e 967 , 941 e 859 cm^{-1} (deformação C-H fora do plano referente a alquenos). As bandas observadas estão com conformidade a literatura (KOSHY; BEYER, 1984), sendo possível confirmar a identidade do fármaco por esta técnica ao utilizar o padrão do colecalciferol USP.

5.1.1.3 Descrição macroscópica

O colecalciferol apresentou-se visualmente como pó amorfo fino, branco e inodoro, apresentando-se conforme as especificações do laudo e farmacopeicas.

Portanto, as confirmações das especificações farmacopeicas para o lote de colecalciferol obtido, evidenciam a qualidade do insumo disponível para farmácias de manipulação e permitiram a realização dos estudos de caracterização física e físico-química, além do desenvolvimento do método de dissolução e do desenvolvimento farmacotécnico.

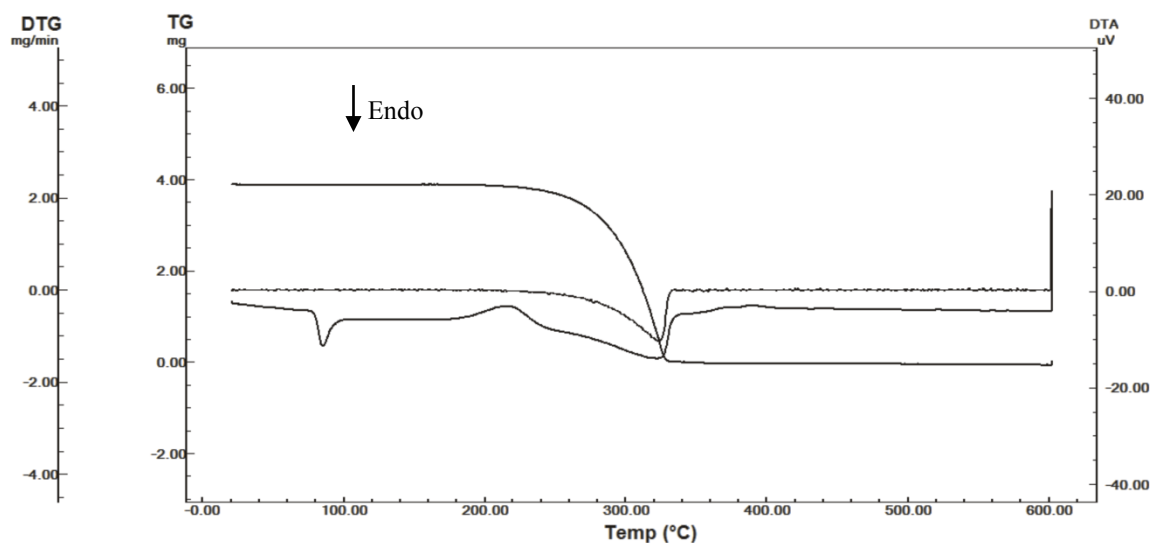
5.1.2 Caracterização física e físico-química do colecalciferol

5.1.2.1 Caracterização térmica: obtenção do perfil e cinética de degradação

Através da curva obtida com a análise de DSC na razão de 2 °C/min realizada para a verificação da faixa de fusão vitamina D₃, evidencia-se um pico endotérmico na faixa de temperatura entre $82,59\text{ °C}$ a $86,56\text{ °C}$, com pico em $84,25\text{ °C}$, característico do processo de fusão do fármaco, em conformidade com o dado descrito na literatura (DRUGBANK, 2012). A entalpia envolvida no processo endotérmico é de $84,01\text{ J/g}$ (Figura 9).

As curvas TG/DTG e DTA demonstraram que a que a degradação térmica do colecalciferol inicia-se em torno de $221,57\text{ °C}$, apresentando uma única etapa de decomposição que ocorre na faixa de $221,57$ a $340,12\text{ °C}$, com perda de massa (Δm) de $95,78\%$ (Figura 10). Além disso, verificou-se que não houve nenhuma variação de massa significativa na faixa de temperatura de fusão, observado na curva DTA.

Figura 9 – Curvas TG/DTG e DTA da vitamina D obtidas em atmosfera de nitrogênio (50 mL.min^{-1}) e razão de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$.



A obtenção da cinética de degradação térmica permite determinar os parâmetros cinéticos envolvidos na reação de decomposição dos fármacos (energia de ativação, ordem de reação e fator frequência), utilizados para prever a estabilidade e fornecer informações fundamentais na etapa de pré-formulação, condições de armazenamento e prazo de validade (FELIX et al., 2009; SOVIZI, 2010) dos fármacos e medicamentos.

De acordo com os ensaios realizados de cinética não-isotérmica com razões de aquecimento (β) de 5; 7,5; 10; 15 e $20^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, foram obtidas cinco curvas TG (Figura 10) e o respectivo gráfico de Ozawa, que correlaciona o logaritmo da β em função do inverso da temperatura (K^{-1}) (Figura 11).

Figura 10 – Curvas TG da vitamina D obtidas em atmosfera de nitrogênio ($100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) a diferentes razões de aquecimento ($5; 7,5; 10; 15$ e $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$).

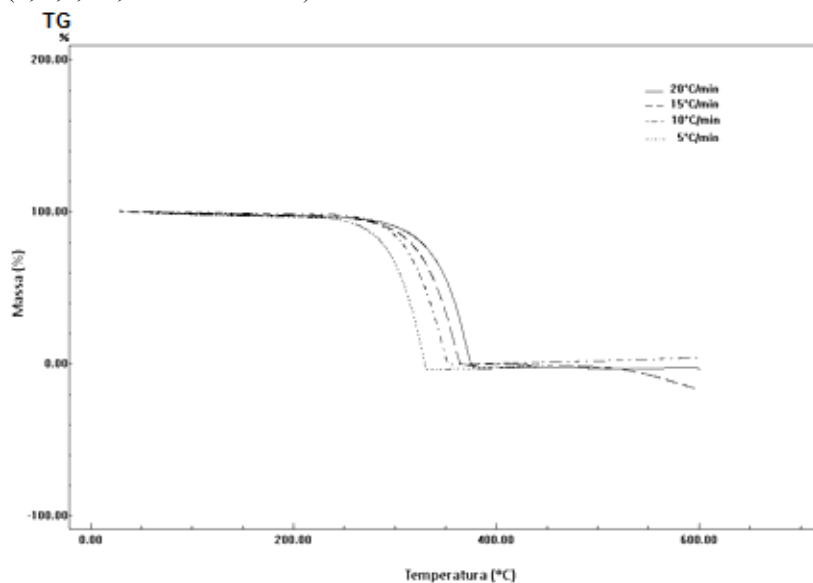
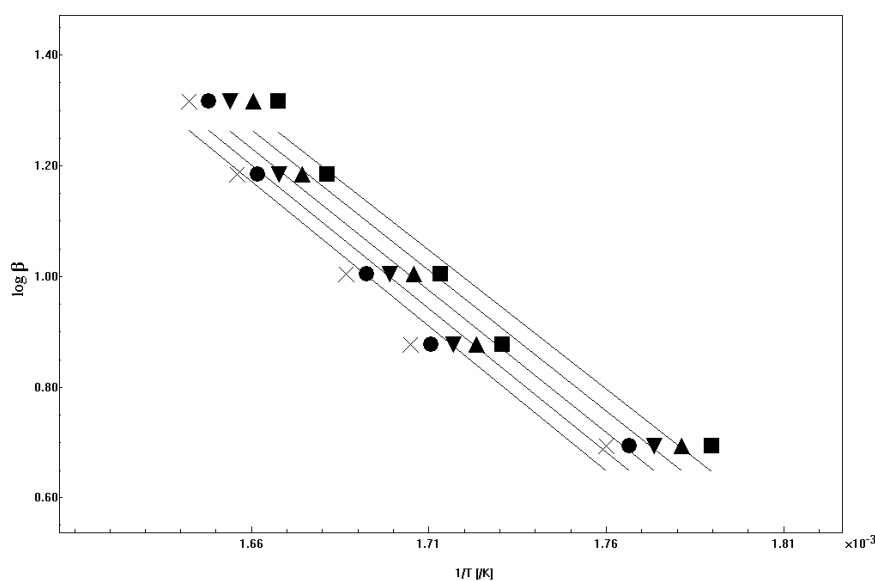
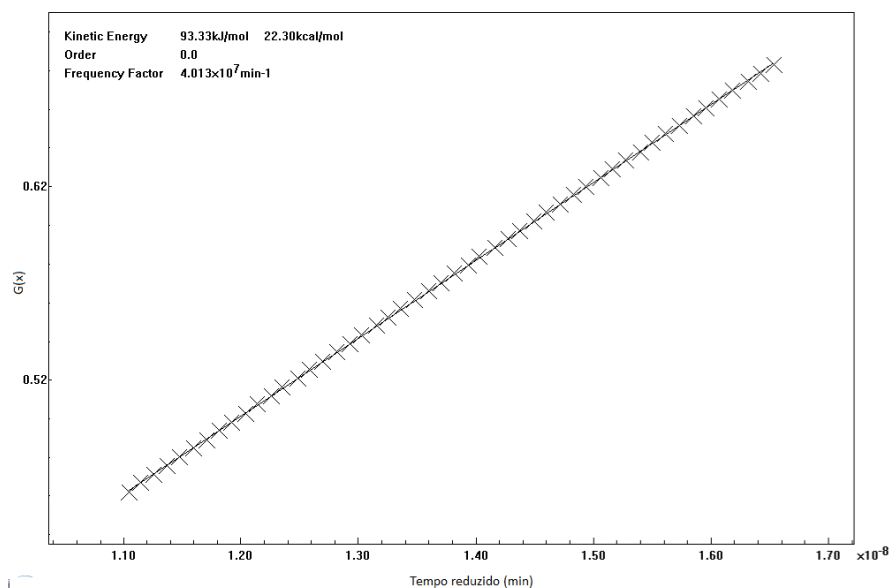


Figura 11 – Curvas do logaritmo da razão de aquecimento ($\log \beta$) em função do inverso da temperatura (K^{-1}) da vitamina D.



Através da determinação do coeficiente angular do gráfico de Osawa (Figura 4) estabeleceu-se energia de ativação (E_a) do processo de degradação térmica do colecalciferol ($93,33 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), assim como também apontou uma boa correlação entre os percentuais de perda de massa e a E_a envolvida na decomposição térmica, sob as diferentes razões de aquecimento. Além do mais, os valores do fator frequência ($4,013 \cdot 10^7 \text{ min}^{-1}$) e da ordem da reação (0) do processo foram obtidos através do gráfico que correlaciona a massa residual da amostra pelo tempo reduzido (Figura 12).

Figura 12 – Gráfico da função $G(X)$ do inverso da temperatura da vitamina D.



Segundo Felix e colaboradores (2009) e Sovizi (2010), a determinação da E_a é o passo de maior interesse para avaliar a estabilidade de compostos farmacêuticos. Através deste parâmetro é possível estabelecer um perfil comparativo de estabilidade entre o princípio ativo puro e suas associações, em que quanto maior a energia de ativação, maior a estabilidade térmica do composto. Assim, a E_a pode ser usada tanto nas etapas de pré-formulação e produção, como também no controle de qualidade de medicamentos. Esses autores evidenciaram através de estudo cinético com duas amostras de salbutamol que a presença de excipientes aumentou a estabilidade térmica do fármaco, em virtude do valor inferior de energia de ativação para a amostra padrão em relação às associações.

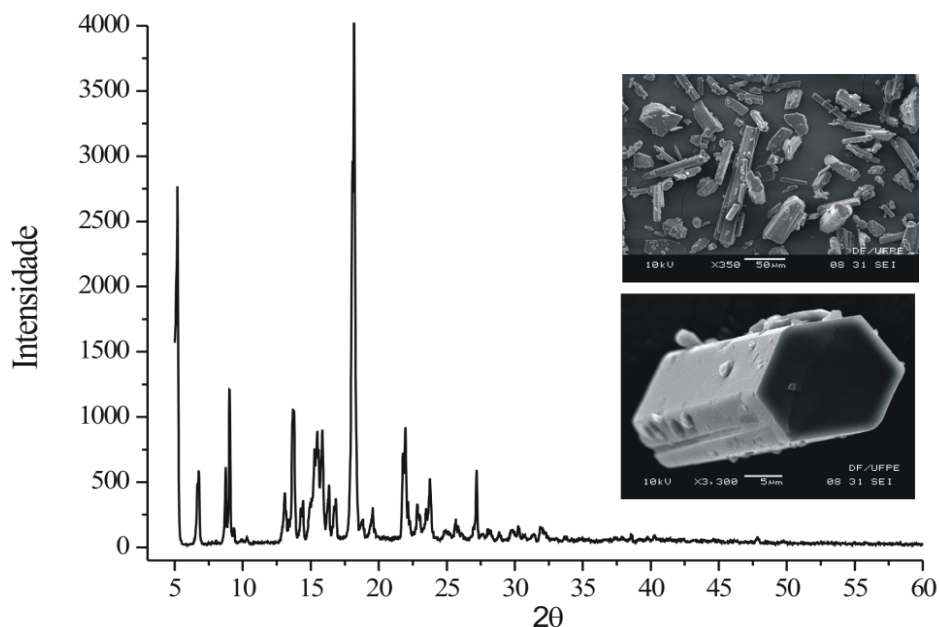
Assim, os experimentos evidenciaram que a vitamina D apresenta-se estável termicamente, em virtude da temperatura e energia de ativação elevadas que são requeridas para início da reação de decomposição. Em conjunto com os parâmetros cinéticos obtidos, estes dados serão úteis para as etapas de pré-formulação a serem realizadas com esta vitamina, sobretudo no que diz respeito aos ensaios de compatibilidade com excipientes diversos.

5.1.2.2 Difração de raios X e Microscopia eletrônica de varredura

O padrão de difração do pó de vitamina D_3 revela a presença de uma série de picos, sendo observado a presença de picos distintos a 2θ em torno de $5,2^\circ$; $9,04^\circ$, e $18,18^\circ$; além de outros secundários de menor intensidade em $6,76^\circ$; $8,74^\circ$; $13,68^\circ$; $15,48^\circ$; $15,86^\circ$; $21,96^\circ$ e $27,2^\circ$,

evidenciando o comportamento tipicamente cristalino (Figura 13).

Figura 13 - Difratograma e eletromicrografia (aumento de x350 e x3380) do pó de vitamina D₃.



Esse aspecto é corroborado pelas eletromicrografias que proporcionam a visualização das partículas cristalinas, sendo observado no aumento de x3380 partículas com formato hexagonal. Essa característica cristalina é relevante na correlação com a solubilização e fluidez.

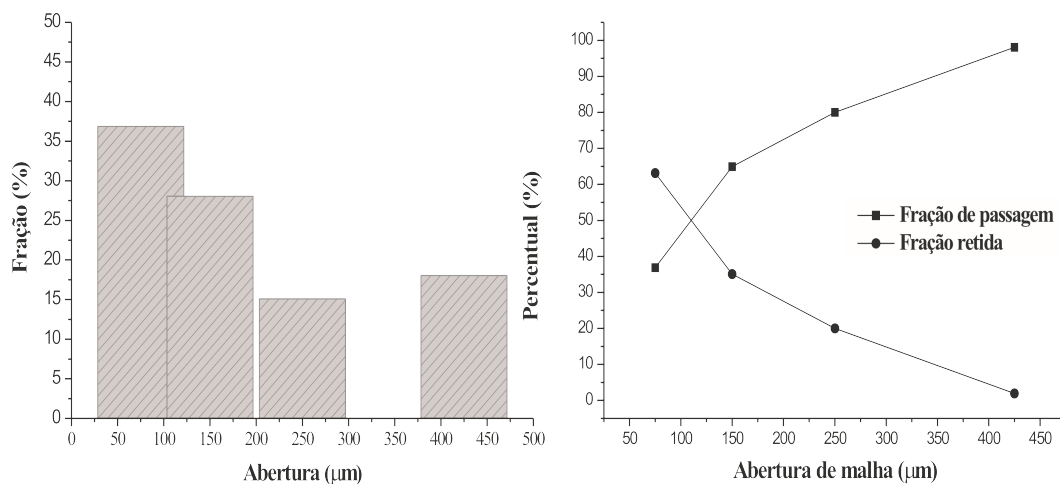
De acordo com a literatura, descreve-se o colecalciferol como um pó cristalino branco ou quase branco, facilmente solúvel em álcool e óleos (DRUGBANK, 2012; FARMACOPEIA PORTUGESA, 7ª edição). Em água, estima-se que sua solubilidade seja em torno de 0,013 mg/mL a 25 °C (PUBCHEM COMPOUND, 2012), sendo classificado como pouco solúvel de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010). A solubilidade de um fármaco é um dos parâmetros chave nos estudos de pré-formulação, pois é um dos que alteram a cinética de liberação do fármaco, assim como a sua forma polimórfica, cristalinidade, tamanho de partícula e quantidade incorporada na forma farmacêutica (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Dessa forma, o conhecimento das características cristalinas na vitamina D₃, possibilita uma correlação com suas demais propriedades, com ênfase na solubilidade.

5.1.2.3 Análise granulométrica

Os resultados obtidos pelo histograma de distribuição granulométrica da vitamina D₃ demonstram que as partículas do fármaco encontram-se predominantemente retidas no tamis

de 75 e 150 μm , representando um percentual de retido de 36,86% e 28,07% do material, respectivamente (Figura 14).

Figura 14 - Histograma de distribuição granulométrica e curvas de retenção e passagem da vitamina D₃



Diante desses resultados, realizou-se uma avaliação da retenção em relação à passagem das partículas no intervalo avaliado. O tamanho médio das partículas, determinado a partir do ponto de interseção das curvas de retenção e passagem, foi de cerca de 110 μm (Figura 4), caracterizando-o como um pó finíssimo, segundo critérios farmacopeicos (FB 5, 2010). Diversas literaturas abordam a dificuldade de se desenvolver formas farmacêuticas a partir de matérias-primas cujo pó possui esta classificação (LACHMAN; LIBERMAN; KANIG, 2001; AULTON, 2005), uma vez que o aumento da carga superficial em função da redução do tamanho das partículas eleva a capacidade de coesão e adesão do pó. Tal fenômeno compromete intensamente as propriedades de fluxo da substância e este representa ponto crítico em diversos processos unitários de produção, tais como mistura, compressão, enchimento adequado das matrizes e transposição de escala (NAVANEETHAN; MISSAGHI; FASSIHI, 2005; AULTON, 2005; SARRAGUÇA et al., 2010).

5.1.2.4 Determinação das propriedades de fluxo e compactação

As propriedades físicas e mecânicas da compactação e da reologia foram determinadas e os resultados são descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da propriedade de compactação e fluxo da vitamina D₃

Parâmetros	Valores
<i>dap</i> (g/mL)	0,44
<i>dcp</i> (g/mL)	0,57
Índice de Hausner	1,31
Índice de Carr	23,92
Tempo de escoamento (s)	∞

Legenda: *dap* - densidade aparente; *dcp* - densidade compactada; ∞ - infinito

Os resultados demonstraram a baixa densidade da vitamina D₃, confirmados através do cálculo do Índice de Carr e Hausner. O Índice de Carr exprime em forma percentual a capacidade de compatibilidade e compressibilidade de um pó ou granulado. Conforme esse índice, a vitamina D₃ apresenta baixa densidade e compactação, visto que se encontra na faixa entre 23 e 28%. Adicionalmente, o Índice de Hausner demonstra que valores entre 1,25 e 1,50, que exigem a adição de lubrificantes para melhorar o escoamento (ALVES et al., 2008; SOARES-SOBRINHO et al., 2008).

Os índices descritos são determinações pontuais, exprimindo apenas o potencial de compactação/compressão, e não a facilidade ou velocidade com que estas ocorrem. Para este tipo de avaliação temos o ângulo de repouso e o tempo de escoamento (ALVES et al., 2008). Através dessa análise, observou-se que o pó da vitamina D₃ apresentou ausência de escoamento, sendo classificado como tempo de escoamento infinito, classificáveis para pós com tempo de escoamento acima de 10 s (referência). O comportamento observado é fundamentado pela morfologia cristalina das partículas do fármaco.

No contexto tecnológico, deve-se levar em conta artifícios, como a adição de excipientes e de processos de granulação que possibilitem a melhoria de duas propriedades de fluxo e compactação, visando o processamento adequado na obtenção da forma farmacêutica sólida (AULTON, 2005). Adicionalmente, levando em consideração a liberação do princípio ativo, também é válida a utilização de excipientes que também levem em consideração o aumento da molhabilidade e dissolução do fármaco, visto a sua característica de baixa solubilidade aquosa, de forma que não prejudique sua biodisponibilidade.

5.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA O COLECALCIFEROL COM LEITURA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA VISÍVEL

5.2.2 Desenvolvimento do método de dissolução

5.2.2.1 Solubilidade qualiquantitativa (seleção do meio de dissolução)

Conforme resultados obtidos (Tabela 7), o colecalciferol apresentou maior concentração de saturação no meio de dissolução H. Houve alteração de cor nos meios de dissolução A e B, passando de coloração levemente amarelada e translúcida para uma coloração verde de média intensidade e turva, dentro de 10 a 15 minutos de exposição, nas condições em que se executou o experimento. As soluções D e G, que continham LSS, demonstraram-se turvas de modo a impossibilitar a leitura no espectrofotômetro.

Tabela 7 – Meios de dissolução utilizados no desenvolvimento do método de dissolução para o colecalciferol.

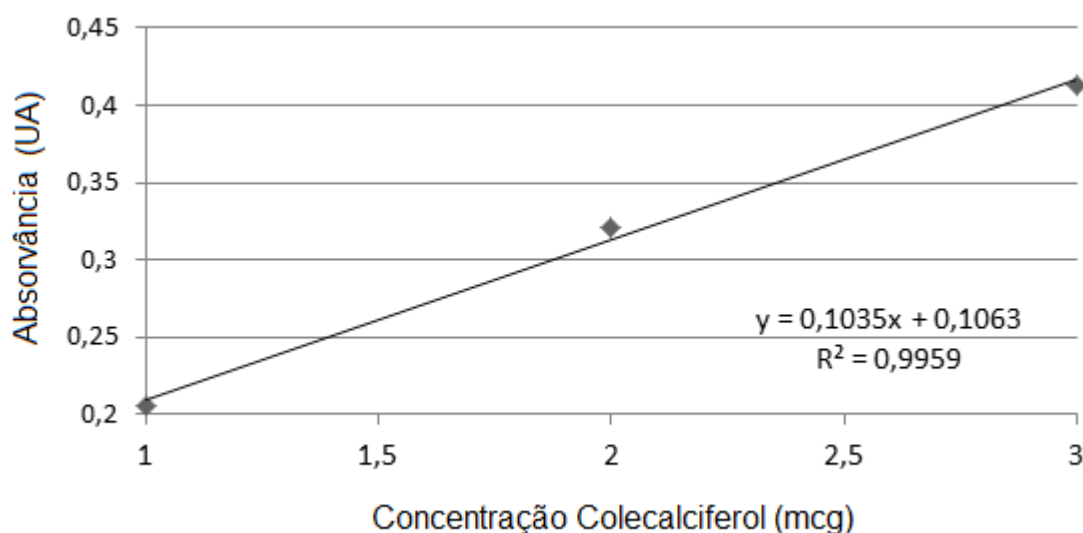
Meio de Dissolução	Absorvância (média)	Concentração de saturação (µg/mL)
A (pH 1,2)	0,07	Solução descartada*
B (pH 1,2 + LSS)	2,047	Solução descartada*
C (pH 4,6)	0,051	0,573
D (pH 4,6 + LSS)	> 4,0	Não mensurável **
E (pH 4,6 + LC)	0,37	2,216
F (pH 6,8)	0,083	1,01
G (pH 6,8 + LSS)	> 4,0	Não mensurável **
H (pH 6,8 + LC)	1,255	11,15

Legenda: * Coloração alterada; ** Solução turva. Inserir na legenda LSS e LC

Por outro lado, a utilização da LC em pH 6,8 demonstrou leitura adequada por espectrofotometria, respeitando a lei de *Lambert-Beer* (entre 0,2 e 0,8 UA) (PERKAMPUS, 1992). Foi utilizada a lecitina de soja para fornecer ao meio um tensoativo presente no organismo *in vivo* (Jantratid *et al.*, 2008), pois a lecitina é um dos componentes biliares importantes no processo de emulsificação de gorduras da dieta e assim, favorecer sua digestão e absorção e dependendo da região gastrintestinal e da presença ou não de alimentos, ela apresenta uma concentração que varia de 0,3 a 5 mM,. No estado pré-prandial, uma fórmula utilizada para estudos de dissolução utilizando meio biorrelevantes contém 0,75 mM de lecitina, o que justificou seu emprego nesta concentração no experimento (Marques, 2004).

Ainda, foi constatado que as absorvâncias obtidas a partir de concentrações conhecidas (1, 2, 3 µg/mL) responderam de forma linear, sendo possível mensurar a concentração de quantidades desconhecida (Figura 15).

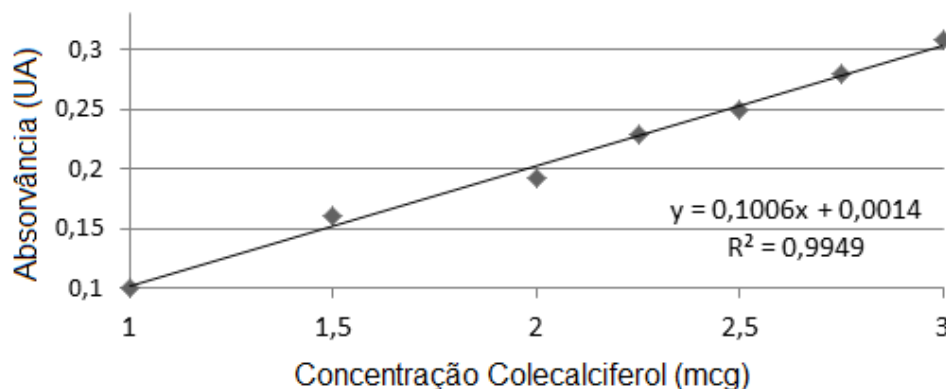
Figura 15 – Curva de calibração do colecalciferol no meio de dissolução em pH 6,8 + LC 0,75 mM, nas concentrações 1, 2 e 3 µg/mL.



5.2.3.2 Avaliação da linearidade e repetibilidade para quantificação do colecalciferol no meio de dissolução.

De acordo com as áreas obtidas para os oito pontos de concentração avaliados, o método demonstrou-se linear com r^2 de 0,9949, como apresentado na Figura 16.

Figura 16 – Linearidade do método de quantificação do colecalciferol no meio de dissolução em pH 6,8 + LC 0,75 mM, nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0; 2,25; 2,5; 2,75; 3,0; 3,25 µg/mL.



Os valores das concentrações obtidas a partir de seis diferentes amostras diluídas obtiveram um coeficiente de variação inferior a 5%, apresentando-se, assim, inserido na margem de variação aceitável para o método desenvolvido. Deste modo, o método foi considerado aceito no quesito repetibilidade (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores do teste de repetibilidade e parâmetros estatísticos.

Nº	UA
1	0,132
2	0,128
3	0,132
4	0,127
5	0,131
6	0,132
Média	0,1303333
DP	0,0022509
CV	1,73%

5.2.3.2 Seleção dos parâmetros da dissolução

Os estudos de dissolução *in vitro* constituem-se em instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacêuticas das formas farmacêuticas sólidas de uso oral, fornecendo informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento quanto para a produção e controle de qualidade (CARDOSO, CORREA, BELLÉ, 2008). Além de diversas outras aplicações, este estudo permite avaliar novas formulações e estabelecer uma correlação *inter-lotes*, fornecendo subsídio para detectar desvios de processo e/ou qualidade dos insumos farmacêuticos utilizados no preparo da formulação final, visando assegurar a homogeneidade de liberação do fármaco da forma farmacêutica (SILVA; VOLPATO; 2002).

Não existe até o momento estudos de dissolução de formas farmacêuticas orais de colecalciferol (sendo isolado ou associado a outros nutrientes), fator explicado pelos dispositivos legais que inserem os produtos industrializados disponíveis no mercado como isentos de registro ou registrados como suplemento vitamínico (alimento) e ambos os casos, não há a exigência por parte das autoridades sanitárias a comprovação de eficácia e segurança (pois não há indicação terapêutica) e nem se trata de alimento para fins especiais (BRASIL, 1998; BRASIL, 2005).

Já a Farmacopeia Americana (USP, 2012) apresenta informações sobre testes de dissolução de nutrientes (vitaminas e minerais) em formas farmacêuticas sólidas. A exigência da realização do teste se dá apenas para as vitaminas hidrossolúveis (Complexo B e Vitamina C) e para a vitamina A. Para formas contendo as vitaminas D, E e K, ambas lipossolúveis, não são requeridos testes de dissolução destas.

Por se tratar de um desenvolvimento farmacotécnico de uma forma farmacêutica sólida de colecalciferol de potencial nutracêutico, e dessa maneira, em dosagem considerada clinicamente significativa (100.000 UI/dose), o teste de dissolução foi adotado como critério comparativo de qualidade para as formulações-testes de (lotes de bancada) e as cápsulas manipuladas em farmácias do município do Recife, propondo assim o avanço tecnológico sobre o tema. Assim, levando em consideração as diretrizes da RDC nº 31/2010 (BRASIL, 2010), variações na composição do meio de dissolução foram realizadas a fim de se estabelecer a condição mais adequada para análise do colecalciferol.

O critério de seleção adotado para a escolha do melhor parâmetro da dissolução foi o correspondente ao que proporcionou maior valor médio de absorvância (da triplicata). Conforme a Tabela 9, a velocidade de rotação em 50 rpm apresentou resultados inferiores A 0,0 UA, sendo então todos descartados.

Tabela 9 - Resultados do teste do desenvolvimento do método de dissolução, expressos em unidades de absorvância em leitura pontual em 265 nm no espectrofotômetro UV-vis.

Aparato	Velocidade de rotação (rpm)	Tempo (min)	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média
CESTA	50	30	< 0,0	< 0,0	< 0,0	-
		60	< 0,0	< 0,0	< 0,0	-
		120 *	-	-	-	-
	100	30	0,198	0,214	0,155	0,1890
		60	0,027	< 0,0	0,038	0,0217
		120	0,025	0,031	0,061	0,0390
	50	30	< 0,0	< 0,0	< 0,0	-
		60	< 0,0	< 0,0	< 0,0	-
		120 *	-	-	-	-
PÁ	75	30	0,188	0,252	> 2,0*	0,1467
		60	0,102	0,149	0,087	0,1127
		120	0,085	0,148	0,145	0,1260
	100	30	0,222	0,127	0,215	0,1880
		60	0,342	0,090	0,127	0,1863
		120	0,126	0,126	0,362	0,2047

Nas demais condições testadas, calculou-se um p-valor de $2,75 \times 10^{-4}$ entre os tempos de leitura para velocidade de rotação de 100 rpm, utilizando o aparato cesta. Já para os tempos de

leitura a 100 rpm utilizando o aparato pá não há variações estatisticamente significativas entre os tempos de leitura ($p = 0,97$). A comparação entre o melhor tempo de leitura para o aparato cesta, a 100 rpm (30 min) e o mesmo tempo de leitura para o aparato pá (100 rpm) não demonstraram diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,97$).

Os tempos de leitura para a velocidade de rotação de 75 rpm (aparato pá) possuem variações estatisticamente significativas em seus resultados ($p = 0,049$). Entretanto, ao comparar seu melhor tempo de leitura (30 min) com a velocidade de rotação de 100 rpm do mesmo aparato (30 min) verifica-se um p-valor muito próximo do significativo ($p = 0,54$), não sendo seguro afirmar que os resultados serão sempre estatisticamente semelhantes.

Assim, pode-se concluir que a velocidade de agitação de 100 rpm é fundamental para obtenção dos melhores resultados possíveis na dissolução do colecalciferol, independentemente do aparato utilizado para tal.

5.3 DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E OBTENÇÃO DOS LOTES DE BANCADA

5.3.1 Compatibilidade físico-química do colecalciferol frente a excipientes candidatos

De acordo com as curvas DTA obtidas a partir das misturas físicas (MF) de colecalciferol/excipientes (1:1) (Figura 17), percebe-se que as temperaturas iniciais de fusão e degradação da Vitamina D3 não foram significativamente alteradas para os excipientes testados, exceto para o BHT (Tabela 10).

Figura 17 – Curvas DTA da Vitamina D3 e suas misturas físicas com excipientes, na proporção 1:1, sob razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de nitrogênio de 100 mL/min.

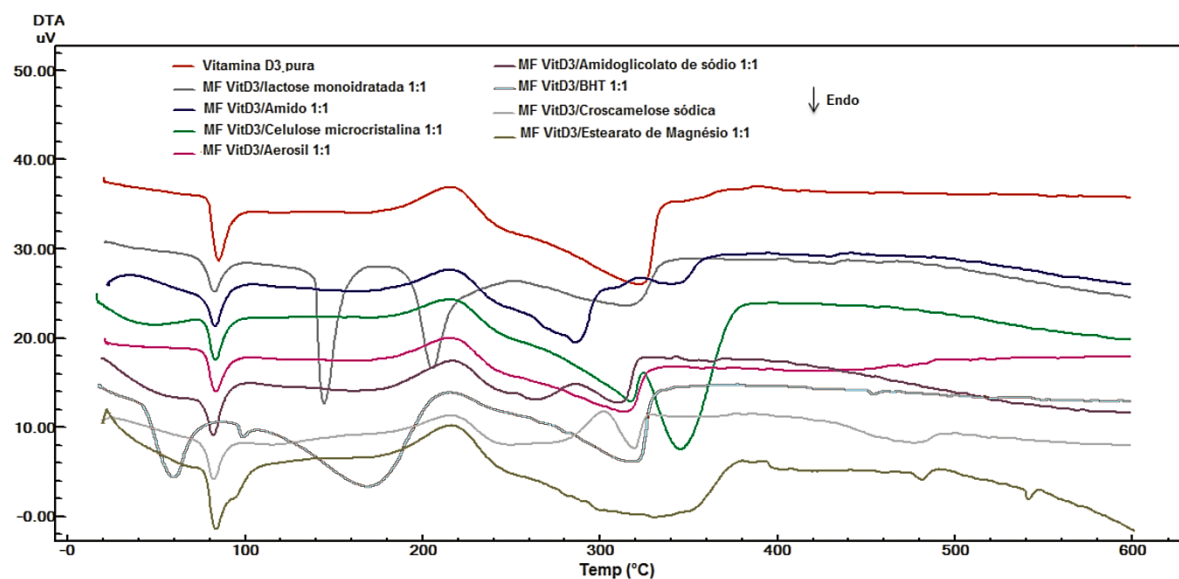


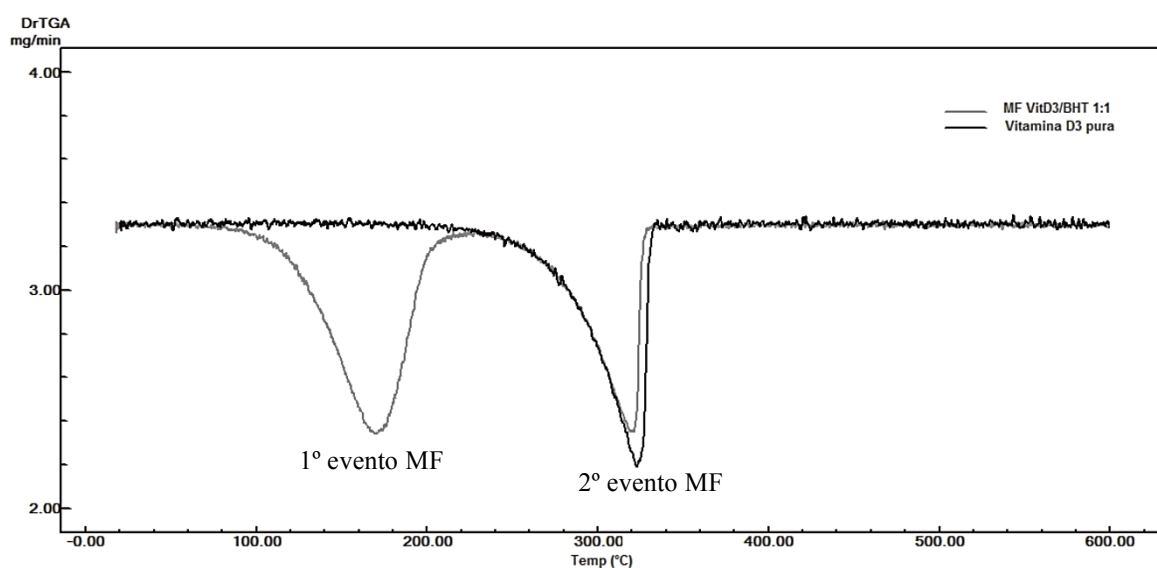
Tabela 10 – Temperaturas iniciais de fusão e degradação da vitamina D3 isolada e em mistura física observadas através das curvas DTA, sob razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de 100 mL/min.

<i>Amostra</i>	<i>Temperatura inicial de fusão da Vit D3 (°C) ± dp</i>	<i>Variação da temperatura inicial de fusão em relação à vitamina pura</i>	<i>Temperatura inicial de degradação da Vit D3 (°C) ± dp</i>	<i>Variação da temperatura inicial de degradação em relação à vitamina pura</i>
Vitamina D3	79,8	-	221,57	-
MF Amido Solúvel (1:1)	78,025 ± 1,11	- 1,77	230,87 ± 0,01	+ 9,32
MF Celulose Microcristalina (1:1)	78,05 ± 0,01	- 1,30	220,38 ± 0,02	+ 1,19
MF Lactose Monoidratada (1:1)	75,90 ± 0,01	- 3,9	221,68 ± 0,03	+ 0,11
MF Amidoglicolato de Sódio (1:1)	76,64 ± 0,04	- 3,16	221,56 ± 0,03	- 0,01
MF Croscamelose Sódica (1:1)	77,86 ± 0,06	- 1,94	221,57	0,0
MF Aerosil (1:1)	78,05 ± 0,02	- 1,75	217,52	- 4,05
MF Estearato de Magnésio (1:1)	78,43 ± 0,02	- 1,37	251,44 ± 0,01	+ 29,87
BHT (1:1)	44,07 ± 0,03	- 35,73	221,64 ± 0,5	+ 0,07

Legenda: atribuiu-se o sinal de – (menos) para os deslocamentos para esquerda e o sinal de + (mais) para os deslocamentos para direita.

Entretanto, apesar de o BHT ter antecipado de forma significativa a temperatura inicial de fusão da vitamina, percebe-se que o processo de degradação desta permanece nas mesmas condições que quando isolada (2º evento), ocorrendo após o processo de degradação do excipiente (1º evento), conforme apresenta a primeira derivada da curva TG (DTG) (Figura 18).

Figura 18 – Curvas DTG da vitamina D3 e sua mistura física com BHT (1:1), sob razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de nitrogênio de 100 mL/min



Segundo Stulzer e colaboradores (2008), este fato reflete que, na presença do BHT, os cristais de colecalciferol se fragilizam, uma vez que é necessário menor quantidade de energia para desfazer a rede cristalina (fusão), o que pode refletir em aumento da solubilidade aquosa da substância, sendo esta uma consequência benéfica para a vitamina, que apresenta uma baixa solubilidade em água.

A alteração da morfologia do pico endotérmico referente à fusão da vitamina D3 na mistura com estearato de magnésio reflete uma ligeira antecipação da fusão do excipiente, que acaba ocorrendo muito próximo à da vitamina.

5.3.2 Seleção quali quantitativa dos excipientes candidatos à formulação

Os excipientes foram selecionados com a finalidade de se alcançar a forma farmacêutica cápsula gelatinosa dura. Para isso, levaram-se em consideração as propriedades da matéria-prima ativa, de modo que os excipientes pudessem suprir as necessidades

tecnológicas para a obtenção da forma farmacêutica ausentes no produto ativo isolado e modular quesitos de estabilidade da forma farmacêutica.

Segundo os estudos de Desai e colaboradores (2008), o colecalciferol apresenta-se facilmente oxidável, hidrolisável e fotolisável por radiação ultravioleta. Em virtude de sua natureza lipofílica (EITENMILLER; YE, 2008), os conservantes fenólicos são muito empregados, pois exercem poderosa ação antioxidante através da interrupção da formação de radicais livres, evitando a inativação do princípio ativo da forma farmacêutica (FERREIRA, 2011). Conforme demonstrado na seção anterior (5.3.1), o BHT não apresentou incompatibilidade físico-química quando em mistura-física com o colecalciferol, segundo o método empregado. Assim, este excipiente foi selecionado como agente antioxidante da formulação a ser desenvolvida.

A susceptibilidade à hidrólise do colecalciferol denota destacada importância, sobretudo por se tratar da forma farmacêutica cápsula, onde sua composição gelatinosa responde rapidamente a alterações de umidade do ambiente, absorvendo para si percentuais significativos de água. Assim, é imprescindível a utilização de agentes dessecantes que evitem este processo. O dióxido de silício coloidal (Aerosil®) é um excipiente comumente empregado para esta finalidade (VILLANOVA; SÁ, 2009; FERREIRA, 2011) e, diante da facilidade de acesso, foi selecionado como componente da formulação.

Além das características de estabilidade da formulação, suas propriedades físicas desempenham papel crítico na obtenção destas formulações. Através dos estudos de caracterização realizados neste trabalho, foi possível identificar propriedades de fluxo e escoamento inadequadas da vitamina D3. Apesar de seu aporte nas formulações farmacêuticas representar uma parcela pouco expressiva quando se considera o fluxo final dos pós, a preocupação com esta propriedade permanece. Isto porque o fluxo adequado dos pós repercute num processo de mistura mais eficiente, acarretando na obtenção de formulações mais homogêneas (LACHMAN, 2002; AULTON, 2005).

Uma vez que o excipiente diluente preencherá um quantitativo superior a 20% do peso das cápsulas, dado o pequeno aporte do princípio ativo, este definirá as propriedades de fluxo da formulação final. De acordo com as propriedades de cada diluente disponível, foi selecionado como principal a celulose microcristalina, por ter apresentado bons resultados na análise de compatibilidade e possuir boas propriedades de fluxo. A seleção do aerosil como componente da formulação também se faz necessária para estabilizar a propriedade hidrofílica da celulose. Entretanto, este excipiente deve ser utilizado em até 30% p/p da formulação, pois acima deste percentual passa a exercer atividade de barreira para liberação do fármaco,

proporcionando sua liberação retardada (VILLANOVA; SÁ, 2009). Como diluente secundário da formulação selecionou-se a lactose monoidratada, onde também se indica a adição de aerosil para o alcance de propriedades de fluxo adequadas. Ainda, Ferreira (2011) indica a utilização deste excipiente no preparo magistral de diluições geométricas com o colecalciferol. A principal reação de incompatibilidade frequentemente observada a partir do uso deste excipiente é afastada no caso da vitamina D3 por não possuir aminas primárias na sua molécula. Já o amido solúvel apresenta indicação restrita para obtenção de cápsulas gelatinosas duras dada sua possibilidade de formação de ligações cruzadas com a gelatina das cápsulas, causada pela presença de hemetileno tetramina, que aumenta o tempo de desintegração das cápsulas (VILLANOVA; SÁ, 2009).

A lipofilicidade da vitamina D3 (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, ANO; EITENMILLER; YE, 2008) é bastante expressiva, e estima-se que sua solubilidade em água gire em torno de $1,3 \times 10^{-5}$ mg/L, a 25°C. (PUBCHEM COMPOUND, 2012). Deste modo, visando alcançar um perfil de dissolução adequado, incluiu-se a seleção do lauril sulfato de sódio como agente molhante, em adição à croscamelose sódica, um agente desintegrante. Esta associação é frequentemente utilizada para fármacos de classificação biofarmacêutica II, como diazepam, furoxican e furosemida, dentre outros, dada suas insolubilidades em água (VILLANOVA; SÁ, 2009).

Assim, os excipientes selecionados para compor a formulação da cápsula gelatinosa dura de vitamina D3 na dose de 100.000 UI está descrita no Tabela 11, bem como a faixa percentual indicada pelo *Handbook of Excipients* (2007) para execução da função desejada.

Tabela 11– Excipientes selecionados para composição das cápsulas gelatinosas duras de colecalciferol na dose de 100.000 UI

Excipiente	Função desejada	Faixa de utilização	% Selecionado pra os lotes de bancada
Celulose Microcristalina	Diluente principal	Até 30%	30%
Lactose Monoidratada	Diluente secundário	10 – 90%	q.s.p. 100%
Butilhidroxitolueno (BHT)	Agente antioxidante	1mg/1 milhão de UI	0,1 mg
Croscamelose Sódica	Agente desintegrante	10 – 25%	10; 15 e 25%
Dióxido de Silício Coloidal	Agente dessecante e lubrificante	0,2 – 1,0%	0,2; 0,5; 1%
Lauril Sulfato de Sódio (LSS)	Agente molhante	1 – 2%	1; 1,5; 2%

Conforme descrito na Tabela 12, os diluentes e o BHT tiveram seus valores fixados. Os demais excipientes tiveram três valores percentuais escolhidos dentro da faixa indicada

para execução da função desejada. Os lotes de colecalciferol 100.000 UI foram obtidos conforme planejamento fatorial de Montgomery (2001) e são descritos na Tabela 12.

Tabela 12 – Lotes de bancada obtidos para cápsulas gelatinosas duras de colecalciferol 100.000 UI

Nº Lote	Croscamelose Sódica	LSS	Aerosil	BHT	Celulose Microcristalina	Lactose Monoidratada
1	10	2	0,2	0,1mg	30%	qsp 100%
2	10	1	1	0,1mg	30%	qsp 100%
3	25	1	0,2	0,1mg	30%	qsp 100%
4	25	2	1	0,1mg	30%	qsp 100%
5	10	2	1	0,1mg	30%	qsp 100%
6	25	2	0,2	0,1mg	30%	qsp 100%
7	25	1	1	0,1mg	30%	qsp 100%
8	20	1	0,2	0,1mg	30%	qsp 100%
9	15	1,5	0,5	0,1mg	30%	qsp 100%

Em função do pequeno aporte de vitamina D3 toda a obtenção dos lotes considerou a utilização de cápsulas gelatinosas pigmentada (vermelha e branca leitosa) nº 03, as quais possuem volume interno de 0,3 mL.

5.4 CONTROLE DE QUALIDADE DOS LOTES DE BANCADA versus FORMULAÇÕES DE MERCADO

5.4.1 Determinação do peso médio, tempo de desintegração, umidade e teor de colecalciferol dos lotes de bancada (fórmulas-testes) e das fórmulas manipuladas (fórmulas de mercado)

Conforme os resultados obtidos (Figura 19), todos os lotes de bancada apresentaram-se dentro das especificações determinadas para o peso médio (método do Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição), pois todos os resultados de quantidade teórica mínima e máxima apresentaram-se entre 90% e 110%, respectivamente e valores inferiores a 4,0%, quanto ao coeficiente de variação. Os tempos médios de desintegração (método da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição) de todos os lotes de bancada mostraram-se com tempo inferior a 30 minutos, atendendo à especificação farmacopeica.

Figura 19 – Resultados do controle de qualidade das formas farmacêuticas dos lotes de bancadas e das 3 fórmulas obtidas em farmácias de Manipulação do município do Recife

LOTE	PESO MÉDIO				PERDA POR DESSECAÇÃO		TEMPO DE DESINTEGRAÇÃO		DOSEAMENTO	
	PESO MÉDIO ± DP	Q _{teor mín.} (%)	Q _{teor máx.} (%)	CV (%)	Teor de água (%) ± DP	CV %	Tempo médio (min) ± DP	CV%	Teor de Vitamina D3 (%) ± DP	CV%
1	202,3 ± 4,586	93,8	101,7	2,27	3,65 ± 0,5347	14,66	300 ± 68,9975	0,23	88,79 ± 0,0098	1,11
2	206,4 ± 4,763	95	102,4	2,31	4,08 ± 0,5743	4,76	265 ± 16,9901	0,064	87,58 ± 0,0098	1,11
3	201,5 ± 2,139	94,1	97,7	1,06	4,22 ± 0,6273	19,22	290 ± 9,8777	0,034	93,93 ± 0,0049	0,52
4	202,7 ± 3,318	96,8	102,8	1,64	3,89 ± 0,5437	19,79	245 ± 14,7196	0,06	93,14 ± 0,0043	0,46
5	202,2 ± 3,641	94,6	100,2	1,82	3,70 ± 0,5599	21,26	250 ± 19,5106	0,078	96,14 ± 0,0359	3,74
6	203,6 ± 5,319	94,5	102,3	2,61	4,07 ± 0,5391	15,68	255 ± 17,1466	0,067	92,5 ± 0,0129	1,41
7	205,8 ± 2,359	96,4	100,4	1,15	2,93 ± 0,5296	18,39	276 ± 4,5460	0,016	79,83 ± 0,0059	0,75
8	209,9 ± 7,577	92,5	103,9	3,61	1,45 ± 0,4504	125,75	280 ± 12,8322	0,046	69,13 ± 0,0030	0,43
9	204,3 ± 5,498	92,6	101,9	2,69	2,28 ± 0,4279	58,16	289 ± 17,9629	0,062	68,61 ± 0,0081	1,2
Farmácia 1	-	-	-	-	-	-	-	-	102,67 ± 0,0147	0,01
Farmácia 2	-	-	-	-	-	-	-	-	68,91 ± 0,0361	0,05
Farmácia 3	-	-	-	-	-	-	-	-	61,69 ± 0,0261	0,04

O teste de perda por dessecação das cápsulas foi realizado de acordo com metodologia estabelecida na Farmacopeia Americana (USP, 2012) e os resultados apresentaram resultados valores de perda de massa inferiores a 5,0%. Por não existir uma metodologia farmacopeica especificamente para determinação de umidade de cápsulas de vitamina D3, o teste foi realizado no intuito de conhecer este parâmetro para o lote de bancada, considerando que se trata de uma molécula higroscópica.

O doseamento foi realizado para os lotes de bancada e para as formulações obtidas em farmácias do município de Recife. Os resultados obtidos mostraram que dos nove lotes de bancada analisados, apenas os lotes 3, 4, 5 e 6 apresentaram teor de vitamina D3 entre 90 e 110% e que entre os produtos adquiridos em farmácias, apenas a farmácia “1” apresentou doseamento dentro das especificações (102,67%). As farmácias “2” e “3” alcançaram valores inferiores a 70% de teor de vitamina D3.

Estes resultados estão associados a limitações do processo de manipulação da forma farmacêutica, uma vez que foi estabelecida previamente uma padronização sistemática das condições de cada etapa do processo (manipulador, acessórios e equipamentos, tempo para homogeneização de cada etapa, tamisação, modo de preenchimento das cápsulas e travamento das cápsulas). Assim, é importante para o controle do processo e do produto que as farmácias de manipulação busquem implementar sistematicamente o controle de qualidade das cápsulas de colecalciferol por metodologia de quantificação por espectrofotometria UV-vis, mesmo não havendo uma recomendação pela legislação vigente (BRASIL, 2007), pois percebe-se que mesmo tendo o peso médio e a tempo de desintegração aprovados conforme especificações farmacopeicas (BRASIL, 2010), o baixo doseamento pode promover inefetividade terapêutica.

Embora estes resultados evidenciem o problema para o processo magistral, foram detectados também não conformidades nos Estados Unidos, tanto para suplementos de colecalciferol industrializados como em manipulados, em um estudo recentemente conduzido por LeBlanc e colaboradores (2013). Segundo os autores, apenas a metade dos produtos industrializados e um terço das fórmulas manipuladas atenderam aos critérios estabelecidos pela Farmacopeia Americana ($100\% \pm 10\%$) (USP, 2012). A análise das fórmulas manipuladas encontrou variações de teor de 52% e 105%, para comprimidos de colecalciferol de 50.000 UI/dose e de 23% a 146%, para comprimidos de colecalciferol de 1.000 UI. Os resultados das análises dos comprimidos de colecalciferol industrializados estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13 – Doseamento de colecalciferol em 5 comprimidos de cada frasco

<i>Fabricante</i>	<i>Dosagem de colecalciferol (UI)</i>	<i>Doseamento</i>		<i>Doseamento médio $\pm$ DP</i>	<i>CV %</i>
		<i>Maior</i>	<i>Menor</i>		
1	10.000	130	123	126,4 $\pm$ 2,7	2,1
2	10.000	114	85	97,6 $\pm$ 12,7	13,0
3	5.000	121	113	118,0 $\pm$ 3,2	2,7
4	5.000	106	99	101,7 $\pm$ 2,5	2,4
5	5.000	132	129	130,8 $\pm$ 1,1	0,8
2	1.000	97	75	90,5 $\pm$ 8,8	9,8
3	1.000	131	102	115,2 $\pm$ 10,7	9,3
5	1.000	124	56	99,6 $\pm$ 25,7	25,7
6	1.000	108	104	105,8 $\pm$ 1,6	1,5
7	1.000	103	95	99,9 $\pm$ 3,3	3,9
8	1.000	122	63	82,2 $\pm$ 23,2	28,2
9	1.000	108	87	97,7 $\pm$ 10,1	10,4
10	1.000	88	52	65,0 $\pm$ 14,0	21,3
11	1.000	110	107	108,6 $\pm$ 1,1	1,0
12	1.000	135	122	128,6 $\pm$ 5,0	3,9

Inserir fonte da tabela

5.4.2 Aplicação dos parâmetros de dissolução para as formas farmacêuticas finais

Para a conclusão do desenvolvimento do método de dissolução, optou-se pela utilização do lote de bancada n° 5 e do produto obtido pela farmácia “1”, devido aos seus maiores doseamentos em relação aos demais lotes (96,14% e 102,67%, respectivamente) e assim, às suas aptidões experimentais.

Nas condições *sink* (900 mL), os resultados obtidos não apresentaram coerência nem confiabilidade para nenhuma das condições testadas (valor de absorvância abaixo de zero). Assim, optou-se por reduzir o volume do meio para 500 mL, na tentativa de alcançar concentrações maiores e consequentemente, resultados mais confiáveis a partir da espectrofotometria UV-vis. Ainda assim, os resultados apresentaram a mesma inconsistência e não confiabilidade, mesmo obtendo curva de calibração diária (Tabela 14).

Mesmo com a linearidade e repetibilidade previamente estabelecidas, que deram subsídios experimentais para etapas subsequentes do desenvolvimento do método de dissolução por espectrofotometria UV-vis, pode-se concluir que a baixa concentração da

vitamina D3 que pode ser e/ou problemas na correção do valor da linha de base inviabilizaram a realização do teste de dissolução.

Tabela 14 – Valores de absorvâncias encontrados para aplicação dos parâmetros de dissolução

Fórmulas	Volumes (mL)	<i>Absorvâncias em UA (30 minutos)</i>			<i>Absorvâncias em UA (60 minutos)</i>		
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
L5	900	0,012	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0
	500	0,104	0,093	0,006	< 0,0	< 0,0	< 0,0
Farmácia 1	900	0,057	< 0,0	< 0,0	< 0,0	0,030	0,038
	500	0,015	< 0,0	0,002	< 0,0	< 0,0	< 0,0

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Os resultados dos experimentos de controle de qualidade (análise de teor, identificação molecular por espectrofotometria de infravermelho, descrição macroscópica) que confirmaram o atendimento às especificações farmacopeicas do colecalciferol e os testes de caracterização física e físico-química (caracterização térmica, difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, análise granulométrica e determinação das propriedades de fluxo e compactação), que determinaram seu grau de pureza e propriedades físicas e físico-químicas não descritas anteriormente na literatura ou em compêndios oficiais, confirmaram as adequações técnicas do insumo farmacêutico ativo para as etapas posteriores do desenvolvimento farmacotécnico.

Os dados obtidos nos testes de compatibilidade fármaco-excipiente podem contribuir de forma significativa para a literatura, indústrias farmacêuticas e farmácias de manipulação, para revisão de suas fórmulas, no intuito de reduzir problemas relacionados à estabilidade físico-química e melhorando a qualidade das formulações existentes, devido à ausência da exigência pelas entidades sanitárias.

A adaptação do método de doseamento de vitamina D3 (insumo), por espectroscopia UV-vis, foi viável tecnicamente para seu doseamento na forma farmacêutica de cápsulas. Os controles de qualidades dos lotes de bancadas mostraram-se em conformidade com as especificações farmacopeicas, exceto o parâmetro doseamento, que ocorreu em cinco dos nove lotes produzidos. Duas das três cápsulas obtidas em farmácias de manipulação também não apresentaram doseamento do insumo ativo adequado, e assim, é evidente que o processo de manipulação de cápsulas de vitamina D3 requer uma atenção especial por parte dos órgãos sanitários reguladores e das farmácias de manipulação, para buscar o aperfeiçoamento contínuo do controle do produto e do processo, para minimizar os riscos de inefetividade terapêutica.

Por inviabilidade técnica, não foi possível realizar o teste de dissolução de cápsulas com doseamento do colecalciferol por espectroscopia por UV-vis, e dessa forma, não foi possível comparar a capacidade de dissolução *in vitro* dos lotes de bancada com as cápsulas manipuladas.

Perspectivas

7 PERSPECTIVAS

- Produzir novamente os lotes reprovados no teste de doseamento, realizar doseamento do teor de vitamina D3 e introduzi-los na análise;
- Realizar demais testes de controle de qualidade para as formulações obtidas em farmácia de manipulação no município de Recife
- Desenvolver método de dissolução para a forma farmacêutica por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Realizar testes de dissolução *in vitro* comparando a eficiência dos lotes de bancada e das formulações obtidas em farmácia de manipulação.

Referências bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8ª edição. Artmed: Porto Alegre, 2007

ALVES, G. M. C.; ROLIM, L. A.; ROLIM-NETO, P. J.; LEITE, A. C. L.; BRONDANI, D. J.; MEDEIROS, F. P. M.; BIEBER, L. W.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B. Purificação e caracterização da β -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 413-416, 2008.

ALVES, L.D.S. **Desenvolvimento de dispersões sólidas binárias visando o incremento de solubilidade aquosa do antirretroviral efavirenz**. 2010. 131p. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica). Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010

ARAÚJO, A.A.S.; BEZERRA, M.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. Determination of the melting temperature, heat of fusion, and purity analysis of different samples of zidovudine (AZT) using DSC. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 46, n. 1, pp. 37-43, 2010.

ARMAS, L. A G.; HOLLIS, B. W.; HEANEY, R. P. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 11, p. 5387-91, nov. 2004.

ARUNABH, S. et al. Body fat content and 25-Hydroxyvitamin D levels in healthy women. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 88, p.157-61, 2003

AULTON, M.E. **Delineamentos de Formas Farmacêuticas**. 2ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2005.

BANDEIRA, F. et al. Vitamin D deficiency: A global perspective. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 4, p. 640-6, ago. 2006.

BAZZO, G.C.; SILVA, M.A.S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.41, n.3, pp. 315-322, 2005

BIANCUZZO, R. M.; YOUNG, A.; BIBULD, D. et al. Fortification of orange juice with vitamin D(2) or vitamin D(3) is as effective as an oral supplement in maintaining vitamin D status in adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 6, p. 1621-6, jun 2010.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais.** Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 30 de março de 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/40_98.htm>

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais, constante do anexo desta Portaria.** Brasília, DF. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 15 de janeiro de 1998.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº 40, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento que estabelece normas para Níveis de Dosagens Diárias de Vitaminas e Minerais em Medicamentos.** Brasília, DF. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 15 de janeiro de 1998.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução Deliberativa de Colegiado nº 67 de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias.** Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de outubro de 2007.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 278 de 22 de setembro de 2005. Aprova as categorias de Alimentos e Embalagens Dispensados e com Obrigatoriedade de Registro.** Brasília, DF, 2005.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.** Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de janeiro de 2002.

BRASIL. CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTAS. **Resolução CFN nº 390/2006. “Regulamenta a prescrição dietética de suplementos nutricionais pelo nutricionista e dá outras providências”.** Brasília, 2006.

BRETT, E. M. et al. **American association of clinical endocrinologists medical guidelines for the clinical use of dietary supplements and nutraceuticals.** AACE Nutrition Guidelines Task Force. AACE Guidelines. v. 9, n. 5, p. 417-470, 2003.

BUGAY, D.E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced drug delivery reviews**, v. 48, n. 1, p. 43-65, 2001

CANTORNA, M. T. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 92, n. 1, p. 60-4, set. 2006.

CHAPUY, M.C. PREZIOSI P, MAAMER M, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. **Osteoporos Int** 1997;7:439-43.

COMINETTU, C.; COZZOLINO, S. M. F. Vitamina D (calciferol) In: COZZOLINO, S. M. F. (Org). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3ª ed. Barueri: Editora Manole, 2009. p. 298-318

CUPPARI, L.; CARVALHO, A. B.; DRAIBE, S. A. Vitamin D status of chronic kidney disease patients living in a sunny country. **Journal of renal nutrition**, v. 18, n. 5, p. 408-14, set 2008.

DAWSON-HUGHES, B.; HEANEY, R. P.; HOLICK, MICHAEL F; et al. Estimates of optimal vitamin D status. **Osteoporosis international**, v. 16, n. 7, p. 713-6, jul 2005.

DESAI, N. D. et al. Stability-Indicating LC Method for Assay of Cholecalciferol. **Chromatographia**. 2009, 69, 385–388

DRUGBANK: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. Cholecalciferol. Disponível em <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00169>>. Acesso em: 30 mar. 2012.

EITENMILLER, R.; YE, L; LANDEN JR, W. O. **Vitamin analysis for the health and food sciences**. 2nd. ed. New York: CRC Press, 2008. p.83-118

EL-HAJJ FULEIHAN G, NABULSI M, CHOUCAIR M, et al. Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. **Pediatrics** 2001;107:E53

EUROPEAN NUTRACEUTICAL ASSOCIATION. **The term nutraceutical**. Disponível em: <http://www.enaonline.org/index.php?lang=en&path=about>. Acesso em 26/02/2012.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira** 5ª. ed., V. 1: Métodos Gerais, 524 p., 2010 a.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA. VII ed. Colecalciferol. Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, 2005. p.1303-1304

FELIX, F. S.; CIDES, L. C. S.; ANGNES, L.; MATOS, J. R. Thermal behavior study and decomposition kinetics of Salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v.95, n.3, pp. 181-214, 2009.

FERREIRA, A.O. **Guia prático da farmácia magistral**. 4ª ed. 1438p. São Paulo: Pharmabooks, 2011.

GARLAND MT. Polimorfismo Farmacéutico. **Cuad Méd Soc (Chile)**, 2007; 47:191-199

GONZALEZ, C. **Vitamin D Supplementation: An Update**. n. Figure 1, p. 1-6, 2010.

GORDON CM, DEPETER KC, FELDMAN HA et al. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. **Arch Pediatr Adolesc Med**. 2004;158:531–537.

HEALTH CANADA. Policy Paper. **Therapeutic Products Programme and the Food Directorate from the Health Protection Branch**. 29 pages. Nov 2, 1998. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/label-etiquet/nutra-funct_foods-nutra-fonct_aliment-eng.pdf. Acesso em: 30/03/2012

HOLICK MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **J Clin Invest** 2006; 116:2062-72.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911-30, jul. 2011.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 266-281, 2007.

HOLICK, M. F. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. **Annals of epidemiology**, v. 19, n. 2, p. 73-8, fev. 2009.

HOLICK, M. F.; BINKLEY, N. C.; BISCHOFF-FERRARI, H. A; et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911-30, jul 2011.

HOLICK, M. F.; SIRIS, E. S.; BINKLEY, N. et al. Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. **J Clin Endocrinol Metab** 2005;90:3215-24.

ICH. **Pharmaceutical Development. Q8(R2) - ICH Harmonised Tripartite Guideline.** . [S.l: s.n.]. , 2009

INDYK, H.; LITTLEJOHN, V.; WOOLLARD, D. C. Stability of vitamin D3 during spray-drying of milk. **Food Chemistry**, Vol. 57, No. 2, pp. 283-286, 1996

IOM (INSTITUTE OF MEDICINE). **Dietary reference intakes for calcium and vitamin D.** Washington DC: The National Academies Press, 2011.

JANTRATID, E. et al. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 7, p. 1663-76, jul. 2008.

JAPAN. Ministry of Health, Labour and Welfare. **Food for Specified Health Uses (FOSHU).** Available in: <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html>. Accessed at: 10/02/2013.

JOVIČIĆ, S.; IGNJATOVIĆ, S.; MAJKIĆ-SINGH, N. Biochemistry and metabolism of vitamin D. v. 31, n. 4, p. 309-315, 2012.

KESERVANI, R. K. et al. **Nutraceutical and Functional Food as Future Food: A Review.** v. 2, n. 1, p. 106-116, 2010.

KOSHY, K.T; BEYER, W. F. **Vitamin D3 (cholecalciferol). Analytical profile of drug substances.** v. 13. p.656-707. Ney York, Academic Press, 1984

KRIS-ETHERTON, P. M., HARRIS, W. S., AND APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb.Vasc.Biol** 2-1-2003;23(2):e20-e30.

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

LEE AY, ERDEMIR D, MYERSON AS. Crystal polymorphism in chemical process development. **Annu. Rev Chem Biomol Eng**, 2011; 2:259-280.

LIPS P, HOSKING D, LIPPUNER K, et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. **J Intern Med**. 2006;260:245–254.

LIPS P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. **Endocr Rev** 2001;22:477-501.

LOCKWOOD, B. *Nutraceuticals: A Guide for Healthcare Professionals*. 2nd. ed. London: **Pharmaceutical Press**, 2007. p. 449

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, 2002.

MAQBOOL, A.; STALLINGS, V. A. Update on fat-soluble vitamins in cystic fibrosis. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 14, n. 6, p. 574-81, nov. 2008.

MARQUES, M. Dissolution Media Simulating Fasted and Fed States. **Dissolution Technologies**, n. May, p. 2004, 2004.

Marwaha RK, Tandon N, Reddy D, et al. Vitamin D and bone mineral density status of healthy schoolchildren in northern India. **Am J Clin Nutr** 2005;82:477-82.

MCGRATH JJ, KIMLIN MG, SAHA S, EYLES DW, PARISI AV. Vitamin D insufficiency in south-east Queensland. **Med J Aust** 2001; 174:150-1.

MONTEIRO, D. B. **Tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de lamivudina, transposição de escala, validação da metodologia analítica, estudo de estabilidade e equivalência farmacêutica**. Recife, 2000. 146p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco.

MUSCOGIURI, G. et al. Can vitamin D deficiency cause diabetes and cardiovascular diseases? Present evidence and future perspectives. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 22, n. 2, p. 81-7, fev. 2012.

NAVANEETHAN, C.V.; MISSAGHI, S.; FASSIHI, R. Application of powder rheometer to determine powder flow properties and lubrication efficiency of pharmaceutical particulate systems. **AAPS Pharmscitech**, v. 6, n. 3, p. E398-404, 2005.

NESBY-O'DELL S, SCANLON KS, COGSWELL ME, et al. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Am J Clin Nutr** 2002;76:187-92.

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

OZAWA, T. A new method of analyzing thermogravimetric data. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**. 1965;38:1881-1886

OZAWA, T. Kinetics of non-isothermal crystallization. **Polymer**, v. 12, p. 150-158, 1971.

PERKAMPUS, H.H.; **UV-VIS Spectroscopy and its Applications**. Springer-Verlag: Berlin, 1992.

PETRITZ, E.; TRITTHART, T.; WINTERSTEIGER, R. Determination of phylloquinone and cholecalciferol encapsulated in granulates formed by melt extrusion. **J. Biochem. Biophys. Methods** 69 (2006) 101–112

PIGNOTTI, G. A P.; GENARO, P. S.; PINHEIRO, M. M.; SZEJNFELD, V. L.; MARTINI, L. A. Is a lower dose of vitamin D supplementation enough to increase 25(OH)D status in a sunny country? **European journal of nutrition**, v. 49, n. 5, p. 277-83, ago 2010.

PINHEIRO, M. M.; SCHUCH, N. J.; GENARO, P. S. et al. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women--the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutrition journal**, v. 8, p. 6, jan 2009.

PREMAOR, M. O.; FURLANETTO, T. W. Hipovitaminose D em Adultos: Entendendo Melhor a Apresentação de Uma Velha Doença. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 1, p. 25-37, 2006.

PUBCHEM COMPOUND from National Institute of Health. Cholecalciferol - Compound Summary (CID 5280795). Disponível em
PUBCHEM COMPOUND from National Institute of Health. Cholecalciferol - Compound Summary (CID 5280795). Disponível em:
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280795&loc=ec_rcs>.
Acesso em: 29 fev. 2012

RAJASEKARAN, A.; SIVAGNANAM, G.; XAVIER, R. **Nutraceuticals as therapeutic agents: A Review**. v. 1, n. 4, p. 328-340, 2008.

RAW AS, YU LX. Pharmaceutical solid polymorphism in drug development and regulation. **Adv Drug Del Rev**, 2004; 56:235-236.

RODRIGUES, P.O.; FERNANDO, T.; CARDOSO, M.; ANTONIO, M.; SILVA, S.; MATOS, R. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização , Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta. Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 3, pp. 383-387, 2005.

ROSS, A.; TAYLOR, C.; YAKTINE, A. **Dietary reference intakes for calcium and vitamin D**. 2011.

ROWE, R .C.; SCHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. (Ed.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 6 ed. Washington: Pharmaceutical Press. ISBN 0853697922, 2009, 665 p.

SARRAGUÇA, M. C.; CRUZ, A. V.; SOARES, S. O.; AMARAL, H. R.; COSTA, P. C.; LOPES, J. A. Determination of flow properties of pharmaceutical powders by near infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 484 - 492, 2010.

SEDRANI SH. Low 25-hydroxyvitamin D and normal serum calcium concentrations in Saudi Arabia: Riyadh region. **Ann Nutr Metab** 1984;28:181-5.

SOARES, M. F. L. **Desenvolvimento tecnológico de comprimido antirretroviral em associação dose fixa de zidovudina, lamivudina e efavirenz**. 2011. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas). Pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SOARES, M. F. R.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; LOPES, P. Q.; CORREIA, L. P.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R. O.; ROLIM-NETO, P. J. Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. **Journal Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 1, p. 307-313, 2011.

SOARES-SOBRINHO, J. L. S.; LIMA, L. N. A.; PERRELLI, D. C.; SILVA, J. L.; MEDEIROS, F. P. M.; SOARES, M. F. L. R.; ROLIM-NETO, P. J. Development and in vitro evaluation of tablets based on the antichagasic benznidazole. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, 2008.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; ROLIM-NETO, P. J. Caracterização físico-química do tripanomicida benznidazol para o desenvolvimento de medicamentos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 5, p. 803-807, 2010a

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

SOUBERBIELLE, J.-C. et al. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. **Autoimmunity reviews**, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20601202>>

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

STAHLY GP. Diversity in single- and multiple-component crystals. The search for and prevalence of polymorphs and cocrystals. **Cryst Growth Des**, 2007; 7:1007-1026.

TANGPRICHA V, PEARCE EN, CHEN TC, HOLICK MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. **Am J Med** 2002;112:659-62.

TANGPRICHA, V.; KOUTKIA, P.; RIEKE, S. M. et al. Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1478-83, jun 2003.

TAYLOR CL. Regulatory frameworks for functional foods and dietary supplements. **Nutr Rev**. 2004 Feb;62(2):55-9.

TENG, Z.; LUO, Y.; WANG, Q. Nanoparticles synthesized from soy protein: preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2712-2720, 2012.

UNGER, M. D.; CUPPARI, L.; TITAN, S. M. et al. Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone? **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 29, n. 6, p. 784-8, dez 2010.

UNITED STATES OF AMERICA. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Dietary Supplement Health and Education Act of 1994 Silver Spring, MD, 1994. Disponível em: <<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Legislation/FederalFoodDrugandCosmeticActFDCAct/SignificantAmendmentstotheFDCAct/ucm148003.htm>>

UNITED STATES PHARMACOPEIA 35. Disponível em: <<http://www.uspnf.com/uspnf/display?cmd=jsp&page=chooser>>. Acesso em 08 fev 2013. USP. Validation of Compendial Methods <1225>. The United States Pharmacopoeia. 30th. Ed.; Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011.

VAN DER MEI IAF, PONSONBY AL, ENGELSEN O, PASCO JA, MCGRATH JJ, EYLES DW et al. The high prevalence of vitamin D insufficiency across Australian populations is only partly explained by season and latitude. **Environ Health Perspect** (2007) 115(8):1132–1139.

VIANA, O. S.; JÚNIOR, J. B.; SILVA, R. M. F.; MEDEIROS, F. P. M.; JÚNIOR, S. G.; ALBUQUERQUE, M. M.; ROLIM-NETO, P. J. Desenvolvimento de formulações e tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de efavirenz – terapia anti-HIV. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v. 42, n.4, p. 505-511, 2006.

VILLANOVA, J.C.O.; DE SÁ, V.R. **Excipientes: guia prático para padronização**. 2 ed. São Paulo: Editora Pharmabooks, 2009

WHO. Report of the subcommittee on fat-soluble vitamins. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_3.pdf>.

WORTSMAN, J.; MATSUOKA, L. Y.; CHEN, T. C.; LU, Z.; HOLICK, M F. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 3, p. 690-3, set 2000.

ZITTERMANN, A et al. Future directions in vitamin D and cardiovascular research. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases**, v. 22, n. 7, p. 541-6, jul. 2012.