



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

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO
BENZNIDAZOL UTILIZADO NO COMBATE A
DOENÇA DE CHAGAS POR HIDRÓLISE,
OXIDAÇÃO, FOTÓLISE E TERMODEGRADAÇÃO**

LARISSA ARAÚJO ROLIM

RECIFE

2010

LARISSA ARAÚJO ROLIM

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO
BENZNIDAZOL UTILIZADO NO COMBATE A
DOENÇA DE CHAGAS POR HIDRÓLISE,
OXIDAÇÃO, FOTÓLISE E TERMODEGRADAÇÃO**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

RECIFE

2010

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

Rolim, Larissa Araujo

Estudo de degradação do fármaco benznidazol utilizado no combate a doença de chagas por hidrólise, oxidação, fotólise e termodegradação / Larissa Araújo Rolim. – Recife: O Autor, 2010.

129 folhas : fig., tab.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Inovação Terapêutica , 2010.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Farmacologia 2. Doença de chagas 3. Doença do barbeiro I. Título.

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-198

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

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^a. Dr^a. Suely Lins Galdino

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

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina de Almeida Fernandes



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

Recife, 30 de Agosto de 2010.

Dissertação de Mestrado defendida e APROVADA, por decisão unânime, em 30 de agosto de 2010, cuja banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profª Drª Ana Cristina Lima Leite
(Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Profª Drª Maria do Carmo Alves de Lima
(Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profª Drª Miracy Muniz de Albuquerque
(Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

Aos meus pais, Jaciara e Pedro Rolim.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, a minha orientadora, que possibilitou a concretização deste trabalho, pelo carinho, amizade e ensinamentos, **Profa. Ana Cristina Lima Leite**. Tati Ana, Merci!

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

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

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

A minha **família**, em especial ao meu irmão **Vinicius Rolim** e aos meus primos, **José Lamartine Soares Sobrinho e Mônica Felts de La Roca Soares** por todo amor, ensinamentos e dedicação.

A **Pablo de Ataíde Ferreira**, pelo amor, dedicação, companheirismo, e compreensão. Te amo, pra sempre!

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

Ao **Laboratório de Planejamento em Química Medicinal - LpQM** e a **todos os seus integrantes** pelo acolhimento e companheirismo.

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

Ao *Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE* pela oportunidade de realizar este trabalho, na figura da Doutora *Flávia Patrícia Moraes de Medeiros* pela ajuda constante durante a realização deste trabalho.

Ao *Departamento de Química Fundamental*, em especial, a *Abene* e *Gustavo* pela disponibilidade e ajuda.

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

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

RESUMO

ROLIM, L.A. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL UTILIZADO NO COMBATE A DOENÇA DE CHAGAS POR HIDRÓLISE, OXIDAÇÃO, FOTÓLISE E TERMODEGRADAÇÃO

O benznidazol (BNZ) é o único medicamento com ação tripanocida empregado clinicamente no Brasil, sendo o fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas, doença crônica que leva o paciente à utilização da medicação com o BNZ por longos períodos de tempo. A ingestão prolongada deste fármaco pode levar ao seu acúmulo no organismo, podendo esse sofrer uma série de reações inesperadas em condições orgânicas como oxidações, hidrólises ácidas, básicas ou neutras, podendo ainda em condições “in vitro” de armazenamento e estocagem, simular a termo e fotodegradação dos princípios ativos. Neste sentido foi realizado o estudo de degradação forçada do BNZ para delineamento da estabilidade deste ativo. No estudo de estabilidade forçada do BNZ foram utilizadas condições de estresse hidrolítico (em meio ácido, básico e neutro), oxidativo (em peróxido de hidrogênio 3%), fotolítico (em lâmpadas ultravioleta e branca fria) e termodegradação (em estufa à 60°C e com termogravimetria até 700°C), as quais foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Posteriormente, avaliou-se a cinética de degradação do BNZ sob condições básica, oxidativa e fotolítica, onde se verificou maior degradação. O método indicativo de estabilidade para detecção e quantificação do BNZ e seus produtos de degradação foi desenvolvido e validado. Sendo amostras de comprimido de BNZ submetidas a estudo de estabilidade acelerada (40±2°C / 75±5% UR) a fim de avaliar a necessidade de notificar, identificar ou qualificar os produtos de degradação obtidos a partir do BNZ em produtos acabados comercializados. Sendo a análise de um lote idicativa da qualificação dos produtos de degradação do BNZ.

PALAVRAS CHAVE: Estudo de degradação forçada, benznidazol, cinética, método indicativo de estabilidade.

ABSTRACT

ROLIM, L.A. DEGRADATION STUDY OF DRUG BENZNIDAZOLE USED IN CHAGAS DISEASE BY HYDROLYSIS, OXIDATION, PHOTOLYSIS AND THERMAL DEGRADATION

The benznidazole (BNZ) is the only drug used clinically with trypanocidal action in Brazil, being the drug of choice for treatment of Chagas disease, a chronic disease that leads the patient to use medication with BNZ for long periods of time. The prolonged ingestion of this drug can lead to its accumulation in the body that can undergo a series of unexpected reactions in organic conditions such as oxidation, acid hydrolysis, basic or neutral and may even under conditions in vitro storage and warehousing, to simulate the end and photodegradation of the active ingredients. In this sense, the study was conducted degradation BNZ forced to design the stability of this asset. In the study of stability forced the BNZ were used hydrolytic stress conditions (in acidic, basic and neutral), oxidative (hydrogen peroxide 3%), photolytic (in cool white and UV lamps) and thermal degradation (in an oven at 60°C and thermogravimetry up to 700°C), which were evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC). Subsequently, we evaluated the degradation of BNZ under basic conditions, oxidative and photolytic, where there was further deterioration. The method indicative of stability for detection and quantification of the BNZ and its degradation products was developed and validated. Samples were compressed BNZ undergo accelerated stability study ($40 \pm 2^\circ \text{C}$ / $75 \pm 5\% \text{RH}$) to assess the nescessidade to notify, identify or describe the degradation products obtained from the BNZ in finished products marketed.

KEYWORDS: Study of forced degradation, benznidazole, kinetics, indicative of stability method.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do BNZ.....	27
Figura 2. Medicamento produzido atualmente pelo LAFEPE®	27
Figura 3. Rota sintética desenvolvida pela Nortec®	28
Figura 4. Curvas típicas dos principais métodos termogravimétricos: (a) dinâmico; (b) isotérmico e (c) quase-isotérmico.....	45
Figura 5. BNZ e suas substâncias relacionadas.....	49
Figura 6. Esquema representativo da metodologia de hidrólise degradativa do BNZ.....	53
Figura 7. Esquema representativo da metodologia de oxidação degradativa do BNZ.....	54
Figura 8. Fotografia ilustrativa da matéria prima BNZ.....	63
Figura 9. Resultados da microscopia óptica da matéria prima BNZ.....	63
Figura 10. MEV da matéria-prima BNZ no aumento de 1000x.....	64
Figura 11. Curva de DSC do BNZ.	65
Figura 12. Espectro de absorção UV do BNZ.	65
Figura 13. Espectro de Infravermelho do BNZ.	67
Figura 14. Espectro de Massas do BNZ.....	68
Figura 15. Esquema da ionização secundária do BNZ.....	69
Figura 16. Resultados da difração de raios X do BNZ.....	70
Figura 17. Estrutura molecular tridimensional do BNZ.....	70
Figura 18. Cromatograma do padrão misto de BNZ e suas SQR's.....	74
Figura 19. Proposição da rota degradativa do BNZ por hidrólise ácida.....	79
Figura 20. Cromatograma da amostra de BNZ submetida a 1M de HCl por 30 dias.....	80
Figura 21. Cromatograma da amostra de BNZ submetida a 1M de NaOH por 24h.....	80
Figura 22. Decaimento das amostras de BNZ submetidas a hidrólise básica por 30 dias.....	81
Figura 23. Cromatograma da amostra de BNZ submetida a 0,1M de NaOH por 24h.....	82
Figura 24. Proposição da rota degradativa do BNZ por hidrólise básica.....	82
Figura 25. Hidrólise Básica do BNZ: Reação de segunda ordem.....	83
Figura 26. Proposição da rota degradativa do BNZ por oxidação.....	84

Figura 27. Decaimento das amostras de BNZ oxidadas por 30 dias.....	85
Figura 28. Cromatograma da amostra de BNZ oxidada por 30 dias.....	85
Figura 29. Oxidação do BNZ: Reação de primeira ordem.....	86
Figura 30. Perfil da Iluminância de acordo com o tempo de exposição	87
Figura 31. Absorbância de fotoprodutos de quinino por hora.....	87
Figura 32. Fotografias das soluções de BNZ na ausência de irradiação (esquerda) e após 5h de exposição (direita).....	88
Figura 33. Espectros de absorção das amostras fotodegradadas de BNZ.....	89
Figura 34. Decaimento do BNZ em função do tempo de exposição.....	89
Figura 35. Cromatograma da solução aquosa de BNZ após 1h de exposição.....	90
Figura 36. Espectro de massas da amostra de BNZ fotodegradada por 1h.....	91
Figura 37. Possível rota degradativa do BNZ por fotólise (1).....	92
Figura 38. Possível rota degradativa do BNZ por fotólise (2).....	93
Figura 39. Possível rota degradativa do BNZ por fotólise (2) continuação.....	93
Figura 40. Possível rota degradativa do BNZ por fotólise (3).....	94
Figura 41. Prováveis produtos de degradação do BNZ obtidos por fotólise.....	94
Figura 42. Fotografias amostras sólidas de BNZ na ausência de irradiação (esquerda) e após 41h de exposição (direita).....	95
Figura 43. Micrografia eletrônica das amostras sólidas do BNZ na ausência (esquerda) e após 41h de exposição (direita).....	95
Figura 44. IV do BNZ padrão em comparação a amostra fotodegradada por 41h.....	96
Figura 45. Fotólise do BNZ: reação de segunda ordem.....	97
Figura 46. Cromatograma do BNZ após 30 dias de degradação térmica a 60°C.....	98
Figura 47. Decomposição térmica do BNZ.....	99
Figura 48. Prováveis produtos de degradação do BNZ.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites dos produtos de degradação expressos com a porcentagem de fármaco.....	34
Tabela 2. Resultados do estudo de solubilidade para o BNZ.....	71
Tabela 3. Cinética degradativa do benznidazol quantificado pelos diferentes métodos.....	72
Tabela 4. Parâmetros cromatográficos do padrão misto do BNZ e suas SQR's.....	73
Tabela 5. Resultados da robustez do método.....	74
Tabela 6. Resultados da linearidade do método indicativo de estabilidade do BNZ.....	75
Tabela 7. Limite de detecção e quantificação das SQR's.....	76
Tabela 8. Resultados da precisão do método.....	76
Tabela 9. Resultados da exatidão do método.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^1H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H
2-AIS	Sulfato de 2-aminoimidazol
2-NIZ	2-nitroimidazol
BNZ	Benznidazol
CETENE	Centro Tecnológico do Nordeste
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DTA	Termoanálise
DTG	Termogravimetria
ITEP	Instituto de Tecnologia do Estado de Pernambuco
IV	Infravermelho
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia óptica
MS	Ministério da Saúde
MSF	Médicos Sem Fronteiras
NBCA	N-benzilcloroacetamida
OMS	Organização Mundial de Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
[]	Concentração
K	Constante de degradação
°C	Graus Celsius
J.g ⁻¹	Joule por gramas
®	Marca registrada
µg	Microgramas
µm	Micrometro
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
π	Ligação pi
δ	Ligação sigma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 Doença de Chagas.....	25
3.2 Benznidazol.....	26
3.3 Estabilidade.....	29
3.4 Estudos de Degradação Forçada.....	33
3.4.1 Hidrólises.....	34
3.4.2 Oxidação.....	35
3.4.3 Fotólise.....	36
3.4.3.1 Princípios básicos para testes de fotoestabilidade de medicamentos.....	36
3.4.3.2 Fotodegradação de Fármacos.....	37
3.4.3.3 Fotorreação direta.....	38
3.4.3.4 Fotoreação indireta.....	38
3.4.3.5 Actinometria.....	39
3.4.3.6 Câmaras de fotoestabilidade.....	41
3.4.3.7 “ICH Harmonised Tripartite Guideline: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B”.....	41
3.4.4 Termodegradação.....	43
3.4.5 Estudo das Cinéticas de Degradação.....	46

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Fármaco e substâncias relacionadas.....	49
4.2 Solventes.....	49
4.3 Reagentes.....	49
4.4 Caracterização da Matéria Prima: Benznidazol.....	50
4.4.1 Descrição Macroscópica.....	50
4.4.2 Microscopia óptica.....	50
4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	50
4.4.4 Determinação da Faixa de Fusão.....	50
4.4.5 Análise Térmica do BNZ por Calorimetria Exploratória Diferencial.....	51
4.4.6 Determinação da Pureza do BNZ.....	51
4.4.7 Espectroscopia de Infravermelho.....	51
4.4.8 Espectroscopia de Massas.....	52
4.4.9 Difração de raios-X (DRX) do BNZ.....	52
4.4.10 Estudo de Solubilidade do BNZ.....	52
4.5 Estudos de Degradação Forçada.....	52
4.5.1 Hidrólise.....	52
4.5.2 Oxidação.....	53
4.5.3 Fotólise.....	54
4.5.3.1 Actinometria Química e Física da Câmara de Fotoestabilidade.....	54
4.5.3.2 Estudo de Fotodegradação do BNZ em solução aquosa.....	55
4.5.3.3 Estudo de Fotodegradação do BNZ no estado sólido.....	55
4.5.4 Termodegradação.....	55
4.5.5 Cinéticas de Degradação do BNZ.....	56
4.6 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico.....	57
4.6.1 Preparação das amostras.....	57

4.6.2	Preparação da Curva de Calibração.....	57
4.6.3	Desenvolvimento do Método Indicativo de Estabilidade.....	58
4.6.4	Validação do Método Indicativo de Estabilidade.....	58
4.6.4.1	Robustez.....	59
4.6.4.2	Linearidade e Intervalo.....	59
4.6.4.3	Estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	59
4.6.4.4	Precisão.....	60
4.6.4.5	Exatidão.....	60
4.6.4.6	Especificidade.....	61
4.6.4.7	Seletividade.....	61
4.6.5	Avaliação do teor de produtos de degradação em forma farmacêutica sólida.....	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1	Caracterização da Matéria Prima BNZ.....	63
5.1.1	Descrição Macroscópica.....	63
5.1.2	Microscopia óptica.....	63
5.1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	64
5.1.4	Determinação da Faixa de Fusão do BNZ.....	64
5.1.5	Análise Térmica do BNZ.....	64
5.1.6	Determinação da Pureza do BNZ matéria prima.....	65
5.1.7	Espectroscopia de Infravermelho.....	66
5.1.8	Espectroscopia de Massas.....	67
5.1.9	Difração de raios-X (DRX) do BNZ.....	69
5.1.10	Estudo de Solubilidade do BNZ.....	70
5.2	Desenvolvimento e Validação do Método Indicativo de Estabilidade.....	71
5.2.1	Desenvolvimento do Método.....	71

5.2.2 Validação do Método Indicativo de Estabilidade.....	72
5.2.2.1 Robustez.....	73
5.2.2.2 Linearidade e Intervalo.....	75
5.2.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	76
5.2.2.4 Precisão.....	76
5.2.2.5 Exatidão.....	77
5.2.2.6 Especificidade.....	77
5.2.2.7 Seletividade.....	78
5.3 Estudo da Degradação do Benznidazol.....	78
5.3.1 Hidrólise.....	78
5.3.1.1 Hidrólise Ácida.....	78
5.3.1.2 Hidrólise Básica.....	79
5.3.1.3 Hidrólise Neutra.....	83
5.3.2 Oxidação.....	84
5.3.2.1 Descrição quantitativa do processo oxidativo.....	86
5.3.3 Fotodegradação.....	86
5.3.3.1 Quantificação da Iluminância e Irradiância da Câmara de Fotoestabilidade.....	86
5.3.3.2 Estudo de Fotodegradação em solução aquosa.....	88
5.3.3.3 Estudo de Fotodegradação no estado sólido.....	94
5.3.3.4 Estudo de Fotodegradação do BNZ em formulações sólidas orais.....	96
5.3.3.5 Descrição quantitativa do processo fotoquímico de degradação....	96
5.3.4 Termodegradação.....	97
5.4 Avaliação do teor de produtos de degradação em forma farmacêutica sólida.....	100
6 CONCLUSÕES.....	103
7 PERSPECTIVAS.....	106

REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICES.....	117
ANEXOS.....	129

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

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

O benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) é um antiparasitário, derivado nitroimidazol, com ação tripanocida, que vem sendo utilizado, desde 1973, no tratamento etiológico da doença de Chagas (LEITE et al., 2009a).

O benznidazol (BNZ) é o único medicamento com ação tripanocida empregado clinicamente no Brasil, sendo o fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas, doença crônica que leva o paciente à utilização da medicação com o BNZ por longos períodos de tempo.

A ingestão prolongada do fármaco pode levar ao seu acúmulo no organismo, podendo esse sofrer uma série de reações inesperadas em condições orgânicas como oxidações, hidrólises ácidas, básicas ou neutras, podendo ainda em condições “in vitro” de armazenamento e estocagem, simular a termo e fotodegradação dos princípios ativos. Estas possíveis reações podem ser mimetizadas pelo “stress testing” que é definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas. Estes testes mostram-se como essenciais dentro do planejamento para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, bem como para fármacos já em produtos comercializados, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente melhorarão a integridade do fármaco e do produto, além de esclarecer os possíveis produtos de degradação que podem ser obtidos a partir do mesmo sob condições extremas.

Neste sentido, foi realizado, a partir de diferentes métodos, o estudo d estabilidade forçada do BNZ, bem como a avaliação das cinéticas degradativas para os casos em que o BNZ foi considerado instável com alterações substâncias.

Na sequência, buscou-se desenvolver um método indicativo de estabilidade e valida-lo segundo ICH e ANVISA, sendo prosteriormente, utilizado para o monitoramento do estudo de estabilidade acelerada da forma farmacêutica comprimido BNZ 100 mg (LAFEPE[®]).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo de estabilidade em condições forçadas do fármaco Benznidazol (BNZ), a fim de verificar os possíveis fatores que conduzem à degradação do fármaco, isolar e identificar seus produtos de degradação, aumentando a segurança e eficácia do medicamento produzido.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar a caracterização físico-química do BNZ matéria prima;
- ✓ Desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar simultaneamente o BNZ e seus produtos de degradação;
- ✓ Realizar o estudo de degradação hidrolítico do BNZ em condições ácida, básica e neutra;
- ✓ Realizar o estudo de degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio;
- ✓ Realizar o estudo de degradação fotolítico do fármaco nas condições pré-estabelecidas pela ANVISA e ICH, por diferentes técnicas analíticas;
- ✓ Realizar o estudo de degradação térmica do BNZ;
- ✓ Propor rotas degradativas do BNZ em cada estudo;
- ✓ Determinar a cinética de degradação do BNZ em cada estudo;
- ✓ Avaliar a degradação de comprimidos de BNZ 100 mg após estudo de estabilidade acelerada.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doença de Chagas

As doenças negligenciadas afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, mas não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados. Em sua maioria, são doenças tropicais infecciosas que atingem principalmente pessoas de baixa renda, como exemplo, a doença de Chagas na América Latina, que gera um impacto devastador sobre a humanidade (LEONARDI et al, 2009; LYRA, 2009).

Na América Latina, a doença de Chagas, transmitida pelo *T. cruzi*, popularmente conhecido como tripanossoma americano, é considerada uma das mais importantes infecções parasíticas, abrangendo do México até a Argentina (MARCILI et al., 2009).

As tripanossomíases são mais comuns em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Mas como essas infecções parasíticas acometem muitos pacientes imunocomprometidos, são também encontradas em países desenvolvidos (ALP et al., 2009; LYRA, 2009).

Em fevereiro de 1909, o médico sanitarista Carlos Chagas, após isolar o parasito *Tripanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado da família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida, conclui todo o ciclo biológico da doença e posteriormente a identificação do vetor. Em sua homenagem foi denominada doença de Chagas. Essa descoberta é considerada até hoje, única na história da ciência e saúde brasileira (SOARES-SOBRINHO et al., 2006).

A doença de Chagas é uma enfermidade endêmica na América Latina, afetando em torno de 10 milhões de pessoas. A doença continua sendo um grave problema de saúde pública na América Latina, onde se estima que 4% a 5% da população possa estar infectada pelo *T. cruzi*. Minas Gerais é considerado um dos Estados brasileiros com maior prevalência da endemia chagásica, tendo sido coincidentemente o palco da descoberta da doença (WHO, 2009).

Atualmente, a doença de Chagas é classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença negligenciada, devido à proposta de classificação das doenças em globais (ocorrem em todo o mundo), negligenciadas (mais prevalentes nos países em desenvolvimento) e mais negligenciadas (exclusivas dos países em desenvolvimento). Essas

denominações representam uma evolução do termo "doenças tropicais" por contemplar os contextos de desenvolvimento político, econômico e social (SILVA et al., 2007).

Ações ao longo desses cem anos têm sido tomadas no combate à enfermidade. O combate à doença existe, porém o conhecimento produzido, ainda, não se reverteu de forma efetiva em avanços terapêuticos como novos fármacos, métodos de diagnósticos e/ou vacinas, por exemplo, apontando a necessidade de institucionalizar mecanismos que levem os produtores a desenvolver pesquisas para o tratamento de doenças próprias da realidade sanitária dos países pobres (MORAN et al., 2009).

Ao enfrentar a escassez ou falta de um tratamento adequado para essas doenças, países atingidos por essas endemias têm, em sua população um custo elevado em decorrência das comorbidades trazidas por essas enfermidades. Como por exemplo, no Brasil, os custos anuais sociais da doença de Chagas chegam próximo a 1 bilhão (BESTETTI, MARTINS, & CARDINALLI-NETO, 2009).

A tripanossomíase americana continua sendo um problema de saúde pública significativa e o potencial terapêutico dos agentes antichagásico é ainda muito limitado (MEZENECV et al., 2008).

No tratamento da doença de Chagas dispõe-se apenas do BNZ. Estudos mostraram que utilizando a dose na fase aguda de 5 a 7 mg/kg, 2 vezes ao dia, durante 60 dias, obtem-se 60 à 70% de curas parasitológicas, tendo como principal efeito secundário, a dermatite alérgica que pode acompanhar-se de sinais gerais. Sua limitação é para crianças e lactentes, pois não existe apresentação pediátrica (ABAD-FRANCH et al., 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, estas infecções parasíticas são parte de um grupo de doenças negligenciadas, em que a quimioterapia ainda precisa ser melhorada dentro das “janelas” terapêuticas (extensão de tempo em que a concentração do medicamento oferece o desejado efeito: quando reduzida, o efeito está aquém do desejado e, quando acima, aparecem os efeitos tóxicos) (BOURGUIGNON et al., 2009).

3.2 Benznidazol

O Benznidazol (BNZ), quimicamente N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida (figura 1), é utilizado como terapia única disponível para o tratamento etiológico da doença de Chagas. Sendo sua ação comprovada por inúmeros estudos desde sua síntese em 1968 por Grumber e colaboradores (ANDRADE et al., 1996;).

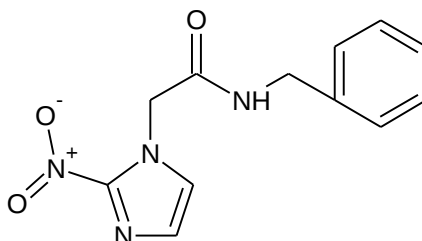


Figura 1. Estrutura química do BNZ.

Desde 1980, o BNZ era comercializado e distribuído para toda população mundial pela indústria farmacêutica Hoffman – La Roche® sob a denominação de Rochagan® (BNZ comprimido 100 mg), sendo neste período, segundo a companhia Suíça, cerca de 200 mil pessoas foram submetidas ao tratamento (DNDi, 2003).

Em 2004, o grupo farmacêutico suíço, anunciou a doação dos direitos de patente ao governo do Estado do Acre, que escolheu o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE®) para a produção do BNZ em escala mundial. Após um período de 2 anos, o laboratório anunciou ter conseguido fazer os “ajustes burocráticos” necessários para a produção do medicamento, estando o mesmo em produção industrial atualmente (figura 6) (DNDi, 2003; LAFEPE, 2009).



Figura 2. Medicamento produzido atualmente pelo LAFEPE®.

Outro “impasse” é relativo a síntese deste fármaco anteriormente realizada pela própria Roche, pois os comprimidos produzidos atualmente, são frutos de matéria prima doada pela Roche. Em vista disto, a Nortec Química Fina está estabelecendo uma parceria mediada pelo DNDi com o LAFEPE, para síntese em escala industrial do fármaco seguindo uma rota já desenvolvida pela Nortec, descrita na figura 3.

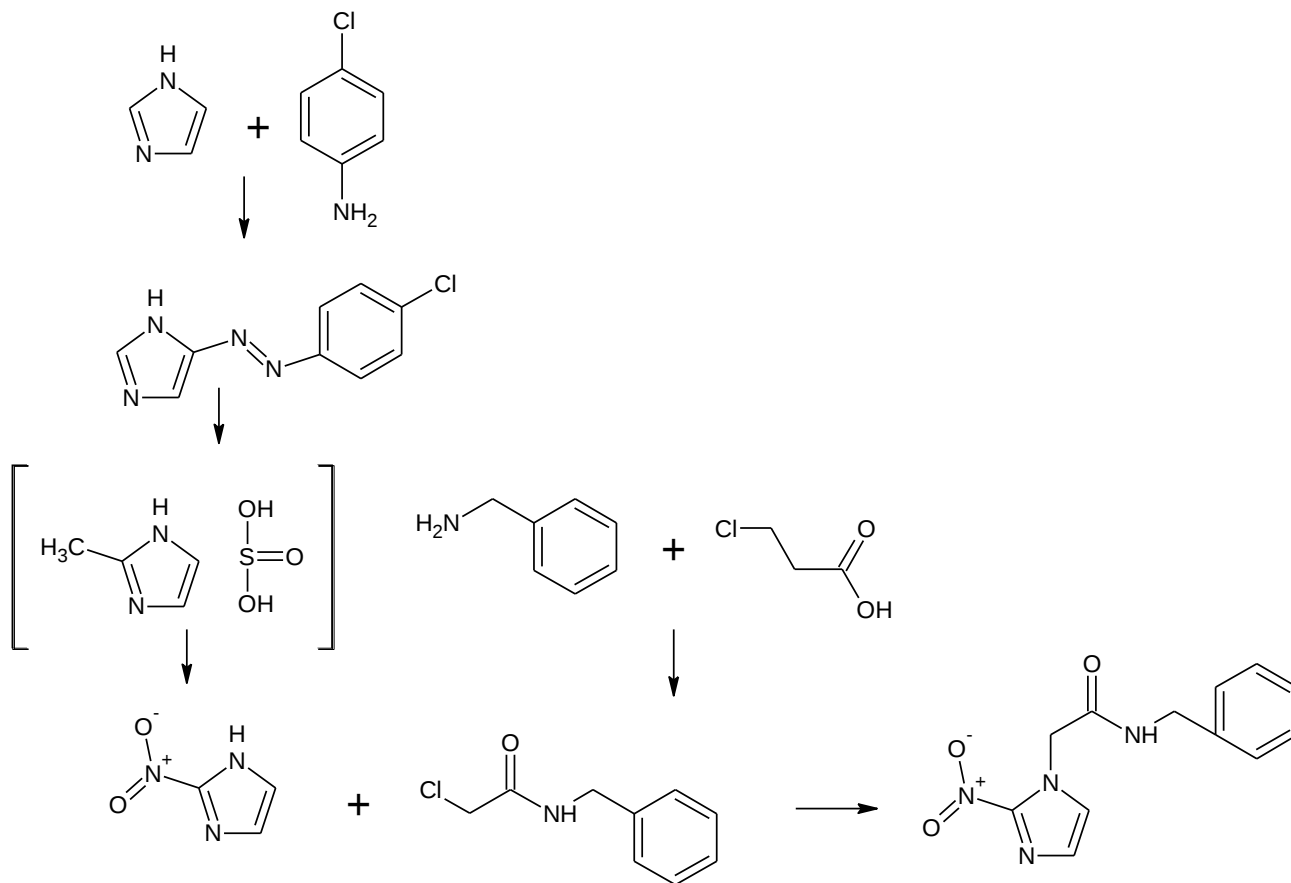


Figura 3. Rota sintética desenvolvida pela Nortec[®].

O BNZ ainda não representa o fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas, visto que apresenta baixa solubilidade em água e alta toxicidade, podendo ocasionar algumas reações adversas graves como dermatite por hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica. Portanto uma série de pesquisas vem sendo desenvolvidas em torno de

novas alternativas tecnológicas, como a obtenção de complexos de inclusão, dispersões sólidas, multiparticulados e sistemas de liberação prolongada, a fim de aumentar a biodisponibilidade do BNZ e assim diminuir o aporte de fármaco administrado aos pacientes (LIMA, 2008; SOARES-SOBRINHO, 2009; LYRA, 2009). Além de alternativas terapêuticas, a longo prazo, na síntese de novos compostos com ação tripanocida promissora (LEITE et al., 2009b)

3.3 Estabilidade

A estabilidade de um fármaco ou medicamento é definida como a capacidade do produto manter-se dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado àquela que sua potência está reduzida a não mais do que 10 %, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (YOSHIOKA & STELLA, 2002; BRASIL, 2005).

Segundo a Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (ANVISA), o Teste de Estabilidade é um conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas. Os três estudos de estabilidade que são preconizados pela resolução são:

- 1) Estudo de Estabilidade Acelerado: Estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte (BRASIL, 2005).
- 2) Estudo de Estabilidade de Longa Duração: Estudo projetado para verificação das

características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005).

3) Estudo de Estabilidade de Acompanhamento: Estudo realizado para verificar que o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005).

A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de alguns fatores que influenciam a estabilidade de medicamentos, cada componente, ativo ou não, pode afetar a estabilidade de um produto, e variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte podem influenciar na estabilidade do produto. Conforme a origem, as alterações podem ser classificadas como extrínsecas, quando determinadas por fatores externos; ou intrínsecas, quando determinadas por fatores inerentes à formulação (TABORIANSKI, 2003).

1) Fatores Extrínsecos (fatores externos aos quais o produto está exposto):

- a) Tempo: o envelhecimento do produto pode levar a alterações nas características organolépticas, físico-químicas, microbiológicas e toxicológicas.
- b) Temperatura: temperaturas elevadas aceleram reações físico-químicas e químicas, ocasionando alterações em: atividade de componentes, viscosidade, aspecto, cor e odor do produto. Baixas temperaturas aceleram possíveis alterações físicas como turvação, precipitação, cristalização. Problemas gerados em função de temperaturas elevadas ou muito baixas podem ser decorrentes também de não-conformidades no processo de fabricação, armazenamento ou transporte do produto.
- c) Luz e Oxigênio: a luz ultravioleta, juntamente com o oxigênio, origina a formação de radicais livres e desencadeia reações de óxido-redução. Os produtos sensíveis à ação da luz devem ser

acondicionados ao abrigo dela, em frascos opacos ou escuros e devem ser adicionadas substâncias antioxidantes na formulação, a fim de retardar o processo oxidativo.

d) Umidade: este fator afeta principalmente as formas cosméticas sólidas como talco, sabonete em barra, sombra, sais de banho, entre outras. Podem ocorrer alterações no aspecto físico do produto, tornando-o amolecido, pegajoso, ou modificando peso ou volume, como também contaminação microbiológica.

e) Material de Acondicionamento: os materiais utilizados para o acondicionamento dos produtos cosméticos, como vidro, papel, metal e plástico podem influenciar na estabilidade. Devem ser efetuados testes de compatibilidade entre o material de acondicionamento e a formulação, a fim de determinar a melhor relação entre eles.

f) Microrganismos: os produtos mais suscetíveis à contaminação são os que apresentam água em sua formulação como emulsões, géis, suspensões ou soluções. A utilização de sistemas conservantes adequados e validados (teste de desafio do sistema conservante - Challenge Test), assim como o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação é necessário para a conservação adequada das formulações.

g) Vibração: vibração durante o transporte pode afetar a estabilidade das formulações, acarretando separação de fases de emulsões, compactação de suspensões, alteração da viscosidade dentre outros. Um fator agravante do efeito da vibração é a alteração da temperatura durante o transporte do produto.

2) Fatores Intrínsecos: fatores relacionados à própria natureza das formulações e sobretudo à interação de seus ingredientes entre si e/ou com o material de acondicionamento. Resultam em incompatibilidades de natureza física ou química que podem, ou não, serem visualizadas pelo consumidor (TABORIANSKI, 2003).

a) Incompatibilidade Física: Ocorrem alterações, no aspecto físico da formulação, observadas por: precipitação, separação de fases, cristalização, formação de gretas, entre outras.

b) Incompatibilidade Química (TABORIANSKI, 2003).

- ✓ pH: devem-se compatibilizar três diferentes aspectos relacionados ao valor de pH: estabilidade dos ingredientes da formulação, eficácia e segurança do produto.
- ✓ Reações de Óxido-Redução: ocorrem processos de oxidação ou redução levando a alterações da atividade das substâncias ativas, das características organolépticas e físicas das formulações.
- ✓ Reações de Hidrólise: acontecem na presença da água, sendo mais sensíveis substâncias com funções éster e amida. Quanto mais elevado o teor de água da formulação, mais provável a ocorrência desse tipo de reação.
- ✓ Interação entre Ingredientes da Formulação: são reações químicas indesejáveis que podem ocorrer entre ingredientes da formulação anulando ou alterando sua atividade.
- ✓ Interação entre Ingredientes da Formulação e o Material de Acondicionamento: são alterações químicas que podem acarretar modificação em nível físico ou químico entre os componentes do material de acondicionamento e os ingredientes da formulação.

Os testes de estabilidade devem ser conduzidos sob condições que permitam fornecer informações sobre a estabilidade do produto em menos tempo possível. Para isso, amostras devem ser armazenadas em condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade (TABORIANSKI, 2003; BRASIL, 2005).

Deve-se ainda estar atento para essas condições não serem tão extremas que, em vez de acelerarem o envelhecimento, provoquem alterações que não ocorreriam no mercado e a sequência sugerida de estudos (acelerados, de longa duração, e estudos de estresse) tem por objetivo avaliar a formulação em etapas, buscando indícios que levem à conclusões sobre sua estabilidade, como conduta preconizada pelos órgãos regulatórios avalia-se apenas degradações em 30 a 40% (SINGH & BAKSHI, 2000).

O prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado por um estudo de estabilidade de longa duração de acordo com os parâmetros definidos pela RE nº 1, de 2005. Por ocasião do registro poderá ser concedido um prazo de validade provisório de 24 meses, se aprovado o relatório de estudo de estabilidade de longa duração de 12 meses,

ou relatório de estudo de estabilidade acelerado de seis meses acompanhado dos resultados preliminares do estudo de longa duração (TABORIANSKI, 2003; BRASIL, 2005).

O protocolo do estudo de estabilidade deve contemplar avaliações físicas, químicas, físico-químicas e biológicas, quando for o caso e deve-se avaliar, também, a presença ou formação qualitativa e quantitativa de subprodutos e/ou produtos de degradação, utilizando-se metodologia adequada. Conforme descrito na publicação de um Informe Técnico nº 1/2008, com o objetivo de esclarecer procedimentos nos casos em que a impureza ou o padrão do produto de degradação não estão disponíveis. Estes procedimentos envolvem a realização de testes de estresse sob condições variadas (BRASIL, 2008).

3.4 Estudos de Degradação Forçada

O teste de estresse destinado a elucidar a estabilidade intrínseca de um fármaco faz parte da estratégia de desenvolvimento de medicamentos, sendo, normalmente, realizado em condições mais severas do que as utilizadas em estudos de estabilidade acelerada. A realização destes estudos permitem o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar os produtos de degradação (PD) dos fármacos. Método este, utilizado para doseamento das formas farmacêuticas após estudo de estabilidade acelerada, de longa duração e de acompanhamento das formas farmacêuticas, a fim de avaliar em condições normais de armazenamento a produção destes degradados durante o armazenamento do produto farmacêutico (SINGH & BAKSHI, 2000; BAERTSCHI, 2005).

O ICH e a ANVISA regulamentam que de acordo com a dose máxima ingerida pelos pacientes, seja analisado a necessidade de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação no decorrer dos estudos de estabilidade, de acordo com a tabela 1.

Para os produtos de degradação que, ao final do estudo de estabilidade, apresentar percentuais iguais ou superiores aos limites de qualificação deverá ser apresentado uma avaliação mínima de genotoxicidade (estudo de alteração cromossomal *in vitro*) e estudos gerais de toxicidade em modelos animais do mesmo (ICHQ3A, 2002; ICHQ3B, 2003).

De modo característico, os estudos para identificação, notificação ou qualificação dos produtos de degradação de fármacos, incluem os efeitos sobre o fármaco da temperatura, da umidade (em diferentes pHs), da oxidação e fotólise (SINKO, 2008).

Tabela 1. Limites dos produtos de degradação expressos de acordo com a porcentagem de fármaco.

	<i>Dose máxima diária</i>	<i>Limites</i>
<i>Limites de Notificação</i>	≤ 1g	0,1%
	> 1g	0,05%
<i>Limites de Identificação</i>	< 1mg	1,0%
	1mg – 10mg	0,5%
	> 10mg – 2g	0,2%
	> 2g	0,1%
<i>Limites de Qualificação</i>	< 10mg	1%
	10mg – 100mg	0,5%
	> 100mg – 2g	0,2%
	> 2g	0,15%

3.4.1 Hidrólises

Muitos fármacos são considerados como instáveis em meio aquoso e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia e sua estabilidade e da forma farmacêutica final não sejam comprometidas. Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação (ANSEL et al., 2007; SINKO, 2008).

Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente ácido clorídrico e para a hidrólise básica utiliza-se hidróxido de sódio, sendo que, muitas variações são observadas no tempo e na temperatura de exposição de fármacos para essa

condição. Existem poucos relatos na literatura sobre a hidrólise realizada em pH neutro, onde geralmente se utiliza água como agente de hidrólise. Nessa condição, a taxa de decomposição é lenta, o que é compreensível, porque reações em pH neutro são não-catalíticas e por isso podem ser necessários períodos muito longos sob condições de temperatura extremas, para conseguir quantidades suficientes de produtos de degradação (SINGH & BAKSHI, 2000; SILVA, et al., 2009).

As condições de estresse iniciais são realizadas, assumindo que o fármaco seja instável, portanto, sujeito a receber condições mais amenas. Dependendo dos resultados obtidos, aumenta-se ou diminui-se a concentração das condições de reação utilizada (SINGH & BAKSHI, 2000; SILVA, et al., 2009).

3.4.2 Oxidação

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos, dentre os mais conhecidos e estudados têm-se os esteróides, antibióticos, vitaminas, óleos e gorduras. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que procedem lentamente sob a influência do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

O peróxido de hidrogênio é utilizado para criar as condições de estresse empregadas para o estudo de oxidação. Esse parece ser muito mais popular para o propósito que qualquer outro agente oxidante. A concentração de peróxido utilizada varia entre 1% a 30% (SILVA, et al., 2009).

A estabilização de fármacos frente a condições oxidativas envolve a observação de um número de precauções durante a manufatura e estocagem. O oxigênio em recipientes farmacêuticos deve ser substituído por nitrogênio ou dióxido de carbono; assim como o contato com íons de metais pesados, que catalisam a oxidação, devem ser evitados e a estocagem deve ser a temperaturas reduzidas (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

3.4.3 Fotólise

Estudos de fotoestabilidade são conduzidos a fim de quantificar a extensão pelas quais as reações induzidas pela luz afetam as formulações dos medicamentos. Em alguns casos, determinar os mecanismos de fotoreações dos fármacos e de outros componentes que compunham o produto avaliado (PIECHOCK & THOMA, 2007).

Para o registro de produtos no Brasil, poderá ser necessária a comprovação da fotoestabilidade em adição aos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos. A RE 01/2005 reporta as recomendações para realização desses estudos. A não apresentação do estudo de fotoestabilidade deve ser justificada tecnicamente com bases em evidências científicas de que os componentes do produto não sofrem fotodegradação ou que a embalagem primária não permite a passagem de luz (BRASIL, 2005; ICHQ1B, 1996).

3.2.3.1 Princípios básicos para testes de fotoestabilidade de medicamentos

Medicamentos são expostos a uma variedade de fontes de emissão de radiação eletromagnética (REM) durante o processo de fabricação, embalagem, distribuição, e nos locais de venda nas farmácias, e nos locais de utilização. As fontes de iluminação são as mais variadas, desde iluminações artificiais como lâmpadas de vapor de Hg, incandescentes, fluorescentes, à iluminação natural pela luz solar filtrada e luz solar direta (TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007).

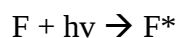
Na rotina de testes de fotoestabilidade, medicamentos são iluminados com extremo cuidado em condições controladas a fim de se determinar se eles são fotoestáveis e quantificar a extensão da fotodegradação de medicamentos que mostram certa sensibilidade à luz (TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007).

A fotodegradação de medicamentos pode conduzir à perda de princípios ativos e assim à perda na sua eficiência, além de formar subprodutos ou intermediários tóxicos de vida curta (p.ex., radicais livres) (PIECHOCK & THOMA, 2007).

A primeira lei da fotoquímica, proposta por Grotthus em 1817 e Draper em 1843, estabelece que apenas radiações que são absorvidas por moléculas podem ser efetivas na

promoção de mudanças fotoquímicas nesta molécula. Muito embora, medicamentos que absorvem radiação eletromagnética nem sempre sofrem fotodegradação (TØNNESSEN, 2004).

Considerando a seguinte descrição de absorção de fótons ($h\nu$) ultravioleta (UV) e visível por fármacos:



Onde F é o fármaco, $h\nu$ é a radiação eletromagnética (REM) com certa energia, frequência e comprimento de onda, F^* é o fármaco em um estado eletronicamente excitado. Assim, estes fármacos excitados podem dissipar a energia absorvida de várias maneiras (TØNNESSEN, 2004).

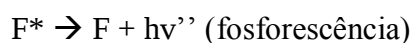
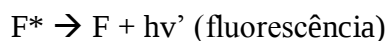
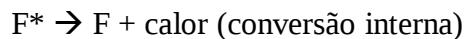
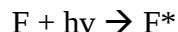
3.2.3.2 Fotodegradação de Fármacos

A energia da luz, da mesma forma que o calor pode promover a ativação necessária para que uma reação ocorra. Para que as reações ocorram é necessária uma radiação de frequência apropriada e uma entidade de luz suficiente. A unidade de energia de radiação PE conhecida como fóton, equivalente a um quantum de energia. As reações fotoquímicas não dependem da temperatura para ativação das moléculas e, por conseguinte, a velocidade de ativação nestas reações são independentes da temperatura. Contudo, após a molécula absorver um quantum de energia radiante, esta pode colidir com outras moléculas, elevando a energia cinética, o que ocasionará aumento da temperatura do sistema (TØNNESSEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007).

O estudo das reações fotoquímicas exige um controle do comprimento de onda, da intensidade da luz e do número de fótons irradiados. Normalmente, as reações que ocorrem por ativação fotoquímica são complexas e seguem uma série de etapas, que compreendem a iniciação, propagação e término, ao resultar em composto inerte (TØNNESSEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007).

3.2.3.3 Fotorreação direta

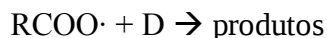
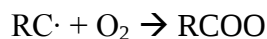
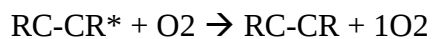
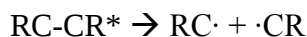
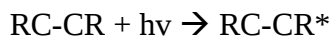
Fotoreação direta refere-se a uma situação em que os fármacos que absorvem REM UV ou visível resultam na perda deste fármaco e a formação de produtos:



Onde F é o fármaco, $h\nu$ é a radiação eletromagnética (REM) com certa energia, frequência e comprimento de onda, F^* é o fármaco em um estado eletronicamente excitado, $h\nu'$ e $h\nu''$ são fótons emitidos via fluorescência e fosforescência, respectivamente, M é uma molécula aceptora, e M^* é a molécula aceptora no estado eletronicamente excitado após receber energia do fármaco (KUHN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007).

3.2.3.4 Fotoreação indireta

No caso de fotoreações indiretas, não o fármaco, mas outro componente da formulação (p.ex., excipientes ou impurezas) absorve REM UV ou visível resultando na formação de uma ou mais espécies reagentes as quais reagem com os fármacos como indicado à seguir:



Neste caso, RC-CR é uma molécula orgânica, como excipientes ou impurezas da forma farmacêutica que absorvem REM UV ou visível. Em alguns casos, a RC-CR pode sofrer fotólise produzindo $RC\cdot$, uma espécie de radical livre que pode combinar com oxigênio molecular (O_2) produzindo radicais alcóxil ($RCOO$) que podem reagir e assim degradar alguns fármacos. Em outros casos, a energia pode ser transferida de um estado eletronicamente excitado ($RC-CR^*$) para o oxigênio molecular produzindo oxigênio molecular singleto (1O_2), uma espécie reativa seletiva que pode reagir e degradar alguns fármacos. O grau com que certos fármacos estão suscetíveis a sofrer reações com radicais peróxil e oxigênio molecular singleto é dependente da estrutura molecular do fármaco, da composição da formulação, e das condições sobre as quais ele é exposto à REM (KUHN, 2004; TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007).

3.2.3.5 Actinometria

A actinometria permite a determinação do fluxo de fótons ($I\lambda$) ou “dose de luz” em que os medicamentos são expostos durante os ensaios de fotoestabilidade, quer por um meio instrumental, com o uso de radiômetro espectral, em radiometria, ou por métodos químicos (KUHN, 2004; TØNNESEN, 2004).

De acordo com o “Glossário de termos usados em fotoquímica” (Recomendações IUPAC, 1996) um actinômetro é um sistema químico ou dispositivo físico em que o número de fótons num feixe absorvido em um espaço definido pode ser integralmente determinado (KUHN, 2004).

Actinômetros físicos

Existem dois principais tipos de detectores como forma de medidas instrumentais empregadas: detectores térmicos que convertem energia radiante em calor (bolômetros e termistores), e dispositivos fotoelétricos que convertem energia radiante em corrente elétrica (fototubos, células fotovoltaicas, luxímetros e radiômetros espectrais).

Para medidas da luz visível, recomenda-se o uso de um luxímetro, devidamente calibrado uma vez que o luxímetro é um aparelho que mede a intensidade da luz visível percebida pelo olho humano, em outras palavras, mede a intensidade de uma iluminação, ou a iluminância, não sendo

sensível, portanto, a outros tipos de fonte de emissão (TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007; AZEVEDO-FILHO, 2008).

A radiometria é feita a partir de dispositivos fotoelétricos que convertem energia eletromagnética em corrente elétrica. O aparelho consiste de um detector UV ou visível com filtro que permite a passagem de comprimentos de onda bem definidos para o sensor. (PIECHOCK & THOMA, 2007; AZEVEDO-FILHO, 2008).

Radiômetros UV podem ser calibrados para dar uma medição absoluta da irradiância para um determinado tipo de fonte, por exemplo, lâmpadas de xenônio ou fluorescentes de um tipo particular. Estes radiômetros podem proporcionar um meio simples de medição de nível da irradiância em toda a área da amostra, mas é necessário realizar calibrações esporádicas uma vez que as medidas podem mudar com o tempo de vida de uma determinada fonte (PIECHOCK & THOMA, 2007).

Até o momento, ainda não foi estabelecido nenhum filtro UV internacionalmente padronizado. Isto significa que medidores de diferentes fabricantes podem não medir a mesma fração de irradiância a partir de uma determinada fonte (TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007; AZEVEDO-FILHO, 2008).

Actinômetros químicos

Um actinômetro químico ou dosímetro é um sistema químico (fluido, gás, sólido, ou um ambiente heterogêneo) que se submete a reações induzidas pela luz (em determinados comprimentos de onda (λ), no qual um campo quântico - $\Phi(\lambda)$ – é precisamente conhecido (KUHN, 2004).

Os princípios da actinometria estão bem estabelecidos, porém os sistemas sensíveis apenas à radiação ultravioleta não são padronizados (TØNNESEN, 2004).

O cloridrato de quinina monohidratado foi originalmente proposta pelo *Japanese National Institute of Health Sciences* e *Japanese Pharmaceutical Manufacturer's Association* (YOSHIOKA, 1994). Na concentração recomendada (2%), a solução de quinina tem uma absorbância ≥ 2 entre 320 a 367 nm, de modo que a irradiância UV acima deste intervalo pode

ser determinada utilizando este sistema (YOSHIOKA, 1994; ICHQ1B, 1996; TØNNESSEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007).

O sal monoclórato de quinina diidratada, alcalóide extraído da planta *Cinchona officinalis*, foi selecionado como padrão actinométrico para o UV por ter suficiente solubilidade e relativo baixo custo, e por ser comercialmente viável (YOSHIOKA, 1994).

Recomenda-se o uso de cubetas de quartzo ou ampolas de vidro para a exposição da solução de quinina a fim de que seja feito a calibração por actinometria química. Antes de serem realizadas as medidas, faz-se necessário verificar se esses recipientes estão isentos de vestígios de ácido, base, sais e tampão (ICHQ1B, 1996).

3.4.3.6 Câmaras de fotoestabilidade

O *design* das câmaras de fotoestabilidade comumente encontrado na Europa e América é do tipo exposição plano horizontal, sem rotação. Considerando que a irradiação é homogênea na área da superfície de exposição é importante determinar precisamente a intensidade de irradiação recebida pelas amostras quando dispostas na área de exposição (PIECHOCK & THOMA, 2007).

Duas opções de sistemas de lâmpadas foram sugeridas para a montagem das câmaras de fotoestabilidade. A natureza das lâmpadas fica a critério de escolha dos fabricantes, desde que atenda aos requisitos estabelecidos. No caso, a opção 1 recomenda o uso de lâmpadas fluorescentes, de xenônio ou halógenas, combinando emissão ultravioleta e visível (similar à emissão da lâmpada D65/ID65), e a opção 2 montada com uma lâmpada branca fluorescente fria, padrão ISO 10977 (1993) e lâmpada fluorescente ultravioleta próximo com espectro de 320 nm a 400 nm, e máximo de emissão entre 350 e 370 nm (PIECHOCK & THOMA, 2007; ICHQ1B, 1996, BRASIL, 2005).

3.4.3.7 “ICH Harmonised Tripartite Guideline: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B”

O *Guideline Q1B* que padroniza os testes de fotoestabilidade de medicamentos para a indústria farmacêutica teve sua primeira publicação em 1996, com o “*ICH Harmonised Tripartite Guideline: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B*” (*Guideline Q1B*),

adotado pela ANVISA na RE nº 398 de 12 de novembro de 2004, que determinou a Guia de Publicação de Estudos de Estabilidade,, atualmente revogada pela RE nº01 de 29 de Julho de 2005. De acordo com a *Guideline Q1B* as características intrínsecas da fotoestabilidade de substâncias ativas e produtos farmacêuticos devem ser avaliadas para demonstrar que a exposição à luz não resulta em mudanças inaceitáveis.

A *Guideline Q1B* foi concebido para testar a fotoestabilidade do produto até a venda, e não menciona testes durante a administração, porém, segundo a recomendação técnica da ANVISA, é apropriado testar certos produtos como infusões líquidas e cremes tópicos a fim de garantir a fotoestabilidade durante o uso. Para isso, modelos reduzidos de planos de estudos de fotoestabilidade podem ser elaborados (ICHQ1B, 1996; BRASIL, 2005; LEITE, 2005). Segundo o *Guideline Q1B* existem dois tipos de estudos de fotoestabilidade:

I. Degradação Forçada: tem como objetivo obter informações a respeito da fotoestabilidade intrínseca da molécula e, portanto, pode ser comparado a um teste de estresse. São testes que fazem parte do desenvolvimento da metodologia analítica, desenvolvimento da formulação, validação da especificidade e são conduzidos com os princípios ativos para entender as vias de fotodegradação;

II. Comprobatório: esse estudo é conduzido com o produto final; pode ser entendido como um teste de estabilidade acelerado. Nessa etapa é muito importante que o estado físico-químico da amostra esteja de acordo com a forma como ele é comercializado. Fornece informações a respeito de precauções especiais a serem adotadas durante o manuseio, a embalagem e a rotulagem dos produtos farmacêuticos. As amostras devem ser expostas à iluminação integrada total de não menos que 1,2 milhões de Lux.hora e a uma energia UV próxima de não menos que 200 W.hora/m², permitindo comparação direta entre substância e produto.

Segundo a recomendação técnica da ANVISA o teste de fotoestabilidade tem como objetivo demonstrar que a exposição à luz não resulta em alterações significantes no produto. A recomendação é de que se proteja o produto de forma a evitar subprodutos de degradação pela

luz, porém, caso a presença seja inevitável, a quantidade dessas impurezas não deve comprometer a qualidade do produto (ICHQ1B, 1996; BRASIL, 2005).

Em alguns produtos onde tem sido demonstrado que a embalagem primária é completamente fotoprotetora, tais como tubos de alumínio ou enlatados, os testes não precisam ser realizados desde que estejam tecnicamente justificados demonstrando que os componentes da formulação não apresentam problemas de fotoestabilidade, o que isenta o produto ao teste (LEITE, 2005; GONÇALVES, 2008).

Os resultados obtidos da análise de amostras expostas devem ser avaliados tanto individualmente como parte de um conjunto de resultados de estabilidade. Esses estudos combinados, por exemplo, resultados de estudo de estabilidade de longa duração somados aos resultados de fotoestabilidade, fornecem a informação necessária para avaliar se a data de validade proposta é aceitável ou se deve ser reduzida (GONÇALVES, 2008).

3.4.4 Termodegradação

A Termogravimetria é uma técnica na qual a variação de massa que ocorre na amostra, perda ou ganho, é acompanhada em função do tempo (a uma temperatura constante) ou em função da temperatura (CONCEIÇÃO, 2004).

A termogravimetria é essencialmente aplicável quando se deseja acompanhar variações de massa envolvidas em um experimento e este tipo de medida é realizada utilizando-se um equipamento denominado termobalança (CONCEIÇÃO, 2004).

A termobalança consiste na combinação de uma microbalança eletrônica adequada com um forno e um programador linear de temperatura, permitindo a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura, à medida em que a amostra é aquecida ou resfriada (CONCEIÇÃO, 2004).

A maioria das balanças baseiam-se no princípio da balança de nulo, operando continuamente em equilíbrio, pois os eventuais deslocamentos do travessão são detectados por um arranjo de feixe luminoso e o restabelecimento ocorre através da força de um motor de torque magnético (WENDLANT, 1986 e CONCEIÇÃO, 2004).

Os fornos, de um modo geral, são capazes de operar até 1000-1200°C, existindo também fornos que podem operar até 1600-2400°C. A temperatura do forno e da amostra é determinada através de um par termoeletrico e o sensor deve estar localizado próximo da amostra (WENDLANT, 1986 e CONCEIÇÃO, 2004).

O porta-amostra deve ser escolhido de acordo com a amostra a ser analisada e com a temperatura máxima de aquecimento aplicada a amostra. Os porta-amostras são geralmente constituídos de alumínio (temperatura máxima de 600°C), alumina (temperatura máxima de 1200°C), platina, níquel, quartzo, tungstênio, grafite e cobre (WENDLANT, 1986 e CONCEIÇÃO, 2004).

A atmosfera que circunda a amostra pode ser controlada, possibilitando trabalhar com atmosfera estática ou dinâmica à pressão ambiente, sob pressão ou a vácuo. Os gases utilizados podem ser inertes (nitrogênio, argônio), oxidantes (oxigênio) ou corrosivos (WENDLANT, 1986 e CONCEIÇÃO, 2004).

Os resultados de experimentos termogravimétricos são curvas, nas quais se observam variações de massa, de modo que se originem produtos voláteis (WENDLANT, 1986 e CONCEIÇÃO, 2004).

A aplicação da termogravimetria para um problema particular é possível se uma mudança de massa for observada, se a mudança de massa não for observada, podem ser utilizadas outras técnicas térmicas tais como: DSC, DTA e TMA. Se a mudança de massa for muito pequena (<1%), pode-se empregar a análise de gás desprendido (EGA) (WENDLANT, 1986 e CONCEIÇÃO, 2004).

De acordo com Conceição em 2004, as principais aplicações da termogravimetria são:

- Estudo da decomposição e da estabilidade térmica de substâncias orgânicas e inorgânicas e dos mais variados materiais: minerais, carvão, madeira, petróleo, polímeros, alimentos, fármacos, etc;
- Estudos sobre corrosão de metais em atmosferas constituídas por diferentes gases e em faixas muito amplas de temperatura;
- Estudos sobre a velocidade de destilação e evaporação de líquidos e de sublimação de sólidos;

- Estudos sobre desidratação, higroscopicidade, absorção, adsorção, desadsorção, determinação do teor de umidade, fração volátil e do teor de cinzas de vários materiais;
- Estudo cinético de reações, inclusive de reações no estado sólido e descoberta de novos compostos químicos;
- Determinação da pureza e da estabilidade térmica de reagentes analíticos, inclusive padrões primários e secundários.

Os métodos termogravimétricos são classificados em: dinâmico, isotérmico e quase-isotérmico (WENDLANDT, 1986), conforme podemos observar na figura 4.

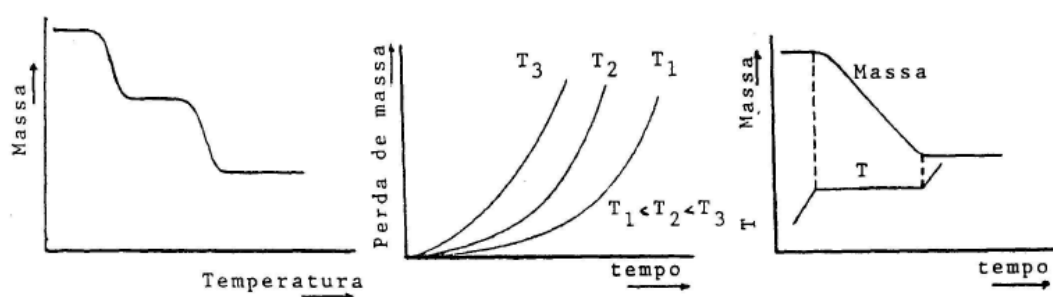


Figura 4. Curvas típicas dos principais métodos termogravimétricos: (a) dinâmico; (b) isotérmico e (c) quase-isotérmico.

No método dinâmico a perda de massa é registrada continuamente à medida que a temperatura aumenta. Este método é o mais geral, quando se utiliza o termo termogravimetria normalmente refere-se à termogravimetria dinâmica (WENDLANT, 1986).

No método isotérmico a variação de massa da amostra é registrada em função do tempo, mantendo-se a temperatura constante, sendo geralmente utilizado em trabalhos cinéticos. (WENDLANT, 1986).

No método quase-isotérmico a partir do momento em que começa a perda de massa da amostra, a temperatura é mantida constante até que a massa se estabilize novamente, neste

momento recomeça-se o aquecimento e este procedimento pode ser repetido em cada etapa da decomposição (WENDLANT, 1986).

3.4.5 Estudo das Cinéticas de Degradação

A degradação compreende uma ou mais reações, cuja velocidade pode ser calculada cineticamente. O estudo da cinética de degradação, fundamental para o estudo de fármacos e medicamentos, foi demonstrado inicialmente por Garret e Carper em 1955.

Apresenta como objetivos obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (NUDELMAN, 1975).

Segundo este método, os valores da constante (k) de degradação de fármacos são obtidos plotando-se em um gráfico da concentração em função do tempo a diferentes temperaturas, por exemplo. Assim, os logaritmos das velocidades de reações nas diferentes temperaturas são plotados por sua vez, em função das temperaturas absolutas, extrapolando-se a linha reta resultante até a temperatura ambiente, podendo-se assim determinar a validade do fármaco ou medicamento nas condições de armazenamento normais.

Uma segunda abordagem para avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos envolve a cinética não-isotérmica, introduzida por Roers em 1963. A energia de ativação, as velocidades de reação e a previsão da estabilidade são obtidas mediante a um único experimento programando a variação de temperatura a uma velocidade predeterminada, sendo a temperatura e tempo relacionados, mediante a equação:

$$1/T = 1/T_0 + at \quad \text{Eq. 01}$$

Onde T_0 é a temperatura inicial, T a temperatura analisada, a o recíproco da constante de velocidade de aquecimento e t o tempo. A qualquer tempo durante o experimento, a equação de Arrhenius para o tempo zero e o tempo t pode ser expressa:

$$\ln K_t = \ln K_0 - E_a/R (1/T_t - 1/T_0) \quad \text{Eq. 02}$$

Substituindo a equação 01 na Eq. 02, obtemos:

$$\ln K_t = \ln K_0 - E_a/R \cdot t \quad \text{Eq. 03}$$

Uma vez que a temperatura está em função do tempo, t , a determinação da estabilidade, K_t , é feita diretamente sobre a faixa de temperatura do experimento, porém existem várias contestações sobre a veracidade dos dados na extrapolação para a temperatura ambiente de constantes calculadas por este modelo cinético.

As velocidades de reação podem classificar-se como de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem, de acordo com os expoentes que afetam as concentrações dos reagentes. A ordem de reação é uma grandeza experimental, determinada a partir da lei de velocidade da reação química, verificando se a concentração de amostras retiradas no decorrer do tempo (NUDELMAN, 1975).

A reação de ordem zero ocorre quando a velocidade de reação é independente da concentração da substância ativa. Nesse caso, um gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação (k). Quando a velocidade da reação depende da concentração do reagente, a reação segue cinética de primeira ordem, obtendo-se uma reta com a representação do logaritmo neperiano da concentração ($\ln C$) em função do tempo (t). A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Para esse tipo de reação, a representação do inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (t) fornece uma reta (NUDELMAN, 1975).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fármaco e substâncias relacionadas

O BNZ, N-benzil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida, Lote 15772, bem como o padrão de trabalho (BNZ 07-1051/000), foram cedidos pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE[®]), fabricados pela Roche[®] Indústria Farmacêutica. Um segundo padrão de trabalho do BNZ foi cedido pela Nortec[®] Química Fina, bem como as substâncias relacionadas, precursores sintéticos do BNZ (Figura 5): 2-nitroimidazol (2-NIZ), N-benzilcloroacetamida (NBCA) e Sulfato de 2-aminoimidazol (2-AIS).

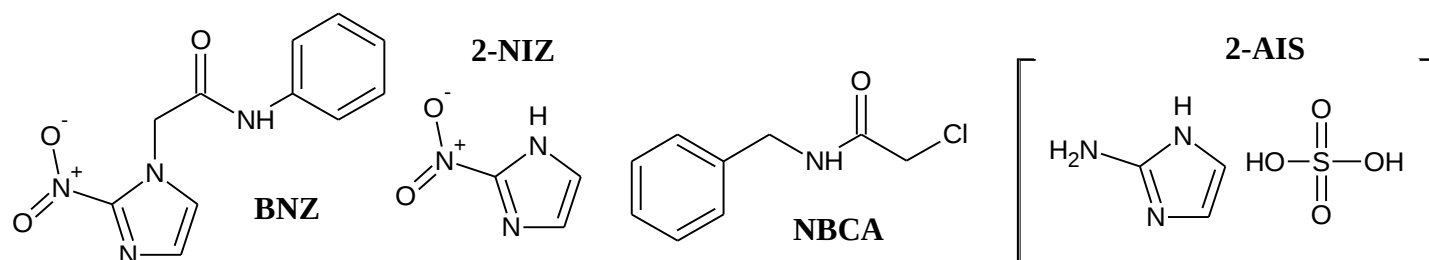


Figura 5. BNZ e suas substâncias relacionadas.

4.2 Solventes

Os solventes: acetonitrila e metanol, utilizados para composição da fase móvel e diluição das amostras foram de grau analítico, marca Carlo Erba[®]. As soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (MILLI Q[®]) e filtradas em membranas filtrantes de porosidade de 0,22 µm Millipore[®] e de 0.45 µm celulose (J'Prolab[®], PR).

4.3 Reagentes

As substâncias reagentes: hidróxido de sódio, fosfato de potássio dibásico, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio, utilizadas na realização dos estudos de degradação forçada e desenvolvimento e validação do método analítico foram da marca Vetec[®].

4.4 Caracterização da Matéria Prima: Benznidazol

4.4.1 Descrição Macroscópica

A matéria prima foi visualizada a olho nu, sobre uma placa de petri para verificação do aspecto e cor, no Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento do LAFEPE[®].

4.4.2 Microscopia óptica

A microscopia óptica (MO) foi realizada no laboratório de Estudos do Estado Sólido da Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos – Fiocruz, sendo as substâncias secas em estufa e analisadas em microscópio Olympus[®] modelo BX 50.

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no laboratório de microscopia eletrônica do Departamento de Física da UFPE, para avaliação do tamanho e formas dos cristais. As amostras foram montadas em fita dupla-face de carbono, sem metalização prévia.

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.

4.4.4 Determinação da Faixa de Fusão

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

4.4.5 Análise Térmica do BNZ por Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas de DSC para o fármaco foram obtidas por meio de um calorímetro da marca Shimadzu®, modelo DSC-60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa das amostras analisadas em torno de 5,0 mg, acondicionadas em cadinhos de alumínio, nas razões de aquecimento de 10, 15 e 20°C.min⁻¹, até a temperatura de 600°C.

Realizou-se a calibração do DTA e do DSC via ponto de fusão do padrão Índio (156,6°C ± 0,3) e Zinco (419,6°C ± 0,3). O fluxo de calor e entalpia foram calibrados via ponto de fusão do Índio (28,59 ± 0,3 J.g⁻¹), sob as mesmas condições das amostras.

4.4.6 Determinação da Pureza do BNZ

Realizou-se a determinação do teor do fármaco por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), segundo metodologia descrita por Silva e colaboradores em 2007, com cromatógrafo Shimadzu® equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP, sendo os dados tratados através do software Shimadzu® LC solution 1.0.

Para fins de comparação o teor do BNZ foi calculado também por espectrofotometria por UV-VIS, segundo SOARES-SOBRINHO e colaboradores em 2006, utilizando espectrômetro de varredura UV-mini marca Shimadzu® modelo 1240; e ainda, pela equação de Vant't Hoff com dados obtidos na calorimetria exploratória diferencial (GIRON, 1999).

4.4.7 Espectrometria no Infravermelho

O espectro de IV do BNZ foi obtido em espectrômetro infravermelho Spectrum 400 da PerkinElmer[®] sendo o resultado obtido, uma média de 10 varreduras realizadas de 650 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.4.8 Espectrometria de Massas

O espectrometro utilizado para analisar as amostras de BNZ foi um equipamento marca Shimadzu, com ionização por nebulização térmica e analisador de massas por tempo de voo, sendo utilizado para diluição do fármaco um sistema acetonitrila:água (50:50), com scan de 80 a 300 m / z.

4.4.9 Difração de raios-X (DRX) do BNZ

Esta análise foi realizada no Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP). As análises de DRX foram realizadas em um equipamento de difração de raios-X de pó, Rigaku[®], modelo Ultima, operando com corrente de 20mA, sob tensão de 40kV e utilizando radiação K-alfa do cobre. As amostras foram colocadas em lâminas de vidro escavadas e analisadas sem tratamento prévio. A difração de raios X foi realizada percorrendo a região entre $2\theta = 2^\circ$ e $2\theta = 60^\circ$.

4.4.10 Estudo de Solubilidade do BNZ

Segundo a monografia da Farmacopéia Brasileira (2002), foram testados os seguintes solventes-teste: água, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, hexano, etanol, metanol, acetato de etila, diclorometano, acetona, clorofórmio, isopropanol, glicerina, éter de petróleo, além de hidróxido de sódio 0,1M e ácido clorídrico 0,1M.

4.5 Estudos de Degradação Forçada

4.5.1 Hidrólise

Os estudos de degradação hidrolítica foram conduzidos com a matéria prima BNZ, utilizando soluções de ácido clorídrico (HCl) em diferentes concentrações, para hidrólise ácida; hidróxido de sódio (NaOH), para hidrólise básica e água ultra-pura para hidrólise neutra, à temperatura ambiente, protegidos da luz, segundo o esquema representado na figura 6.

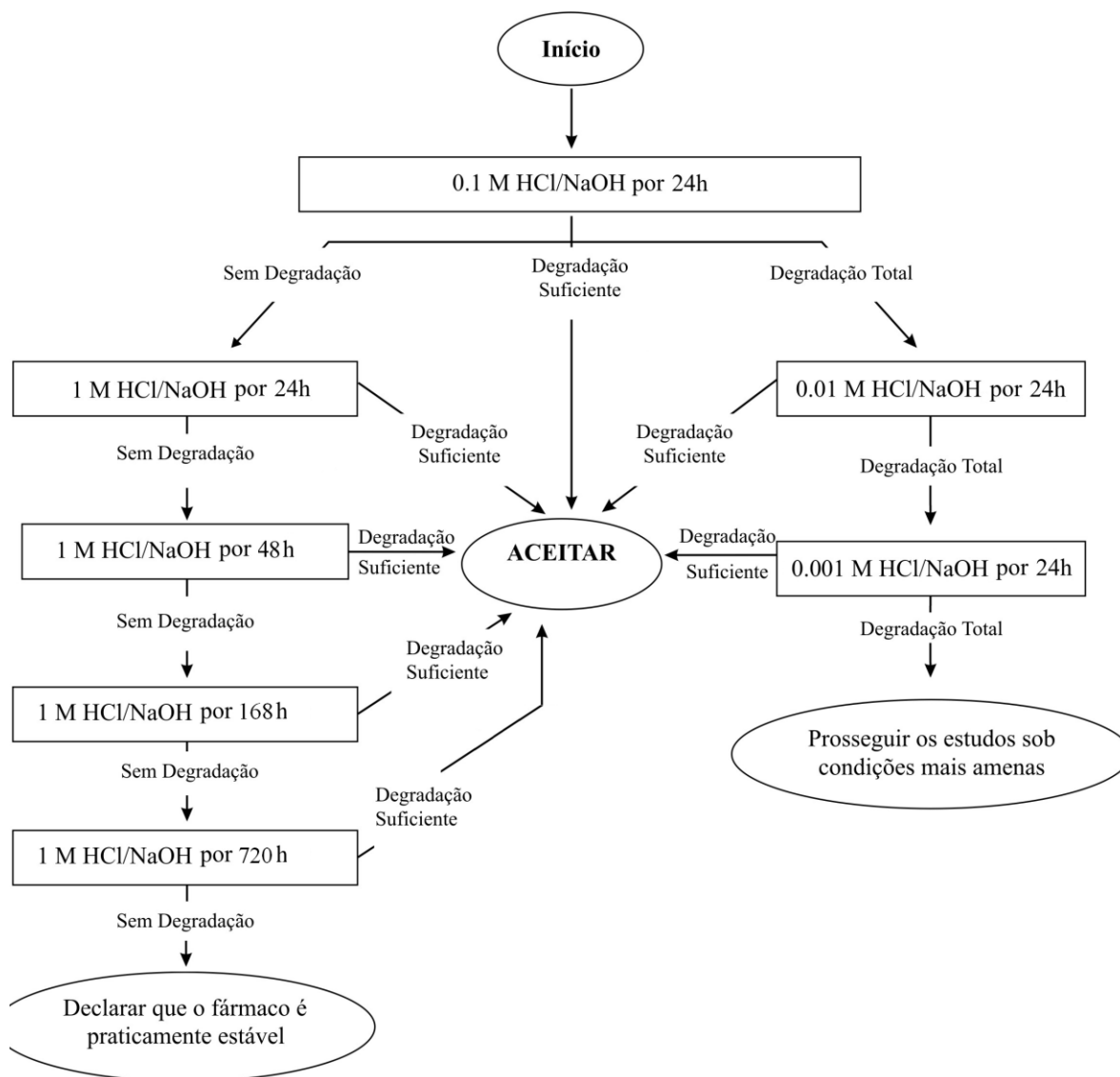


Figura 6. Esquema representativo da metodologia de hidrólise degradativa do BNZ.

4.5.2 Oxidação

A degradação oxidativa foi conduzida utilizando uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a temperatura ambiente, protegidos da luz, segundo esquema representado na figura 7.

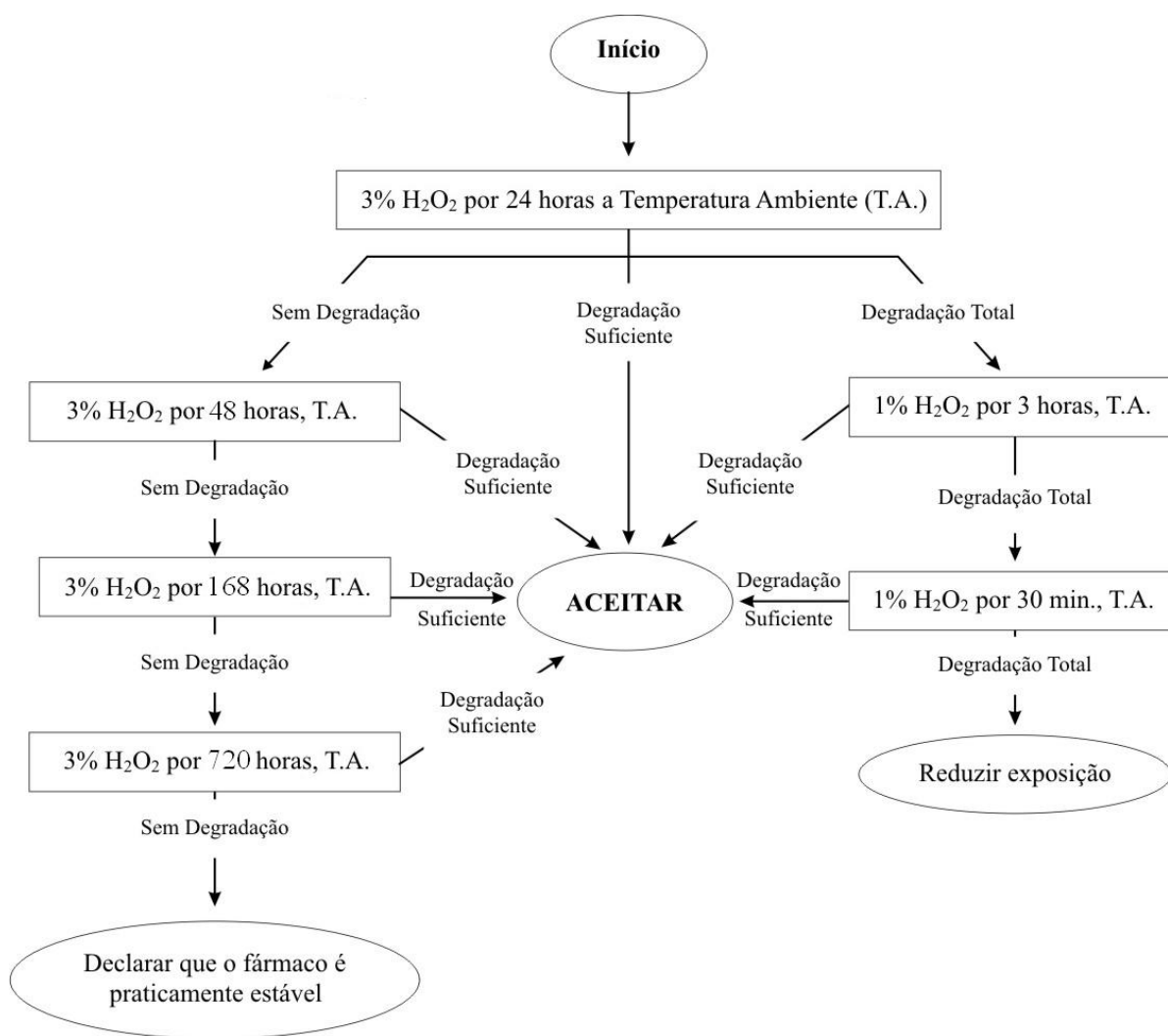


Figura 7. Esquema representativo da metodologia de oxidação degradativa do BNZ.

4.5.3 Fotólise

4.5.3.1 Actinometria Química e Física da Câmara de Fotoestabilidade

A intensidade da fonte de fótons emitidos pela câmara é a maior variável do estudo de fotoestabilidade, e depende bastante da natureza das lâmpadas (formato e tempo de uso) utilizadas. Estes fatores, com respeito às amostras, sendo a dose incidente que as amostras irão receber relativizadas com o tempo de exposição.

De acordo com a ANVISA, a dose de irradiação UV mínima recomendada para testes de fotoestabilidade é de 200 W/m^2 , e de luz visível 1.200.000 Lux. O cálculo da equivalência em tempo necessário para duas fontes de radiação com irradiâncias ou iluminâncias diferentes produzirem a mesma dose é feito através da equação da reta obtida com a média de 3 análises idênticas para a absorbância do quinino(irradiância) e a quantidade de lux por hora (iluminância).

4.5.3.2 Estudo de Fotodegradação do BNZ em solução aquosa

Soluções aquosas de BNZ ($200 \mu\text{g/mL}$) foram colocadas em câmara de fotoestabilidade Nova Ética[®] (Modelo C242), que consiste na associação de lâmpadas UV e fluorescente com emissão de 30.000 lux e $13,33 \text{ W/m}^2$ por hora. O estudo foi realizado a temperatura de 25°C e amostradas em intervalos de tempo especificados (0.16, 0.33, 0.5, 0.66, 0.83, 1, 2, 3, 4 e 5h), sendo a concentração de BNZ determinada por UV-VIS e CLAE e os produtos de degradação monitorados por espectrometria de massas, segundo metodologia semelhante ao descrito no item 4.4.8. Os resultados foram expressos em percentagem do BNZ e cada análise realizada em triplicata, para cálculo da cinética de fotodegradação do BNZ.

4.5.3.3 Estudo de Fotodegradação do BNZ no estado sólido

Amostras sólidas de BNZ foram expostas à mesma dose de irradiação em uma fina camada (1 mm) em uma placa de petri, por 1.200.000 lux e 200 W/m^2 .

Adicionalmente foi realizada a análise do espectro no Infravermelho (Infravermelho PerkinElmer[®] Modelo Spectrum 400/ATR) e microfotografias eletrônicas (MEV), a fim de comparar os espectros e imagens da matéria prima fotodegradada e a matéria prima BNZ padrão.

4.5.4 Termodegradação

A termodegradação do BNZ foi conduzida de duas formas: inicialmente para o desenvolvimento do método analítico indicativo de estabilidade foram realizadas degradações submetendo o fármaco a uma temperatura de 60°C em estufa calibrada, por 30 dias e posteriormente realizado um estudo mais preciso com utilização da termoanálise.

As curvas de DTA do fármaco foram obtidas por meio de um analisador térmico diferencial de marca Shimadzu[®], modelo DTA-60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50mL.min⁻¹, sendo a massa das amostras analisadas em torno de 10,0 mg, acondicionadas em um cadinho de alumina nas razões de aquecimento de 1, 2, 3, 4 e 5°C.min⁻¹ até 700°C.

As curvas de DSC para o fármaco foram obtidas por meio de um calorímetro da marca Shimadzu[®], modelo DSC-60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa das amostras analisadas em torno de 3,0 mg, acondicionadas em cadinhos de alumínio com razão de aquecimento de 5°C.min⁻¹, até a temperatura de 600°C.

Realizou-se a calibração do DTA e do DSC via ponto de fusão do padrão Índio (156,6°C $\pm$ 0,3) e Zinco (419,6°C $\pm$ 0,3). O fluxo de calor e entalpia foram calibrados via ponto de fusão do Índio (28,59 $\pm$ 0,3 J.g⁻¹), sob as mesmas condições das amostras.

As curvas de TG do fármaco foram obtidas por meio de termobalança Shimadzu, modelo DTG 60H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa das amostras em torno de 10,0 mg ($\pm$ 0,5), acondicionadas em cadinho de alumina, nas razões de aquecimento de 1, 2, 3, 4 e 5°C.min⁻¹, até 600°C. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS[®] (Therma Analysis) versão 2.20 da Shimadzu[®].

4.5.5 Cinéticas de Degradação do BNZ

A ordem de reação para as cinéticas de hidrólise básica, oxidação e fotodegradação do BNZ em solução aquosa e no estado sólido foram determinadas representando o percentual de fármaco residual em função do tempo (ordem zero), ln do percentual de fármaco em função do tempo (primeira ordem) e inverso do percentual de fármaco em função do tempo (segunda ordem). Os coeficientes de regressão linear foram obtidos, sendo o coeficiente mais próximo da unidade indicador da ordem das degradações do BNZ (SINKO, 2008).

O modelo cinético pode ser representado pelas seguintes equações:

$C = C_0 - k.t$	$t_{90\%} = (0,1 \times C_0) / k$	(Ordem zero)
$\ln C = \ln C_0 - k.t$	$t_{90\%} = 0,16 / k$	(Primeira ordem)
$1 / C = 1 / C_0 + k.t$	$t_{90\%} = 1 / (9k \times C_0)$	(Segunda ordem)

Onde C_0 é a concentração inicial dos reagentes no tempo zero, C é a concentração após a reação, t o tempo de reação e k a constante de reação (SINKO, 2008).

4.6 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico Indicativo de Estabilidade

4.6.1 Preparação das amostras

As amostras de BNZ foram obtidas a partir de uma diluição inicial de 10 mg de BNZ matéria prima em 10 mL de acetonitrila, com 5 min de agitação por sonicação, em balão volumétrico de 50 mL aferido com água ultra-pura. Obtendo-se a concentração final de 200 µg/mL, para posterior diluição com solução de acetonitrila:água (1:4), obtendo assim, uma concentração final de 12 µg/mL.

As soluções de BNZ padrão e substâncias relacionadas foram preparadas de forma semelhante às soluções amostra, obtendo-se a concentração final de 12µg/mL.

Para as amostras de comprimido LAFEPE BNZ 100 mg, foram pesadas analiticamente quantidade equivalente a 10 mg de BNZ solubilizados em 10 mL de acetonitrila, com 5 min de agitação por sonicação, em balão volumétrico de 50 mL aferido com água ultra-pura. Obtendo-se a concentração final de 200 µg/mL, para posterior diluição com solução de acetonitrila:água (1:4), obtendo assim, uma concentração final de 12 µg/mL, semelhante ao realizado para o BNZ matéria prima.

4.6.2 Preparação da Curva de Calibração

Após a definição da metodologia analítica foi realizado o estudo teórico para elaboração volumétrica da curva de calibração, nas mesmas condições analíticas das amostras, que será utilizada durante o processo de validação em cada parâmetro avaliado para a obtenção das concentrações das amostras do dia.

Portanto, uma solução de BNZ foi preparada com o padrão de trabalho na concentração de 200 µg/mL, com posteriores diluições volumétricas utilizando o sistema de solventes da fase móvel, para obtenção da curva de calibração com as concentrações de 8, 12 e 16 µg/mL.

4.6.3 Desenvolvimento do Método Indicativo de Estabilidade

Inicialmente, as soluções obtidas dos estudos de degradação foram submetidas individualmente a análise por CLAE, seguindo os parâmetros descritos por Silva et al., 2007, que consiste na utilização de uma coluna C18 (5 µm) a 30°C, como fase estacionária, uma solução acetonitrila:água (50:50), como fase móvel, com fluxo de 1mL.min⁻¹.

Como a separação do fármaco e seus produtos de degradação não foi seletiva, portanto, alterações em componentes do método como pH, proporção de solvente da fase móvel, fluxo e temperatura do forno da coluna foram julgados. O método otimizado foi validado em relação a vários parâmetros descritos pela *International Conference on Harmonization* (ICH Q2A e ICH Q2B) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE 899/03.

4.6.4 Validação do Método Indicativo de Estabilidade

No processo de validação da metodologia analítica desenvolvida foram avaliados os seguintes parâmetros: robustez, linearidade, intervalo, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e seletividade (ICHQ2B, 1996b; BRASIL, 2003)

A confiabilidade dos parâmetros estudados pode ser observada pelo coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo de uma série de medidas. Para os estudos realizados, foi determinado um coeficiente de variação menor 5%. Para cada parâmetro avaliado foram realizadas análises estatísticas dos resultados obtidos.

Foram avaliados ainda, os parâmetros de resolução, eficiência de coluna, assimetria e fator de capacidade (USP, 2010) em todos os parâmetros da validação. Sendo cada amostra acompanhada por uma curva controle preparada a partir de uma solução mãe, diariamente, nas concentrações de 8, 12 e 16 µg/mL contendo o BNZ e suas SQR's: sulfato de aminoimidazol, 2-nitroimidazol e N-benzilcloroacetamida, simultaneamente.

4.6.4.1 Robustez

A robustez mede a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos definidos indicando a confiabilidade do método durante o seu uso normal. Na validação do método as variáveis analisadas foram:

- Variação do fabricante do fosfato de potássio dibásico (componente da fase móvel), avaliando as marcas Carlo Erba[®] e Synth[®].
- Variação da temperatura do forno da coluna cromatográfica, avaliando as temperaturas de 39, 40 e 41°C.
- Variação do fluxo da fase móvel entre 0,99; 1 e 1,01 mL/min.
- Avaliação da estabilidade da solução amostra em 24h de armazenamento à 2-8°C.

4.6.4.2 Linearidade e Intervalo

Na linearidade é observada pela capacidade da metodologia analítica em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

A variação média do estudo foi realizada com intervalo com amplitude maior que 50% a 150%. Foi preparada uma solução de BNZ em acetonitrila na concentração de 200 µg/mL, com posteriores diluições volumétricas, utilizando o sistema de solventes da fase móvel, para constituição da curva com as concentrações de 4, 8, 12, 16, 20 e 40 µg/mL. A análise estatística do ensaio foi realizada com a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados da média de cada um dos 3 pontos de concentração de três curvas autênticas. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) é de 0,99 (BRASIL, 2003).

4.6.4.3 Estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2005).

O limite de quantificação é o valor mais baixo do analito de uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2005).

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados pela razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares (b) das três curvas do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares (a) das respectivas curvas multiplicadas por 3 e 10, respectivamente (BRASIL, 2005).

4.6.4.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostra e foi avaliada em três níveis (BRASIL, 2005):

- Repetitividade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo analista com a mesma instrumentação. A repetitividade do método foi verificada por 6 determinações autênticas a 100% da concentração do teste.
- Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária foram realizadas análises em 2 dias diferentes com analistas diferentes.
- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. Foi realizada em dois laboratórios diferentes em triplicata de amostras.

4.6.4.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método de estudo em relação ao valor teórico. Foi determinada após o estabelecimento da linearidade e do

intervalo, sendo verificada a partir de amostras obtidas com a matéria prima de BNZ nas concentrações de 8, 12 e 16 µg/mL, em triplicata para cada concentração, comparando com o valor obtido pela mesma análise realizada com o padrão de trabalho.

4.6.4.6 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através do fator de resolução e tempo de retenção relativo existente na construção da curva de linearidade com as substâncias relacionadas (2-NIZ e NBCA).

4.6.4.7 Seletividade

A seletividade foi estabelecida através da determinação de pureza de cada pico utilizando o detector de DAD.

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

A fim de cumprir o que estabelece o ICH e ANVISA com relação a quantificação dos produtos de degradação foi analisado o teor dos produtos de degradação que foram detectados num lote de produção industrial representativo (Lote BNZ 100 mg / LAFEPE) após estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 75% UR $\pm$ 5%, por 6 meses), a fim de avaliar a necessidade de notificá-los, identificá-los ou qualificá-los.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Matéria Prima BNZ

5.1.1 Descrição Macroscópica

O BNZ utilizado apresentou-se como um pó branco, levemente amarelado com tendência a formar aglomerações, atendendo a especificação da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2003a).

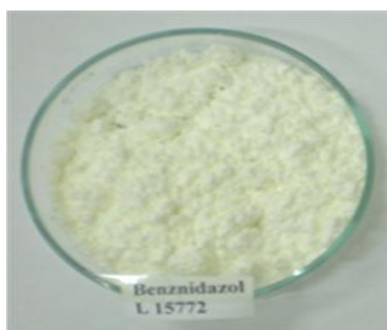


Figura 8. Fotografia ilustrativa da matéria prima BNZ.

5.1.2 Microscopia óptica

A microscopia óptica (MO) foi realizada no laboratório de Estudos do Estado Sólido da Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos – Fiocruz, sendo as substâncias secas em etufa e analisadas em microscópio Olympus[®] modelo BX 50.

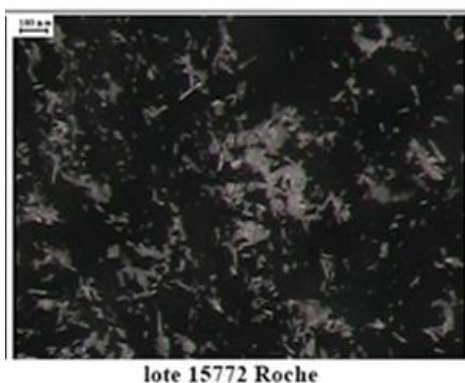


Figura 9. Resultados da microscopia óptica da matéria prima BNZ.

5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) do BNZ matéria prima está apresentada na figura 10, comprovando sua estrutura cristalina.

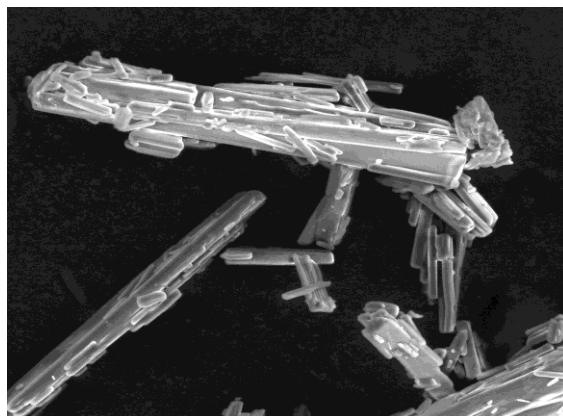


Figura 10. MEV da matéria prima BNZ no aumento de 1000x.

5.1.4 Determinação da Faixa de Fusão do BNZ

A faixa de fusão BNZ foi avaliada por dois métodos, obtido visualmente pelo método capilar como descrito na farmacopéia e por calorimetria exploratória diferencial, que será discutido no próximo item.

A faixa de fusão especificada para o BNZ está entre 188 e 190°C, que comprovam a pureza da matéria prima utilizada que apresentou, pelo método capilar, faixa de fusão de 189-190°C (BRASIL, 2003a).

5.1.5 Análise Térmica do BNZ

O evento da fusão corresponde à porção endotérmica da curva de DSC que se afasta da linha de base, retornando posteriormente a mesma (RODRIGUES et al., 2005). A figura 11 apresenta o termograma do BNZ na razão de aquecimento 10°C/min, apresentando pico de fusão em de $191,56 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

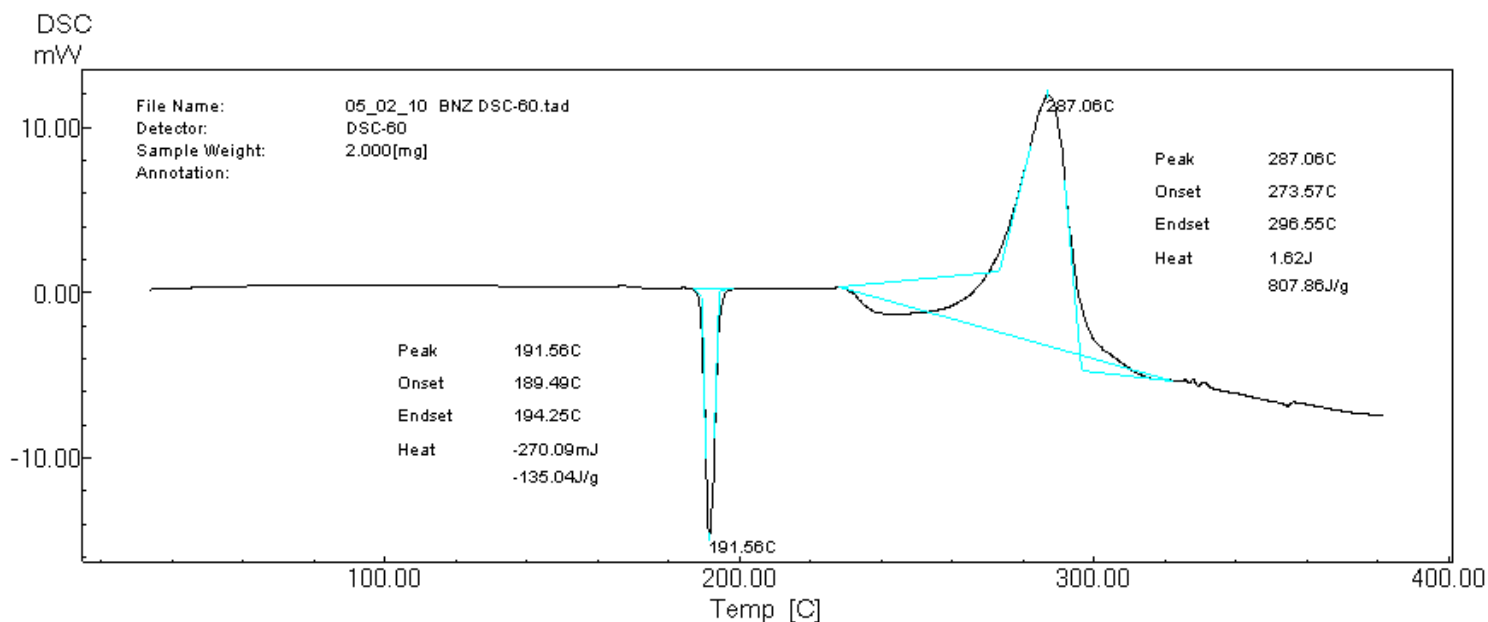


Figura 11. Curva de DSC do BNZ

5.1.6 Determinação da Pureza do BNZ matéria prima

Para determinação do teor da matéria prima foi realizado análise, inicialmente, por espectrofotômetro, segundo metodologia descrita por Soares-Sobrinho e colaboradores em 2006, obtendo o espectro de absorção no UV (figura 12), com teor equivalente a 98,2% quando comparado a curva de calibração de BNZ padrão (equação da reta $\rightarrow y = 0,0301x + 0,001$).

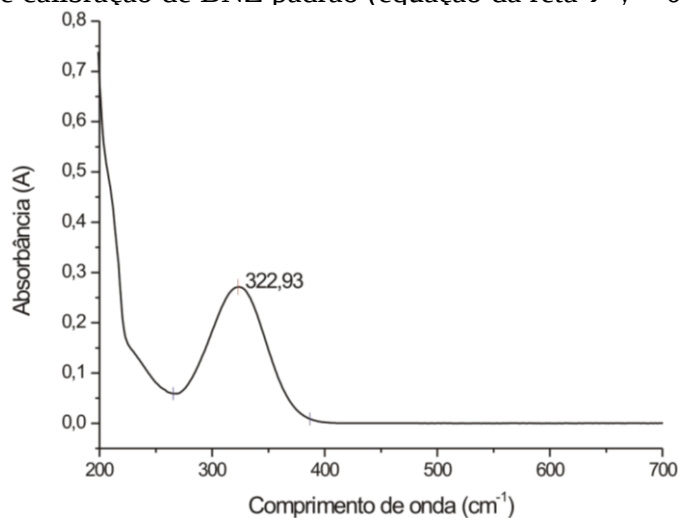


Figura 12. Espectro de absorção UV do BNZ.

Para confirmação do teor da matéria prima, foi realizada a análise por CLAE segundo metodologia descrita por Silva e colaboradores em 2007, com teor equivalente a 99,85 quando comparado a curva de calibração de BNZ padrão (equação da reta $\rightarrow y = 39025,5 x + 57455,86$).

A determinação da pureza por DSC é explicado pela teoria da não linearidade, ou seja, a área onde normalmente é iniciado o evento é decorrente da fusão das impurezas, justificando um processo não linear.

Considerando que as três amostras satisfizeram os requisitos mínimos preconizados pela teoria de Von't Hoff para determinação de pureza por DSC, foi possível utilizar a metodologia da ASTM928/03. A pureza média das referidas amostras por DSC foi $99,92 \pm 0,07$ mol % ($n = 3$; $S = 0,006$).

5.1.7 Espectroscopia de Infravermelho

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

O espectrograma no IV do BNZ (Figura 13) apresenta picos característicos, principalmente com relação as bandas típicas das amidas (vibração de estiramento N-H), estiramento de carbonila (banda amida I) e deformação N-H (banda amida II), além das vibrações devido ao grupo benzílico e imidazólico, e em particular, ao grupo nitro. A banda devido às vibrações de estiramento N-H, encontra-se em 3330 cm^{-1} . A banda de estiramento da carbonila encontra-se em 1685 cm^{-1} e a deformação de N-H (amida II) em 1565 cm^{-1} , característica da amida secundária. Além dessas, a banda em 1318 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-N. O conjunto de bandas em 3180, 3160, 3120, 3090 e 3000 cm^{-1} surgem das vibrações de estiramento simétrico e assimétrico de metileno do grupo benzila e o estiramento do C-H aromático, conforme demonstrado na figura 13.

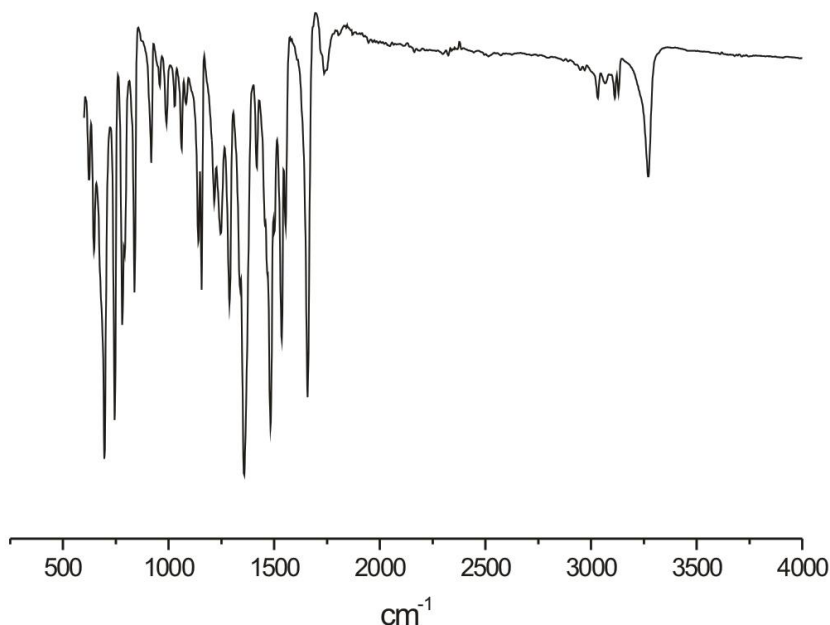


Figura 13. Espectro de Infravermelho do BNZ.

5.1.8 Espectrometria de Massas (IT-TOF)

O espectrômetro de massas utilizado é o equipamento mais indicado para detecção de produtos de degradação de fármacos por alta resolução e alta sensibilidade, porém tais condições são uma desvantagem quando se observa o número de ruídos no espectro inicial da molécula do BNZ isolada. (REF)

Inicialmente, foram avaliadas as duas ionizações possíveis: a positiva (M^+) e a negativa (M^-), para avaliação da susceptibilidade do BNZ a sofrer-las. A figura 14 demonstra que a ionização positiva foi muito mais eficaz em evidenciar o real pico majoritário do BNZ, sendo observado com 100% da intensidade um pico característico em 261,09 m/z, já que a massa molecular do BNZ é 260 g/mol, então $[M + 1]^+ = 261,09$ m/z, sendo possível também a observação do $[M + 2]^+ = 262,09$ m/z. Enquanto que na ionização negativa os picos principais, isto é com intensidade próxima a 100% estão na região de 300 m/z sendo a observação do pico característico do BNZ $[M - 1] = 259,08$ m/z com intensidade de 50%, aproximadamente. Sendo assim para análise do espectro de massas primário e secundário do BNZ foram utilizados aqueles obtidos com a ionização positiva, utilizando a negativa apenas para confirmação dos resultados.

O espectro de massas primário obtido das duas ionizações do BNZ está representado na figura X, sendo observado além do pico principal do BNZ $[M + 1]$, picos característicos em 139,99; 158,99; 176,99, 200,02; 262,1 e 283,07 m/z.

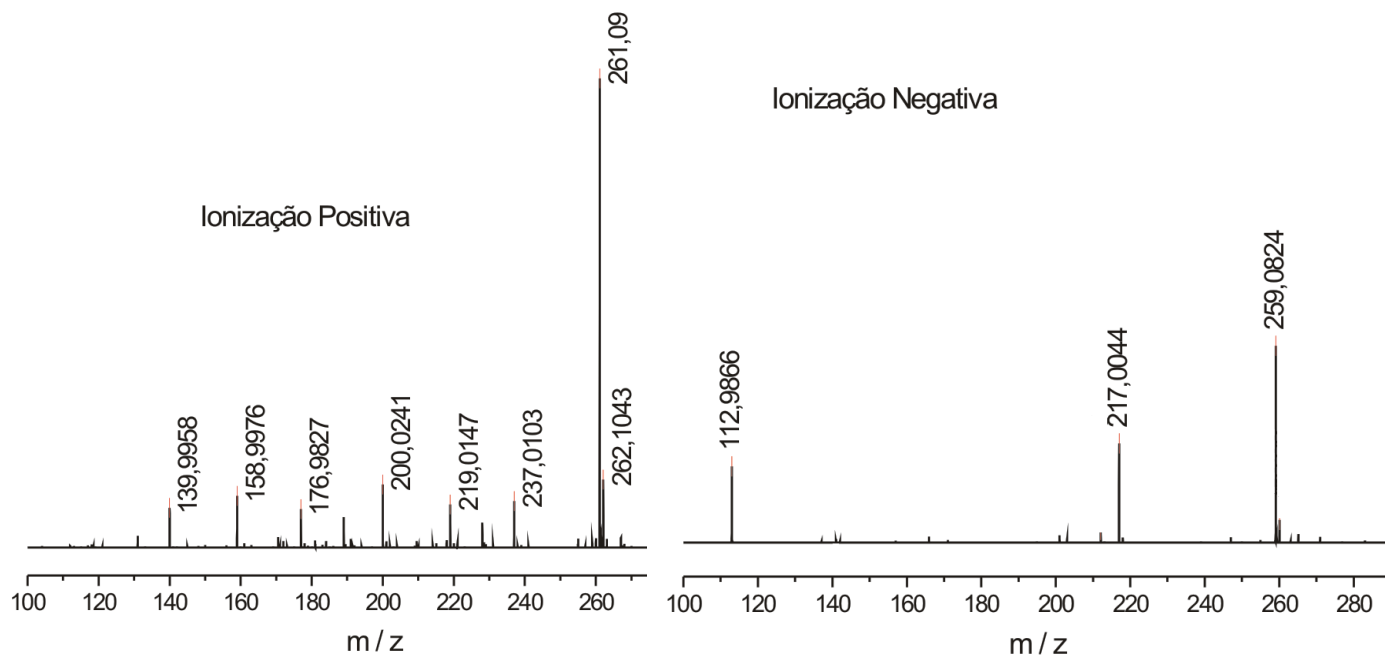


Figura 14. Espectro de massas do BNZ.

Os picos observados no espectro do BNZ são referentes a ionizações secundárias do fármaco durante a ionização principal ou a possíveis contaminantes da amostra durante o preparo ou a produtos de degradação obtidos durante armazenamento da matéria prima. Para sanar quaisquer dúvidas a cerca da ionização secundária do BNZ foi realizado o MS^2 para confirmação do perfil degradativo do BNZ por ionização térmica, com análise por tempo de voo. As massas observadas na ionização unicamente do pico correspondente ao BNZ, com intensidade significativa, isto é superior a 10%, foram apenas 5: 91,05; 107,04; 118,01; 157,07; e 214,09 m / z; que provavelmente, correspondem às estruturas químicas representadas no esquema abaixo (Figura 15).

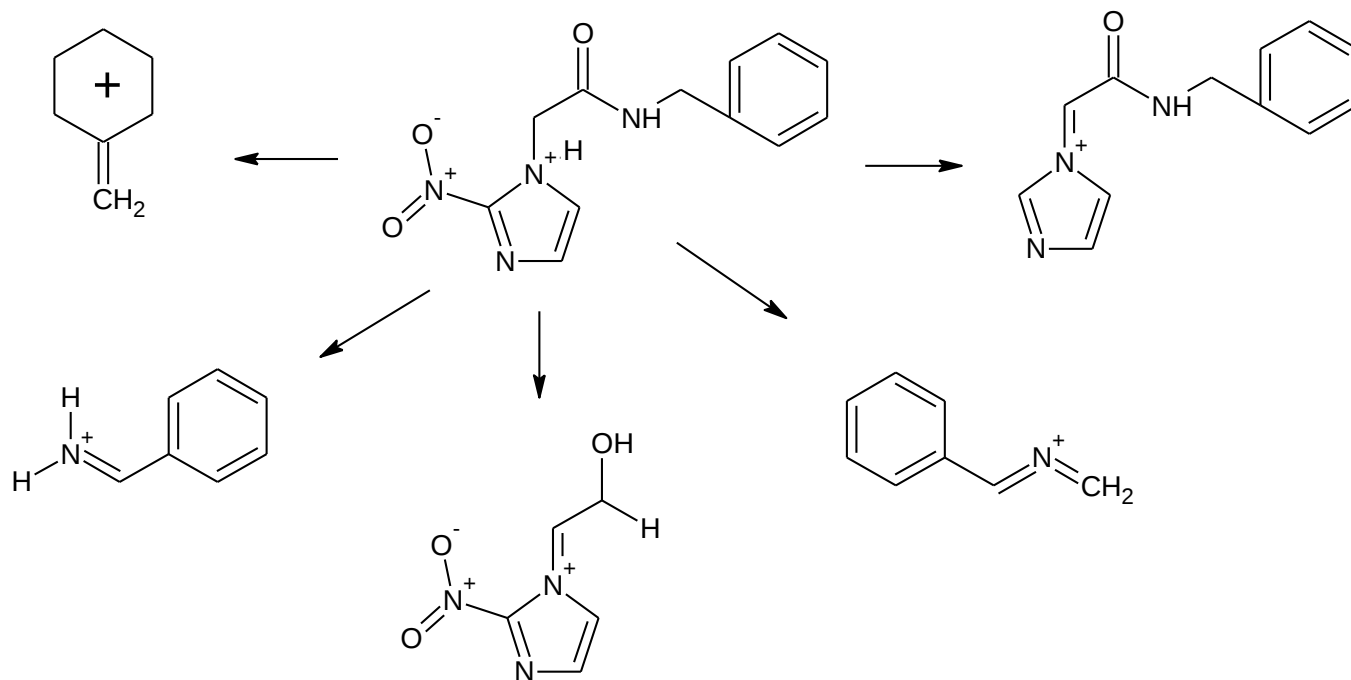


Figura 15. Esquema da ionização secundária do BNZ.

5.1.9 Difração de raios-X (DRX) do BNZ

O perfil difractométrico do BNZ revela a presença de 3 picos de maior intensidade a 7,5; 16,5 e 22° 2 θ , além de diversos picos secundários, evidenciando o comportamento cristalino do BNZ, sugerindo que o fármaco analisado apresenta-se como um composto de características cristalinas.

Outra técnica cristalográfica mais sofisticada utilizada é o ensaio de difração de Raios-X de monocristal. Este, por sua vez, é o único capaz de estabelecer com precisão a estrutura geométrica do cristal (MARTINELLO & SERRA, 2008).

A conformação cristalográfica do BNZ, realizado por Soares-Sobrinho em 2008, descreve a orientação relativa dos três fragmentos planares, o grupo imidazol (A), grupo benzil (B) e fragmento acetamida (C), com seus correspondentes ângulos diedro, sendo eles: A/C = 88,17;

$B/C = 67,12$ e $A/B = 21,05$. Estes três fragmentos planares podem ser visualizados através da estrutura tridimensional do BNZ na Figura 17.

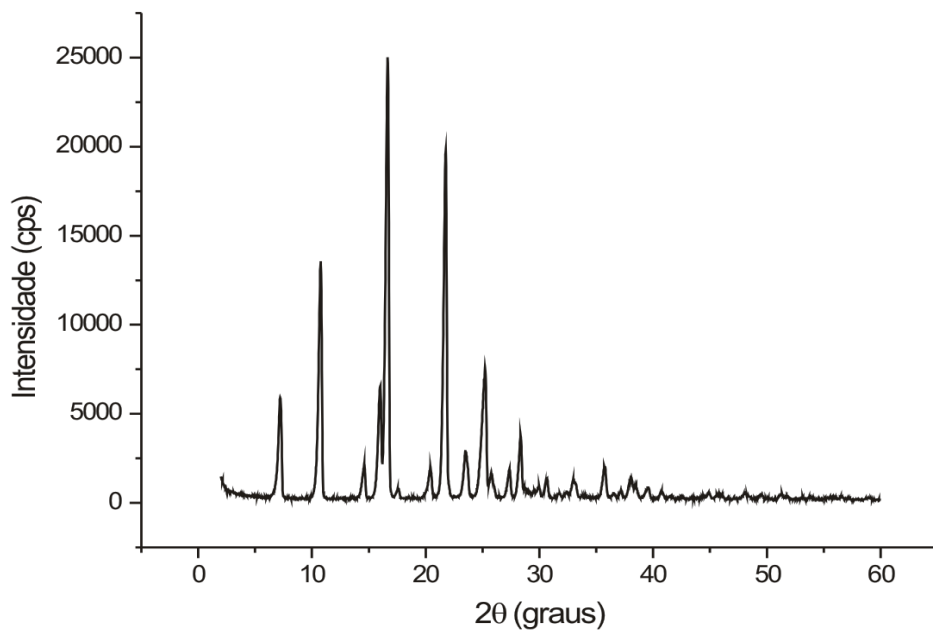


Figura 16. Resultados da difração de raios X do BNZ.

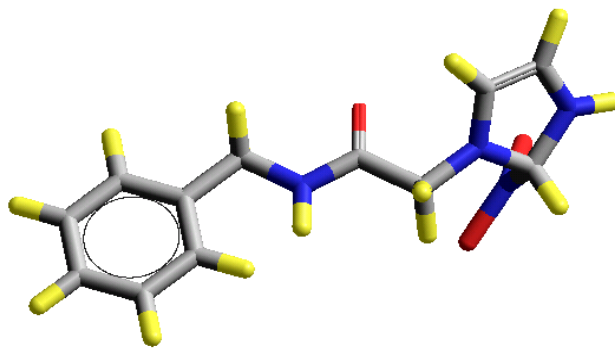


Figura 17. Estrutura molecular tridimensional do BNZ.

5.1.10 Estudo de Solubilidade do BNZ

O conhecimento das propriedades físicas e químicas dos fármacos, que determinem sua pureza e características intrínsecas, principalmente para fármacos de baixa solubilidade e alta

toxicidade como o BNZ são de extrema importância para o início de estudos farmacotécnicos a cerca deste fármaco. Por sua vez, a realização de um “screening” da solubilidade do BNZ frente a diversos solventes e reagentes foi de extrema importância para dar início aos estudos de estabilidade e o desenvolvimento do método analítico indicativo de estabilidade.

Os resultados obtidos corroboraram com a literatura e as especificações descritas na farmacopéia brasileira, evidenciando um fármaco pouco solúvel em água e solventes polares (BRASIL, 2003a).

Tabela 2. Resultados do estudo de solubilidade para o BNZ.

<i>Solvente</i>	<i>Resultados</i>
Clorofórmio	Muito pouco solúvel
Dimetilsulfóxido	Muito solúvel
Hexano	Solúvel
Metanol	Ligeiramente solúvel
Acetona	Pouco solúvel
Isopropanol	Muito pouco solúvel
Glicerina	Muito pouco solúvel
Éter	Praticamente insolúvel
Etanol	Ligeiramente solúvel
N,N-dimetilformamida	Facilmente solúvel
Acetato de etila	Ligeiramente solúvel
Diclorometano	Ligeiramente solúvel
NaOH 0,1M pH 13,1	Muito pouco solúvel
HCl 0,1M pH 0,56	Muito pouco solúvel
Água ultra pura	Muito pouco solúvel

5.2 Desenvolvimento e Validação do Método Indicativo de Estabilidade

5.2.1 Desenvolvimento do Método

O desenvolvimento do método foi inicialmente testado a partir das soluções fotodegradadas de BNZ em lâmpada UV. Já que, de acordo com a literatura, a fotólise consiste na reação mais destrutiva às moléculas no que diz respeito a número de produtos de degradação, pela capacidade da irradiação em excitar elétrons reativos, desencadeando reações mediadas por radicais livres, em sua maioria.

Após algumas tentativas, 2 métodos analíticos foram escolhidos, o primeiro utilizando um gradiente de solventes acetonitrila:água (0-100%) com 100 min de tempo de corrida, e o segundo, um método isocrático tampão fosfato:acetonitrila (80:20) pH 2,7 com 60 min de tempo de corrida; obtendo assim, os resultados descritos na tabela 3.

Tabela 3. Cinética degradativa do benznidazol quantificado pelo diferentes métodos.

<i>Amostra</i>	<i>Tempo</i>	<i>M. Gradiente</i>	<i>M. Isocrático</i>
Matéria prima BNZ	0	100,00	100,00
Solução fotodegradada 1h	1	66,79	64,86
Solução fotodegradada 2h	2	41,69	36,65
Solução fotodegradada 3h	3	22,99	16,36
Solução fotodegradada 4h	4	8,25	1,21
Solução fotodegradada 5h	5	8,10	0,60
Solução fotodegradada 6h	6	7,96	0,63

Diante dos resultados acima, foi verificado que a mesma amostra fotodegradada, apresentou diferentes resultados quanto a concentração residual de BNZ, pois quando eluidas amostras irradiadas por 5h no método gradiente quantificou-se em torno de 8% residual de BNZ, em contrapartida no método isocrático, a mesma amostra, foi analisada com apenas 0,6% de fármaco residual. Sendo o método isocrático mais seletivo, quantificando o BNZ apenas, e não outros possíveis interferentes.

5.2.2 Validação do Método Indicativo de Estabilidade

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

Os parâmetros cromatográficos para o método em validação devem ser checados para confirmar que o sistema está trabalhando corretamente durante as análises (HADAD, 2008), os parâmetros avaliados para as SQR's estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros cromatográficos do padrão misto do BNZ e suas SQR's.

Substância	2-AIS	2-NIZ	BNZ	NBCA
Tempo de Retenção	2,473	3,767	20,853	24,427
Tempo de Retenção Relativo	0,118	0,18	1,00	1,17
Nº de pratos teóricos	1910	4230	5593	5581
Resolução	0,0	5,648	25,370	2,949
Assimetria	1,139	1,321	1,429	1,453
Fator de capacidade	0,066	0,624	7,988	9,528

Tendo em vista os resultados apresentados na tabela 4 e as especificações da USP 33 (2010), o padrão misto considerado no estudo de validação foi composto pelas SQR 2-nitroimidazol, benznidazol e N-benzilcloroacetamida, visto que o 2-aminoimidazol apresentou resultados baixo para o fator de capacidade, provavelmente, devido este apresentar tempo de retenção (T_R), próximo ao volume morto da coluna que foi de $TV_o = 2,32$ minutos. No entanto, foi possível calcular o seu tempo de retenção relativo (TRR) em relação ao benznidazol e também realizar sua análise espectral, relevante para a pesquisa de produtos de degradação, um dos objetivos deste estudo.

5.2.2.1 Robustez

Após verificação dos parâmetros cromatográficos, foram testadas variações para a temperatura do forno, visto que o método preconiza a programação deste a 40°C, sendo portanto avaliada a variação de $\pm 1^\circ\text{C}$. Os resultados de todos os parâmetros da robustez estão apresentados na tabela 5, os quais foram tratados estatisticamente por Análise de Variância One Way (ANOVA).

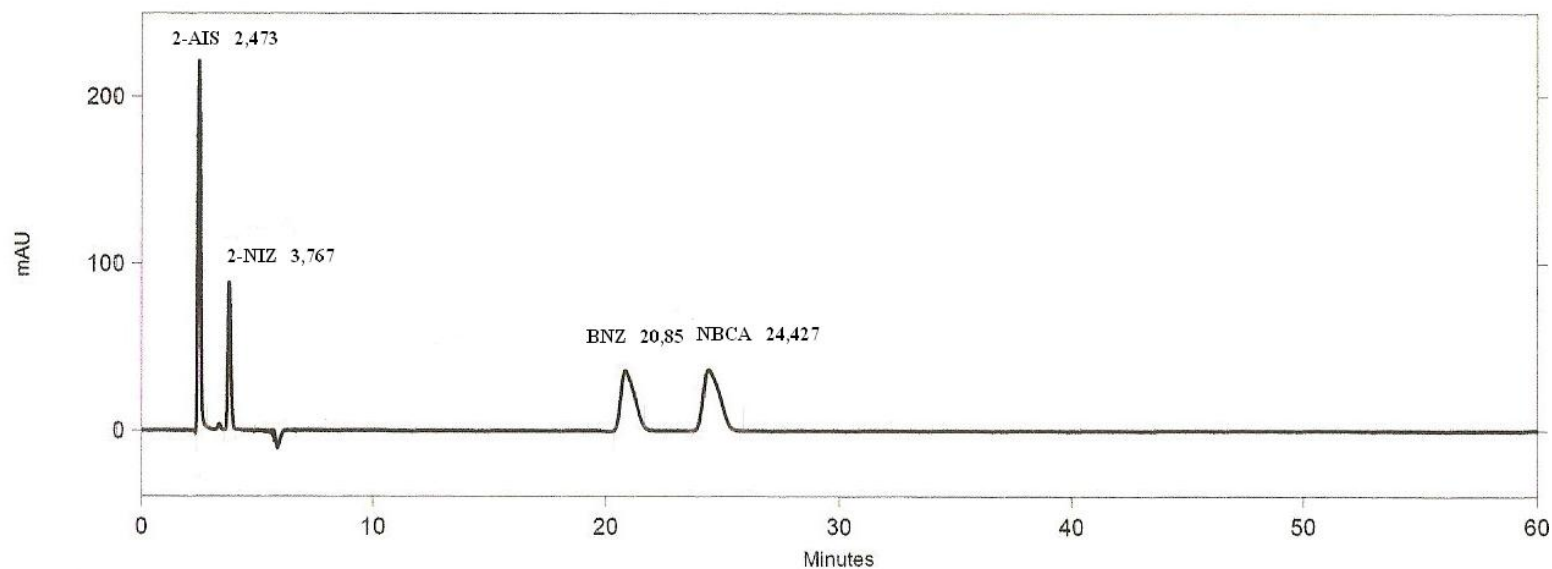


Figura 18. Cromatograma do padrão misto de SQR, na concentração de 12 µg/mL.

Tabela 5. Resultados da robustez do método.

Amostras	Temperatura			Fabricante		Fluxo (mL/min)		
	39°C	40°C	41°C	Synth®	CarloErba®	0,99	1,00	1,01
1	12,32	12,31	12,34	12,31	13,06	12,32	12,31	12,40
2	12,45	12,34	12,35	12,34	12,09	12,31	12,34	12,44
3	12,04	12,01	12,02	12,01	12,16	11,98	12,01	12,07
4	12,81	12,79	12,93	12,79	12,04	12,69	12,79	12,83
5	11,96	11,90	11,85	11,90	12,12	11,84	11,90	11,99
6	11,85	11,79	11,80	11,79	12,25	11,81	11,79	11,87
Média	12,24	12,19	12,22	12,19	12,29	12,16	12,19	12,26
CV (%)	2,94	3,00	3,45	3,00	3,14	2,82	3,00	2,92

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

Outra variação proposta foi a avaliação diferentes fabricantes do sal fosfato utilizado na preparação da fase móvel do método. Os resultados foram tratados por teste “t Student”.

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

O fluxo de deslocamento da fase móvel também foi avaliado, considerando uma variação dentro do aceitável durante a qualificação do equipamento. A variação proposta foi de $\pm 0,01$ mL/min. O tratamento estatístico demonstrou, com 95% de confiança, que o F calculado 0,143 foi menor que o F tabelado de 3,682, o que possibilitou a conclusão que este foi robusto também para variação de fluxo proposta.

Por fim, a estabilidade das amostras com $n=4$ foi verificada, em 24 horas. O tratamento estatístico utilizado foi o teste “t Student”. O resultado apresentou que o t calculado foi 1,080 e o t tabelado foi 2,446, com 95% de confiança, presumindo variâncias equivalentes.

5.2.2.2 Linearidade e Intervalo

A linearidade da resposta do detector do HPLC foi avaliada analisando 06 diferentes concentrações (4; 8; 12; 16; 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$) para o fármaco e cada SQR (2-nitroimidazol e N-benzilcloroacetamida), quantificadas na forma de padrão misto. Segue tabela 6, resumindo os resultados obtidos.

Tabela 6. Resultados da linearidade do método indicativo de estabilidade do BNZ.

<i>Substância</i>	<i>Equação da reta</i>	<i>R²</i>
2-NIZ	$y = 253540,2 (\pm 8985,9) + 29518,3 (\pm 182689,3)$	0,9955
BNZ	$y = 462405,4 (\pm 15383,0) + 221556,3 (\pm 312746,3)$	0,9961

NBCA	$y = 576944,0 (\pm 11836,79) + 187507,4 (\pm 240649,1)$	0,9985
------	---	--------

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

5.2.2.3 Estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Foram calculados os limites de detecção para o BNZ e suas substâncias relacionadas, descritos na tabela 7.

Tabela 7. Limite de detecção e quantificação das substâncias.

<i>Substâncias</i>	<i>Limite de Detecção (µg/mL)</i>	<i>Limite de Quantificação (µg/mL)</i>
2-NIZ	0,2613	0,8071
BNZ	0,03537	0,1179
NBCA	0,2058	0,6860

5.2.2.4 Precisão

A determinação da precisão do método foi realizada a partir da avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Na tabela 8, seguem os resultados da repetitividade e da precisão intermediária.

Tabela 8. Resultados da precisão do método.

<i>Amostras</i>	<i>Repetitividade</i> Analista 1	<i>Precisão Intermediária</i>			
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
		Analista 1	Analista 1	Analista 2	Analista 2
1	12,13	10,74	11,70	12,31	12,13
2	12,26	11,58	11,45	12,34	12,26
3	11,83	11,68	11,19	12,01	11,83
4	12,27	11,76	11,86	12,79	12,27

5	12,44	11,58	11,51	11,90	12,44
6	12,04	11,55	11,72	11,79	12,04
Média	12,16	11,48	11,57	12,19	12,16
CV (%)	1,74	3,24	2,06	3,00	1,74

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

5.2.2.5 Exatidão

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

Tabela 9. Resultados da exatidão do método.

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

A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Diante dos resultados apresentados, o método foi considerado exato (Tabela 9).

5.2.2.6 Especificidade

Nos testes de degradação forçada, os cromatogramas obtidos das soluções de BNZ, submetidas a diferentes condições de estresse, foram comparados aos cromatogramas das mesmas soluções não submetidas à degradação e preparadas no momento do teste. O pico de retenção da SQR BNZ foi identificado pelo tempo de retenção e espectro obtido pelo DAD, este mesmo procedimento foi seguido para avaliar na curva controle as SQR do 2-nitroimidazol e N-benzilcloroacetamida. Assim, o método demonstrou-se específico.

5.2.2.7 Seletividade

Foi verificada com a determinação da pureza dos picos individuais do BNZ e SQR's: S2-AT, 2-NIZ e NBCA. As condições para determinação da pureza, foi utilizado o detector de arranjo diodos (DAD), num intervalo de 200 nm a 400 nm. A pureza do pico referentes ao BNZ e suas SQR's foi de 0,99 segundo o software LC Solution 1.0. Os resultados obtidos foram com compensação da linha de base, com cálculo do espectro de pureza total sendo realizado a partir da média de 03 pontos (em anexo representação gráfica da pureza dos picos com suas respectivas análises espectrais).

5.3 Estudo da Degradação do Benznidazol

Alguns estudos de degradação foram, inicialmente, utilizados para o desenvolvimento do método analítico, porém todos os dados descritos como resultados do estudo de degradação que segue, foram obtidos após desenvolvimento e validação do método analítico indicativo de estabilidade.

5.3.1 Hidrólise

Os estudos hidrolíticos do BNZ foram realizados sem o aquecimento das amostras estressadas, para avaliação das condições de degradação isoladas, sem a presença de nenhum agente catalisador.

5.3.1.1 Hidrólise Ácida

As amostras de BNZ foram inicialmente, submetidas à hidrólise ácida HCl 0,1M por tempo total de 30 dias, não ocorrendo degradação as soluções aquosas de BNZ foram submetidas à condições mais extremas, conforme demonstrado no fluxograma do item 4.5.1.

O BNZ demonstrou-se estável frente à hidrólise ácida, segundo planejamento realizado, pois ao final de 30 dias de análise com a condição ácida mais agressiva (HCl 1M) não houve decaimento estatisticamente significativo do BNZ nas amostras. Apesar de teóricamente tal degradação ser passível de ocorrer, figura 19, segundo mecanismo clássico de hidrólise de amidas quando submetidas à condições ácidas, porém, ocorrem mais lentamente que hidrólises de grupamentos ésteres, necessitando assim de condições forçadas de aquecimento e /ou ácido ou base forte (SOLOMOS, 2009).

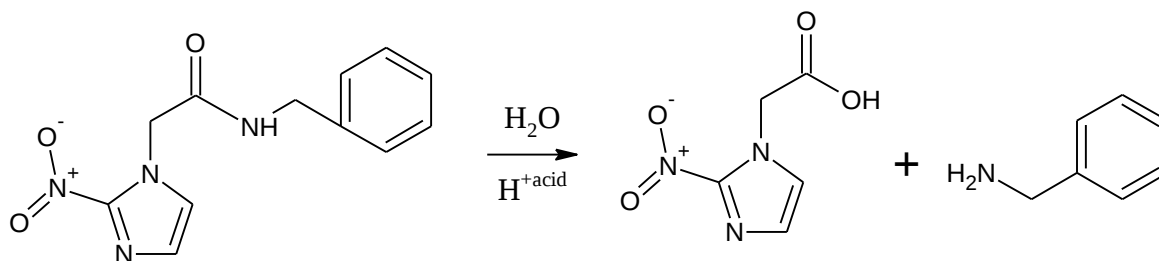


Figura 19. Proposição da rota degradativa do BNZ por hidrólise ácida.

Sendo o BNZ estável ao estresse hidrolítico de 1M de HCl por até 30 dias, conforme ilustrado na figura 20 que representa o cromatograma do BNZ após ser exposto a tal condição, sem detecção de nenhum produto de degradação relevante e com decaimento de apenas 0,2%.

5.3.1.2 Hidrólise Básica

Em contrapartida, os resultados obtidos na hidrólise alcalina do BNZ demonstraram que a mesma ocorre “instantaneamente”, com substancial degradação, quando submetida a hidrólise com hidróxido de sódio 1M. Avaliando amostras coletadas nos tempos 0 e de 24h, foi possível a observação de dois produtos de degradação significativos, conforme demonstrado no cromatograma ilustrado na figura 21.

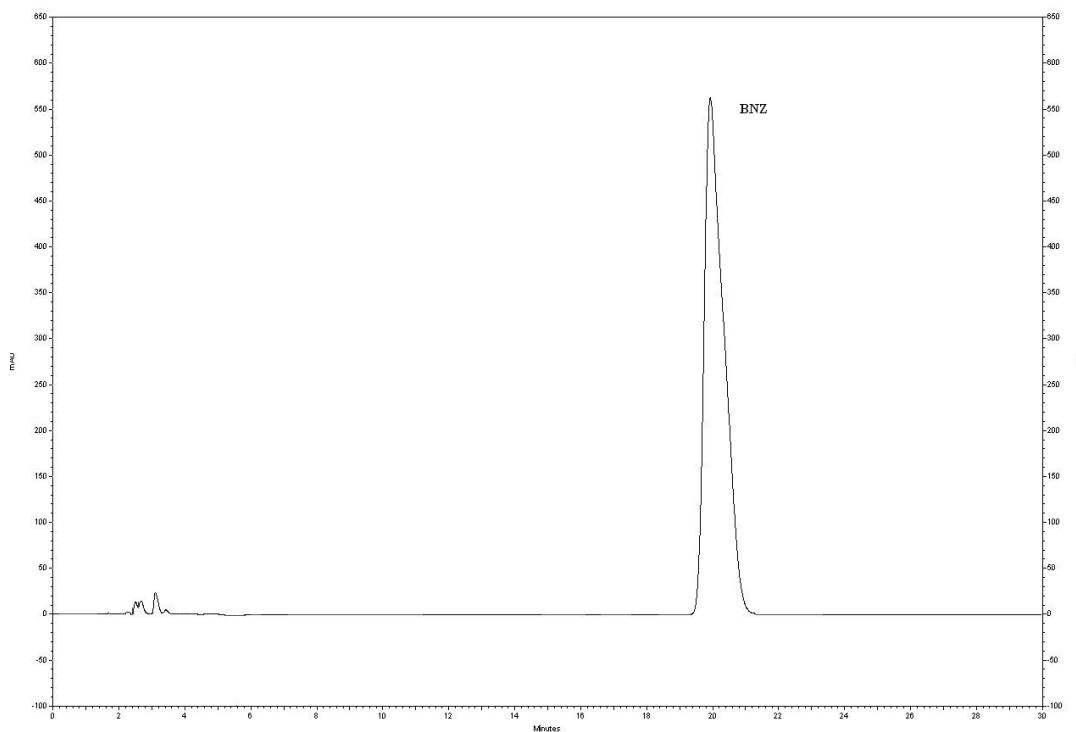


Figura 20. Cromatograma da amostra de BNZ submetida a 1M de HCl por 30 dias.

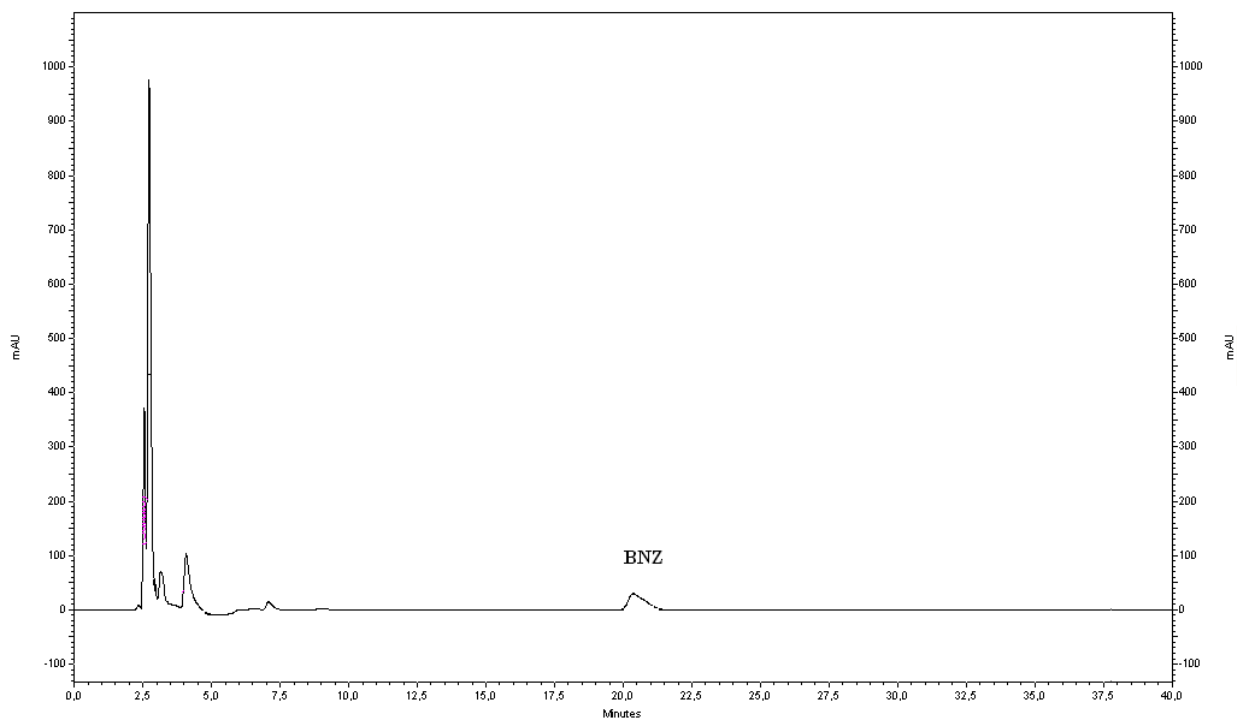


Figura 21. Cromatograma da amostra de BNZ submetida a 1M de NaOH por 24h.

Para verificação, que tais produtos de degradação eram originários do BNZ e não de seus produtos de degradação iniciais, o BNZ foi submetido a condições hidrolíticas mais amenas, utilizando hidróxido de sódio 0,1M. A análise das amostras submetidas a tal condição nos permitiu determinar quantos produtos de degradação são obtidos pela hidrólise básica do fármaco, bem como o decaimento do fármaco quando submetido a tais condições conforme a figura 22.

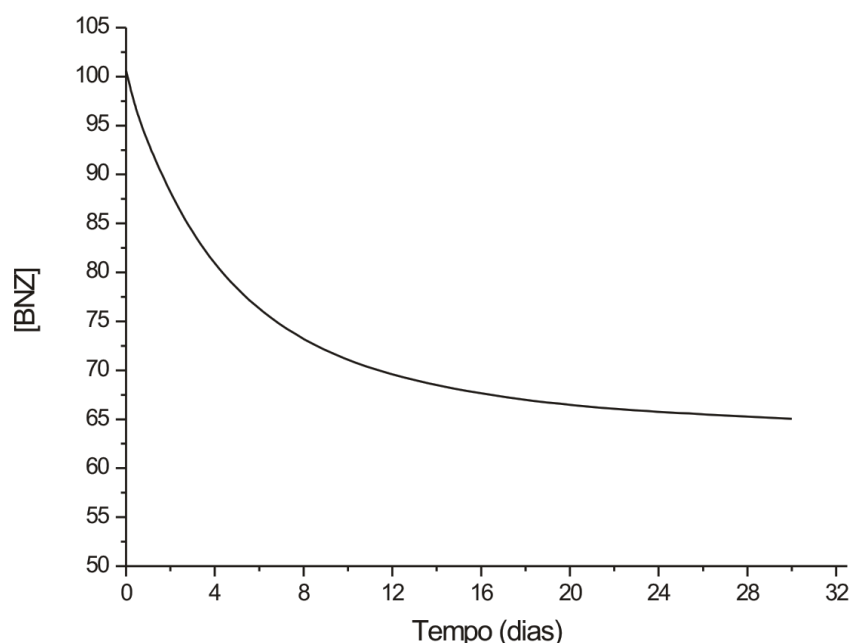


Figura 22. Decaimento das amostras de BNZ submetidas à hidrólise básica (NaOH 0,1M) por 30 dias.

As amostras submetidas à hidrólise básica com NaOH 0,1M evidenciaram o aparecimento de 3 produtos de degradação majoritários, com tempos de retenção bem próximos: produto da degradação hidrolítica (PDH) – 1, com $T_R = 2,72$, PDH – 2 com $T_R = 3,14$ e PDH – 3 com $T_R = 4,02$, como é possível observar no cromatograma da amostra hidrolisada por 30 dias.

A partir deste resultado, foi possível prever uma rota degradativa possível para hidrólise básica do BNZ, já que as amidas sofrem hidrólises quando submetidas a soluções básicas, e como o BNZ possui como grupamento central, uma amida N-substituída, que provavelmente

reagiu segundo o mecanismo descrito na figura 24, produzindo 2 produtos de degradação majoritariamente, que podem ser os mesmos observados no cromatograma das amostras hidrolisadas.

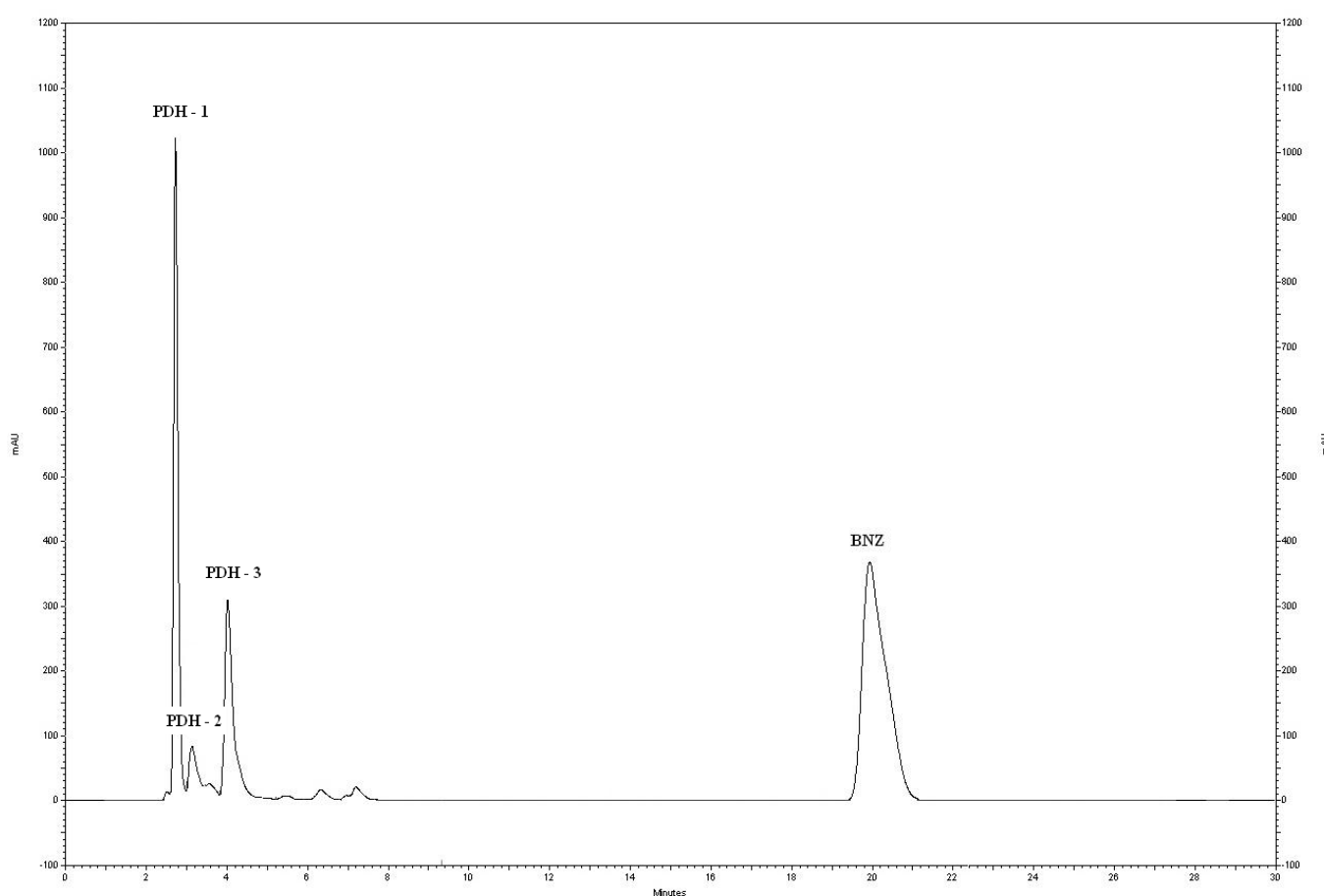


Figura 23. Cromatograma da amostra de BNZ submetida a 0,1M de NaOH por 30 dias.

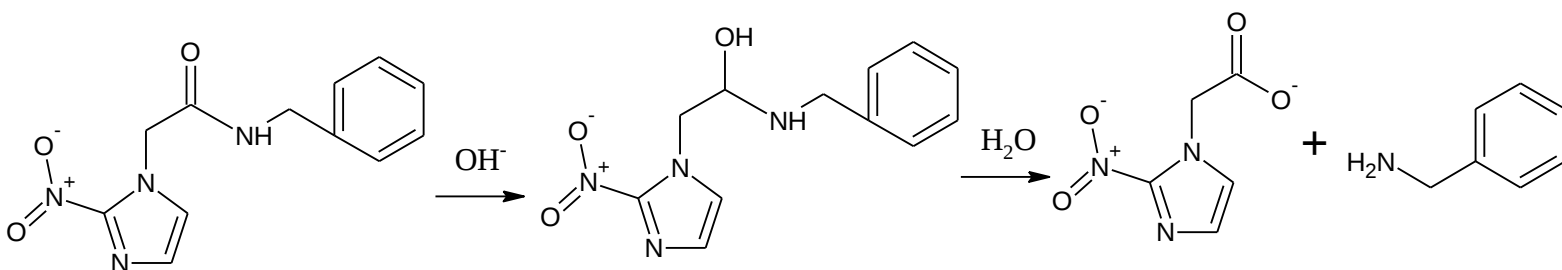


Figura 24. Proposição da rota degradativa do BNZ por hidrólise básica.

Descrição quantitativa da hidrólise do BNZ em pH básico

Os parâmetros cinéticos obtidos demonstraram que a decomposição hidrolítica do BNZ em condições básicas, segue uma reação de segunda ordem, calculados de acordo com a seguinte equação: $\ln C = \ln C_0 - k.t$ (cinética de segunda ordem), onde C_0 é a concentração inicial, C a concentração remanescente, k a constante de velocidade (s^{-1}) e t é o tempo (s), conforme demonstrado na figura 24.

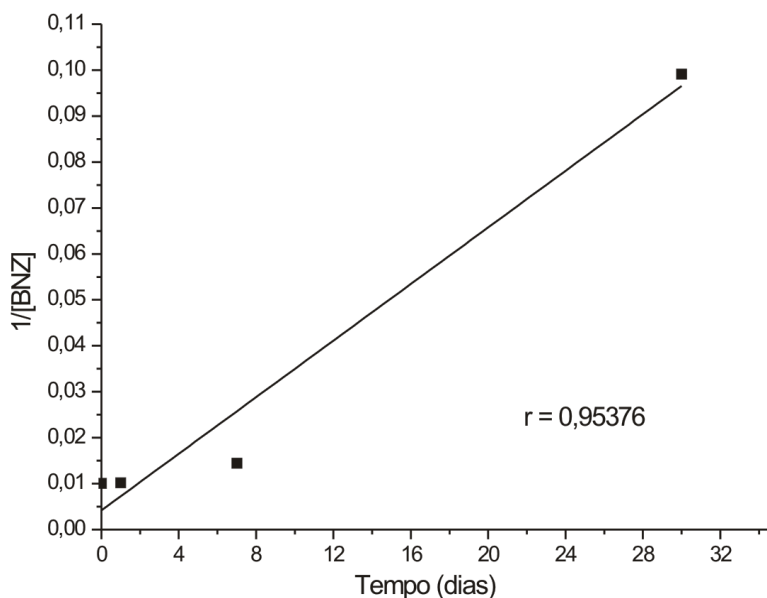


Figura 25. Hidrólise Básica do BNZ: Reação de segunda ordem.

Evidenciando que a hidrólise básica do BNZ depende da concentração dos dois reagentes: o BNZ e o hidróxido de sódio ou de um dos reagentes ao quadrado, necessitando de um planejamento fatorial com os reagentes para tal determinação.

A constante de velocidade da reação foi igual à inclinação da reta obtida, tomada com o sinal oposto. Sua análise revelou que, nestas condições experimentais o valor da taxa constante de decomposição hidrolítica do BNZ em pH básico (NaOH 0,1M) foi $k = 3,08 \times 10^{-3} \pm 3,88 \times 10^{-4} \text{ dias}^{-1}$.

5.3.1.3 Hidrólise Neutra

As amostras submetidas à hidrólise neutra não apresentaram degradação após o período máximo de análise em 30 dias (25°C), evidenciando a estabilidade do BNZ em solução aquosa. Sugere-se com este resultado, a realização de novos estudos com o fornecimento de calor para as amostras a fim de atingir a energia de ativação necessária para hidrólise do BNZ, já que em condições mais amenas a reação não ocorreu.

5.3.2 Oxidação

O BNZ, de acordo com sua estrutura química, seria muito susceptível a oxidação, por mecanismo geral de oxidação de amidas (figura 26).

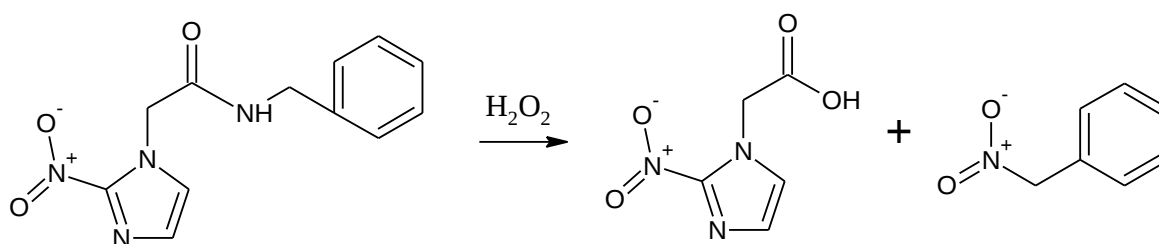


Figura 26. Proposição da rota degradativa do BNZ por oxidação.

Porém o BNZ demonstrou-se relativamente resistente a degradação oxidativa (3% H_2O_2) apresentando decaimento considerável apenas em 7 dias de degradação (Figura 27), sendo esta amostra utilizada para o desenvolvimento de método analítico.

A análise dos cromatogramas das amostras de BNZ oxidadas por 30 dias permitiu a detecção de 1 produto da degradação oxidativa (PDO - 1) aparentemente similar ao PDH - 1, com tempo de retenção de 2,353 min, conforme ilustrado na figura 25, alguns outros produtos de degradação com concentração muito baixa. Nos cromatogramas das amostras de BNZ oxidadas há o aparecimento de um pico muito intenso correspondente ao peróxido de hidrogênio, agente oxidante do estudo.

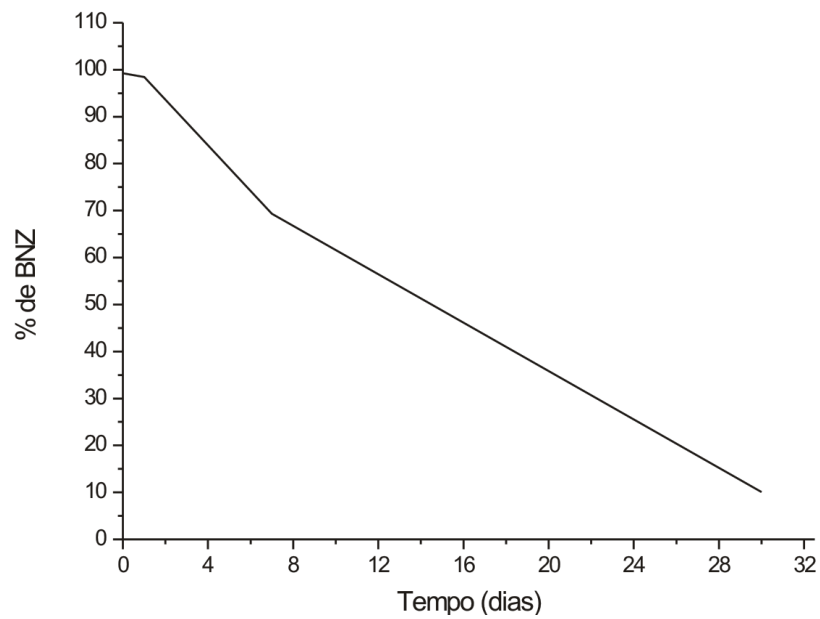


Figura 27. Decaimento das amostras de BNZ oxidadas por 30 dias.

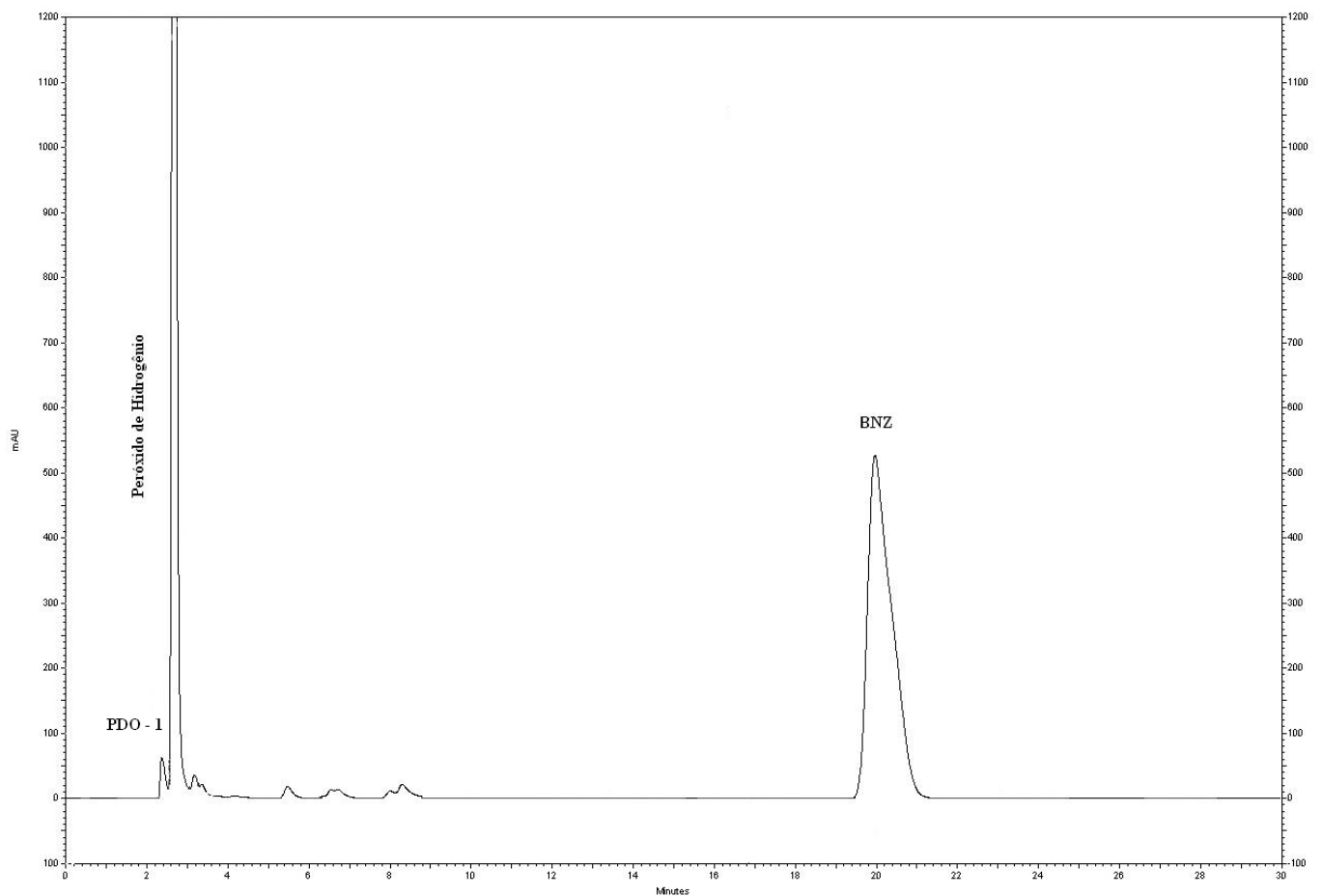


Figura 28. Cromatograma da amostra de BNZ oxidada por 30 dias.

5.3.2.1 Descrição quantitativa do processo oxidativo

Os parâmetros cinéticos obtidos demonstraram que a decomposição oxidativa do BNZ, segue uma reação de primeira ordem, calculados de acordo com a seguinte equação: $1/C = 1/C_0 + k.t$ (cinética de primeira ordem), onde C_0 é a concentração inicial, C a concentração remanescente, k a constante de velocidade (s^{-1}) e t o tempo (s), conforme demonstrado na figura 28. Evidenciando que a oxidação do BNZ depende da concentração de um dos reagentes: o BNZ ou o peróxido de hidrogênio, necessitando de um planejamento fatorial com os reagentes para determinação do reagente crítico.

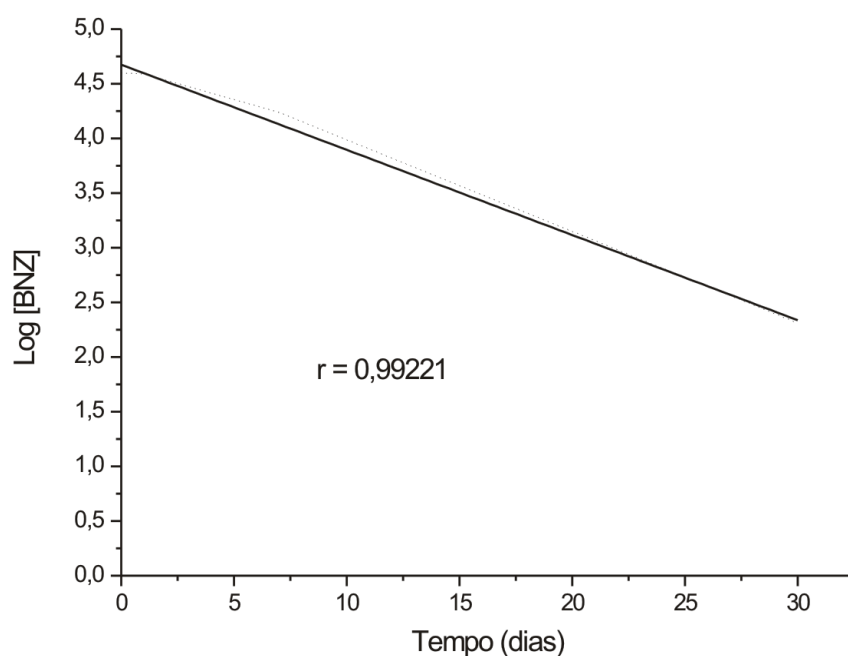


Figura 28. Oxidação do BNZ: Reação de primeira ordem.

A constante de velocidade da reação foi igual à inclinação da reta obtida, tomada com o sinal oposto. Sua análise revelou que, nestas condições experimentais o valor da taxa constante de decomposição oxidativa do BNZ em solução de peróxido de hidrogênio 3% foi $k = 7,792 \times 10^{-2} \pm 3,98 \times 10^{-3}$ dias⁻¹.

5.3.3 Fotodegradação

5.3.3.1 Quantificação da Iluminância e Irradiância da Câmara de Fotoestabilidade

Com a utilização de um luxímetro obteve-se o perfil de lux emitidos por hora (Figura 30, equação da reta $y = 2875.x - 1,164 \times 10^{-10}$), estabelecendo portanto para nossa análise que o tempo total de exposição segundo recomendação do ICH/ANVISA para 1.200.000 lux corresponde a 41h de exposição.

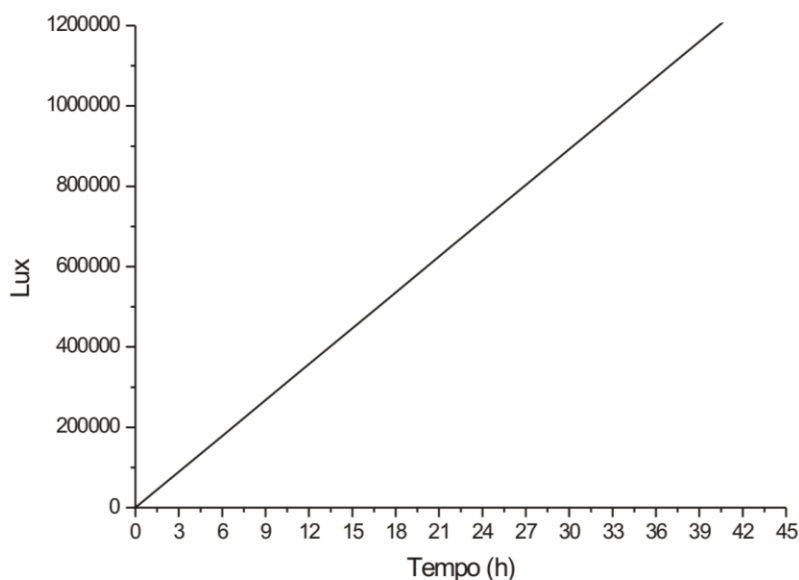


Figura 30. Perfil da Iluminância de acordo com o tempo de exposição.

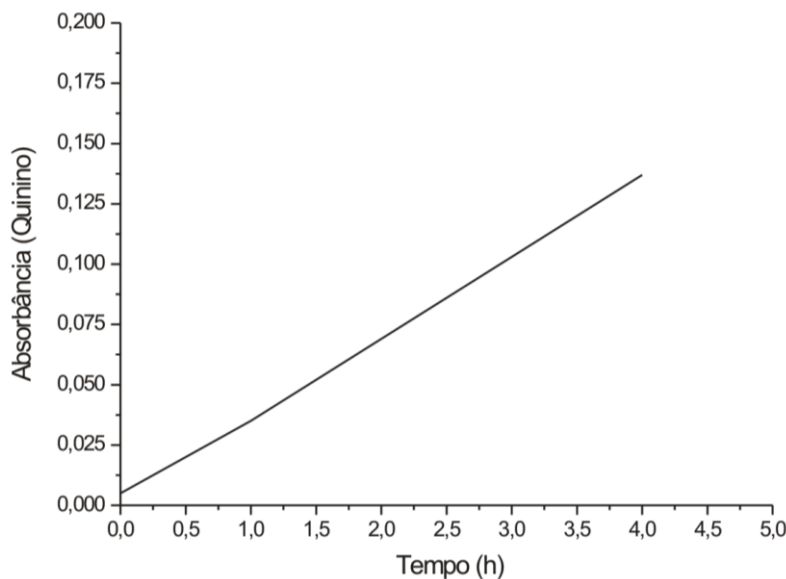


Figura 31. Absorbância de fotoprodutos de quinino por hora.

Para determinação da irradiância, foi utilizado a avaliação da fotoestabilidade do quinino, em que preconiza-se para irradiância de 200 W.h/m^2 corresponda-se uma absorbância relativa aos fotoprodutos do quinino em 0,5A. A avaliação da média da diferença de absorbância das amostras de quinino expostas a irradiação resultaram no perfil observado na figura 31 (equação da reta $y = 0,0331x + 0,0032$), permitindo o cálculo do tempo mínimo de exposição de acordo com o ICH/ANVISA de 15 horas de exposição.

5.3.3.2 Estudo de Fotodegradação em solução aquosa

O processo de fotodegradação foi acompanhado inicialmente pela análise dos espectros de UV-vis gravados após a irradiação do BNZ com doses crescentes de irradiação. Após 5h de irradiação as amostras apresentavam uma mudança na coloração, de acordo com a figura 32.



Figura 32. Fotografias das soluções de BNZ após 5h de exposição (esquerda) e na ausência de irradiação (direita).

A análise espectral das amostras irradiadas possibilitou observar a degradação fotoquímica do BNZ (figura 33), porém como as leituras da absorbância das amostras era realizada sem nenhum preparo inicial das amostras, as absorções observadas poderiam ser correspondentes ao BNZ ou a uma soma de absorções relativa aos produtos de degradação obtidos durante o estresse fotolítico.

A escolha da análise do decaimento de BNZ no processo fotodegradativo por espectroscopia de UV, ocorreu devido a velocidade de reação, já que grande parte das reações fotolíticas ocorrem via radicais livres, e portanto evoluem rapidamente. Porém, visto a mudança de coloração nas soluções irradiadas, surgiu a suspeita da formação do composto 2-nitroimidazol,

precursor sintético do BNZ de coloração amarelo intenso, sendo portanto, as amostras analisadas novamente por CLAE, segundo método validado.

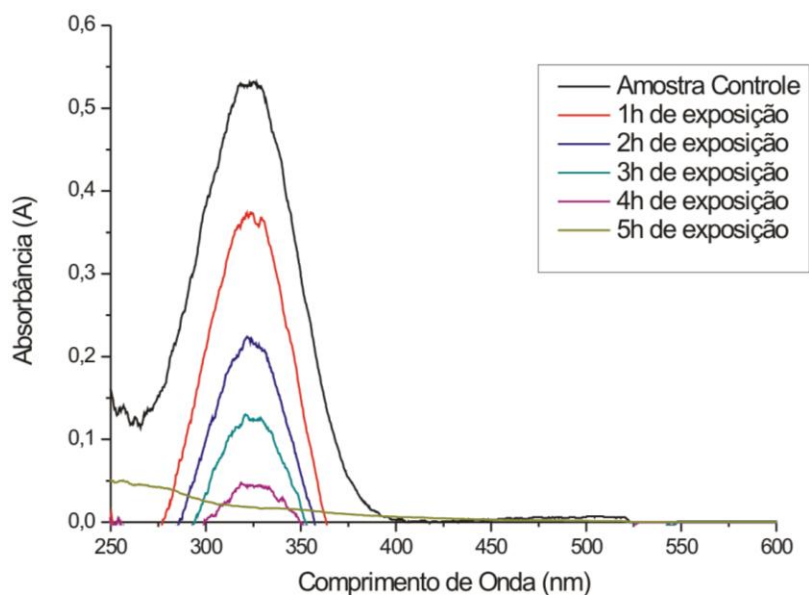


Figura 33. Espectros de absorção das amostras fotodegradadas de BNZ.

Portanto, as mudanças nas soluções e amostras sólidas foram monitoradas por CLAE em função do tempo de exposição, possibilitando a detecção e quantificação de 2 fotoprodutos relevantes, FP-1 ($T_r = 2,75$ min) e FP-2 ($T_r = 7,53$ min), sendo analisada a amostra com 1h de exposição a irradiação visto que a mesma apresentou um decaimento do fármaco em torno de 30% (figura 34).

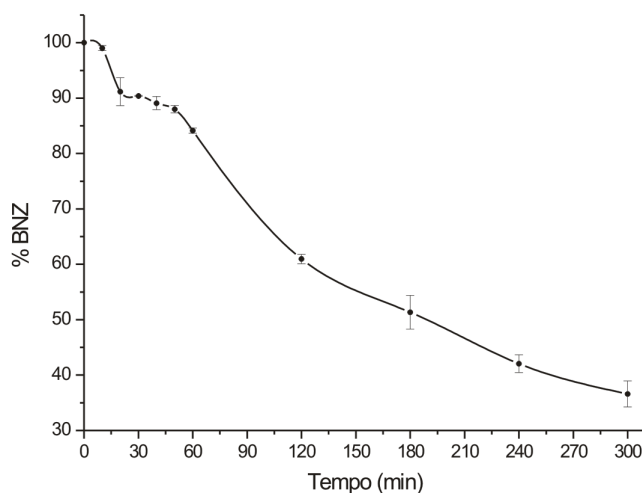


Figura 34. Decaimento do BNZ em função do tempo de exposição.

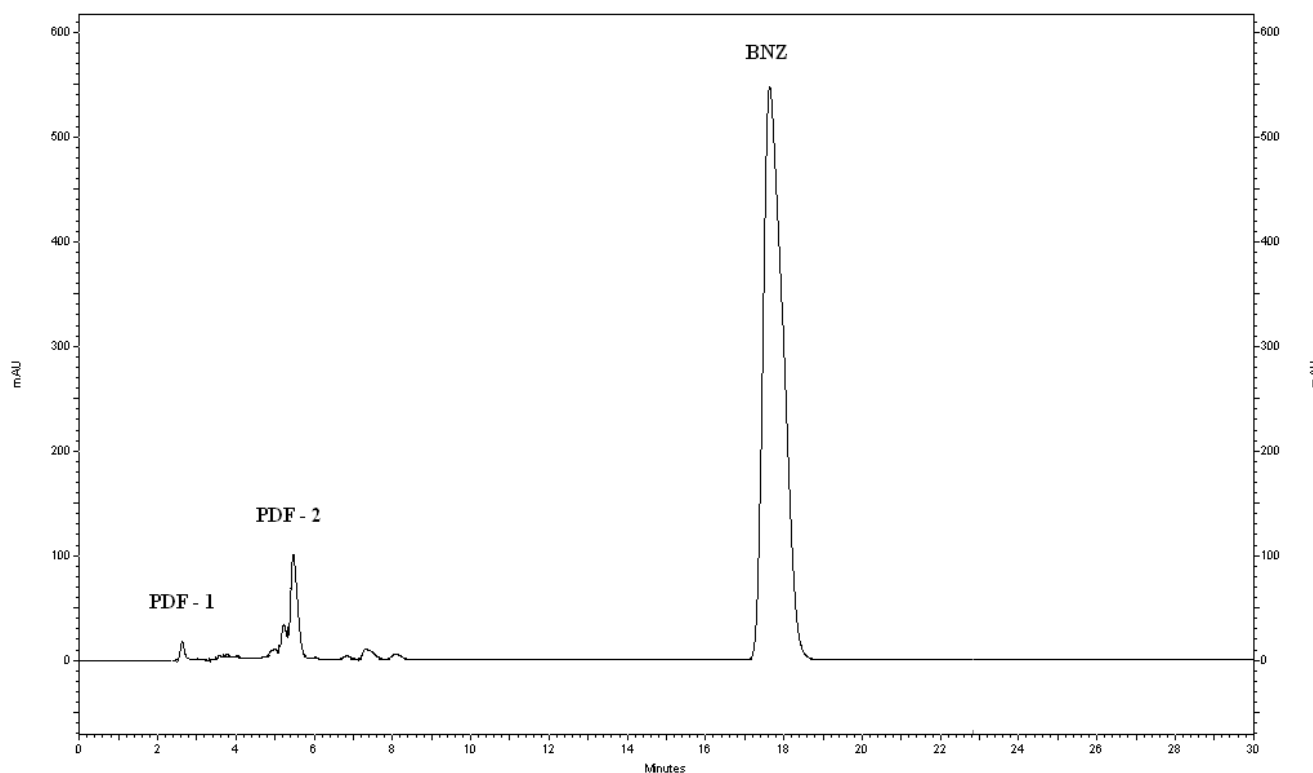


Figura 35. Cromatograma da solução aquosa de BNZ após 1h de exposição.

As soluções de BNZ fotodegradado foram avaliadas ainda por inserção direta no MS-IT-TOF, na intenção de elucidar as massas moleculares dos produtos de degradação do BNZ já que a fotodegradação produziu o principal produto de degradação do BNZ o PDF – 1, sendo tal produto pertencente as demais degradações visto que é semelhante ao PDH – 1, PDO – 1 e ao PDT – 1, como será demonstrado adiante.

As análises dos espectros de massas, segundo metodologia descrita para análise do fármaco puro, das amostras podem ser representadas pelo espectro da amostra degradada por 1h, já a análise cromatográfica por DAD foi realizada também com tal amostra, majoritariamente é possível a detecção de 2 fotoprodutos de degradação por CLAE, sendo esta afirmativa confirmada nos espectros das amostras em que se percebe um aumento de intensidade dos picos correspondentes as massas 183 e 199 g/mol, além da detecção de 2 outros picos consideráveis (1

– 138 g/mol e 2 – 155 g/mol) que também é percebida na análise por CLAE quando avaliado as amostras

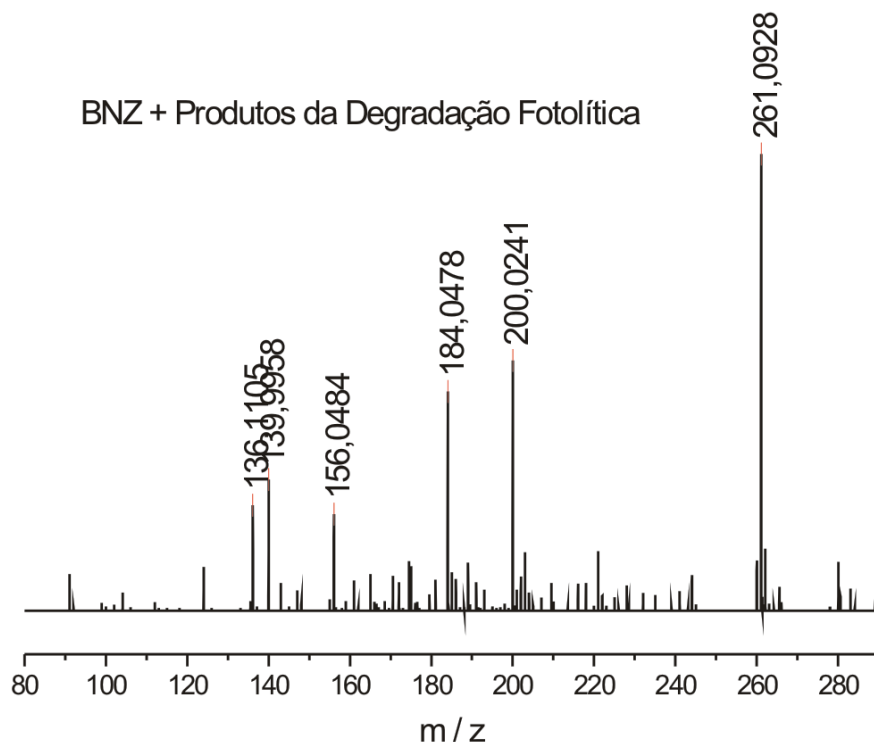


Figura 36. Espectro de massas da amostra de BNZ fotodegradada por 1h.

As reações fotolíticas são, com frequência, reações em cadeia, isto é produzem intermediários muito reativos que reagem para produzir outros intermediários reativos que, por sua vez, reagem sucessivamente, devido a formação de radicais livres a partir da energia liberada pelo retorno ao estado inicial de elétrons excitados para orbitais de maior energia, ao absorverem os fótons emitidos pela irradiação o qual estão sendo expostos.

A princípio, devido à coloração levemente amarelada das soluções irradiadas suspeitou-se que o principal fotoproduto do BNZ fosse seu precursor sintético, o composto 2-nitroimidazol, porém a análise cromatográfica de um padrão isolado deste composto, fornecido pela Nortec[®], evidenciou tempos de retenção “bem próximos” utilizando o mesmo método cromatográfico entre o sulfato de 2-aminoimidazol ($T_R = 2.473$), e o FP-1 ($T_R = 2.62$), sugerindo que o FP-1 possui estrutura química semelhante ao precursor sintético do BNZ.

A partir destas evidências cromatográficas (CLAE-DAD) e espectrais (MS), e dos dados teóricos, realizou-se uma revisão sistemática da literatura a cerca de mecanismos fotoquímicos de degradação de moléculas com grupos funcionais semelhantes ao BNZ.

Analisando estruturas orgânicas de fármacos, foi observado que grupamentos químicos que possuem ligações π e orbitais livres na camada de valência são mais resistentes a quebra fotolítica, devido ao fato que, quando os elétrons são excitados pelos fótons mudam apenas de orbitais, não absorvendo energia necessária para que sua dissipação resulte em quebra daquele grupamento (TØNNESSEN, 2004).

No caso de ligações duplas entre carbono e oxigênio, ambos os átomos (presentes no grupamento amida do BNZ) possuem orbitais livres na última camada que neste caso, também é a de valência: $C_6 \rightarrow 1s^2 2s^2 2p^2$ / $O_8 \rightarrow 1s^2 2s^2 2p^4$, portanto quando estes átomos estão ligados em dupla coordenação (em orbitais π), forma-se uma “barreira” eletrostática, que não permite uma excitação maior dos elétrons, não sendo capazes de absorver energia necessária para quebra homolítica das ligações (TØNNESSEN, 2004; WILKINS et al., 1987; PFOERTNER & DALY, 1987). Tal revisão evidenciou 3 pontos fotoinstáveis, de fácil excitação, na molécula do BNZ. Inicialmente analisamos que a amida central, ponto lábil das degradações hidrolíticas e oxidativas não seria lisada no caso da fotólise, a quebra ocorreria entre os átomos de carbono e carbono (ligação δ), resultando em uma amida e um derivado imidazol. De acordo com o esquema demonstrado na figura 37.

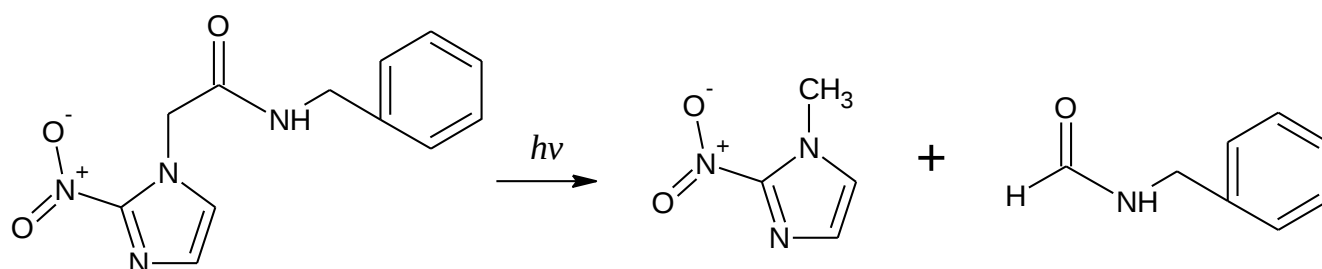


Figura 37. Possível rota degradativa do BNZ por fotólise (1).

Sendo, o segundo grupamento fotoinstável o grupo nitro ligado a anel imidazol, conforme já descrito para o fármaco metronidazol, a fotorreação provável é a redução do grupo nitro para

nitroso, com sua posterior eliminação do composto inicial, numa reação quase que instantânea (Figura 38).

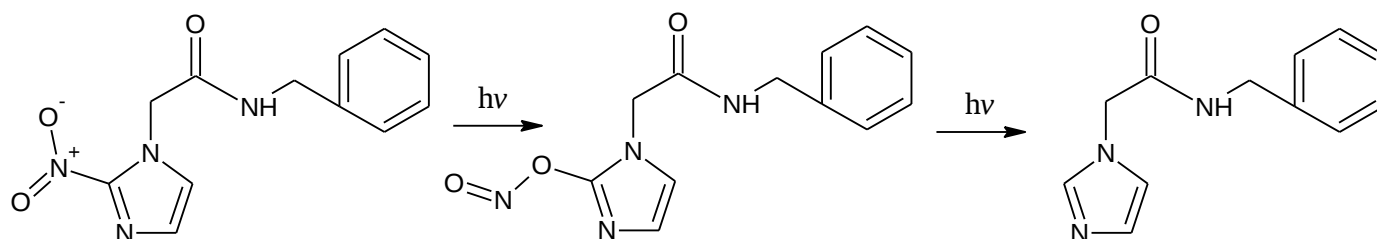


Figura 38. Possível rota degradativa do BNZ por fotólise (2).

Em meio aquoso, esta reação é descrita ainda com mais uma etapa em que ocorre a redução também da carbonila da amida sendo produzido os compostos descritos na figura 39, corroborando com os dados encontrado no espectro de massa em que evidencia um fotoproduto com massa molecular de 199 g/mol, que quando ionizado positivamente é encontrão como 200 m/z.

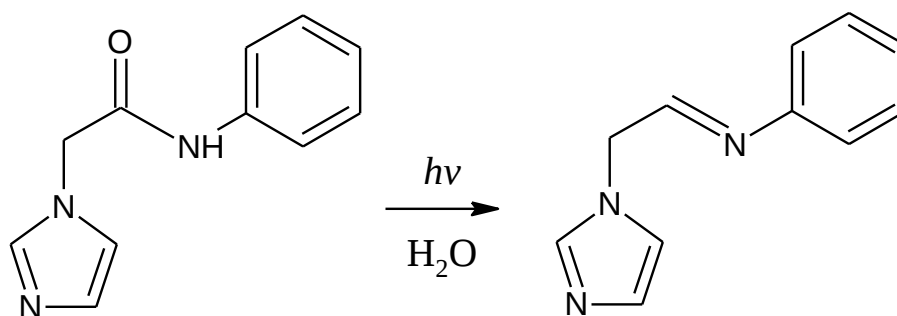


Figura 39. Possível rota degradativa do BNZ por fotólise (2) continuação.

E, corroborando com a espectrometria de massas a lise entre carbonos vicinais a anéis aromáticos também é relatada pela literatura, produzindo assim os compostos descritos na figura 40, em que o primeiro composto tem massa molecular 183 g/mol e quando ionizado positivamente 184 m/z e o segundo seria o anel benzeno.

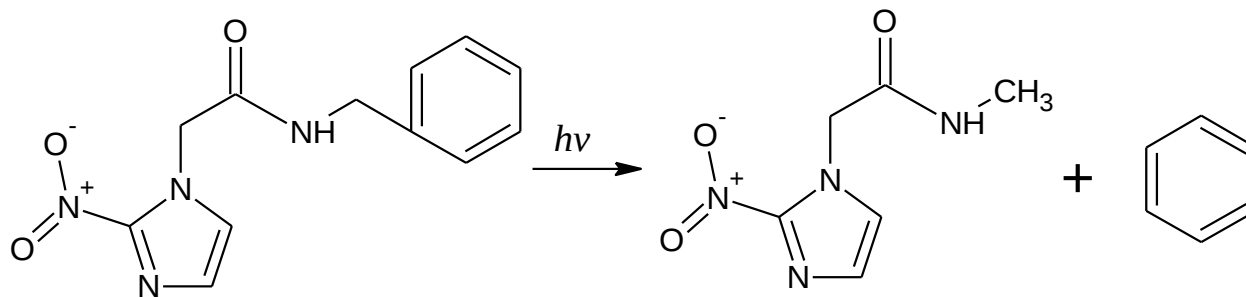


Figura 40. Possível rota degradativa do BNZ por fotólise (3).

Tal reação também pode ser obtida por hidrólise do BNZ, sendo possível que tais produtos de degradação sejam semelhantes aos da degradação hidrolítica básica.

Os demais compostos que são evidenciados no espectro de massa com relação massa carga de 136,11; 139,99 e 156,04 podem ser estruturados de acordo com a figura 41.

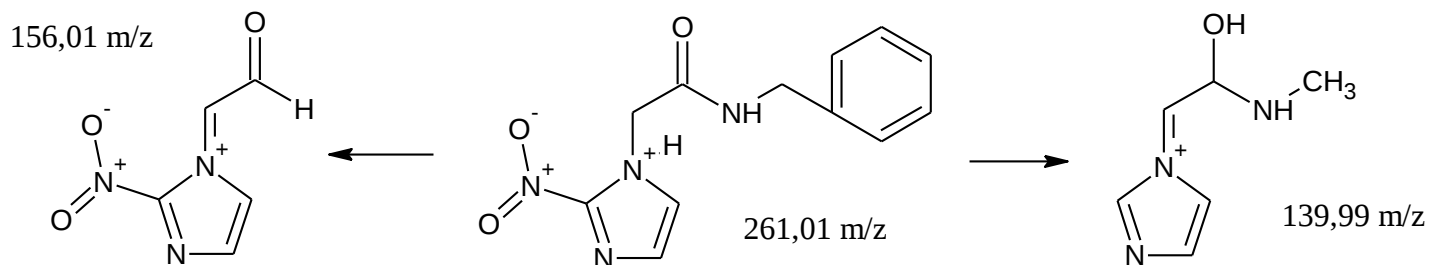


Figura 41. Prováveis produtos de degradação do BNZ obtidos por fotólise.

5.3.3.3 Estudo de Fotodegradação no estado sólido

No estado sólido, após exposição de 41h de iluminância/irradiação, foi observado a mudança de coloração do BNZ, para um pó amarelado (figura 42), evidenciando a degradação do fármaco. Os cromatogramas das amostras sólidas evidenciaram que o BNZ é fotossensível de acordo com o normatizado pelo ICH/ANVISA, já que após a iluminância/irradiação determinada pelos órgãos regulatórios o < 5%, apresentando decaimento de 15% quando avaliado por CLAE, produzindo produtos de degradação com tempo de retenção semelhantes a fotodegradação do

BNZ em solução, provavelmente devido ao fato das amostras serem expostas a fotodegradação sem controle da umidade.



Figura 42. Fotografias de amostras sólidas de BNZ na ausência de irradiação (esquerda) e após 41h de exposição (direita).

A micrografia eletrônica de varredura da amostra degradada não apresentou mudanças estruturais nos cristais de BNZ, conforme ilustrado na figura 43, sugerindo que a fotodegradação do BNZ no estado sólido além de superficial não modifica fisicamente a estrutura cristalina do fármaco.

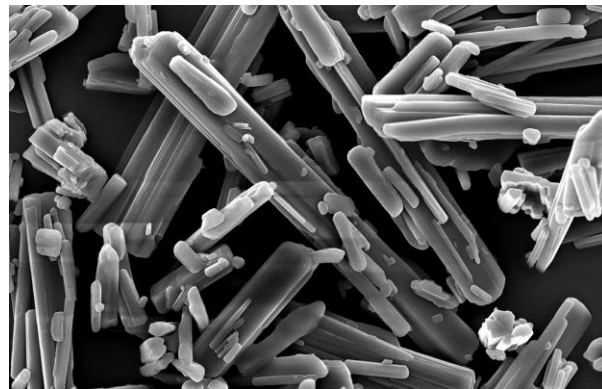
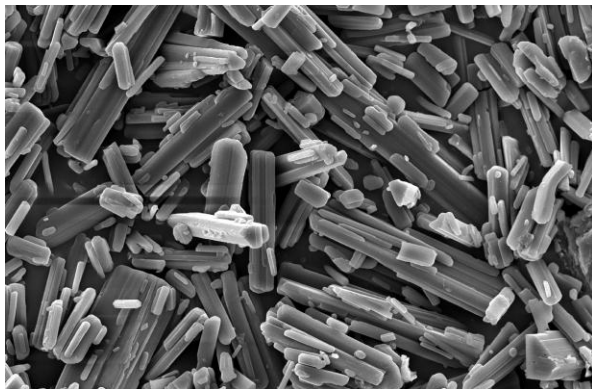


Figura 43. Micrografia eletrônica das amostras sólidas de BNZ na ausência de irradiação (esquerda) e após 41h de exposição (direita).

A análise dos espectros de infravermelho (figura 44) demonstraram que a amostra de BNZ fotodegradado em comparação a matéria prima padrão, não apresentou mudanças significativas

nas bandas caracterísitcas do BNZ, comprovando que a degradação do BNZ no estado sólido foi reduzida não sendo possível sua visualização sem o isolamento dos compostos.

5.3.3.4 Estudo de Fotodegradação do BNZ em formulações sólidas orais.

O estudo de fotoestabilidade em formulações foi importante para determinação que a fotodegradação do BNZ ocorre de forma direta, pois as análises dos cromatogramas dos comprimidos degradados não apresentaram fotoprodutos, nem velocidade de degradação do BNZ diferentes, quando avaliado a superfície do comprimido. Pois devido a não penetração da irradiação as formas farmacêuticas sólidas orais obtiveram decaimento inferior a matéria prima no estado sólido, em torno de 6,52% pela proteção física da forma farmacêutica.

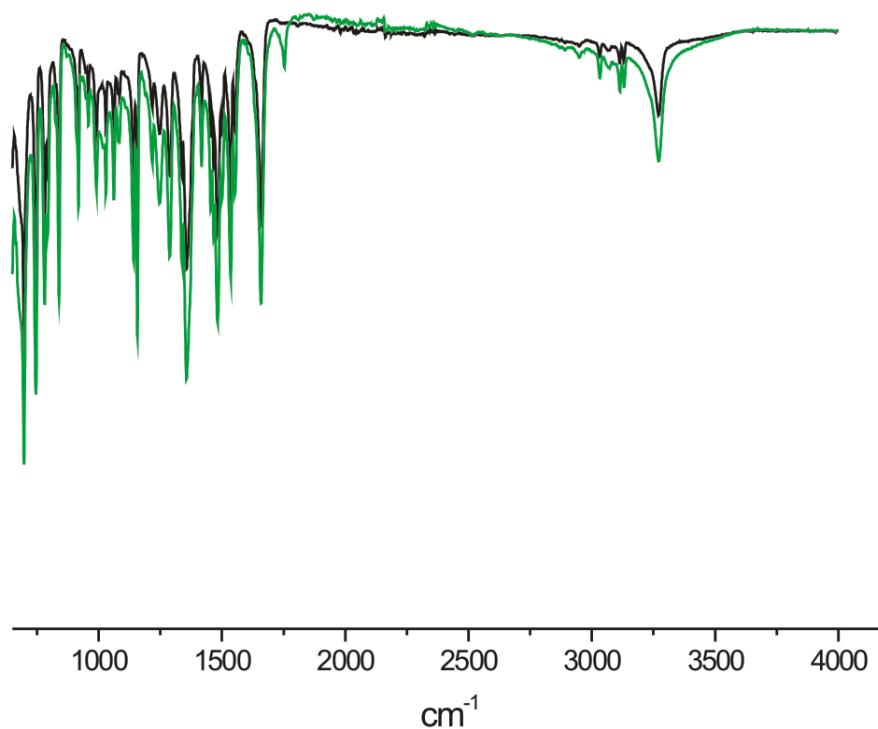


Figura 44. IV do BNZ padrão (em verde) em comparação ao fotodegradado (em preto).

5.3.3.5 Descrição quantitativa do processo fotoquímico de degradação

Conforme mencionado a concentração de BNZ nas soluções aquosas durante a irradiação foi monitorada por CLAE e esses dados foram utilizados para estimar a cinética do processo de fotodegradação.

Os parâmetros cinéticos obtidos confirmaram que a decomposição fotoquímica do BNZ em solução aquosa, segue uma reação de segunda ordem, calculados de acordo com a seguinte equação: $1 / C = 1 / C_0 + k.t$ (cinética de segunda ordem), C_0 é a concentração inicial, C a concentração remanescente, k a constante de velocidade (s^{-1}) e t é o tempo (s), conforme demonstrado na figura 45.

A constante de velocidade da reação foi igual à inclinação da reta obtida, tomada com o sinal oposto. Sua análise revelou que, nestas condições experimentais o valor da taxa constante de decomposição fotolítica do BNZ em solução aquosa foi $k = 3,54 \times 10^{-4} \pm 9,43 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$.

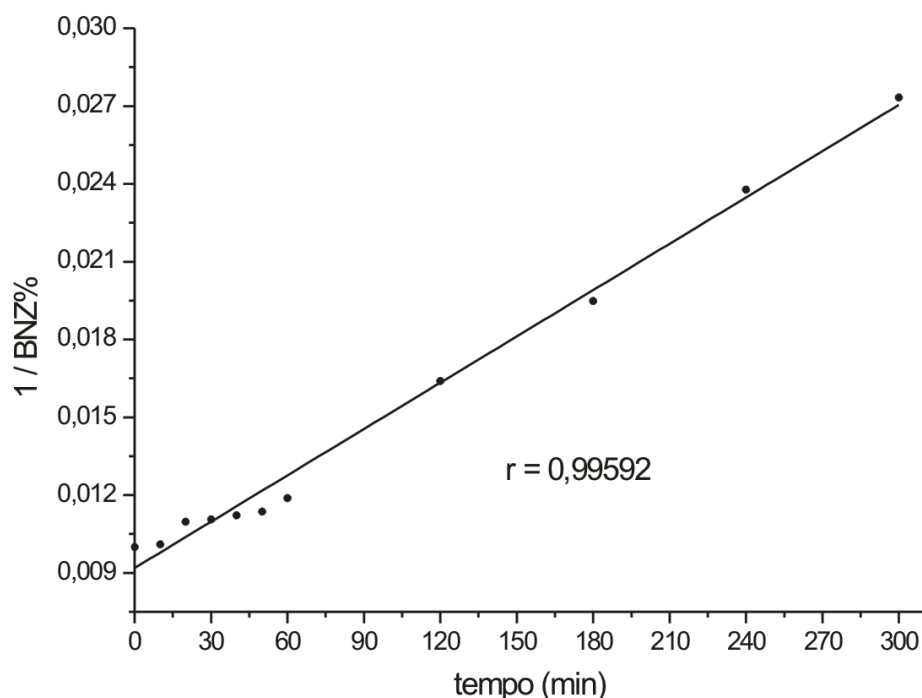


Figura 45. Fotólise do BNZ: reação de segunda ordem.

5.3.4 Termodegradação

A termodegradação do BNZ pode ser descrita com a auto-degradação do BNZ, pois o calor fornecido as moléculas de BNZ é utilizado apenas como catalizador de reações, fornecendo a energia de ativação para que a mesma ocorra. Portanto, foi avaliada por 2 métodos diferentes, sendo o método inicial, sob condições mais amenas, utilizado para amostragem do método indicativo de estabilidade, em que o BNZ foi submetido a 60°C em estufa calibrada por 30 dias, não foi capaz de produzir produtos de degradação térmica em concentrações relevantes, apesar de ser possível a detecção de 2 produtos de degradação: PDT – 1 ($T_R = 2,65$) e PDT – 2 ($T_R = 3,14$), conforme ilustrado na figura 46.

O segundo método, consistiu na utilização da análise termogravimétrica, a fim alcançar temperaturas mais extremas, forçando a degradação do BNZ, e assim, avaliar seus processos degradativos.

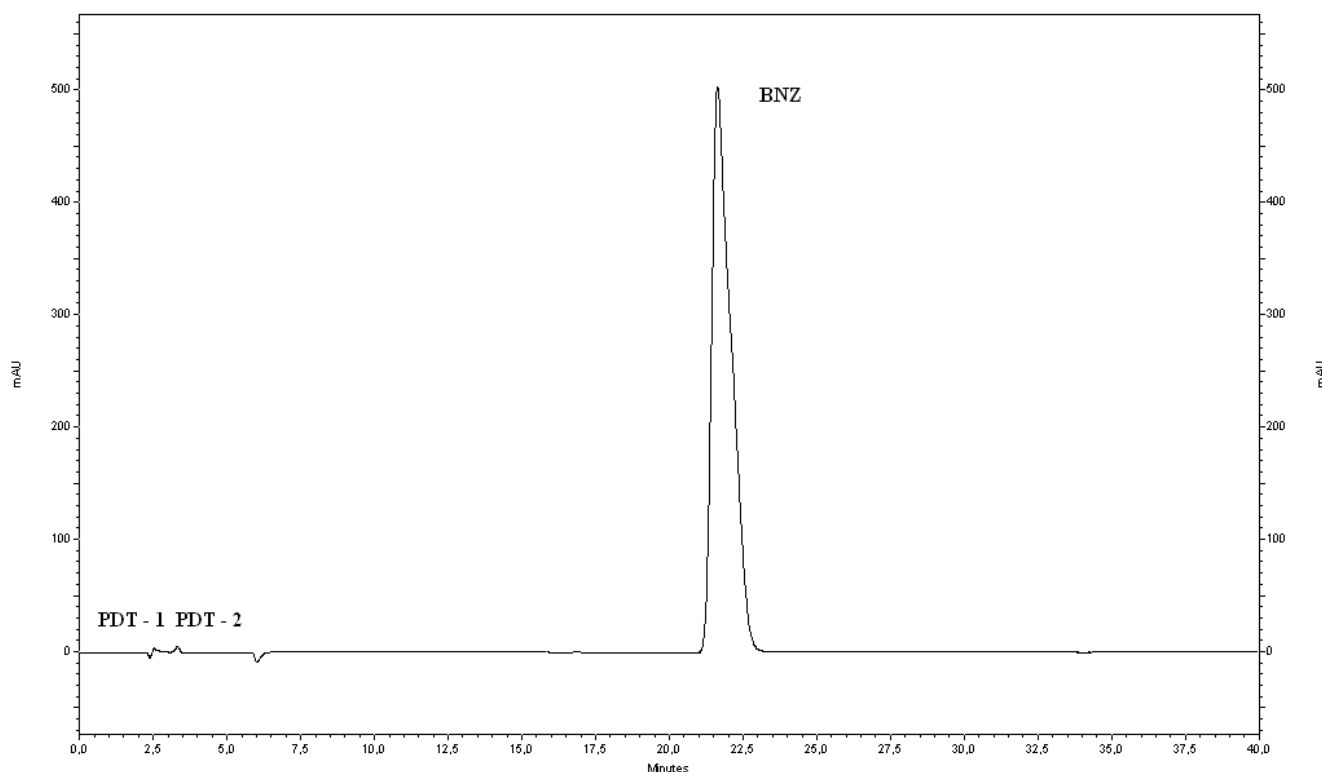


Figura 46. Cromatograma do BNZ após 30 dias de degradação térmica a 60°C.

A curva de DTA do fármaco benznidazol demonstrou o processo endotérmico característico de fusão na faixa de temperatura de 187,68 a 198,88°C, com pico de fusão em 191,1°C e calor de reação de 934,7 J.g⁻¹, correspondente a faixa de fusão da literatura (THE MERK INDEX, 2001) e processo exotérmico característico de decomposição na faixa de 259,94 a 285,16, com pico em 278,62°C (Figura 47).

Na curva de termogravimétrica do BNZ observa-se que o fármaco é termicamente estável até a 233,76°C e apresenta etapa principal de decomposição entre 233,76 a 319,35°C, com perda de massa inicial de 30,917% como demonstrado na Figura 47, finalizando a perda de massa em 70% da massa inicial. O gráfico em verde representa a primeira derivada da curva de decaimento gravimétrico do BNZ em função da temperatura, elucidando que o BNZ possui um processo degradativo apenas, evidenciado pelo decaimento da curva.

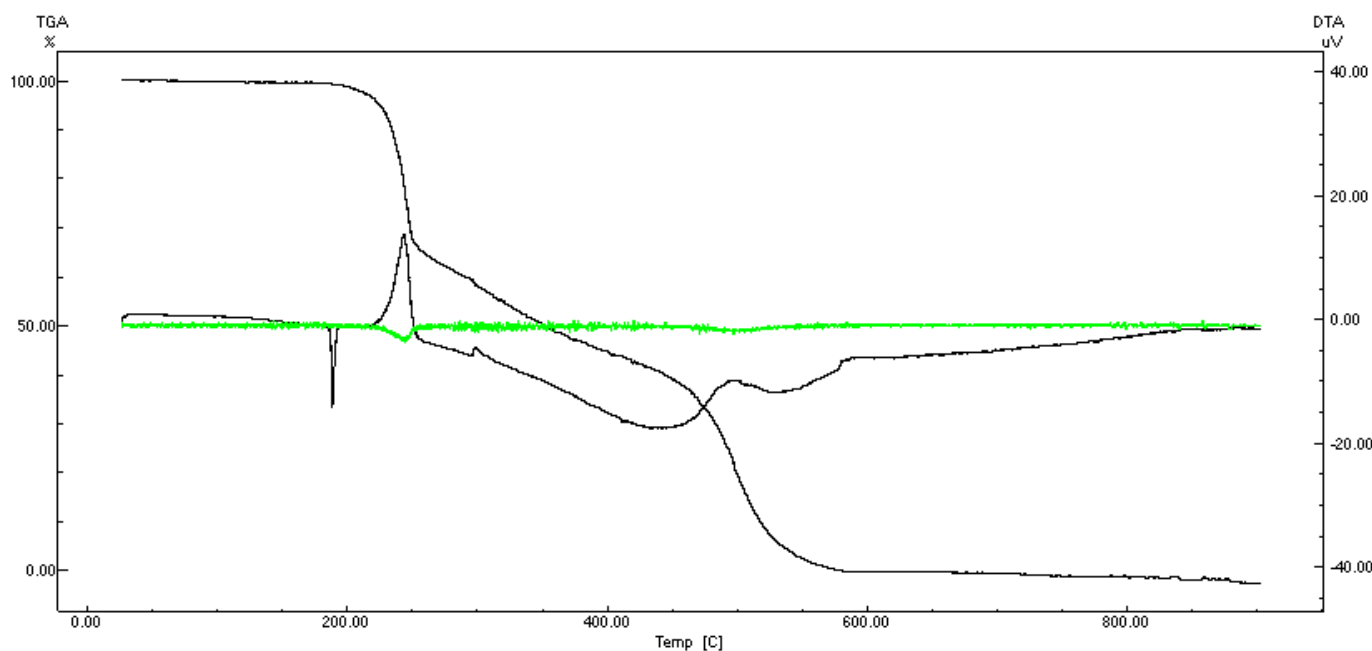


Figura 47. Decomposição térmica do BNZ.

Extrapolando-se a perda de massa em mg do BNZ para a massa molecular do fármaco (MM = 260,252 g/mol), pode-se dizer que a degradação do mesmo leva a volatilização

de um grupamento químico com 77, 90 g/mol, inicialmente, transformando-se em um composto intermediário instável, que se estabiliza após perder cerca de 70% da massa inicial de BNZ. Correspondendo, provavelmente a perda do anel benzílico, que possui massa molecular de 77 g/mol, porém os compostos formados a partir desta degradação são instáveis não sendo possível caracterização dos mesmos por IV, visto que o IV realizado ao atingir a temperatura de 320°C, com conseqüente resfriamento, evidenciou um espectro sem bandas características, induzindo que ao aquecermos a esta temperatura o BNZ, o calor que resulta do aquecimento é suficiente para carbonizar a molécula do BNZ quebrando todas as ligações C-C (IV do composto degradado a 320°C em anexo).

Tal resultado corrobora com o observado na degradação fotolítica em que foi evidenciado que um dos produtos de degradação do BNZ é o composto resultante da eliminação do anel benzílico da molécula do fármaco.

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

Os comprimidos de BNZ resultantes após o estudo de estabilidade acelerada (EEA) foram quantificados pelo método indicativo de estabilidade a fim de dosear o BNZ e seus produtos de degradação.

A avaliação dos comprimidos após EEA (cromatograma em anexo), evidenciou a formação de 2 produtos de degradação relevantes, em ambos os estudos: PD – 1 ($T_R = 2,653$) e PD – 2 ($T_R = 3,585$), tais produtos de degradação são detectados nos estudos de oxidação, hidrólise básica, fotoestabilidade e termodegradação, sendo tais produtos quimicamente possíveis de serem formados em todas as degradações supracitadas.

Sugere-se, portanto que um dos produtos de degradação da forma farmacêutica sejam os já descritos na rota degradativa fotolítica, já que o benzeno é volátil (Ponto de fusão = 5,5°C), que corroboraram com os dados obtidos na termodegradação (DTG) (figura 48), porém tal indício necessita de uma análise por LC-MS, de maior precisão.

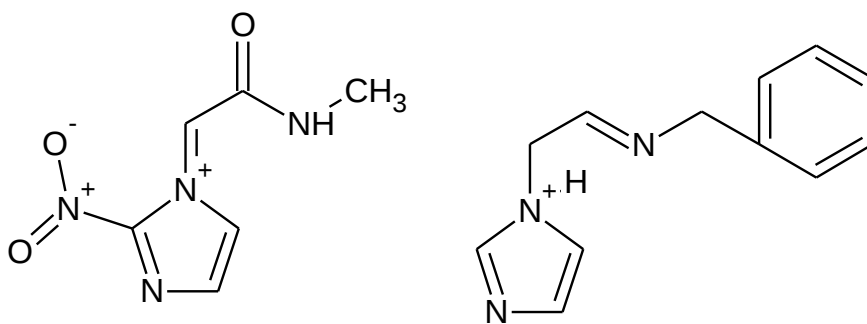


Figura 48. Prováveis produtos de degradação do BNZ.

A concentração dos produtos de degradação quantificados foi de 0,156% para o PD-1 e 0,2% para o PD-2. Sendo a dose diária de ingestão de BNZ de 200 a 300 mg, variando de acordo com o paciente, estes produtos de degradação deveriam ser identificados e qualificados (PD-2), porém estes resultados são fruto de uma análise preliminar já que os órgãos regulatórios (o ICH e a ANVISA) estabelecem que sejam avaliados 3 lotes diferentes para assegurar esta hipótese.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1) O fármaco Benznidazol foi avaliado físico-quimicamente, frente a diferentes técnicas e métodos, sendo possível caracterizá-lo do ponto de vista morfológico e químico, para certificação de seu grau de pureza.
- 2) O método analítico indicativo de estabilidade desenvolvido foi validado seguindo as Boas Práticas de Laboratório e a Resolução, nº 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003). Ele foi considerado robusto, linear, preciso, exato, específico e seletivo para detectar e quantificar os produtos de degradação do BNZ.
- 3) Os estudos de degradação realizados foram capazes de delinear a estabilidade deste fármaco frente aos estresses submetidos, pois:
 - O BNZ mostrou-se inalterado frente ao estresse hidrolítico ácido e neutro durante 30 dias, sendo, portanto, considerável à estas condições.
 - O BNZ demonstrou-se instável em meio básico, sendo possível avaliar o decaimento do mesmo, bem como demonstrar a cinética degradativa de segunda ordem do BNZ nas condições de hidrólise básica (NaOH 0,1M).
 - A degradação oxidativa apresentou-se como uma degradação linear de primeira ordem, sendo o BNZ relativamente estável a tais condições.
 - O estudo de fotoestabilidade do BNZ com irradiação de fótons UV e no espectro visível demonstrou que o BNZ mesmo no estado sólido é fotosensível, sendo esta instabilidade mais pronunciada em solução aquosa.

- A termodegradação em estufa a 60°C evidenciou a produção de 2 produtos de degradação semelhantes aos produtos de degradação reais, obtidos na forma farmacêutica sólida BNZ 100 (LAFEPE); enquanto que a termogravimetria demonstrou um processo degradativo único do BNZ, logo após o processo de fusão.
- 4) As análises espectrais por MS/MS sugeriram as possíveis estruturas químicas dos produtos de degradação do BNZ.
- 5) A avaliação da forma farmacêutica comprimido BNZ LAFPE evidenciou 2 produtos de degradação relevantes, em concentrações qualificáveis, sendo portanto necessário um aprofundamento da investigação em outros lotes do produto farmacêutico comercializado.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

- Isolar os produtos de degradação do BNZ obtidos no estudo de hidrólise básica, oxidação e termodegradação, identificar e caracterizá-los, para confirmação da suas estruturas químicas.
- Analisar mais dois diferentes lotes de BNZ comprimido para avaliação da real necessidade de qualificar os produtos de degradação do BNZ.

REFERÊNCIAS

ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.

8 REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F.A.; JARAMILLO, N.O.; GURGEL-GONÇALVES, R.; DIAS, F.B.S.; DIOTAIUTI, L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop.* 110: 159–177, 2009.

ALP, M.; GÖKER, H.; BRUN, R.; YILDIZ, S. Synthesis and antiparasitic and antifungal evaluation of 20-arylsubstituted-1H,10H-[2,5]bisbenzimidazolyl-5-carboxamidines. *Eur. J. Med. Chem.* 44 : 2002–2008, 2009.

ALVES, G.M.C. *Desenvolvimento de cápsula gelatinosa mole de β -Lapachona para terapias antineoplásicas em humanos*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

ANDRADE, A. L. S. S., ZICKER, F.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, S.A.; LUQUETTI, A.; TRAVASSOS, L..R.; ALMEIDA, I.C.; ANDRADE, S.S; ANDRADE, J.G.; MARTELLI, C.M.T. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early Trypanosoma cruzi infection. *The Lancet*, 348 (9039) : 1407 - 1413, 1996. doi:10.1016/S0140-6736(96)04128-1

ANSEL, H. C.; LOYD V. A. & POPOVICH, N. G. **Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

AZEVEDO-FILHO, C. A. *Construção de uma câmara de fotoestabilidade, estudo da fotodegradação da vitamina A e da ação antioxidante do polifosfato de sódio em misturas de nutrição parenteral*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 2008.

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

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

ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.

BESTETTI, R.B.; MARTINS, C.A. & CARDINALI-NETO, A. Justice where justice is due: A posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879–1934), the discoverer of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Int. J. Cardiol.* 134: 9–16, 2009.

BOURGUIGNON, S.C. & et al. Trypanosoma cruzi: *in vitro* activity of Epoxy-alpha-Lap, a derivative of alpha-lapachone, on trypomastigote and amastigote forms. *Exp. Parasitol.* 122 (2): 91-96, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 150, de 17 de junho de 2003**, Aprovação do Fascículo 4 da Parte II, da 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira / Benznidazol Monografia nº 177 (2002). Brasília: Diário Oficial da União 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **RE nº 899, de 29 de maio de 2003**, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Diário Oficial da União 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE n.º 01, de 29 de julho de 2005**, do Guia para realização dos estudos de estabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008** - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, Brasília, Diário Oficial da União, 15 jul. 2008. Disponível em: <http://www.sindusfarma.org.br/informativos/BBPAF03808.doc>.

BRAWLEY, V.; BHATIA, J.; KARP, W.; Effect of sodium metabisulfite on hydrogen peroxide production in light-exposed pediatric parenteral amino acid solutions. **American Journal of Health-System Pharmacy.** 55(12): 1288-1292, 1998.

CONCEIÇÃO, M. M.; **Estudo da degradação térmica de adoçante com aspartame**, Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa, 2004.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative). *Doenças Negligenciadas*, 2009a. Disponível em: < http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx >. Acesso em 02 de setembro de 2009.

ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative). *Projetos da DNDi – Principais Atividades 2008/2009 – Doença de Chagas*, 2008. Disponível em: < http://www.dndi.org.br/Portugues/atuais_projetos_portfolio_dndi.aspx#Chagas >. Acesso em 25 de abril de 2010.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative). *Quem faz parte da DNDi*, 2009b. Disponível em: < http://www.dndi.org.br/Portugues/sobre_dndi.aspx >. Acesso em: 04 de setembro de 2009.

DONATO, EM.; *Lopinavir/Ritonavir cápsulas: perfil de dissolução in vitro baseado nos dados in vivo, estudos de estabilidade térmica e metodologia analítica*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, 2008.

FLORENCE AT, ATTWOOD D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*. 3. ed. São Paulo: Edusp; 2003. p. 711.

GIRON, D. Thermal Analysis, Microcalorimetry and Combined Techniques for the Study of Pharmaceuticals. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Budapest, 56(3): 1285-1304, 1999.

GONÇALVES, L M; *Guia para fotoestabilidade: como se adequar às recomendações do ICH e da ANVISA*. Disponível em: <http://www.nteditorial.com.br>; acesso em 15 de Julho de 2008;

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

International Conference on Harmonization, “**ICH Q1B**: Photostability Testing of New Drug Substances and Products,” Step 5 (1996a).

International Conference on Harmonization, “**ICH Q2A**: Validation of Analytical Procedures: Methodology,” Step 5 (1994).

ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.

International Conference on Harmonization, “**ICH Q2B:** Validation of Analytical Procedures: Terms and Definitions,” Step 5 (1996b).

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

International Conference on Harmonization, “**ICH Q3B-(R):** Impurities in New Drug Products,” Step 5 (2003).

International Conference on Harmonization, “**ICH Q6A:** Test Procedures and Acceptance Criteria For New Drug Substances And New Drug Products: Chemical Substances”, Step 4 (1999).

KUHN, H.J., BRASLAVSKY, S.E., SCHIMIDT, R.; Chemical actinometry. **Pure Appl. Chem.**, 76 (12) 2105 – 2146, 2004.

LAFEPE (Laboratório Farmacêutico de Pernambuco). *LAFEPE conquista classificação da Organização Mundial de Saúde*, 2009. Disponível em: < <http://www.lafepe.pe.gov.br/LAFEPE/noticias/noticiario/190808.html> >. Acessado em 13 de setembro de 2009.

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

LEITE, A. C. L.; LIMA, R.S., MOREIRA, D.R., CARDOSO, M.V., DE BRITO, A.C.G., DOS SANTOS, L.M.F., HERNANDES, M.Z., KIPUSTOK, A.C., DE LIMA, R.S.; SOARES, M.B.P. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** .14 (11): 3749-3757, 2006.

LEITE, A.C.L.; DONNICI, C.L.; MARIA HELENA ARAÚJO,M.H.; OLIVEIRA,H.S.; MOREIRA,D.R.M.; PEREIRA,V.R.A.; SOUZA,M.A.; CASTRO, M.A.B.. Ruthenium complexes endowed with potent anti-*Trypanosoma cruzi* activity: Synthesis, biological

ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.

characterization and structure–activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Junho 2009.

LEITE, E.G; *Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos*; Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2005.

LEONARDI, D. & et al. Development of novel formulations for Chagas' disease: Optimization of benznidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. *International Journal of Pharmaceuticals* 367:140–147, 2009.

LIMA, A.A.N. *Desenvolvimento de dispersões sólidas e complexos de inclusão para benznidazol em formas farmacêuticas sólidas*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco Recife, 2008.

LYRA, M.A.M.; *Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas*; Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 2009.

MARCILI, A. & et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.* 39:615–623, 2009.

MARTINELLO, V.C.A. & SERRA, C.H.R., Estudo de dissolução de cápsulas contendo itraconazol: Desenvolvimento e validação de método. *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (1): 93-9, 2008.

MEZENCEV, R.; GALIZZI, M.; KUTSCHY, P.; DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi*: Antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 122: 66–69, 2008.

MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, A.L.; MCDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected Disease Research and Development: How Much Are We Really Spending? *PLoS Medic.* 6 (2), 2009.

ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.

PFOERTNER, K.H. & DALY, J.J. Photochemical rearrangement of N-substituted 2-ethyl-5-nitro-1H-imidazoles in the presence of water, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62: 1479-1482, 1987.

PIECHOCK, J.T., THOMA, K.; **Pharmaceutical Photostability and Stabilization Technology**, Ed .Informa Healthcare USA, Inc., 2007.

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

SILKE KLINK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; GRIEND, C.S.; BELD, C.; SOMSEN, G.W.; JONG, G.J. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products *Pharmaceutical Technology*, 5: 48-58, 2005.

SILVA, A. L. M. ; SOARES-SOBRINHO, J.L. ; ROLIM-NETO, P.J. ; SILVA, R.M.F. ; MEDEIROS, F.P.M. ; LIMA, L.G. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de benznidazol para a doença de chagas. *Quim. Nova*. 30 (5): 1163-1166, 2007.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM-NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(2):1-8, 2009.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharm Technol*. 24:1-14, 2000.

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

SOARES-SOBRINHO, J. L.; SILVA, A. L. M.; GRANGEIRO-JÚNIOR, S.; MEDEIROS, F. P. M.; ROLIM-NETO, P. J.; Desenvolvimento e validação do método analítico para o doseamento de benznidazol. *Revista Brasileira de Farmácia*, 87 (3), p. 78-80, 2006.

ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.

SOARES-SOBRINHO, J. L. **Sistema de vetorização de fármaco para comprimido de liberação clássica e prolongada a base de benznidazol**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007a.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; MEDEIROS, F.P.M.; ROCA, M.F; SILVA, K.E.R.; LIMA, L.N.A.; ROLIM-NETO, P.J. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de chagas. **Rev. Patol. Trop.** 36 (2): 103-118, 2007b.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; CUNHA-FILHO, M.S.S.; ROLIM-NETO, P.J.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.; DACUNHA-MARINHO, B. Benznidazole. **Acta Crystallographica Section E** (2008). E64,n ° 634.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; **Sistemas de vetorização do benznidazol para o tratamento da doença de Chagas**; Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco - Recife, 2009.

SOLOMONS, TWG.; FRYHLE, CB. **Química Orgânica**, Vol I e II, 9ª ed., Editora LTC, 2009.

TABORIANSKI, A. M.; **Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas**. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Universidade de São Paulo - São Paulo, 2003.

THE MERK INDEX: An encyclopedia of chemicals and drugs. 13. ed. Nova Jersey: Whitehouse Station, Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., 2001. 1741p.
TØNNESEN, H. H., **Photostability of Drugs and Drug Formulations**. 2nd Ed. CRC Press. 134-135. 2004.

USP. Validation of Compendial Methods <1225>. The United States Pharmacopoeia. 33th. Ed.; Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2010.

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

WENDLANDT, W. W.; **Thermal Analysis**, 3a Edição, Jonh Wiley & Sons, New York, 1986.

ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.

WHO. International Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. Annex 5, **WHO Technical Report Series**. 863, 1996.

WHO (World Health Organization). *TDR and product/drug discovery, introduction*, 2009. Disponível em: < <http://apps.who.int/tdr/svc/topics/product-drug-development> >, Acesso em: 13 de maio de 2009.

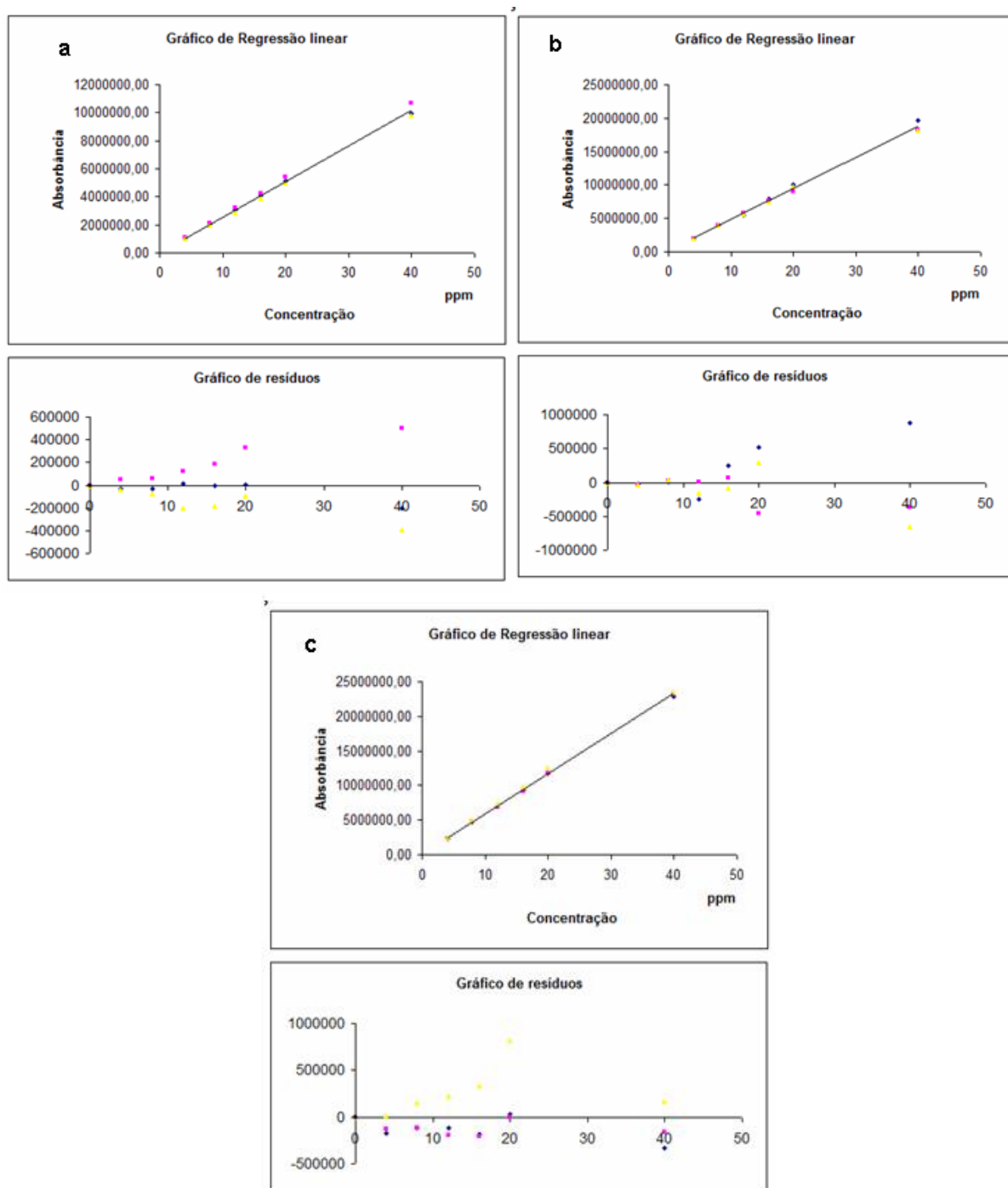
WILKINS, B.J. GAINSFORD, G.J. MOORE, D.E. Photolytic rearrangement of metronidazole to N-(2-hydroxyethyl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazole-3-carboxamide. Crystal structure of its 4-nitrobenzoate derivate, **J. Chem. Soc. Perkin Trans.** 1: 1817-1820, 1987.

YOSHIOKA, S., Quinine Actinometry as a Method for Calibrating Ultraviolet Radiation Intensity in Light- stability Testing of Pharmaceuticals, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 20(13): 2049-2062, 1994.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V.J. **Stability of Drugs and Dosage Forms** Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2002.

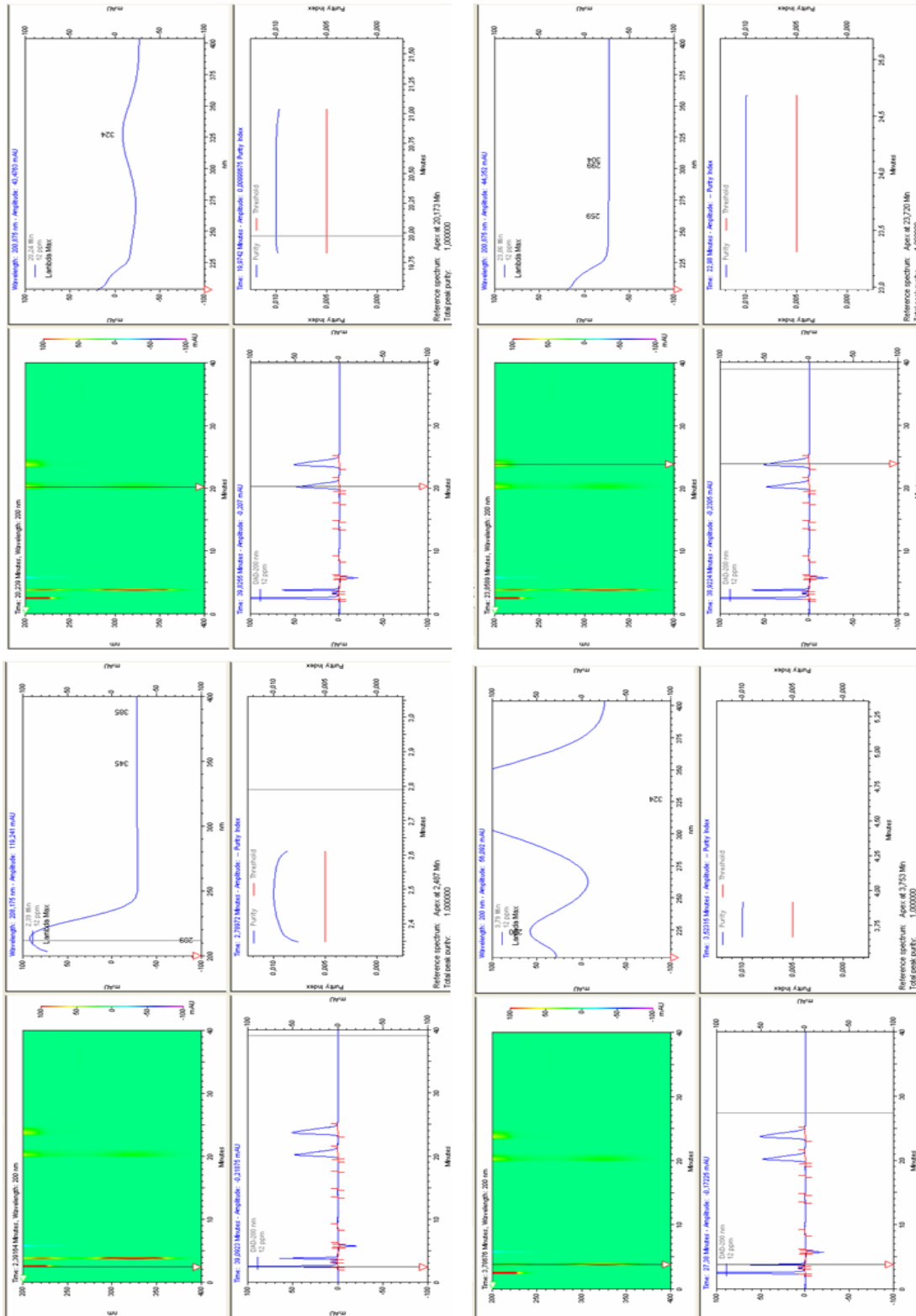
APÊNDICES

APÊNDICE A - Gráfico da regressão linear e distribuição dos resíduos para as SQR: a) 2-nitroimidazol, b) benznidazol e c) N-benzilcloroacetamida.

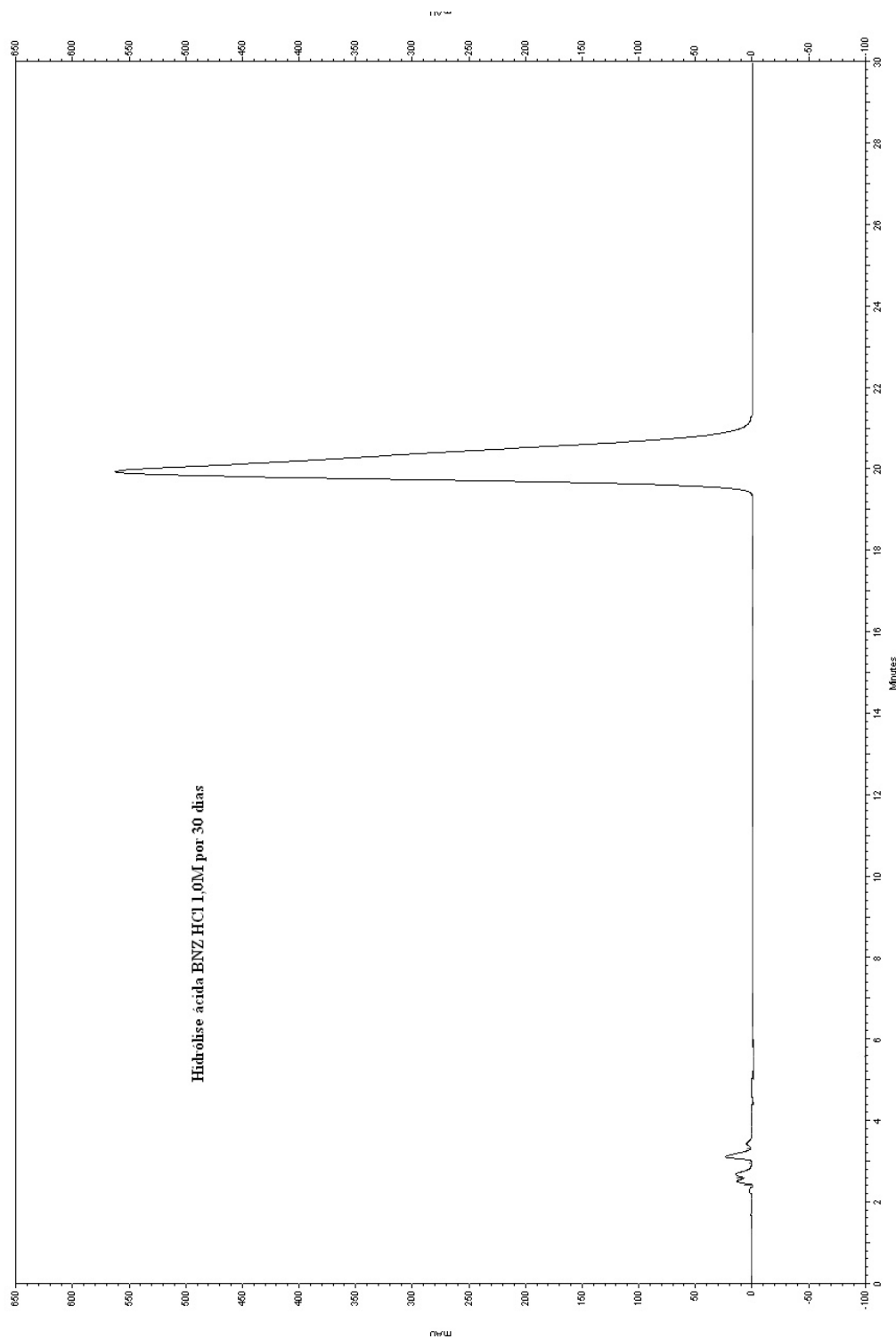


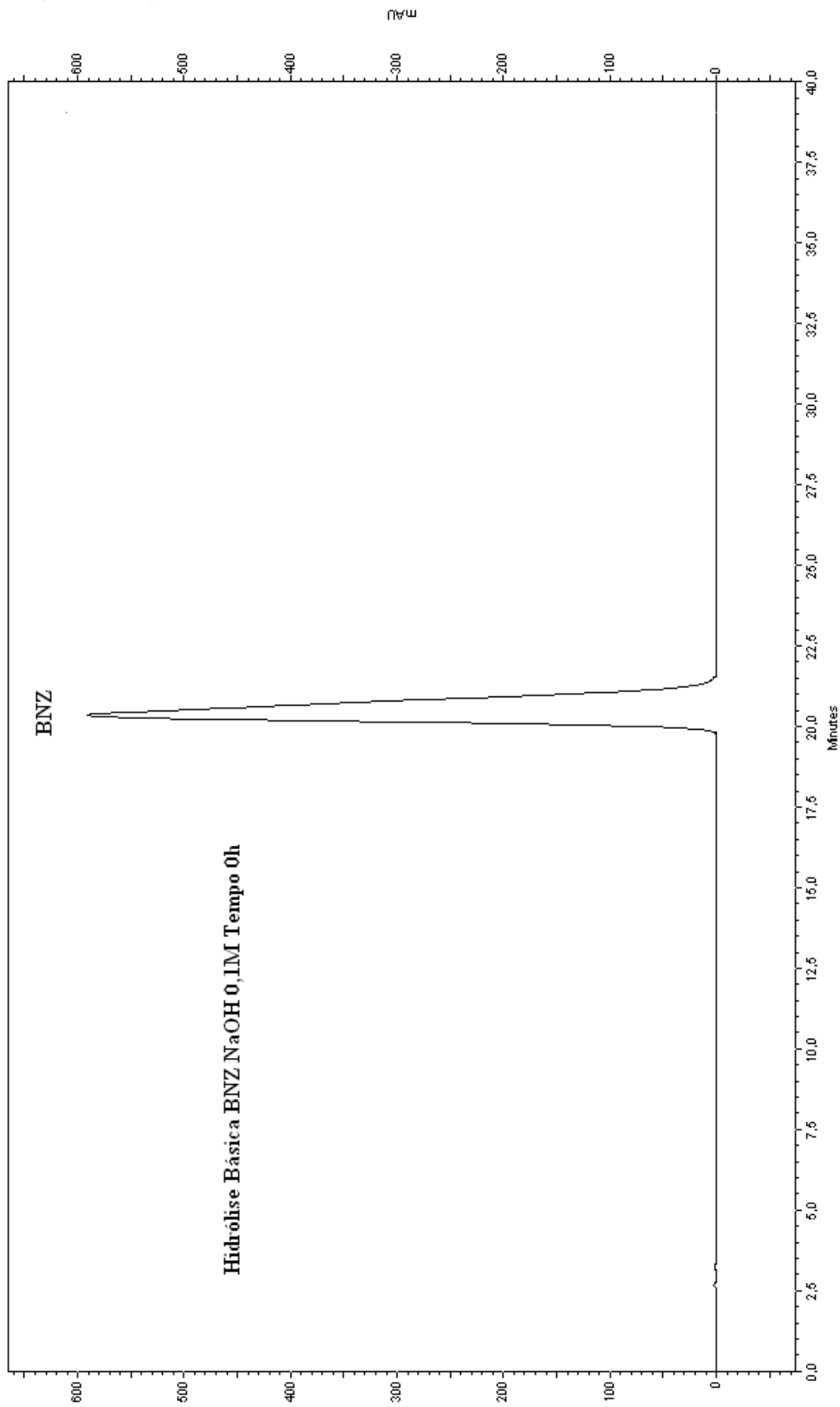
ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.

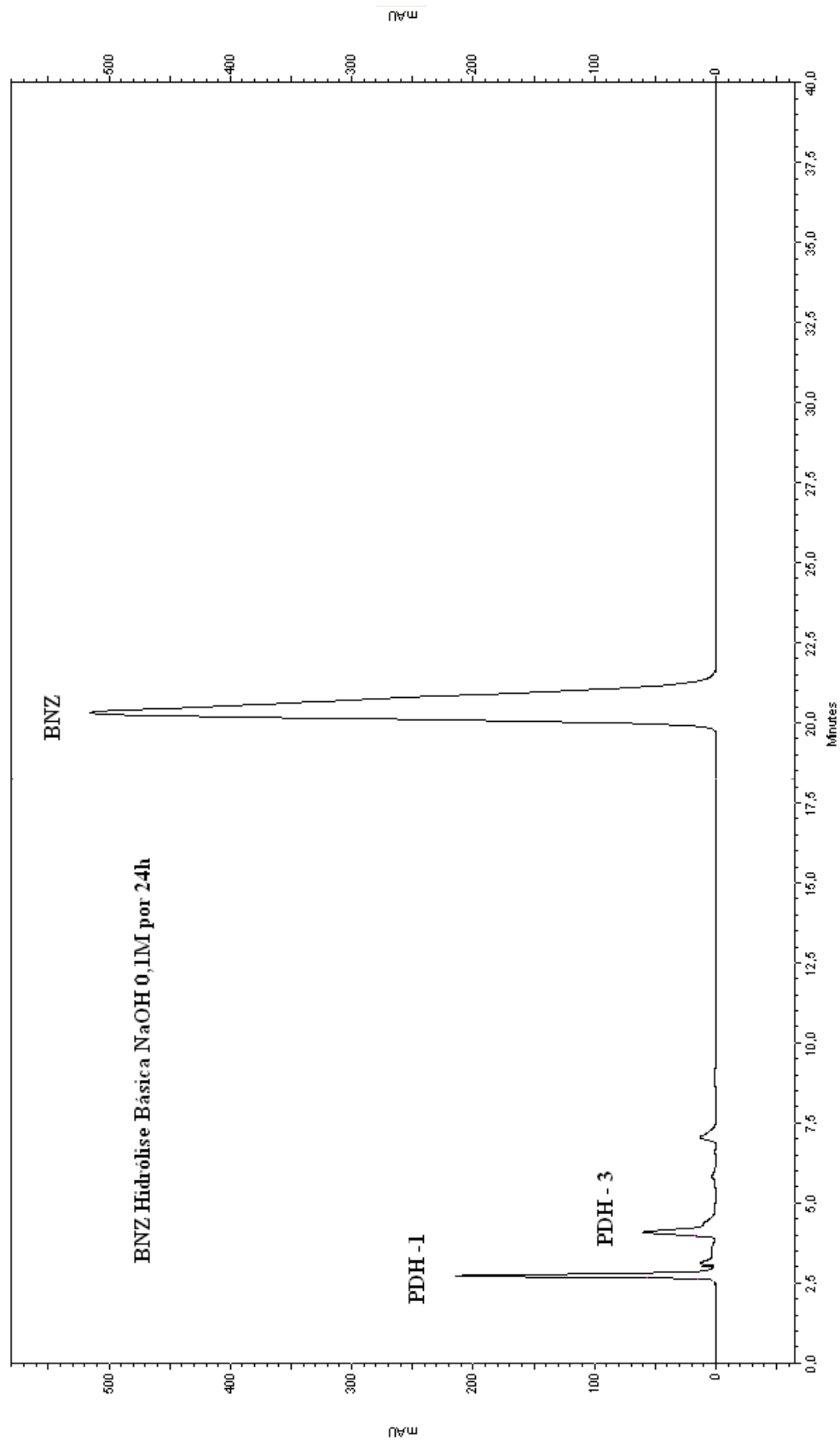
APÊNDICE B – Espectros UV do cromatograma do padrão misto do BNZ e suas SQR's.

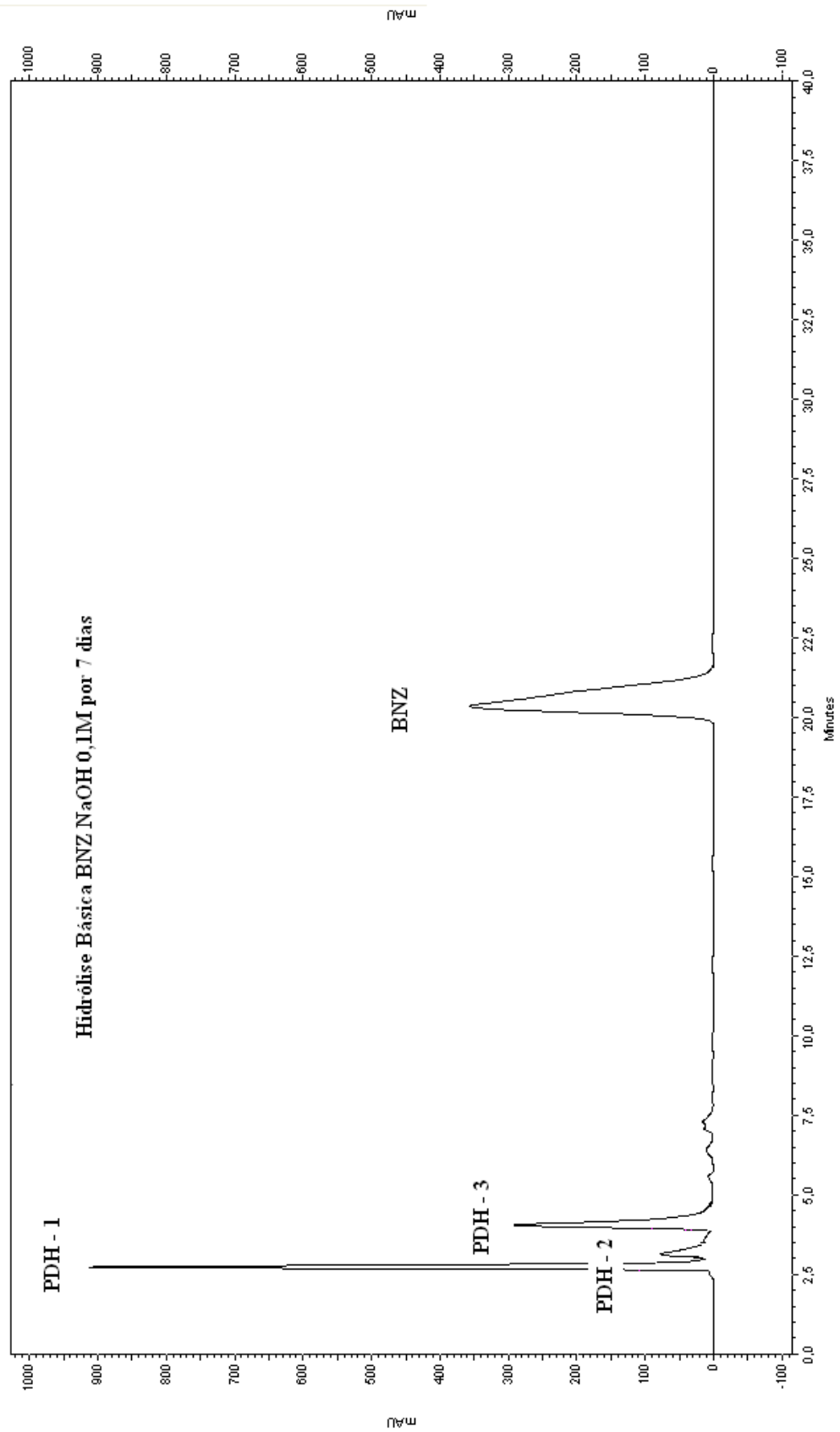


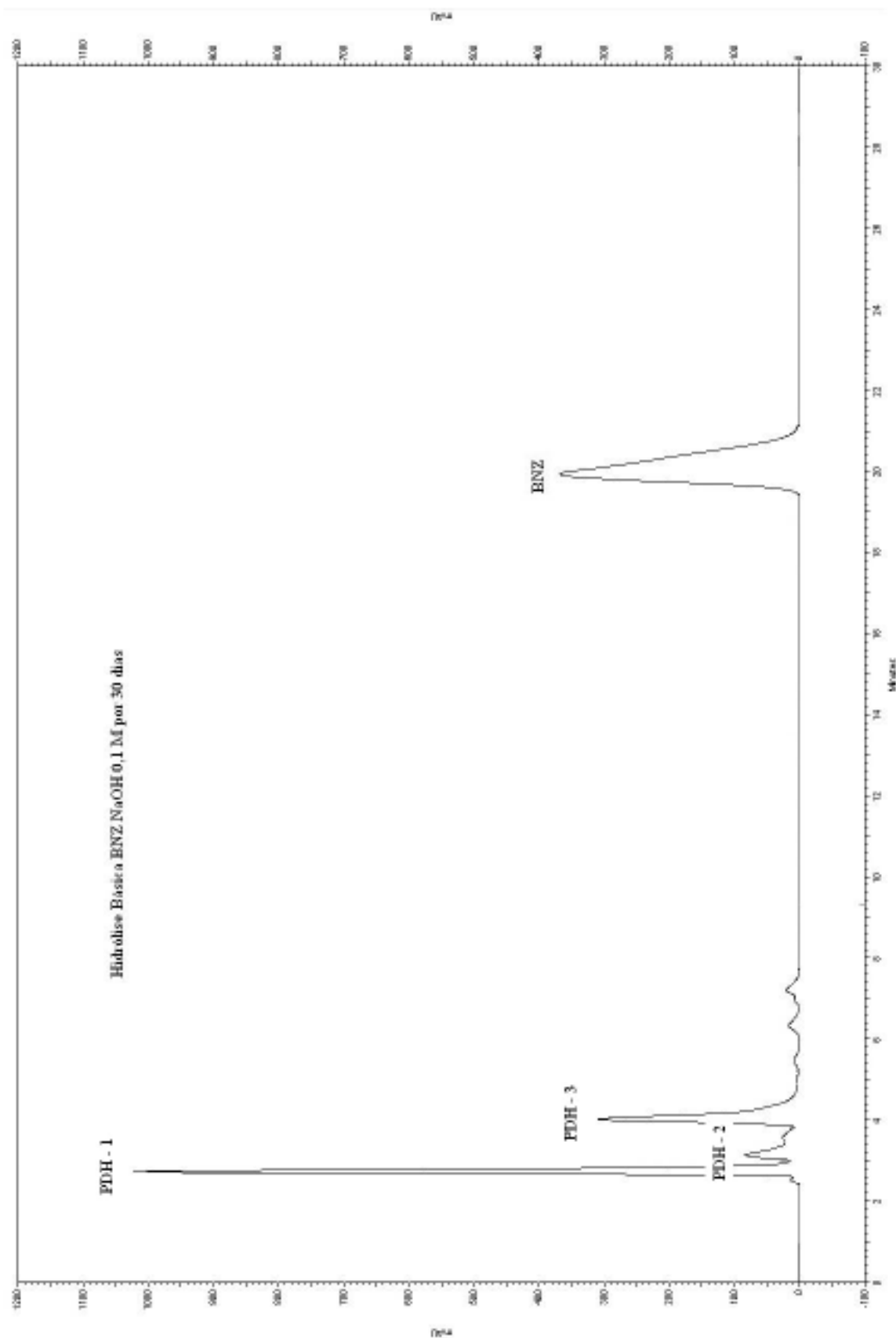
ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.

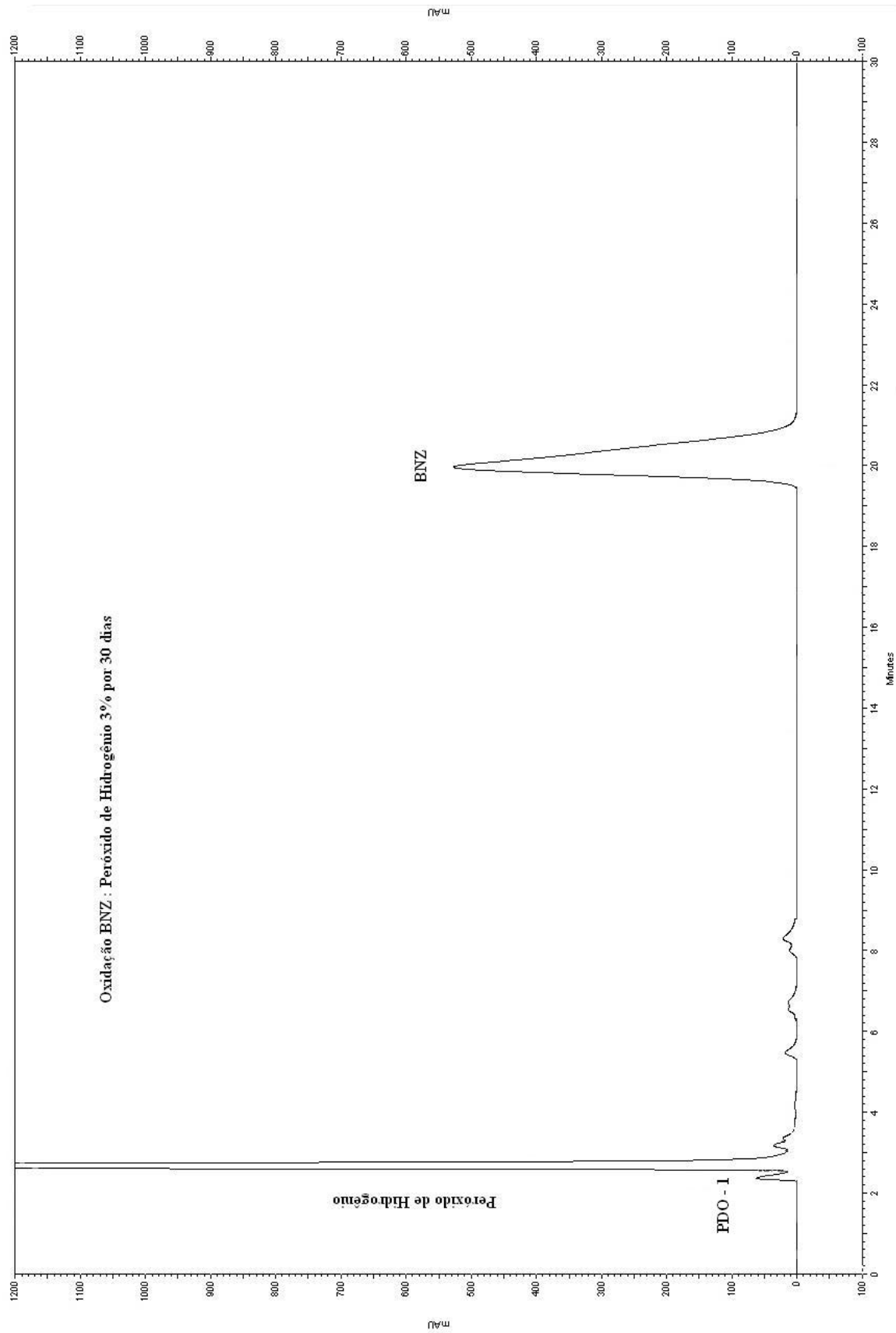
APÊNDICE C – Cromatogramas dos estudos de degradação do BNZ.

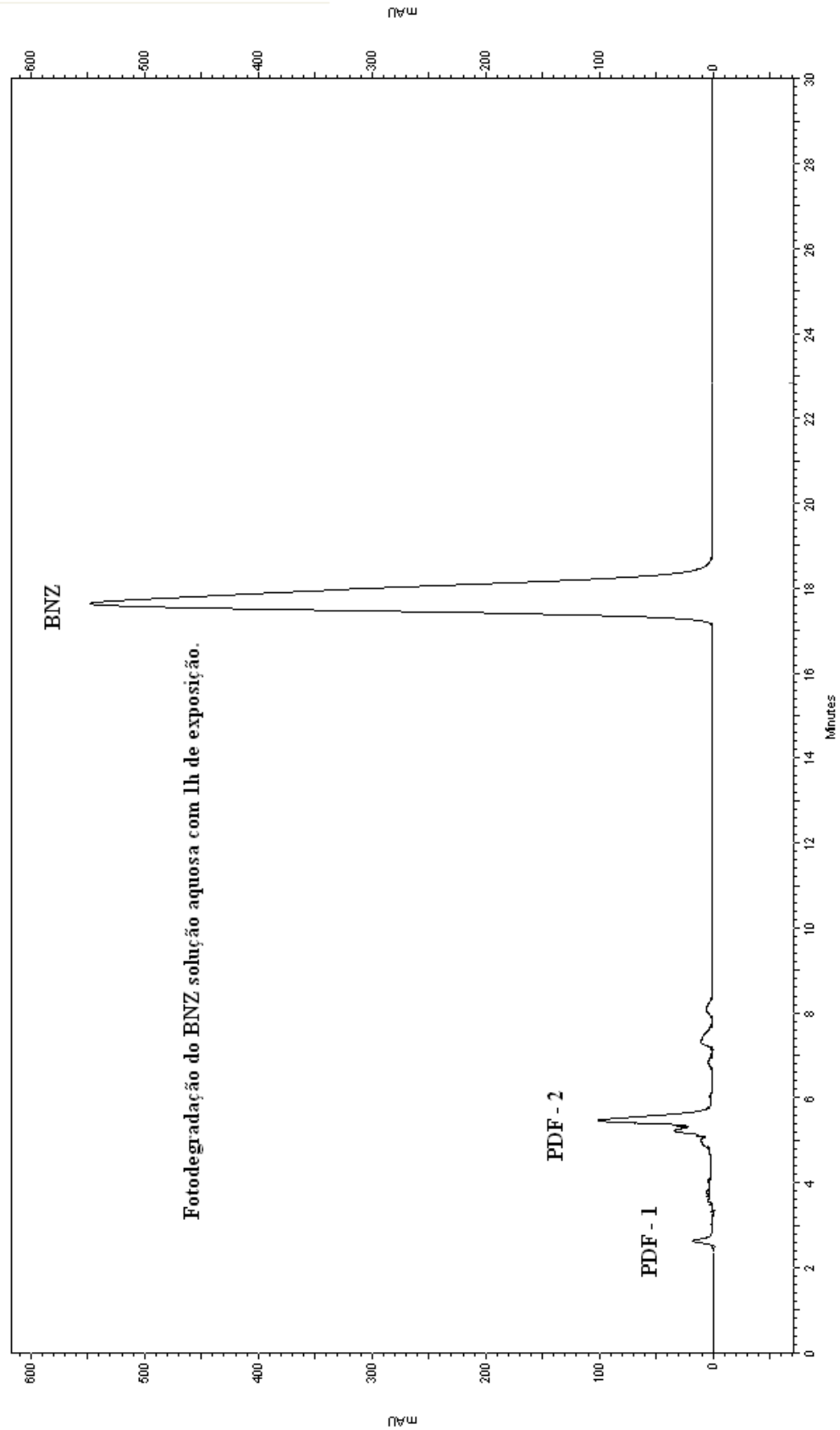


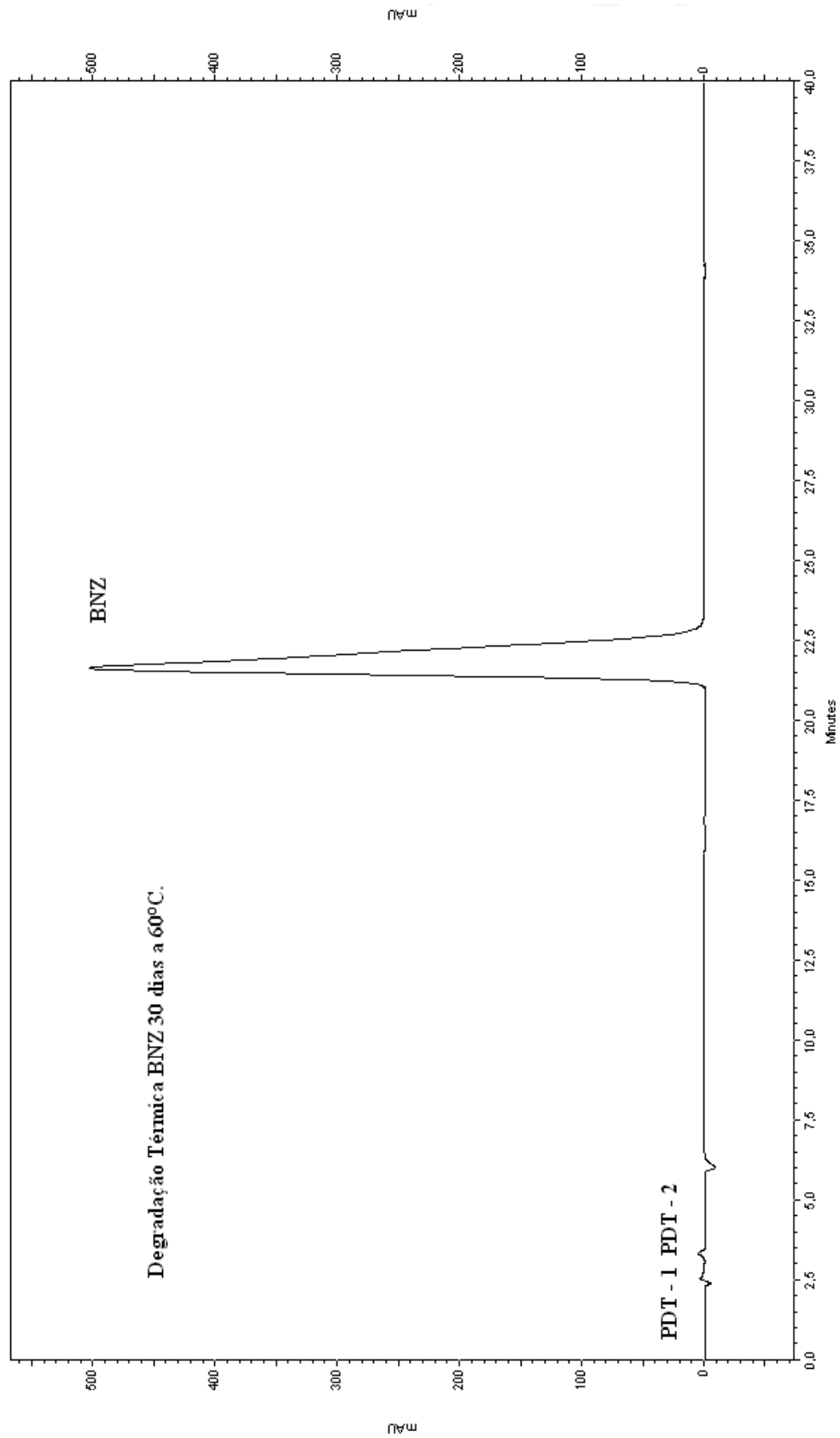


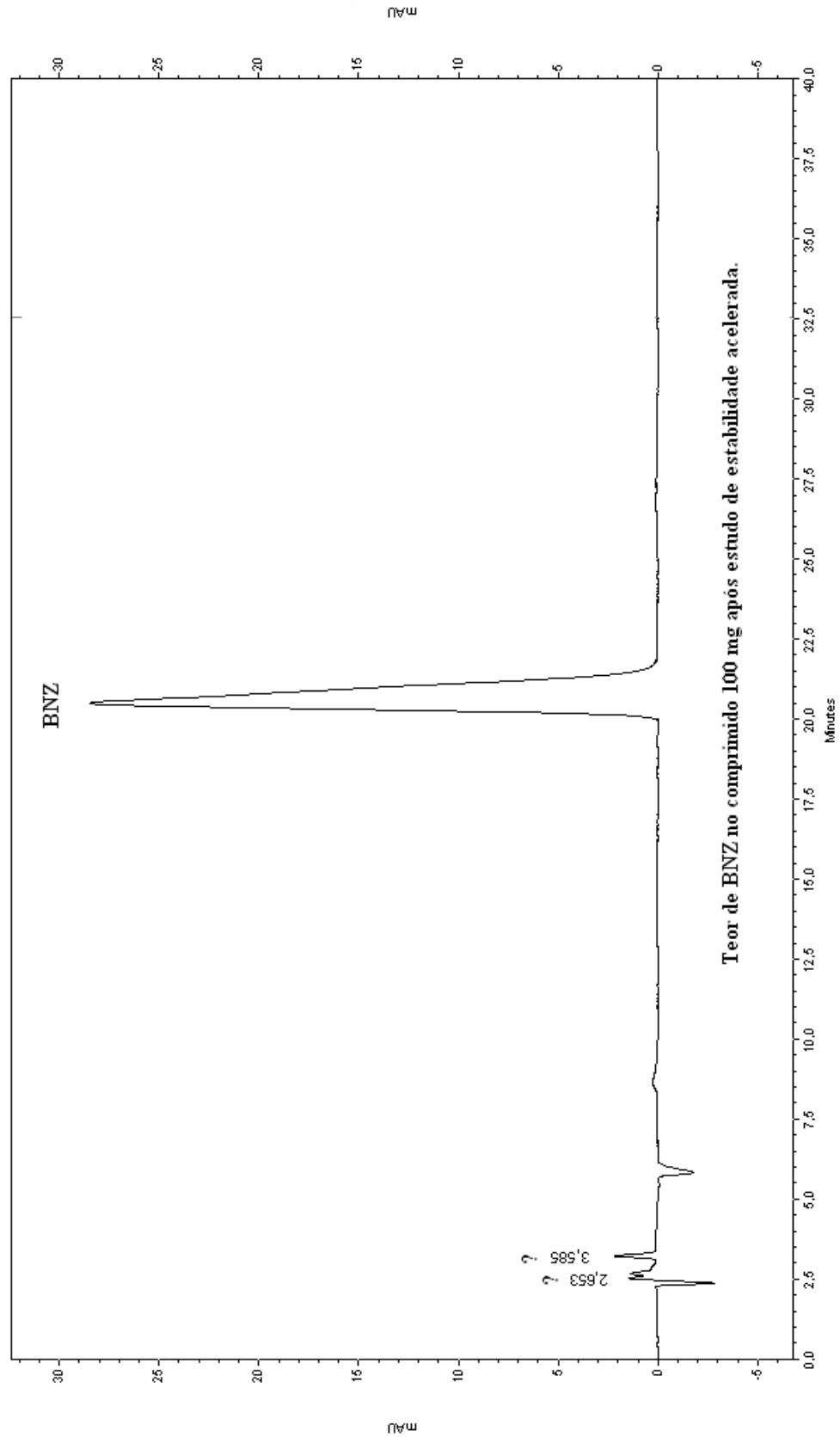












ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – Submissão do artigo intitulado: EVALUATION OF FORCED DEGRADATION STUDIES OF ANTICHAGASIC BENZNIDAZOLE USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY no Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

Journal of
PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS

Contact us ☒ Help ?

Username: pedrorolim
Role: Author

Version: EES 2010.1

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Submissions Being Processed for Author **Pedro José Rolim-Neto, Dr.**

Page: 1 of 1 (2 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		EVALUATION OF FORCED DEGRADATION STUDIES OF ANTICHAGASIC BENZNIDAZOLE USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY	Aug 23, 2010	Aug 23, 2010	Submitted to Journal
Action Links	JPBA-D-10-01044	Study of benznidazole-cyclodextrin inclusion complexes, cytotoxicity and trypanocidal activity	Jul 27, 2010	Aug 07, 2010	Under Review

Page: 1 of 1 (2 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

ROLIM, L.A. Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol, Utilizado no Combate a Doença de Chagas.