

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**COMPRIMIDOS MATRICIAIS DE POLI(ÓXIDO) DE ETILENO CONTENDO O
ANTIMALÁRICO PRIMAQUINA: ESTUDO DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO *IN*
VIVO.**

CHARISE DALLAZEM BERTOL

FLORIANÓPOLIS

2009

CHARISE DALLAZEM BERTOL

**COMPRIMIDOS MATRICIAIS DE POLI(ÓXIDO) DE ETILENO CONTENDO O
ANTIMALÁRICO PRIMAQUINA: ESTUDO DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO *IN*
VIVO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos – Desenvolvimento de formas farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva

FLORIANÓPOLIS

2009

Dedico este trabalho, como gratidão, ao meu noivo Josuel, pelo incentivo, cumplicidade e amor, ao meu filho Rafael, pela motivação e alegria de viver e aos meus pais Neudi e Regina por confiarem e possibilitarem a realização dos meus sonhos, e por estarem sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a concretização de tudo em minha vida.

Ao meu noivo Josuel, pelo amor verdadeiro, parceria, cumplicidade, dedicação, paciência, e por ser meu porto-seguro nos momentos de fraqueza e braço direito na execução deste trabalho.

Ao meu filho Rafael, que me fez seguir e concluir meus objetivos com ainda mais afinco, e por mostrar que a vida é muito melhor do que podemos imaginar, e nada é tão difícil quanto parece antes de colocarmos a “mão na massa”.

Aos meus pais Neudi e Regina pelo exemplo de vida mais fascinante e vitorioso que conheço, pelo aconchego, formação pessoal e incentivo, além de possibilitarem mais uma vez (entre tantas) a concretização dos meus sonhos.

A minha irmã Josi pela amizade, carinho, compreensão, confiança e por compartilhar este ideal, sempre me incentivando e apoiando.

Aos familiares em geral (avós, sogra, tias, primas, cunhados), e amigos (Carine, Nessa) pelo apoio emocional e por sempre torcerem por mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos A. Segatto Silva pela oportunidade e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Controle de Qualidade, em especial à Simone, Gis, Paulo, Hellen, Monika, Fábio, Rafael, Lari, Gabi, Silvia, Cassi, Lu, Bruno, Amarílis, e Patrik pela amizade e contribuições durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários Ivonete e Solange, pela atenção dispensada.

Aos colegas dos laboratórios de Biotecnologia e do Biotério da UFSC.

Ao professor do Departamento de Farmacologia da UFSC Anicleto pelas contribuições e atenção.

Aos funcionários da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em especial Helvécio, pela atenção e disponibilidade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização da dissertação.

Muito obrigada!

“O futuro é daqueles que acreditam na beleza de seus sonhos e imaginações.”

RESUMO

A primaquina (PQ) é o antimalárico de escolha para prevenir as recaídas e para prover a cura radical do *Plasmodium vivax*. O desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação prolongada representa uma alternativa promissora na otimização do esquema posológico e na redução dos efeitos adversos existentes. Através da dissertação de mestrado intitulada “Desenvolvimento e avaliação de matrizes de polióxido de etileno (POE) contendo o antimalárico primaquina”, foram produzidos comprimidos de liberação prolongada contendo PQ (CRUZ, 2006). As formulações continham 30 ou 60 % do polímero de peso molecular de 4×10^6 Da ou 8×10^6 Da. Parâmetros quanto ao intumescimento, erosão e dissolução foram avaliados, apontando a formulação que continha 30 % do POE de 8×10^6 Da como a mais adequada. Neste presente trabalho, esta formulação foi submetida ao controle de qualidade, estudo de estabilidade e avaliação da biodisponibilidade em cães. A caracterização físico-química de matérias-primas (MPs) de PQ de quatro diferentes fornecedores foi realizada quanto à qualidade e o teor. A identificação foi positiva para todas MPs. O teor foi determinado por titulação potenciométrica e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Por titulação, o teor das MPs variou de 98,8 a 101,1 %, estando de acordo com as especificações farmacopéicas. Por CLAE, duas das quatro MPs demonstraram teor inadequado (90,7 % e 93,1 %), revelando-se a presença de uma impureza, possivelmente um isômero de posição. A estabilidade das MPs em estufa a 80 °C, 100 °C e 120 °C foi avaliada, e todas seguiram uma cinética de decomposição de ordem zero. Através da aplicação do método gráfico de Arrhenius, foram observadas diferenças entre a constante de velocidade de degradação na temperatura de 25 °C (K_{25}) e entre a energia de ativação das MPs. Os comprimidos foram produzidos com a MP C, seguindo-se com a determinação dos parâmetros físicos da formulação. O doseamento dos comprimidos foi de $94,45 \pm 0,61$ % ($n = 20$), estando dentro dos limites farmacopéicos. O estudo de estabilidade abrangeu diferentes condições e materiais de acondicionamento para a determinação dos parâmetros cinéticos. Em estufa a 80 °C, 100 °C e 120 °C, a formulação exibiu uma cinética de degradação de ordem zero, sendo que o teor diminuiu mais rapidamente conforme aumentou a temperatura. Em câmara climática (40 °C e 75 % de umidade relativa) e câmara de luz UV ($\lambda = 254$ nm), os comprimidos foram expostos sem embalagem, em blíster e em frascos plásticos âmbar. A maior degradação ocorreu nos comprimidos sem embalagem, sendo que os blísters e os frascos plásticos não foram suficientes para conter a degradação propiciada pelo excesso de umidade e de luz. Nas câmaras climáticas e de luz UV, os comprimidos tiveram uma degradação maior do que 10 % em 6 meses. A umidade e a luz foram os fatores mais relevantes na degradação do fármaco e da formulação, mais do que a própria temperatura. Para a avaliação da formulação *in vivo*, foram utilizados cães beagles, onde um método bioanalítico para análise da PQ no plasma foi desenvolvido e validado. A extração dos analitos de interesse do plasma foi realizada em fase sólida. A metodologia de doseamento por CLAE demonstrou ser específica, linear na faixa de 75 – 3000 ng/mL, exata, precisa e estável (curto prazo, longo prazo, após ciclos de congelamento/descongelamento e pós-processamento) dentro das condições experimentais testadas. As taxas de recuperação foram adequadas tanto para a PQ quanto para o padrão interno mostrando-se próximas a 100 %. O comportamento dos comprimidos de liberação prolongada foi comparado ao dos comprimidos de liberação imediata existentes no mercado. Os mesmos foram administrados oralmente aos cães na dose de 60 mg, com amostras de sangue coletadas em tempos pré-determinados para obtenção do perfil plasmático. Os parâmetros farmacocinéticos como ASC, C_{max} e t_{max} foram determinados para as duas formulações. Os comprimidos de liberação prolongada demonstraram maior ASC, menor C_{max} e maior t_{max} . O aumento da ASC demonstra um aumento na extensão da absorção e da ação, o maior t_{max} demonstra uma menor velocidade de absorção e o menor C_{max} pode sugerir uma menor toxicidade da PQ. A biodisponibilidade relativa dos comprimidos de liberação prolongada em relação aos de liberação imediata foi de 227,70 %, demonstrando que a formulação teste foi mais biodisponível.

Unitermos: Primaquina, comprimidos de liberação prolongada, estabilidade, validação de método bioanalítico, biodisponibilidade.

ABSTRACT

POLY (ETHYLENE) OXIDE MATRIX TABLETS CONTAINING THE ANTIMALARIAL PRIMAQUINE: STABILITY STUDY AND IN VIVO EVALUATION.

The primaquine (PQ) is the choice of antimalarial drugs to prevent relapse and to provide the radical cure of *Plasmodium vivax*. The development of extended-release dosage forms represents a promising alternative for the optimization of dosing program and reducing the side effects. Through the work entitled "Development and evaluation of poly(ethylene) oxide matrix containing the antimalarial primaquine", were produced extended release tablets containing PQ (CRUZ, 2006). The formulations contained 30 or 60% of the polymer molecular weight of the of 4×10^6 Da or 8×10^6 Da. Parameters like swelling, erosion and dissolution were evaluated, indicating that the formulation contained 30% of POE of 8×10^6 Da as more appropriate. In the present work, this formulation was submitted to quality control, stability study and biodisponibility evaluation in dogs. The physical-chemical characterization of PQ raw materials (RMs) from four different suppliers were realized on the quality and drug content. The identification was positive for all RMs. The assay was determinate by potentiometric titration and by high performance liquid chromatography (HPLC). By titration, the content of RMs ranged from 98.8 to 101.1%, in accordance with the pharmacopoeia specifications. By HPLC, two of the four MPs demonstrated inadequate content (90.7% and 93.1%), and the presence of an impurity, possibly an isomer of position. The stability of RMs in the oven at 80 °C, 100 °C and 120 °C was evaluated, and all followed zero order decomposition kinetics. Using the Arrhenius plot method, differences were observed between the constant speed of degradation in the temperature of 25 °C (K_{25}) and between the activation energy of RMs. The tablets were produced with the MP C, followed by the determination of physical parameters of the formulation. The assay of the tablets was $94.45\% \pm 0.61\%$ ($n = 20$), in accordance with the pharmacopoeia limits. The stability study covered different conditions and packaging materials for the determination of kinetic parameters. In oven at 80 °C, 100 °C and 120 °C, the formulation exhibited a zero order kinetic degradation, and the drug content decreased more rapidly with the temperature increased. In climatic chamber (40 °C and 75% relative humidity) and chamber of UV ($\lambda = 254$ nm), the tablets were exposed without packaging, in blister and in amber plastic bottles. The largest degradation occurred in tablets without packaging, and the blisters and plastic bottles were not sufficient to contain the degradation provided by moisture and light excess. In climatic chambers and UV light, the tablets had decomposition greater than 10% in 6 months. The humidity and light were the most important factors in the drug and formulation degradation, rather than the temperature. For the assessment of the formulation *in vivo*, beagle dogs were used and a bioanalytical method for the analysis of PQ in plasma was developed and validated. The extraction of interest analytes from plasma was performed in solid phase. The method by HPLC proved to be specific, linear in the range 75 to 3000 ng / mL, accurate, precise and stable (short term, long term, after cycles of freezing / thawing and post-processing) within the experimental conditions tested. The recovery rates were appropriate for PQ and internal standard, showing up close to 100%. The extended-release behavior of tablets was compared to that of immediate-release, available in the market. They were administered orally to dogs at a dose of 60 mg, and blood samples collected at pre-determined times, to obtain the plasma profile. The pharmacokinetic parameters as AUC, C_{max} and T_{max} were determined for both formulations. The extended-release tablets demonstrated greater ASC, lower C_{max} and increased T_{max} . The increase in ASC shows an increase in the extent of absorption and action, the greater T_{max} shows a lower rate of absorption and lower C_{max} may suggest a lower toxicity of PQ. The relative bioavailability of extended-release tablets for immediate release was 227.70%, demonstrating that the test formulation was more bioavailable.

Key words: Primaquine, extended release tablets, stability, bioanalytical method validation, bioavailability

Lista de Figuras

Figura 1	Malária no mundo.	08
Figura 2	Estrutura do sal difosfato de primaquina.	13
Figura 3	Principal rota para síntese de primaquina e da substância relacionada quinocida.	26
Figura 4	Curva DSC das MPs em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/ min) e razão de aquecimento de 2 °C/ min.	34
Figura 5	Espectros de absorção na região do IV obtidos a partir das MPs A, B, C e D de PQ.	36
Figura 6	Espectro de absorção na região UV/VIS das MPs.	39
Figura 7	Difratogramas obtidos para as MPs A, B, C e D de PQ.	41
Figura 8	Fotomicrografias das MPs A, B, C e D no aumento de 400 e 800 x.	43
Figura 9	Cromatogramas obtidos a partir da SQR e das MPs A, B, C e D de PQ.	46
Figura 10	Gráfico representativo do teor (%) <i>versus</i> o tempo (dias) das MPs na temperatura de 120 °C.	59
Figura 11	Curvas TG e gráfico de Ozawa obtidas a partir das cinco razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não isotérmico.	67
Figura 12	Curvas TG e gráfico de Ozawa de PQ obtidas a partir das cinco razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de ar no método não isotérmico.	67
Figura 13	Curvas TG isotérmicas de PQ obtidas nas temperaturas 220, 215, 210, 205 e 200 °C sob atmosfera de nitrogênio.	68
Figura 14	Curvas TG isotérmicas de PQ obtidas nas temperaturas 220, 215, 210, 205 e 200 °C sob atmosfera de ar.	69
Figura 15	CLPs depois de 13 dias na câmara climática em (A) Sem embalagem; (B) Blíster; e (C) Frasco.	87
Figura 16	CLPs depois de 13 dias na câmara UV em (A) Sem embalagem; (B) Blíster; e (C) Frasco	87

Figura 17	CLPs depois de 170 dias em condições de estresse nas câmaras climáticas: (A) CLP sem embalagem; (B) CLP blíster; (C) CLP frasco, e nas câmaras UV: (D) CLP sem embalagem; (E) CLP blíster; (F) CLP frasco, e (G) CLP no tempo zero (sem degradação). MP C depois de 137 dias em condições de estresse nas câmaras climáticas (H) e câmara UV (I).	88
Figura 18	Dureza dos CLPs nas câmaras climáticas e UV, durante o estudo de estabilidade.	89
Figura 19	Perfis de dissolução dos CLPs obtidos no tempo zero e depois de 136 dias expostos na câmara climática e na câmara de luz UV, sem embalagem, nos blísters e nos frascos plásticos.	91
Figura 20	Etapas percorridas por um medicamento quando administrado por via oral.	95
Figura 21	Curva representativa da concentração plasmática no tempo depois da administração oral de um fármaco.	97
Figura 22	Desenho esquemático de um cartucho SPE.	100
Figura 23	Etapas envolvidas no procedimento experimental da SPE: (1) condicionamento/ ativação do adsorvente (cartucho); (2) aplicação da amostra que deve ficar retida no adsorvente (etapa de sorção/ retenção), representada pelas letras “a”, “b” e “c”, onde “a” é o analito de interesse e “b” e “c” equivalem aos interferentes; (3) lavagem e remoção dos interferentes; (4) eluição dos analitos de interesse do adsorvente com solvente apropriado (etapa de dessorção/ eluição).	101
Figura 24	Cromatogramas obtidos para análise da especificidade do método de diferentes plasma de cães <i>Beagles</i> (A) Plasma branco; (B) Plasma lipêmico; (C) Plasma hemolisado; (D) Plasma contendo 75 ng/ mL de PQ e 15 µg/ mL de PI (bromoprida). Condições analíticas: coluna C ₁₈ (250 x 4.6 mm - 5 µm), fase móvel: acetonitrila:metanol:água:ácido	117

acético (18:3.5:78:0.5; v/v), pH 2,75, 254 nm.

Figura 25 Curva de calibração média da PQ obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta. **118**

Figura 26 Curva de concentração plasmática de CLI e CLP de PQ em função do tempo (h), obtidas da média de 6 cães *Beagles* que receberam por via oral uma dose de 60 mg de PQ. **123**

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resultados de caracteres físicos, solubilidade e perda por dessecação das MPs A, B, C e D.	33
Tabela 2	Faixas de fusão obtidas através da DSC para as MPs.	34
Tabela 3	Tipo e freqüências de vibrações das bandas de absorção na região do IV para o difosfato de primaquina descritas por Clarke's em 2004 e Al-Badr em 2005.	37
Tabela 4	Valores de ABS obtidos através da espectroscopia na região do UV/VIS para as MPs A, B, C e D.	38
Tabela 5	Resultados de teor obtidos pela titulação em meio não aquoso para todas as MPs de PQ	45
Tabela 6	Valores de teor (%) das MPs A, B, C e D de PQ em relação à SQR.	47
Tabela 7	Teor das MPs obtidos pelas análises em estufa a 80 °C.	55
Tabela 8	Teor das MPs obtidos pelas análises em estufa a 100 °C.	56
Tabela 9	Teor das MPs obtidos pelas análises em estufa a 120 °C.	56
Tabela 10	Coefficiente de correlação (R^2) obtidos a partir dos gráficos construídos.	58
Tabela 11	Valores de K obtidos para as temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C calculados para cada MP conforme equação de zero ordem.	61
Tabela 12	Valores de K_{25} e de E_a obtidos para as MPs.	61
Tabela 13	Parâmetros cinéticos obtidos no método não isotérmico sob ambas as atmosferas.	68
Tabela 14	Parâmetros cinéticos obtidos no método isotérmico em ambas as atmosferas.	69
Tabela 15	Testes físicos realizados com os CLPs	80
Tabela 16	Uniformidade do conteúdo de 10 comprimidos.	81
Tabela 17	Teor (%) dos CLP em estufa nas temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C.	82
Tabela 18	Teor (%) dos CLP em câmara climática e câmara de luz UV.	84
Tabela 19	Teor (%) da MP C em câmara climática e câmara de luz UV.	85
Tabela 20	Peso médio dos CLPs durante os estudos de estabilidade	90

	acelerada e fotoestabilidade.	
Tabela 21	Perfis de dissolução das câmaras climáticas e de luz UV comparados entre si através de f1 e f2.	92
Tabela 22	Resumos de trabalhos de métodos desenvolvidos em matrizes biológicas para primaquina encontrados na literatura.	103
Tabela 23	Recuperação de PQ depois do procedimento de extração.	119
Tabela 24	Precisão e exatidão intra e inter dias para a determinação de PQ em plasma de cães.	120
Tabela 25	Resultados da estabilidade de PQ em plasma de cães.	122
Tabela 26	Valores dos parâmetros farmacocinéticos dos CLIs e CLPs obtidos de 6 cães <i>Beagles</i> após ingestão de 60 mg de PQ.	124
Tabela 27	Análise estatística das razões individuais entre grupos da $ASC_{[0-\infty]}$ e C_{max} e das diferenças individuais de t_{max} para a PQ.	126

Lista de Abreviaturas

ABS	Absorbância
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área Sob a Curva
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLI	Comprimido de Liberação Imediata
CLP	Comprimido de Liberação Prolongada
CLUP	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
C_{max}	Concentração máxima
CME	Concentração Mínima Eficaz
CMT	Concentração Mínima Tóxica
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRX	Difração de Raios- X de pó
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
E_a	Energia de Ativação
EFS	Extração em Fase Sólida
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMAP	<i>Global Malarie Action Plan</i>
GMP	<i>Global Malarie Programe</i>
G6FD	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
HCl	Ácido Clorídrico
IC	Intervalo de Confiança
ICH	<i>International Conference of Harmonization</i>
IV	Infravermelho
K	Constante de Velocidade
K₂₅	Constante de velocidade na temperatura de 25 °C
K_e	Constante de Eliminação Terminal
KBr	Brometo de Potássio
LD	Limite de Detecção

LQI	Limite de Quantificação Inferior
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MP	Matéria-prima
NaOH	Hidróxido de Sódio
PI	Padrão Interno
PF	Ponto de Fusão
PNCM	Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária
POE	Polióxido de etileno
PQ	Primaquina
R²	Coeficiente de Correlação
RENAME	Relação de Medicamentos Essenciais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por Minuto
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
t₉₀ %	Tempo necessário para que o teor do fármaco reduza a 90 %
T_{1/2}	Tempo de Meia-vida de Eliminação
TG	Termogravimetria
T_{max}	Tempo máximo
UR	Umidade Relativa
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
WHO	<i>World Health Organization</i>

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	01
OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS	05
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA	
1	07
1.1	08
1.2	10
1.3	11
1.4	11
1.5	13
1.5.1	13
1.5.2	14
2	17
3	19
CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	
1	23
2	28
3	28
3.1	28
3.2	29
3.2.1	29
3.2.2	29
3.2.3	30
3.3	30
3.4	30
3.5	30
3.5.1	30
3.5.2	31
3.5.2.1	31

4	Resultados e Discussões	32
4.1	Caracteres físicos, solubilidade, perda por dessecação e faixa de fusão	32
4.2	Ensaio de Identificação	35
4.2.1	Espectro de absorção na região do infravermelho (IV)	35
4.2.2	Espectro de absorção na região do ultravioleta (UV) e do visível (VIS)	37
4.2.3	Reações ao íon fosfato	39
4.3	Difração de raios- X de pó (DRX)	39
4.4	Avaliação morfológica	42
4.5	Doseamento	44
4.5.1	Titulação em meio não-aquoso	44
4.5.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	44
5	Conclusões	48

CAPÍTULO 3- ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DAS MATÉRIAS-PRIMAS DE PRIMA5QUINA

1	Introdução	51
2	Metodologia	54
3	Resultados e Discussões	55
4	Conclusões	62

CAPÍTULO 4 – ESTUDO DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DA MATÉRIA-PRIMA DE PRIMAQUINA (MP C) POR TERMOGRAVIMETRIA

1	Introdução	64
2	Materiais	65
3	Métodos	65
4	Resultados e Discussões	65
5	Conclusões	70

CAPÍTULO 5 – DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE COMPRIMIDOS MATRICIAIS DE PRIMAQUINA

1	Introdução	72
2	Materiais	73

3	Métodos	74
3.1	Preparação dos comprimidos	74
3.2	Avaliação física dos comprimidos	74
3.2.1	Determinação do peso médio	74
3.2.2	Determinação da dureza	74
3.2.3	Determinação da friabilidade	75
3.2.4	Doseamento dos comprimidos	75
3.2.5	Uniformidade de conteúdo	76
3.3	Estudo de estabilidade dos comprimidos de liberação prolongada	76
3.3.1	Estudo de degradação forçada a 80 °C, 100 °C e 120 °C	77
3.3.2	Estudo de estabilidade acelerada e de fotoestabilidade	77
3.3.2.1	Ensaio de dissolução	78
4	Resultados e Discussões	79
4.1	Avaliação física dos comprimidos	79
4.1.1	Doseamento dos comprimidos	80
4.1.2	Uniformidade de conteúdo	81
4.2	Estudo de estabilidade dos comprimidos de liberação prolongada	82
4.2.1	Estudo de degradação forçada a 80 °C, 100 °C e 120 °C	82
4.2.2	Estudo de estabilidade acelerada e de fotoestabilidade	83
4.2.2.1	Ensaio de dissolução	90
5	Conclusões	93
CAPÍTULO 6 – DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO		
1	Introdução	95
2	Materiais	104
3	Métodos	104
3.1	Condições cromatográficas	104
3.2	Preparo das soluções padrões e curva de calibração	105
3.3	Extração em fase sólida (EFS) da PQ contida no plasma	105
3.4	Validação do método	106
3.4.1	Especificidade	106
3.4.2	Linearidade (curva de calibração)	107

3.4.3	Limite de detecção (LD) e de quantificação inferior (LQI)	107
3.4.4	Recuperação	107
3.4.5	Precisão e exatidão	108
3.4.6	Estabilidade do fármaco na matriz biológica	108
3.4.6.1	Processamento das amostras biológicas	108
3.4.6.2	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento	108
3.4.6.3	Estabilidade de curta duração	109
3.4.6.4	Estabilidade de longa duração	109
3.4.6.5	Estabilidade pós-processamento	110
3.4.6.6	Análise dos resultados	110
3.5	Estudo pré-clínico em cães	110
3.5.1	Protocolo experimental	110
3.5.2	Metodologia analítica	111
3.5.3	Cálculo das concentrações	111
3.5.4	Análise farmacocinética e estatística	112
4	Resultados e Discussões	113
4.1	Desenvolvimento do método	113
4.1.1	Precipitação de proteínas	113
4.1.2	Extração líquido-líquido	114
4.1.3	Extração em fase sólida (EFS)	115
4.2	Validação do método	116
4.2.1	Especificidade	116
4.2.2	Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação inferior (LQI)	117
4.2.3	Recuperação	119
4.2.4	Precisão e exatidão	119
4.2.5	Estabilidade do fármaco na matriz biológica	121
4.3	Estudo pré-clínico em cães – Análise farmacocinética	123
5	Conclusões	127
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
	APÊNDICES	143

APÊNDICE 1: Artigo Submetido: Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions **144**

Jornal: Journal of Thermal Analysis and Calorimetry

APÊNDICE 2: Artigo Submetido: Development and Validation of a SPE –LC Method for Determination of Primaquine Extended Release Tablets in Beagle Dog Plasma **156**

Jornal: Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies

INTRODUÇÃO GERAL

As doenças tropicais normalmente estão relacionadas a regiões não desenvolvidas do globo e são negligenciadas pelas indústrias farmacêuticas, sendo alvo de muitos pesquisadores (VALE; MOREIRA; GOMES, 2009). A malária é uma doença infecciosa, causada por um protozoário unicelular do gênero *Plasmodium*, que é transmitida através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, produzindo febre além de outros sintomas.

Muitas estratégias e programas globais, como o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM), *Global Malaria Programme* (GMP) e *Global Malaria Action Plan* (GMAP) já foram implementados, visando à eliminação ou redução de riscos de adoecer ou morrer de malária, além da erradicação da doença (MS; FUNASA, 2001; WHO, 2008a; WHO, 2009). Entranto, apesar dos resultados positivos, ainda é um desafio fazer com que essas ações cheguem para todos os que dela necessitem. A prevalência da doença mostra números que estão longe de ser negligenciáveis, sendo importantes ações de fortalecimento das estratégias de intervenções desses programas. Dentro das estratégias adotadas, a prevenção e o tratamento correto são itens fundamentais para obter a erradicação (MS; FUNASA, 2001; WHO, 2006b). Além disso, as estimativas dos números de casos e de óbitos, em muitos países, são muito imprecisas para planejar e avaliar o sucesso das medidas de controle. (WHO, 2008b).

Dessa maneira, novos esquemas de controle e combate à malária, como novos medicamentos, novas formas farmacêuticas e métodos alternativos como a vacinação, por exemplo, são essenciais.

A primaquina é utilizada na prevenção da transmissão e quimiopprofilaxia da malária (RANG et al., 2004). Mostra-se efetiva contra os estágios hepáticos de todos os tipos de parasitas, e é usada para prover a cura radical, evitando gastos com novos tratamentos e permanência de fontes de infecção de malária (BAIRD; FRYAUFF; HOFFMAN, 2003; WHO, 2008b). Entretanto, a primaquina possui diversos efeitos adversos, e sua toxicidade tem se tornado um problema. Além disso, a falta de adesão do paciente ao tratamento pode levar a concentrações sub-terapêuticas que levam a resistência do parasita ao fármaco. (DOHERTYET et al., 1997; BAIRD; RIECKMANN, 2003).

Os comprimidos de liberação prolongada objetivam o prolongamento do tempo de ação farmacológica, diminuição de reações adversas, manutenção da

eficácia terapêutica, otimização da aderência ao tratamento e minimização das flutuações plasmáticas (LEE; ROBINSON, 2000; ALLEN et al., 2005; AULTON, 2005).

Apesar de existirem estudos envolvendo novos sistemas farmacêuticos contendo a primaquina, como por exemplo lipossomas (PIRSON et al., 1980; ALVING et al., 1980; STENSRUD et al., 2000), nanopartículas (LABHASETWAR; DORLE, 1990; GASPAR; PREAT; ROLAND, 1991; MBELA; POUPAERT; DUMONT, 1992; RODRIGUES Jr et al., 1995; BHADRA et al., 2005), microesferas (STJARNKVIST, 1993; BORISSOVA et al., 1995; NISHI; JAYAKRISHNAN, 2004) e sistemas de distribuição transdérmico (MAYORGA; PUISIEUX; COUARRAZE, 1996; MAYORGA et al., 1997, 1998; MORRIS et al., 1998; JEANS; HEARD, 1999; HEARD; MONK; MODLEY, 2003) nenhum desses sistemas encontram-se comercialmente disponíveis.

O desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação prolongada, como sistema matricial monolítico mostra-se uma alternativa promissora na otimização do esquema posológico. Além disso, as formas farmacêuticas sólidas destinadas à administração oral apresentam as vantagens de facilidade de produção (etapas tecnológicas simples e de baixo custo) e deglutição, e precisão de dosagem.

Através da dissertação de mestrado intitulada “Desenvolvimento e avaliação de matrizes de polióxido de etileno (POE) contendo o antimalárico primaquina”, foram desenvolvidos comprimidos de liberação prolongada contendo primaquina (CRUZ, 2006). As formulações desenvolvidas continham 30 ou 60 % de POE de peso molecular de 4×10^6 g/ mol ou 8×10^6 g/ mol. Neste estudo foram desenvolvidas e validadas metodologias de análise de teor dos comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria na região do ultravioleta (UV). As matrizes hidrofílicas desenvolvidas foram avaliadas quanto ao intumescimento, erosão e dissolução. Os resultados indicaram que a melhor formulação desenvolvida foi a que continha 30 % do POE de 8×10^6 g/ mol.

No enfoque de controle de qualidade, a análise de produtos farmacêuticos deve estar inserida em todas as etapas produtivas, desde a matéria-prima e insumos até o produto acabado, visando garantir produtos que satisfaçam às normas de identidade, pureza e atividade. Dessa forma, as análises a serem efetuadas devem contemplar aspectos como identificação e quantificação da substância ativa,

identificação e determinação dos níveis de impureza, produtos de degradação, e verificação da estabilidade da substância ativa na formulação, garantido a análise completa do produto (WATSON, 2003).

A avaliação da estabilidade de uma nova formulação desenvolvida deve ser realizada para verificação das características de degradação, e principalmente para a determinação das condições de armazenamento.

Sabe-se que os critérios que garantem a identidade, a pureza, o teor e a estabilidade dos medicamentos não são suficientes para assegurar a eficácia clínica dos mesmos. Não basta o medicamento ser tecnicamente perfeito, ele deve ser capaz de liberar o princípio ativo na quantidade e na velocidade apropriada ao seu objetivo terapêutico. Assim sempre que possível deve-se fazer a determinação quantitativa do fármaco no sangue total, plasma, soro e outros líquidos biológicos em função do tempo.

A avaliação da biodisponibilidade de novas formulações contendo ativos já utilizados na terapêutica é uma situação em que a utilização de animais em substituição ao homem pode ser feita desde que haja correlação entre os resultados obtidos empregando-se ambos os modelos (STORPIRTIS; CONSIGLIERI, 1995).

Diante do exposto, o escopo deste trabalho foi a continuação da avaliação da formulação desenvolvida por Cruz (2006). Para isso foram produzidos comprimidos de liberação prolongada de primaquina (contendo 30 % do POE de 8×10^6 g/ mol), avaliou-se a cinética de degradação e a estabilidade da formulação e do fármaco e, foi determinada a biodisponibilidade relativa dos comprimidos em estudo pré-clínico utilizando como modelo animal cães *Beagles*. Para avaliação da formulação *in vivo* foi desenvolvido e validado um método bioanalítico que contemplou os parâmetros de especificidade, recuperação, limites de quantificação e detecção, linearidade, exatidão, precisão (intra e inter-dias) e estabilidade (FDA, 2001).

OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade dos comprimidos de liberação prolongada de primaquina e a biodisponibilidade destes comprimidos em cães.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterização físico-química de matérias-primas de primaquina de diferentes fornecedores (MP A, MP B, MP C e MP D), quanto à pureza e teor de princípio ativo.
2. Produção dos comprimidos de liberação prolongada contendo 30 mg de primaquina e 30 % de polióxido de etileno 8×10^6 g/ mol, por compressão direta.
3. Análise farmacopéica dos comprimidos matriciais produzidos.
4. Estudo de estabilidade dos comprimidos desenvolvidos e das matérias-primas de primaquina, determinando os principais parâmetros cinéticos.
5. Avaliação dos parâmetros cinéticos de degradação da matéria-prima de primaquina (MP C) por termogravimetria.
6. Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de primaquina em plasma de cães.
7. Avaliação e comparação da biodisponibilidade dos comprimidos de liberação prolongada com os comprimidos de liberação imediata de primaquina, em estudo experimental em cães *Beagles*.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Considerações gerais sobre a malária

A malária, conhecida como paludismo, é um dos problemas de saúde coletiva mais graves nas regiões tropicais. Antes de ser descoberta em 1880 por Alphonse Laveran, 90 % da população mundial vivia em áreas endêmicas (WHO, 2008a). Apesar do elevado grau de desenvolvimento científico e tecnológico alcançado pela humanidade, os países tropicais e subtropicais não conseguiram controlar a malária (MS; FUNASA, 2001). Mundialmente, 3 bilhões de pessoas estão em constante risco de infecção em 109 países e territórios que possuem malária, e 250 milhões de casos de malária ocorrem anualmente, levando a aproximadamente 1 milhão de mortes (WHO, 2008b). Na África, a malária é uma das principais causas de mortalidade em crianças menores que cinco anos, mulheres grávidas e visitantes não imunes (CEESAY et al., 2008).

Na América Latina, o maior número de casos é verificado na Amazônia Brasileira, com registro de cerca de 500 mil casos/ano. No Brasil, mais de 60% do seu território possui condições de transmissão da malária ou está em fase de transmissão da doença. A Amazônia legal (divisão política que engloba: Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão) é responsável por 99,7% dos casos. Os Estados do Pará, Amazonas e Rondônia são responsáveis por 76% dos casos relatados, prevalecendo às infecções pelo *Plasmodium vivax* (80,8%) seguido pelo *P. falciparum* (19,2%) (MS; FUNASA, 2001).

Na figura 1, estão representadas as áreas onde ocorre a transmissão da malária no mundo.

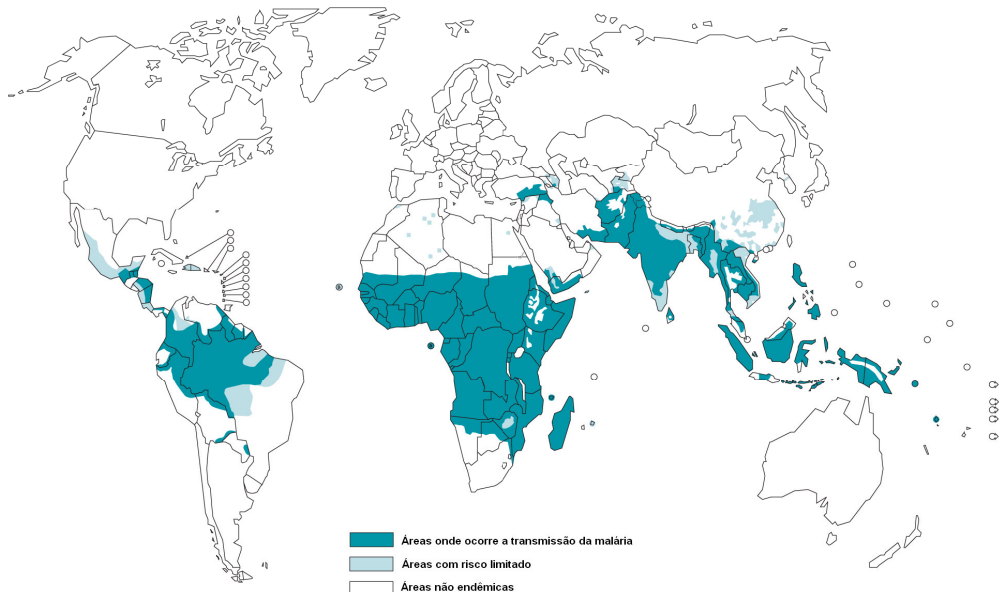


Figura 1. Malária no mundo (adaptada de WHO, 2006).

A malária humana, uma doença parasitária que tem como agentes etiológicos protozoários do gênero *Plasmodium*, é transmitida ao homem pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. (RANG et al., 2004). Raramente pode ser transmitida pelo compartilhamento de seringas (consumidores de drogas), transfusão de sangue, e até mesmo da mãe para o feto durante a gravidez (VEROSI; FOCACCIA, 1997).

1.1 Ciclo biológico dos plasmódios

São quatro as espécies de parasitas que causam a malária humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*. Nas quatro espécies, o ciclo de vida é essencialmente o mesmo. Apresentam uma fase sexuada exógena (esporogonia), com a multiplicação dos parasitas em mosquitos do gênero *Anopheles*, e uma fase assexuada endógena (esquizogonia), com a multiplicação no hospedeiro humano (FERREIRA, 2002).

A infecção inicia-se quando esporozoítos infectantes são inoculados no homem pelo inseto vetor. Estas formas desaparecem da circulação sangüínea dentro de 30 a 60 minutos para alcançarem os hepatócitos, onde evoluem. Após invadir o hepatócito, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos. Estes se multiplicarão por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e posteriormente a milhares de merozoítos que invadirão os eritrócitos. Esta primeira fase do ciclo é denominada exo-eritrocítica, pré-eritrocítica ou tecidual e, portanto, precede o ciclo sangüíneo do parasito (MS; FUNASA, 2001).

O desenvolvimento nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax*, o mosquito vetor inocula populações geneticamente distintas de esporozoítos: algumas se desenvolvem rapidamente, enquanto outras ficam em estado de latência no hepatócito, sendo, por isso, denominadas hipnozoítos (do grego *hypnos*, sono). Estes hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação, em geral dentro de seis meses para a maioria das cepas de *P. vivax*. O ciclo eritrocítico inicia-se quando os merozoítos teciduais invadem os eritrócitos. O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito se dá por esquizogonia, com formação de merozoítos, que se multiplicam por divisão binária, até que são liberados na circulação após ruptura do eritrócito, para em seguida invadirem novas células. Depois de algumas gerações de merozoítos sangüíneos, algumas formas se diferenciam em estágios sexuais, os gametócitos, que não mais se dividem e que seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor, dando origem aos esporozoítos. O ciclo sangüíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas, nas infecções pelo *P. falciparum* e *P. vivax*, e a cada 72 horas nas infecções pelo *P. malariae*. A malária por *P. ovale*, ocorre apenas no continente africano, e deve ser tratada da mesma forma que a malária por *P. vivax* (MS; FUNASA, 2001).

1.2 Manifestações clínicas da malária não complicada e complicada

O período de incubação da malária varia de acordo com a espécie de plasmódio, sendo de 8 a 12 dias para *P. falciparum*, 13 a 17 para *P. vivax* e 28 a 30 dias para *P. malariae*. A fase inicial é sintomática caracterizada por sintomas como mal-estar, cefaléia, cansaço e mialgia, que precedem a clássica febre da malária. O ataque paroxístico inicia-se com calafrio que dura de 15 minutos à uma hora, sendo seguido por uma fase febril, com temperatura corpórea podendo atingir 41 °C ou mais. Após um período de duas a seis horas, ocorre diminuição da febre, sudorese profusa e fraqueza intensa. Em seguida, a febre assume um caráter intermitente, dependente do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* e 72 horas para *P. malariae*. Entretanto, a constatação desta regularidade é pouco comum nos dias atuais, em decorrência de tratamento precoce, infecção por populações distintas de plasmódios e infecção em primoinfectados por retardo da resposta imune específica (MS; FUNASA, 2001).

A malária pode ser dividida em não complicada e grave/ou complicada. Na malária não complicada, as manifestações clínicas na fase aguda são comuns às quatro espécies que parasitam o homem e, em geral, os acessos maláricos são acompanhados de intensa debilidade física, febre, náuseas e vômitos. Na malária grave ou complicada as manifestações clínicas são mais graves, podendo ser fatal no caso de *P. falciparum* e que, em geral, é função do nível de parasitemia. Sintomas como hipoglicemia, convulsões, vômitos repetidos, hiperpirexia, icterícia e distúrbio da consciência, são indicadores de pior prognóstico e podem preceder às seguintes formas clínicas: malária cerebral (cefaléia, hipertermia, vômitos e sonolência) que pode evoluir para um quadro de coma, com pupilas contraídas e alteração dos reflexos profundos; insuficiência renal aguda (redução do volume urinário, aumento da uréia e da creatinina plasmáticas); edema pulmonar agudo (síndrome da angústia respiratória do adulto); hipoglicemia; disfunção hepática; hemoglobinúria (hemólise intravascular aguda maciça, urina cor de coca-cola, vômitos biliosos e icterícia intensa) (MS; FUNASA, 2001).

Para o diagnóstico da malária grave, algumas características clínicas devem ser observadas atentamente: hiperparasitismo, anemia grave, icterícia, hipertermia

mantida, distúrbios hidroeletrólíticos e do equilíbrio ácido-base, insuficiência respiratória, insuficiência renal, alteração do nível de consciência, colapso circulatório, distúrbios hemorrágicos e da coagulação, hipoglicemia e coma.

1.3 Diagnóstico da malária

O diagnóstico da malária é baseado no exame clínico e confirmado por teste laboratorial, tal como, exame microscópico da gota espessa para demonstração de parasitas no sangue (WHO, 2006b; MS, 2005). Entretanto, os sintomas da malária são inespecíficos e similares aos de uma doença viral sistêmica. Dessa forma, no Brasil, em situações de epidemia e em áreas de difícil acesso da população aos serviços de saúde, conforme orientação dos programas oficiais de controle, indivíduos com febre são considerados portadores de malária.

A inexistência de uma única combinação de medicamentos efetivos contra ambas as espécies de *P. vivax* e *P. falciparum* (mais prevalentes no Brasil), juntamente com a dificuldade para diferenciar clinicamente a infecção por uma ou outra espécie, levam à necessidade de estabelecer o diagnóstico laboratorial específico para o tratamento adequado (MS; FUNASA, 2001).

1.4 Tratamento antimalárico

A terapêutica da malária não complicada visa curar a infecção aguda e prevenir as recaídas da doença através da eliminação dos plasmódios no sangue e tecidos, respectivamente (MS, 2006). Na escolha do esquema posológico, são consideradas a tolerabilidade, efeitos adversos e velocidade da resposta terapêutica (WHO, 2006b).

Na malária complicada, o objetivo primário é prevenir a morte, sendo secundário evitar os efeitos adversos e recaídas. No tratamento da malária cerebral, a prevenção de deficiência neurológica é fundamental. Em mulheres grávidas, salvar a vida da mãe é a prioridade (WHO, 2006b).

A decisão de como tratar o paciente com malária deve ser precedida de informações sobre a gravidade, espécie de plasmódio, idade do paciente (pior prognóstico na criança e no idoso), história de exposição anterior à infecção (indivíduos não imunes tendem a apresentar formas clínicas mais graves) e susceptibilidade dos parasitos aos antimaláricos convencionais.

A eficácia dos agentes antimaláricos varia entre as espécies de parasitas e entre estágios de seu ciclo de vida (RANG et al., 2004). Os agentes esquizotocidas sangüíneos são utilizados no tratamento da infecção aguda, atuando sobre as formas eritrocitárias do plasmódio. Nas infecções por *P. falciparum* ou *P. malariae*, que não apresentam estágio exoeritrocitário, esses fármacos produzem cura; no caso de *P. vivax* ou *P. ovale*, os fármacos suprimem a infecção, porém as formas exoeritrocitárias podem causar recidivas posteriores. Esse grupo de fármacos inclui quinina, mefloquina, cloroquina, halofantrina, sulfonas, pirimetamina, proguanil, atovaquona, artemeter, arteflene e artesunato. Alguns antibióticos, como tetraciclina e doxiciclina, podem ser combinados a esses agentes (TRACY; WEBSTER Jr, 2001; RANG et al., 2004; WHO, 2006b). Os agentes esquizotocidas teciduais (primaquina, tafenoquina) promovem a cura radical ao atuarem sobre os parasitas no fígado. Alguns fármacos também podem ser utilizados na prevenção da transmissão e quimioprofilaxia (RANG et al., 2004).

A resistência aos antimaláricos tem sido documentada para *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*. Ambos *P. vivax* e *P. malariae* tem desenvolvido resistência a cloroquina e *P. falciparum* tem sido resistente a quase todos antimaláricos (amodiaquina, cloroquina, mefloquina, quinina e sulfadoxina-pirimetamina), exceto para artemisina e seus derivados (WHO, 2006b). Os portadores de malária, após as primeiras doses do fármaco, tornam-se assintomáticos e tendem a abandonar o tratamento. O não cumprimento do tratamento pode levar ao desenvolvimento da resistência do protozoário ao agente antimalárico (WHO, 2009).

Para prevenir a resistência e obter êxito no tratamento, a World Health Organization (WHO) sugere a combinação de antimaláricos com diferentes mecanismos de ação e diversificados esquemas posológicos (WHO, 2006b).

1.5 Primaquina

1.5.1 Histórico

A quinina, primeiro antimalárico conhecido, é um alcalóide proveniente das cascas de árvores do gênero *Cinchona*, e seu uso iniciou-se no século 17. Os alcalóides derivados da quinina foram isolados em 1820. As 9-amino acridinas representam uma segunda classe de substâncias que derivaram antimaláricos sintéticos como, por exemplo, a quinacrina em 1934. A partir das estruturas iniciais da quinina e da quinacrina foram sintetizadas as moléculas dos grupos das 4-aminoquinolinas (estruturalmente similares a quinacrina); 8-aminoquinolinas (retêm o núcleo metoxiquinolino da quinina e da quinacrina); e as Quinolina – 4 metanol (porção similar a 4 quinolina metanol da quinina) (LEMKE, 2002).

A primaquina (PQ) foi sintetizada pela primeira vez nos Estados Unidos, durante a 2ª Guerra Mundial, com objetivo de combater a malária, doença de grande incidência na região do Pacífico. Esta, é uma molécula derivada da pamaquina, quimicamente conhecida como 8-(4-dietilamino-1-metilbutilamino)-6-metoxiquinolina, primeiro derivado 8-aminoquinolínico produzido em laboratório, na década de 1920, na Alemanha (BAIRD; RIECKMANN, 2003). A PQ mostrou-se eficiente no ataque contra os parasitas e foi introduzida definitivamente como fármaco anti-malárico em 1952 (Figura 2) (BAIRD; FRYAUFF, HOFFMAN, 2003; BAIRD; HOFFMAN, 2004; FDA, 2005, DRUG POINTS SYSTEM, 2005).

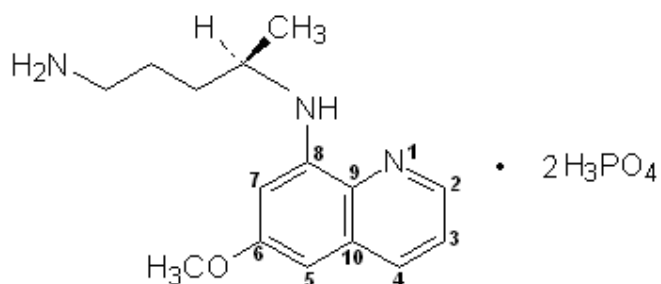


Figura 2. Estrutura do sal difosfato de primaquina.

Este medicamento encontra-se disponível na forma de comprimidos de 15 mg (KOROLKOVAS, 2004) e comprimidos revestidos de 15 mg e 7,5 mg (DRUGDEX DRUG EVALUATIONS, 2005), sendo apresentado na Relação Nacional de Medicamentos Essências (RENAME) de 2008 na concentração de 5,0 mg e 15,0 mg de base como difosfato (equivale a 8,8 mg e 26,4 mg do sal, respectivamente) (MS; FUNASA, 2001; BRASIL, 2008).

1.5.2 Metabolismo, ação e farmacocinética

A PQ é ativa contra gametócitos de todas as espécies de malária humana e contra hipnozoítos (presentes no fígado na forma latente) do *P. vivax* e *P. ovale*, prevenindo as recaídas e promovendo a cura radical da malária (TRACY; WEBSTER Jr, 2001; WHO, 2006b). Também é utilizada para profilaxia em indivíduos que retornam de áreas com incidência de malária (BAIRD; FRYAUFF, HOFFMAN, 2003; CDC, 2005) e, em combinação com clindamicina, para o tratamento de pneumonias ocasionadas por *Pneumocystis carinii*, adquirida principalmente por pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (KLASCO, 2005; BRASIL, 2008). Atua também contra as fases assexuadas sangüíneas, mas somente em doses elevadas são consideradas tóxicas. Pode ser empregada em controle de epidemias, porém sempre em simultaneidade com outras medidas, incluindo o controle de vetores (MS; FUNASA, 2001).

O mecanismo de ação exato ainda não foi estabelecido, podendo-se considerar a ação da PQ por si mesma, ou mais provavelmente a ação de espécies reativas intermediárias, sobre o parasito, tais como espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, espécies estas que seriam formadas durante o processo metabólico da PQ (FLETCHER; BARTON; KELLY, 1988; VÁSQUEZ- VIVAR; AUGUSTO, 1994; LÓPES- ANTUÑANO, 1999; BAIRD; HOFFMAN, 2004).

O metabolismo é complexo e não foi ainda compreendido de forma definitiva. Sua biotransformação envolve um processo de óxido-redução da molécula original, para a formação dos respectivos metabólitos, os quais provavelmente possuirão atividade oxidativa sobre os parasitas. Dentre os metabólitos sugeridos, não há um exclusivamente que tenha sido relacionado diretamente à ação da PQ contra

qualquer parasito (BAIRD; RIECKMANN, 2003; BAIRD; HOFFMAN, 2004). Quanto à forma de ação, sabe-se que alguns metabólitos, sendo espécies hidroxiladas ou radicalares e altamente reativas, aparentemente rompem as membranas mitocondriais do parasito, causando impossibilidade de respiração celular (BAIRD; RIECKMANN, 2003).

Um dos problemas enfrentados na determinação exata do metabolismo da PQ é a dificuldade de se isolar os seus metabólitos a partir de amostras biológicas, por extração com solventes, e a instabilidade dos mesmos, os quais são susceptíveis à decomposição oxidativa. A identificação de metabólitos isolados é dificultada também porque muito dos compostos têm características cromatográficas, ou espectrométricas muito parecidas (IDOWU; PEGGINS; BREWER, 1995).

A PQ é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal quando tomada por via oral, alcançando níveis plasmáticos máximos (50 a 104 ng/ mL) em 1-3 horas. É rapidamente metabolizada no fígado e uma pequena porção é excretada na forma inalterada na urina indicando extensa reciclagem intra-hepática. Apresenta meia-vida de eliminação de cerca de 3 a 6 horas, entretanto é comum ocorrer variações individuais no perfil farmacocinético. (MS; FUNASA, 2001). Apenas diminutas quantidades de fármaco permanecem depois de 24 horas e menos do que 1% do fármaco é excretado não modificado na urina. (BHATIA et al.,1986 *apud* SWEETMAN, 2005; KLASCO, 2005). A PQ distribui-se amplamente nos tecidos, porém apenas uma pequena quantidade liga-se nestes locais (KATZUNG, 1998).

Duas vias metabólicas importantes foram descritas para a PQ. Uma leva à formação de 5-hidroxiprimaquina e 5-hidroxidimetilprimaquina (ambas possuem ação antimalárica e causam a formação de metahemoglobina); a segunda via resulta na formação de N-acetilprimaquina e ácido desamino-carboxílico (denominado de carboxiprimaquina). A carboxiprimaquina é o principal metabólico em seres humanos, e resulta da α -oxidação do grupo amino primário, e é uma transformação extremamente rápida após administração intravenosa de PQ. A carboxiprimaquina é eliminada lentamente e se acumula no plasma com doses repetidas, e não parece ser ativa contra os plasmódios (KLASCO, 2005; SWEETMAN, 2005). Num estudo realizado por Dua e colaboradores (1996) em pacientes com malária *vivax*, foi observado que o nível de carboxiprimaquina aumentou depois da ingestão de 15 mg

de PQ/ dia/ 5 dias e o nível do fármaco permaneceu o mesmo no plasma e nas células sanguíneas, devido ao rápido metabolismo da PQ em carboxiprimaquina. As concentrações de carboxiprimaquina foram maiores nas células sanguíneas que no plasma, sugerindo que os eritrócitos é a maior rota de distribuição e metabolismo do fármaco e de seus metabólitos. Pacientes com malária *P. vivax* metabolizaram mais rapidamente a PQ em carboxiprimaquina que pacientes sadios (DUA et al., 1996).

Devido aos efeitos colaterais da PQ serem dose dependente, suas aplicações profiláticas e terapêuticas são limitadas (MS; FUNASA, 2001). Como efeitos colaterais relacionados com as doses terapêuticas, a PQ apresenta anorexia, náusea, vômito, dores abdominais e cólicas (CLYDE, 1981 *apud* SWEETMAN, 2005). Para diminuir esta irritação gástrica, recomenda-se a ingestão junto com as refeições (KOROLKOVAS, 2004). As reações adversas mais graves, com doses mais elevadas, estão relacionadas com o efeito da PQ nos elementos formados no sangue e medula óssea, resultando em leucopenia, anemia, supressão da atividade mielóide e meta-hemoglobinemia. A ação hemolítica da primaquina aumenta em pessoas com deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6FD) (MS; FUNASA, 2001; SWEETMAN, 2005).

A PQ é contra-indicada durante a gravidez devido ao risco de hemólise em fetos, que são deficientes de G6FD; em crianças menores de seis meses, pela mesma razão, e ainda porque pode causar hipoplasia ou aplasia medular (MS; FUNASA, 2001); e em qualquer afecção que predisponha à granulocitopenia, incluindo artrite reumatóide ativa e lúpus eritematoso.

Para o tratamento da malária, a PQ deve ser administrada juntamente com um esquizonticida sanguíneo (como por exemplo a cloroquina), pois ela tem baixa atividade contra as formas eritrocíticas assexuais do plasmódio que causa os sintomas clínicos (KLASCO, 2005). Contudo, é efetiva contra formas intra-hepáticas de todos os tipos de parasita maláricos (SWEETMAN, 2005). Quando administrada em conjunção com a cloroquina, a dose recomendada em adultos é 15 miligramas diariamente por 14 dias, ou 45 miligramas uma vez por semana por 8 semanas (DRUGDEX DRUG EVALUATIONS, 2005). Contudo, tem sido descrito recaídas de malária *vivax* depois deste tratamento padrão (ROMBO et al., 1987; ARIAS; CORREDOR, 1989; GASCON et al., 1994). Dohertyet e colaboradores analisaram esta baixa resposta ao tratamento de PQ, sugerindo um regime modificado de 15 mg

três vezes por dia (DOHERTYET et al., 1997). Neste caso foi possível reduzir o período de tempo de concentrações subterapêuticas no plasma, mas com o risco aumentado de efeitos adversos. Para algumas cepas de *P. vivax*, a dose de 22,5 a 30 mg diariamente por 14 dias pode ser requerida para a cura radical da malária. Para eliminar gametócito de *P. falciparum*, uma dose simples de 45 mg pode ser administrada (USP DI, 2005).

2 Formas farmacêuticas de liberação modificada

Para uma terapia adequada racional deve-se ajustar a administração do medicamento às necessidades do paciente, empregando quantidades equilibradas do princípio ativo, com objetivo de curar ou controlar um estado patológico (VILA-JATO, 2001).

Determinadas formas farmacêuticas sólidas são formuladas para liberar o fármaco no organismo de modo imediato, para que seja absorvido rapidamente, enquanto outras devem liberar o fármaco lentamente para que a ação seja prolongada. Dessa forma, as formas farmacêuticas de liberação prolongada são aquelas onde há um prolongamento do efeito terapêutico, onde a concentração plasmática é obtida e mantida durante um tempo maior do que uma forma farmacêutica convencional de liberação imediata. Adicionalmente, as de liberação controlada são aquelas em que a velocidade de liberação do fármaco é controlada com maior precisão em comparação com o produto de liberação prolongada (STORPIRTS et al., 1999; PASTRANA et al., 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; VILA-JATO, 2001; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2005).

Nas últimas décadas, a tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos tem sido amplamente investigada com a finalidade de compensar as desvantagens das formas farmacêuticas convencionais e apropriar a biodisponibilidade do fármaco, através do controle da velocidade de liberação e absorção máximas do fármaco (KHAN, 1995; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2005).

As formas farmacêuticas de liberação convencional ou imediata apresentam problemas relacionados à administração, como flutuações das concentrações

plasmáticas, tempo de ação efetiva reduzido, distribuição aleatória do fármaco no organismo e possibilidade da não aderência do paciente ao tratamento em função das inúmeras doses a serem administradas (PASTRANA et al., 2000; DING; ALAN; ROBINSON, 2005).

As vantagens potenciais na utilização dos sistemas de liberação modificada residem na redução ou eliminação de flutuações nos níveis plasmáticos e efeitos adversos locais ou sistêmicos do fármaco, proporcionando maior adesão do paciente à terapêutica. Propiciam também aumento da biodisponibilidade de fármacos susceptíveis à inativação enzimática ou decomposição bacteriana, através de encapsulação em sistemas poliméricos adequados. Para os fármacos que possuem locais específicos de absorção, o aumento da biodisponibilidade pode ser obtido localizando os sistemas de liberação em regiões específicas do trato gastrointestinal. Além disso, melhoram o controle da doença pois diminuem o tempo necessário para dispensar os medicamentos e monitorar os pacientes, o que leva redução do custo do tratamento a longo prazo (BALLARD, 1978; SAKS; GARDNER, 1997; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; DING; ALAN; ROBINSON, 2005; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2005; AULTON, 2005).

Os comprimidos matriciais são formas farmacêuticas de liberação modificada, onde o fármaco encontra-se disperso uniformemente num sistema constituído por uma ou várias substâncias polimerizadas, que podem ser de natureza hidrofílica, hidrofóbica (lipídica) ou inerte (materiais insolúveis de origem orgânica ou inorgânica) (VISCASILLAS et al., 1996; COSTA; LOBO, 1999; LEE; ROBINSON, 2000). A presença destes polímeros ou agentes formadores da matriz permitem ao comprimido resistência à desintegração (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Em geral, a matriz hidrata e intumescer, ou é parcialmente destruída ou dissolvida, quando em contato com fluído biológico. O comportamento depende, essencialmente, da natureza da matriz, porém o processo de preparação pode desempenhar um papel importante (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

O grupo de matrizes coloidais hidrofílicas, quando em contato com água, intumescem formando um gel pela transição do estado vítreo (“glassy”) para estado de borracha/ maleável (“rubbery”). O mecanismo de liberação do fármaco pode ser governado pela dissolução e/ou difusão do princípio ativo no sistema intumescido,

e/ou pela erosão do polímero com conseqüente liberação da substância (COLOMBO et al., 2000; AULTON, 2005).

3 Sistemas farmacêuticos de liberação modificada contendo primaquina

Alguns sistemas farmacêuticos com modificações na forma de liberação para a PQ têm sido investigados com o objetivo de melhorar a eficácia terapêutica e reduzir seus efeitos adversos.

Alguns estudos propuseram a incorporação de PQ em lipossomas visando direcionar o fármaco ao sítio de ação, no caso o fígado. Os lipossomas foram avaliados quanto à liberação *in vivo* (PIRSON et al., 1980), atividade contra *Leishmaniae visceral* (ALVING et al., 1980) e resposta a um gradiente de pH (STENSRUD et al., 2000). A eficiência de encapsulação foi dependente da composição lipídica do lipossoma, da capacidade tamponante interna e do tempo de incubação lipídio/ fármaco.

Outras tentativas de direcionar a ação da PQ envolveram a produção de nanopartículas. Labhasetwar e Dorle prepararam nanopartículas de albumina e gelatina aplicando a técnica de desnaturação a altas temperaturas e combinando emulsificação e congelamento, respectivamente (LABHASETWAR; DORLE, 1990). Gaspar e colaboradores desenvolveram nanopartículas de poli-isohexilcianoerilato empregando método de polimerização (GASPAR; PREAT; ROLAND, 1991), que foi posteriormente utilizado por Mbela e colaboradores para obter nanopartículas de poli(dietilmetilideno malonato) (MBELA; POUPAERT; DUMONT, 1992). Esta forma de liberação também foi produzida usando polilactídeo (RODRIGUES Jr et al., 1995) e glicodendrimeros de polipropileneimina (BHADRA et al., 2005), cujos estudos *in vivo* demonstraram uma adequada tolerabilidade e redução da toxicidade do fármaco.

Apropriadas biocompatibilidade, biodisponibilidade e biodegradação foram obtidas em estudos com biomateriais, como microesferas de PQ constituídas de amido (STJARNKVIST, 1993), polissacarídeos (BORISSOVA et al., 1995) e goma arábica (NISHI; JAYAKRISHNAN, 2004). Hofsteenge e colaboradores conjugaram, através de pontes de dissulfeto, PQ e uma proteína carreadora contendo grupos

piridilditio-propionato, alcançando um índice terapêutico 12 vezes maior do que o fármaco livre (HOFSTEENG et al., 1986). Um aumento do volume de distribuição da PQ (10 vezes maior do que o fármaco livre) também foi encontrado por Green e colaboradores, quando foi utilizada albumina como veículo de liberação (GREEN et al., 2004). A incorporação de PQ a eritrócitos e hepatócitos pelo processo de endocitose demonstrou ser promissora para o desenvolvimento de sistemas injetáveis (TALWAR; JAIN, 1992; BALAKRISHNAN; JAYAKRISHNAN, 2005).

Outros trabalhos utilizaram sistemas de distribuição transdérmico (MAYORGA; PUISIEUX; COUARRAZE, 1996; MAYORGA et al., 1997, 1998; MORRIS et al., 1998; JEANS; HEARD, 1999; HEARD; MONK; MODLEY, 2003) para alterar a forma de liberação da primaquina. Através destes sistemas, obteve-se uma adequada permeabilidade do fármaco com controle de sua liberação e redução de efeitos adversos.

Apesar desses diferentes sistemas farmacêuticos desenvolvidos, nenhum deles encontra-se comercialmente disponíveis. Devido à meia-vida biológica curta e os efeitos adversos, a PQ demonstrou ser um candidato ideal para preparações sólidas de liberação prolongada. Dessa forma, através da dissertação de mestrado intitulada “Desenvolvimento e avaliação de matrizes de polióxido de etileno (POE) contendo o antimalárico primaquina”, foram desenvolvidos comprimidos de liberação prolongada (CRUZ, 2006) visando o prolongamento da ação terapêutica, a otimização do esquema posológico, a facilidade de produção, administração e dosagem.

O POE é um polímero hidrofílico que foi selecionado para a obtenção dos comprimidos matriciais, devido a sua boa compressibilidade (YANG; VENKATESH; FASSIHI, 1996), por ser não tóxico (BALLANTYNE et al., 1998), não iônico, intumescível, de compatibilidade aceitável, insensível ao pH do meio biológico e de fácil produção, empregando tecnologias simples, e economicamente viáveis (DAWAN et al., 2005). No estudo de Cruz e colaboradores, foram analisados os comportamentos de intumescência, erosão e liberação de quatro formulações contendo 30 ou 60 % de POE de dois pesos moleculares (4×10^6 e 8×10^6 g/ mol), e 30 mg de PQ (base). Os melhores resultados *in vitro* foram obtidos com a formulação contendo 30 % de POE de 8×10^6 g/ mol (CRUZ, 2006; CRUZ et al., 2008a).

Sendo assim, este trabalho objetivou a continuação da avaliação da formulação, contando com a reprodução dos comprimidos (30 % de POE de 8×10^6 g/ mol), avaliação da estabilidade e cinética de degradação da formulação e do fármaco e, determinação da biodisponibilidade em estudo experimental pré-clínico utilizando como modelo animal cães *Beagles*.

***CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO DE MATÉRIAS-PRIMA DE
PRIMAQUINA***

1 Introdução

A caracterização físico-química de fármacos deve ser realizada antes do preparo da forma farmacêutica a fim de garantir que a matéria-prima utilizada apresente qualidade satisfatória. Para realizar esses estudos são utilizadas metodologias descritas em farmacopéias e outras que não são preconizadas por compêndios oficiais.

Em 1995, num estudo sobre a qualidade dos medicamentos antimaláricos utilizados na região amazônica, foi verificado que em 43% dos casos diagnosticados como infecções por *P. vivax* houveram recaídas. Os tratamentos incluíram a PQ (30 mg/ dia/ 7 dias) em associação com a cloroquina, amodiaquina, Fansidar (sulfadoxina 500 mg + pirimetamina 25 mg), ou quinina. Para observar se as recidivas estavam relacionadas ao medicamento ou à resistência do parasita, 12 amostras de PQ (9 fabricantes diferentes) utilizadas durante o estudo foram submetidas à análise química. Os resultados indicaram que 50% das amostras não estavam de acordo com os requisitos qualitativos e nenhuma estava de acordo com os requisitos quantitativos exigidos. A concentração química da substância ativa variou de 19-168% da concentração indicada no rótulo e amostras do mesmo lote variaram aleatoriamente em sua qualidade, indicando a falta de conformidade com boas práticas de fabricação na produção dos comprimidos. Dessa forma, as falhas no tratamento possivelmente estavam relacionadas à má qualidade química dos medicamentos e não à resistência dos parasitas aos antimaláricos (PETRALANDA, 1995).

A investigação, identificação e caracterização de impurezas e avaliação da toxicidade é um passo importante no desenvolvimento de um fármaco seguro e efetivo. Atualmente as dificuldades relacionadas a teor e uniformidade de conteúdo diminuíram, entretanto surgiram problemas devido à possibilidade da presença de contaminantes na matéria-prima PQ, resultantes do processo de síntese.

A PQ é descrita nas farmacopéias Brasileira, Portuguesa, Européia, Internacional, Americana e Britânica. De acordo com estes compêndios, o fármaco na temperatura de 25 °C apresenta-se como um pó cristalino laranja ou laranja avermelhado, de fraco odor, solúvel em água, praticamente insolúvel em álcool,

insolúvel em clorofórmio e em éter (SWEETMAN, 2005). O fosfato de primaquina possui a fórmula molecular $C_{15}H_{21}N_3O \cdot 2H_3PO_4$, peso molecular 455,34 g/ mol e pKa de 3,2 e 10,4 (STENSRUD et al., 2000; BONATO et al., 2002; CLARKE'S, 2004). Com base no sistema de classificação biofarmacêutica, a PQ é classificada como um fármaco classe I, ou seja, é uma substância com alta permeabilidade e alta solubilidade em meio aquoso (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

Na Farmacopéia Britânica de 1988 (adendo 1990), foi sugerido um método cromatográfico para as substâncias relacionadas, onde se aceitava no máximo 6%. Em 1993, o fármaco difosfato de primaquina começou a ser listado como difosfato de primaquina e enantiômero. Em 1993 (adendo 1997), passou-se a aceitar no máximo 3 % de substâncias relacionadas, critério válido até hoje (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007). As Farmacopéias Britânica e Européia descrevem o fármaco como PQ e enantiômero; entretanto o método para separação e quantificação dos enantiômeros e a natureza das substâncias relacionadas não são discutidas (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001; BRONDZ et al., 2004; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007; BRONDZ et al., 2007).

Em 1946, assumia-se que o principal contaminante da PQ era seu enantiômero (ELDERFIELD et al., 1946 *apud* BRONDZ et al., 2004). Entretanto alguns pesquisadores, através da utilização de técnicas analíticas avançadas e precisas como espectro de massas, ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência e co-cromatografia (utilizando colunas cromatográficas específicas), concluíram que o contaminante principal é o isômero posicional denominado quinocida, que possui uma metila no carbono 4 da cadeia lateral, enquanto que a PQ possui a metila no carbono 1 (Figura 3) (BRONDZ et al., 2004; BRONDZ et al., 2005; DONGRE et al., 2005; BRONDZ et al., 2007; BRONDZ; FIALKOV; AMIRAV, 2009).

A quinocida, conhecida quimicamente como 8-[4-amino-4-metil-butilamino)]-6-metoxiquinolino, também possui atividade antimalárica, com atividade contra os hipnozoítas, as formas teciduais, e as formas gametocidas (BRONZ et al., 2004). Na literatura encontram-se disponíveis artigos que descrevem métodos relacionados à separação desta impureza. A PQ e seu principal contaminante já foram separados usando cromatografia líquida de alta eficiência/ espectroscopia de massas (CLAE/ MS) (BRONDZ et al., 2004), cromatografia gasosa/ MS (CG/ MS) (BRONDZ et al.,

2005), cromatografia de fluido supercrítico/ ionização de elétronspray/ MS (SFC/ ESI/ MS) (BRONDZ et al., 2007), CG/ MS com feixe molecular supersônico (BRONDZ; FIALKOV; AMIRAV, 2009), CG/ impacto de elétrons/ MS (DONGRE et al., 2005), cromatografia líquida de ultra performance (CLUP) (DONGRE et al., 2007).

Brondz e colaboradores em 2004 descreveram uma possível rota de síntese da PQ e formação da quinocida. A formação da quinocida está relacionada a um rearranjo que pode ocorrer devido ao “ataque” da cadeia lateral ao sistema anelar. Na figura 3 estão demonstrados os estágios da síntese da PQ. Quando 1,4-dibromopentano é refluxado com ftalimido de potássio em solução de acetona, 1-ftalimido-4-bromopentano (**A**) é formado, então a condensação de A com 6-metoxi-8-aminoquinolino leva ao produto final primaquina. Quando o produto 1-ftalimido-1-metil-4-bromobutano (**B**) é formado, a condensação de **B** com 6-metoxi-8-aminoquinolino levam ao possível isômero posicional da PQ, a quinocida. Cada isômero posicional pode também ter um estereoisômero. Conseqüentemente, a produção de 4 substâncias é possível (BRONDZ et al., 2004). A formação do sal fosfato a partir do produto obtido é realizada pelo tratamento com ácido fosfórico e cristalização com metanol (DONGRE et al., 2005).

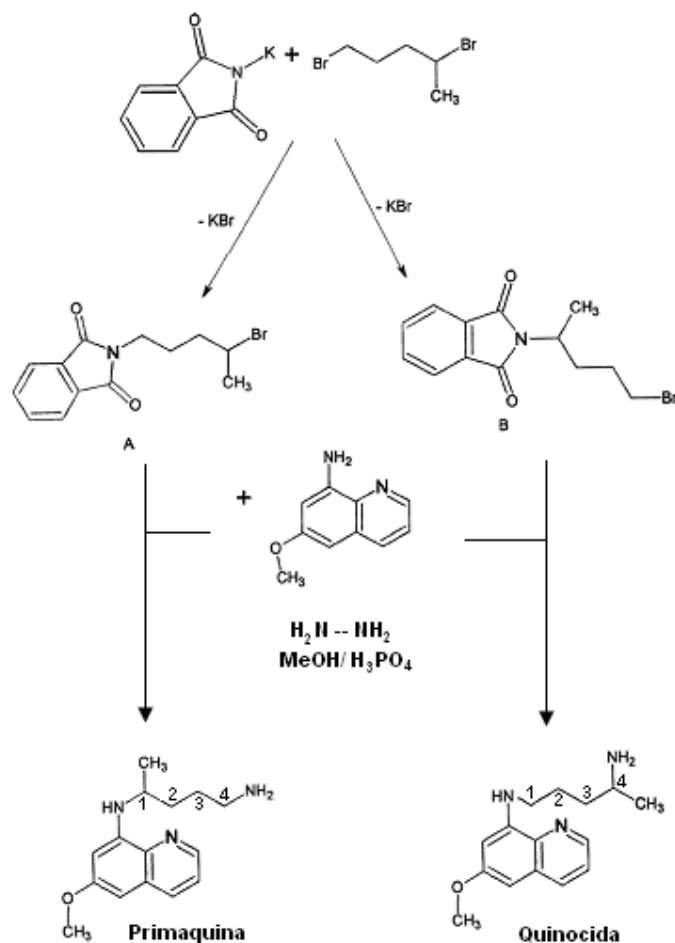


Figura 3. Principal rota para síntese de primaquina e da substância relacionada quinocida (adaptada de BRONDZ et al., 2004; DONGRE et al., 2005).

Os estereoisômeros da PQ e os isômeros posicionais possuem diferente metabolismo e toxicidade. Diferentes metabólitos são formados a partir da primaquina e do isômero posicional quinocida; eles são carboxiprimaquina e cetona quinocida, respectivamente (BRONDZ et al., 2004).

A definição para racêmico é reservada para uma combinação de quantidades iguais de dois enantiômeros (50 % de cada) cuja atividade óptica não desvia a luz polarizada nem para a esquerda (*L*- levógiro) e nem para a direita (*D*- dextrógiro). Apesar de existirem relatos na literatura que descrevem a PQ como racemato, Brondz e colaboradores (2004) não encontraram resultados que confirmassem esta

pureza óptica. Cada enantiômero deve girar o plano de luz polarizada na direção oposta, mas no mesmo ângulo. Os espectros de dicroísmo circular e UV obtidos pelos pesquisadores foram característicos de amostras opticamente ativas, não de racematos. Sendo assim, a PQ mostrou ser uma mistura de *D* e *L*-isômeros, com *L* predominante (BRONDZ et al., 2004).

A atividade biológica dos enantiômeros da PQ foi estudada e a capacidade dos isômeros e do racemato para curar infecções de *Plasmodium cynomolgi* em macacos rhesus foram idênticas. Por outro lado, foram encontradas diferenças na toxicidade onde o *L*-isômero mostrou ser 3-5 vezes mais tóxico que o *D*-isômero (SCHMIDT et al., 1977 *apud* BRONDZ et al., 2004).

As especificações em torno da pureza da PQ são muito menos rigorosas que diversos fármacos usados no tratamento de outras doenças. A identificação de impurezas e produtos tóxicos em fármacos deve ser estabelecida sem possibilidade de erros. Faz-se extremamente necessário o desenvolvimento de um procedimento analítico preciso para a determinação de contaminantes tóxicos em fármacos especialmente em casos onde há ausência de um padrão autêntico disponível comercialmente (BRONDZ et al. 2007).

Devido à alta contaminação das matérias-primas de PQ por quinocida, a *United States Pharmacopoeia* (USP) tem buscado propostas e alternativas para aprimorar os métodos descritos na monografia, substituindo os procedimentos deficientes, visando à utilização de padrões autênticos de primaquina e quinocida (BRONDZ; FIALKOV; AMIRAV, 2009).

Dessa maneira, este capítulo aborda a caracterização de matérias-primas de PQ de quatro diferentes fornecedores e a seleção daquela mais adequada para a produção de comprimidos de liberação prolongada.

2 Materiais

A substância química de referência (SQR) de difosfato de primaquina foi adquirida da U. S. Pharmacopoeia, Rockville (USA). Foram utilizadas nesse estudo de caracterização quatro matérias-primas (MP) de difosfato de PQ de diferentes fornecedores:

- **MP (A):** Fornecedor Sigma-Aldrich (Alemanha), Lote: 05607BD, Val: 10/2010
- **MP (B):** Fornecedor Xiamen Mchem Laboratories Ltd. (China); doada pela Farmanguinhos, n° registro: 37619, Val: 04/08
- **MP (C):** Fornecedor Shanghai Zhongxi Pharmaceutical Co. Ltd. (China), Lote: 20040408; doada pela Farmanguinhos, n ° Registro: 28007, Val: 04/08
- **MP (D):** Fornecedor Ipca Laboratories Limited (Índia), Lote: PP3016PQRJ; doada pela Farmanguinhos, n° Registro: 27096, Val: 06/07

3 Métodos

3.1 Caracteres físicos, solubilidade, perda por dessecação e faixa de fusão

Os caracteres físicos e solubilidade foram determinados de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV edição (2000).

Para a determinação da porcentagem de perda de água e possíveis voláteis nas MPs foi utilizado o método gravimétrico em estufa. Pesa-filtros (\varnothing 52 mm x 48 mm) previamente dessecados, pesados sem amostra e tarados foram adicionados de aproximadamente 1 g de MP A, B, C, D exatamente pesado. As amostras foram colocadas em estufa a 105 °C por 2 horas. Os resultados de três determinações foram analisados e a média foi expressa em porcentagem (USP 30, 2007).

Para determinação da faixa de fusão das matérias-primas, utilizou-se calorimetria exploratória diferencial (DSC). As curvas DSC foram obtidas em uma

cédula DSC-60 da Shimadzu utilizando cápsulas de alumínio hermeticamente fechadas com aproximadamente 2 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/ min) e razão de aquecimento de 2 °C/ min na faixa de temperatura de 25 a 250 °C. As determinações foram determinadas em triplicata. O equipamento foi previamente calibrado com índio (ponto de fusão = 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J/g}$) e zinco (ponto de fusão = 419,6 °C).

3.2 Ensaios de Identificação

3.2.1 Espectro de absorção na região do infravermelho (IV)

As amostras foram preparadas pela mistura de 2 % (p/p) do fármaco em brometo de potássio (KBr). Os espectros de absorção por reflexão difusa na região do IV foram realizados com o equipamento Shimadzu modelo FTIR Prestige, numa escala de 4000 e 400 cm^{-1} .

3.2.2 Espectro de absorção na região do ultravioleta (UV) e do visível (VIS)

Para a realização dos ensaios, foi utilizado o espectrofotômetro UV-VIS modelo Cary 50 Bio da marca Varian (USA) e cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Pesou-se 0,01 g em balão volumétrico de 100 mL das amostras e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,01M. As amostras foram analisadas na faixa de 310 a 450 nm. Destas soluções foram retiradas alíquotas de 5 mL, transferidas para balões volumétricos de 50 mL, completou-se o volume com o mesmo solvente e analisou-se na faixa de 215 a 310 nm (F. BRAS. IV, 2000).

3.2.3 Reações ao íon fosfato

Uma alíquota de 50 mg das amostras foi dissolvida em 5 mL de água. Foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 2 M, agitados com duas porções de 5 mL de clorofórmio, acidificando-se a camada aquosa com ácido nítrico (F. BRAS. IV, 2000).

3.3 Difração de raios- X de pó (DRX)

As amostras foram avaliadas através de difração de raios-X de pó utilizando difratômetro modelo Siemens D5000, com um tubo de cobre K α 40 kW e corrente de 40 mA, em intervalo de 3-65 (2θ) por segundo.

3.4 Avaliação morfológica

Foram realizadas fotomicrografias utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), em equipamento Phillips modelo XL30. As amostras foram previamente recobertas com ouro (350 Å) sob vácuo com auxílio do equipamento Polaron E 5000. As amostras foram analisadas na magnificação de 100x, 200x, 400x e 800x.

3.5 Doseamento

3.5.1 Titulação em meio não-aquoso

Pesou-se, exatamente, cerca de 0,2 g de cada amostra e dissolveu-se em 40 mL de ácido acético glacial, aquecendo moderadamente. Utilizou-se ácido perclórico 0,1 M SV como titulante e determinou-se o ponto final potenciometricamente. Cada mL de ácido perclórico 0,1 M SV equivale a 22,77 mg de difosfato de primaquina (F. BRAS. IV, 2000).

3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Procedeu-se conforme metodologia desenvolvida e validada (CRUZ et al., 2008b). O doseamento das MPs foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japan) equipado com bomba LC-10AD, detector UV SPD-10AV_{VP}, controlador SCL-10A_{VP}, degaseificador DGU-14A, forno CTO-10AS_{VP}, sendo a injeção da amostra realizada por uma válvula Rheodyne 7125 contendo *loop* de 20 µL. A detecção foi fixada em 254 nm e a área do pico integrada automaticamente pelo programa Shimadzu Class VP[®] V 6.14. Foi utilizada uma coluna C₁₈ de fase reversa (Phenomenex®, Torrance, USA), com 150 mm x 4,6 mm D.I. e tamanho de partícula de 5 µm, mantida a 35 ± 1 °C. A fase móvel foi constituída por uma mistura de acetonitrila: metanol: água: ácido perclórico 1M (33:6:87:1, v/v) pH 1,75 e fluxo de 1 mL/ min.

3.5.2.1 Preparo das soluções amostra e padrão

Para o preparo das soluções foi utilizada água ultra-pura obtida por um sistema de purificação Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, USA). Metanol e acetonitrila de grau HPLC foram adquiridos da Vetec[®] (Rio de Janeiro). Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

Foram transferidos exatamente cerca de 10 mg das MPs para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com água ultra-pura. Retirou-se uma alíquota de 1,25 mL desta solução para balão volumétrico de 25 mL, completou-se com água, obtendo uma solução na concentração de aproximadamente 20 µg/ mL. Para o preparo da solução padrão foi dissolvida quantidade de SQR de PQ exatamente pesada, em água ultra-pura para obter solução de concentração próxima a 20 µg/ mL.

As soluções preparadas foram injetadas em triplicata no cromatógrafo, os cromatogramas foram registrados e foram obtidas as áreas dos picos principais. A quantidade, em %, de PQ encontrada nas MPs foi calculada através da equação 1:

(equação 1)

$$\text{Teor}_{MP} = \frac{A_{MP} \times \text{teor}_{SQR}}{A_{SQR}}$$

Onde **Teor_{SQR}** é o teor da SQR (= 100%), **A_{SQR}** é a área da SQR e **A_{MP}** é a área da matéria-prima analisada.

Todos os valores de área utilizados foram na concentração de 20 µg/ mL para ser feita uma relação direta entre SQR e amostra. O teor das MPs deve estar entre 98,0 % e 102,0 % (F. BRAS. IV, 2000).

O porcentual de impureza presente em algumas MPs foi calculado em relação ao teor total, ou seja teor da impureza mais teor da MP, conforme equação 2:

(equação 2)

$$\text{Teor}_{IMP} = \frac{A_{IMP} \times (\text{teor}_{MP} + \text{teor}_{IMP})}{A_{MP}}, \text{ ou seja têm-se: } \frac{A_{IMP}}{A_{MP}} = 1 + (\text{teor}_{MP} / \text{teor}_{IMP})$$

Onde **A_{IMP}** é a área referente ao pico da impureza, **Teor_{MP}** é o teor da MP que contém a impureza e **A_{MP}** é área do pico referente à PQ

4 Resultados e Discussões

4.1 Caracteres físicos, solubilidade, perda por dessecação e faixa de fusão

Na tabela 1 podem ser visualizados os resultados dos ensaios de caracteres físicos, solubilidade, e perda por dessecação, e demonstraram que as MPs estão de acordo com as especificações (F. BRAS. IV, 2000; USP 30, 2007; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007).

Tabela 1. Resultados de caracteres físicos, solubilidade e perda por dessecação das MPs A, B, C e D.

	Especificação	MP A	MP B	MP C	MP D
Caracteres físicos	Pó cristalino alaranjado, inodoro ou quase inodoro (F. BRAS. IV, 2000)	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Solubilidade	Solúvel em água, praticamente insolúvel em etanol, éter etílico e clorofórmio (F. BRAS. IV, 2000)	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Perda por dessecação	Secar a 105 °C por 2h, a perda deve ser ≤ 1 % (USP 30, 2007) Secar a 100- 105 °C, a perda deve ser $\leq 0,5$ % (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007)	0,162 %	0,219 %	0,196 %	0,281 %

Os resultados obtidos através da DSC podem ser observados na tabela 2, onde se encontram os valores da T_{onset} que corresponde à temperatura inicial da fusão, o T_{pico} que corresponde ao pico da fusão, a T_{endset} que corresponde à temperatura final da fusão, e o ΔH (J/ g) que equivale à entalpia de fusão, ou seja ao consumo de energia (absorção) gerado pelo processo endotérmico característico da fusão. O desvio padrão relativo (D.P.R.) inferior a 1 % demonstra a precisão do método. Apesar de não existir diferenças estatisticamente significativas nas faixas de fusão quando se aplicou ANOVA ($p < 0,05$), as MPs A e B apresentaram um início da fusão (T_{onset}) menor que as MPs C e D, o que pode estar relacionado a um grau de pureza inferior.

Na figura 4 podem ser visualizadas as curvas DSC das MPs, demonstrando que todas MPs apresentaram faixas de fusão de acordo com a especificação de fundir a aproximadamente 200 ° C seguida de decomposição (caracterizada nas curvas DSC pelo pico exotérmico ascendente) (F. BRAS. IV, 2000).

Tabela 2. Faixas de fusão obtidas através da DSC para as MPs.

Matéria-prima PQ	T_{onset} (°C)* ± D.P.R.	T_{pico} (°C)* ± D.P.R.	T_{endset} (°C)* ± D.P.R.	ΔH_{fusão} (J/ g)*
MP A	191,79 ± 0,33	195,26 ± 0,24	196,79 ± 0,18	-44,77
MP B	193,70 ± 0,19	196,94 ± 0,07	198,37 ± 0,04	-64,64
MP C	195,10 ± 1,05	198,63 ± 0,60	200,67 ± 0,50	-34,35
MP D	194,74 ± 0,55	197,16 ± 0,43	198,48 ± 0,40	-79,41

* Média de três determinações.

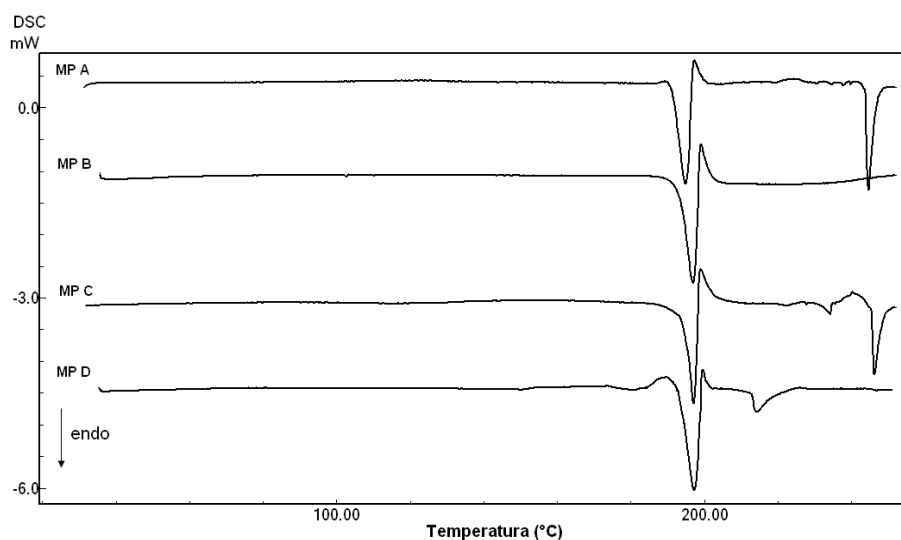


Figura 4. Curva DSC das MPs em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL/ min) e razão de aquecimento de 2 °C/ min.

4.2 Ensaio de Identificação

4.2.1 Espectro de absorção na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do IV fornece informações sobre a estrutura e a conformação molecular da substância no estado sólido por investigar as vibrações dos átomos sendo mais indicada para matéria-prima pura e não misturada. No setor farmacêutico é usada em inúmeras aplicações, como identificação dos grupos funcionais dos fármacos, avaliação da pureza, cristalinidade e estudos de compatibilidade (KALINKOVA, 1999).

A espectroscopia de IV por reflexão difusa foi usada no estudo por ser considerada a técnica mais apropriada de métodos espectroscópicos não destrutivos, atraente na análise quantitativa de sólidos, uma vez que o material não é submetido à energia mecânica ou térmica durante a preparação das amostras, prevenindo transformações no estado sólido (MURAKAMI et al., 2008)

A região do IV compreende as radiações cujos comprimentos de onda (λ) variam entre 4000 (alta frequência) e 500 cm^{-1} . Existem dois tipos de vibrações moleculares: as deformações axiais e as deformações angulares (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979). A energia absorvida pelas moléculas gera alterações no comprimento (estiramentos) ou no ângulo (deformações) das ligações interatômicas. Essas alterações sofrem influência do ambiente vizinho à ligação, que pode, por exemplo, no caso de moléculas cíclicas, possibilitarem maior ou menor rigidez à estrutura tridimensional da molécula (e da ligação). Assim, uma ligação entre átomos de carbono e oxigênio (ou entre carbono e nitrogênio) poderá sofrer efeitos diferenciados dependendo se o grupo funcional envolvido é um álcool, um éster, ou outra função orgânica. Em função das frequências onde se registram as principais alterações, podem-se inferir sobre os tipos de grupamentos funcionais presentes na molécula. A umidade presente nas amostras pode interferir nos espectros, devido às absorções características das ligações OH.

No presente trabalho, o objetivo da realização deste ensaio foi avaliar a autenticidade das MPs A, B, C e D, e observar se haveriam diferenças entre elas nos espectros na região do IV (Figura 5).

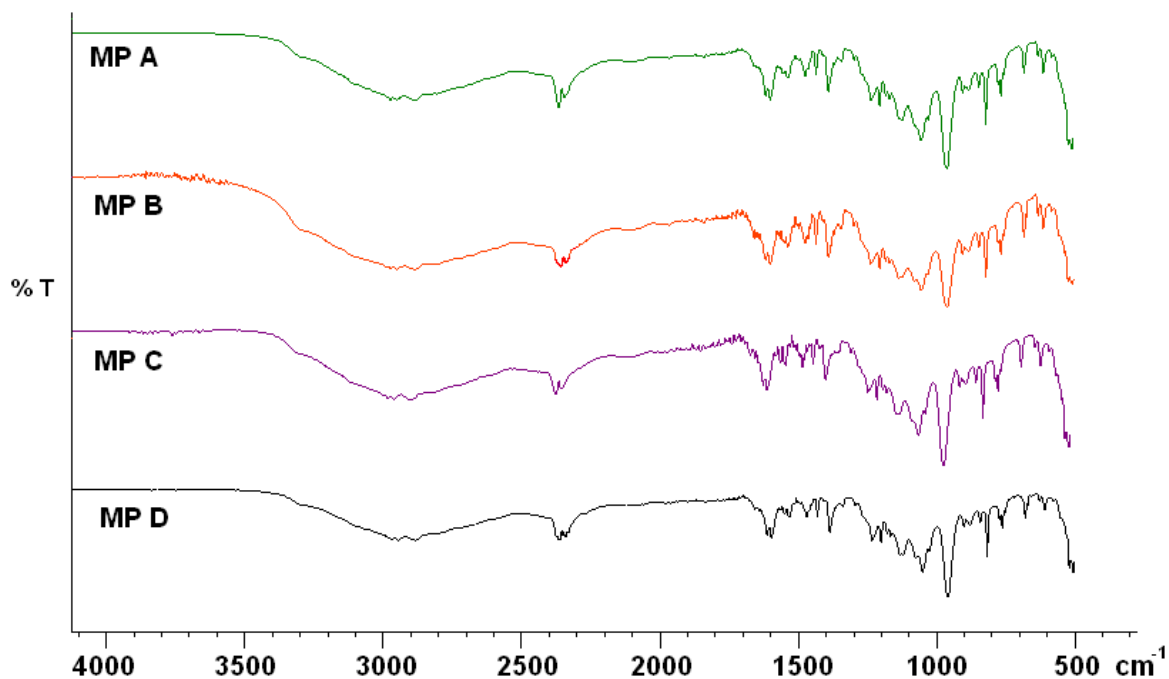


Figura 5. Espectros de absorção na região do IV obtidos a partir das MPs A, B, C e D de PQ.

Bandas características de grupamentos NH_2 , CH_3 , CH_2 , C-H, C=C e C-O foram observadas nos espectros de absorção no IV das MPs e suas frequências foram semelhantes às reportadas por Clarkes em 2004 e Al-Badr em 2005 (tabela 3), confirmando a autenticidade das amostras. Não houve diferenças nos espectros entre as principais bandas características das MPs. Nas MPs observou-se a presença de umidade devido às bandas em aproximadamente 2350 cm^{-1} , características dos grupamentos OH.

Tabela 3. Tipo e frequências de vibrações das bandas de absorção na região do IV para o difosfato de primaquina descritas por Clarke's em 2004 e Al-Badr em 2005.

Tipo de vibração	Frequência Vibracional (cm ⁻¹)	
	Clarke's, 2004	Al-Badr, 2005
Deformação axial NH ₂ e NH	---	3300-3150
Deformação axial CH ₃ e CH ₂	---	2946- 2900
Deformação axial C= C	1611	1612
Deformação angular CH ₂	---	1469, 1430
Deformação angular C-H	1230	1384, 1200
Deformação axial C-O	---	1050
Deformação angular C-H	815	956, 815, 769

4.2.2 Espectro de absorção na região do ultravioleta (UV) e do visível (VIS)

Os valores de absorbâncias (ABS) e os espectros UV/VIS obtidos através da análise espectroscópica estão representados na tabela 4 e na figura 6, respectivamente.

Tabela 4. Valores de ABS obtidos através da espectroscopia na região do UV/VIS para as MPs A, B, C e D.

Epectro de Absorção na região UV/VIS			MP A		MP B		MP C		MP D	
Especificação (F. Bras IV, 2000)	λ (nm)	ABS	λ (nm)	ABS	λ (nm)	ABS	λ (nm)	ABS	λ (nm)	ABS
Varredura na faixa de 310-450 nm	332	0,450-0,520	333,0	0,489	333,0	0,481	333,0	0,482	333,0	0,479
	415	0,270-0,350	415,1	0,337	415,1	0,331	415,1	0,333	416,9	0,331
Varredura na faixa de 215-310 nm	225	0,495-0,515	224,0	0,504	224,0	0,496	224,0	0,508	224,0	0,501
	265	0,335-0,350	265,0	0,346	265,0	0,339	265,0	0,343	265,0	0,339
	282	0,330-0,345	281,0	0,338	281,0	0,331	282,0	0,338	282,0	0,332

De acordo com a especificação preconizadas todas as soluções das MPs exibiram dois máximos de absorção na faixa de 310-450 nm, e três máximos de absorção na faixa de 215-310 nm (F. BRAS. IV, 2000). A figura 6 apresenta os espectros de absorção na região do UV/VIS das MPs sobreponíveis.

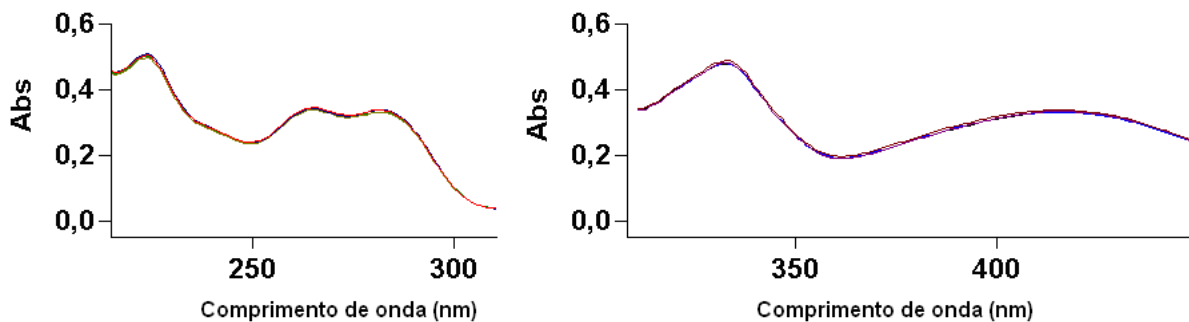


Figura 6. Espectro de absorção na região UV/VIS das MPs.

4.2.3 Reações ao íon fosfato

Todas as MPs responderam as reações específicas para o íon fosfato, formando um precipitado amarelo.

4.3 Difração de raios- X de pó (DRX)

O delineamento das propriedades físicas de formas sólidas tem se tornado um procedimento padrão no desenvolvimento de fármacos ou formas farmacêuticas (AALTONEN et al., 2009). O caráter amorfo ou cristalino de uma substância pode causar diferenças sob o ponto de vista farmacêutico, como densidade, ponto de fusão, solubilidade e dissolução. Essas características podem influenciar o processo de manipulação industrial, estabilidade química e atividade farmacológica (MARTIN, 1993; FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

As substâncias no estado sólido podem apresentar característica cristalina ou amorfa, ou uma mistura dessas duas formas. Os cristais contêm arranjos ordenados de moléculas e átomos, mantidos em contato por interações não covalentes. Um sólido amorfo é caracterizado pelo estado desorganizado de suas moléculas (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

A difração de raios-X baseia-se na propriedade intrínseca de cada cristal em desviar, em um ângulo específico, a direção dos raios-X emitidos sobre ele. O ângulo do desvio da radiação é único para cada forma do cristal, permitindo assim caracterizá-lo (WEST, 1984).

A técnica de difração de raios-X de pó foi utilizada a fim de verificar as características de cristalinidade das MPs. Os difratogramas das MPs podem ser observados na figura 7 onde os padrões de raios- X não revelaram grandes diferenças nos picos de difração, e todas as MPs demonstraram apresentar estrutura cristalina semelhante, ou seja, estrutura interna ordenada.

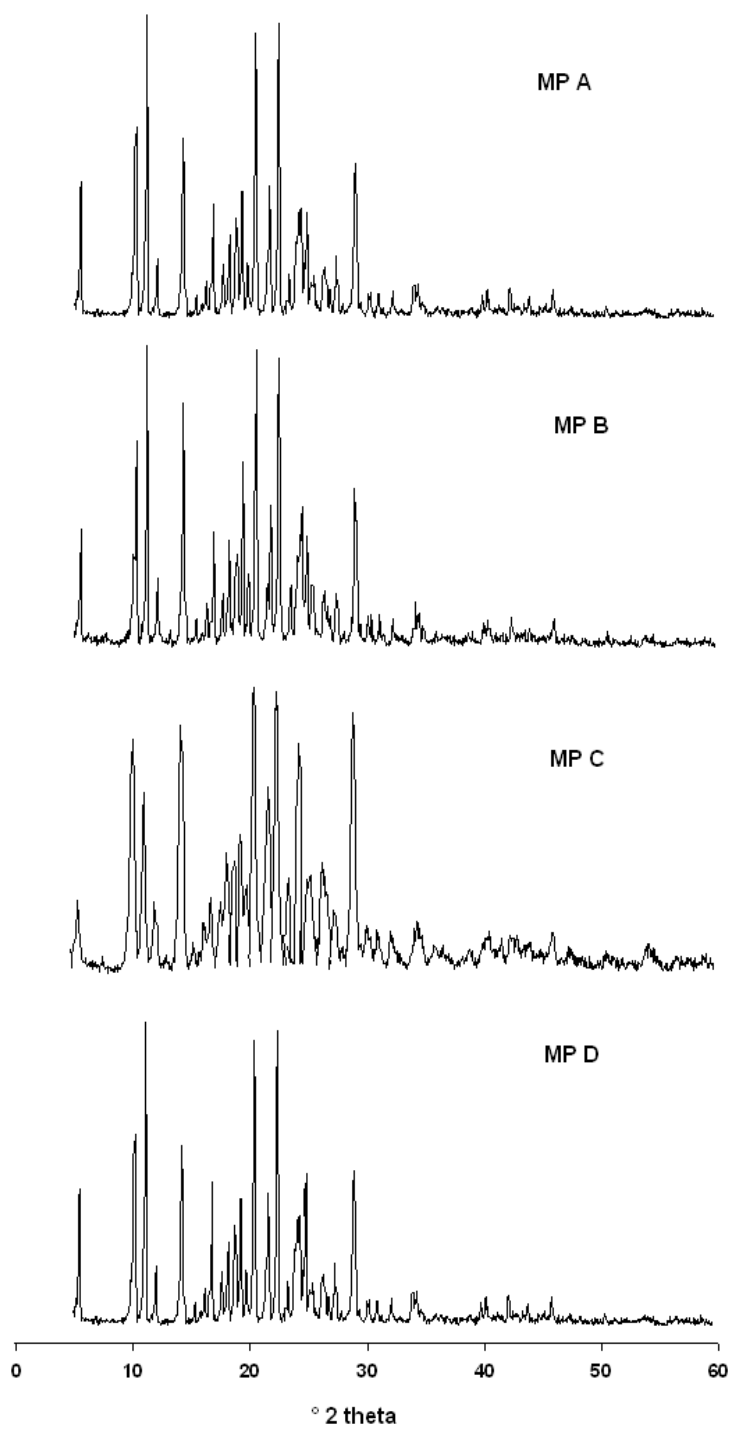


Figura 7. Difratogramas obtidos para as MPs A, B, C e D de PQ.

4.4 Avaliação morfológica

A natureza da forma cristalina de uma substância pode afetar sua estabilidade no estado sólido, suas propriedades de fluidez e biodisponibilidade, pois as propriedades cristalinas influenciam a velocidade de dissolução e conseqüente absorção (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

A área superficial das partículas do fármaco é outro parâmetro que está relacionado com a dissolução, pois o tamanho das partículas determina a sua área de superfície de contato e é diretamente proporcional a taxa de dissolução. A redução do diâmetro médio das partículas acarreta no aumento da área superficial exposta para sofrer dissolução, o que eleva a velocidade com que o processo ocorre (STORPIRTIS et al., 1999).

A análise de MEV foi realizada através de imagens produzidas pelos elétrons secundários. A vantagem da análise feita pela emissão de elétrons secundários é que ela fornece uma análise da topografia (morfologia e porosidade) do material, pois apesar do feixe de elétron incidente na amostra produzir elétrons secundários em todo o volume somente àqueles que estiverem próximos à superfície é que serão emitidos e irão contribuir para a obtenção do sinal.

De acordo com as fotomicrografias apresentadas na figura 8, a PQ em todas as MPs apresentou-se na forma de cristais regulares. Na magnitude de 800x a MP D mostrou cristais muito maiores que as outras MPs, seguida pela MP A, MP B e MP C. Essas características morfológicas interferem no processo de produção, pois podem alterar as propriedades de fluxo na câmara de compressão, levar a uma baixa uniformidade de conteúdo e conseqüente falta de reprodutibilidade na produção de comprimidos. Os resultados poderiam ser mais concluidores se fossem realizados com as MPs análises como ângulo de repouso, densidade bruta e compactada e fator de Hausner, que forneceria a classificação da fluidez do pó.

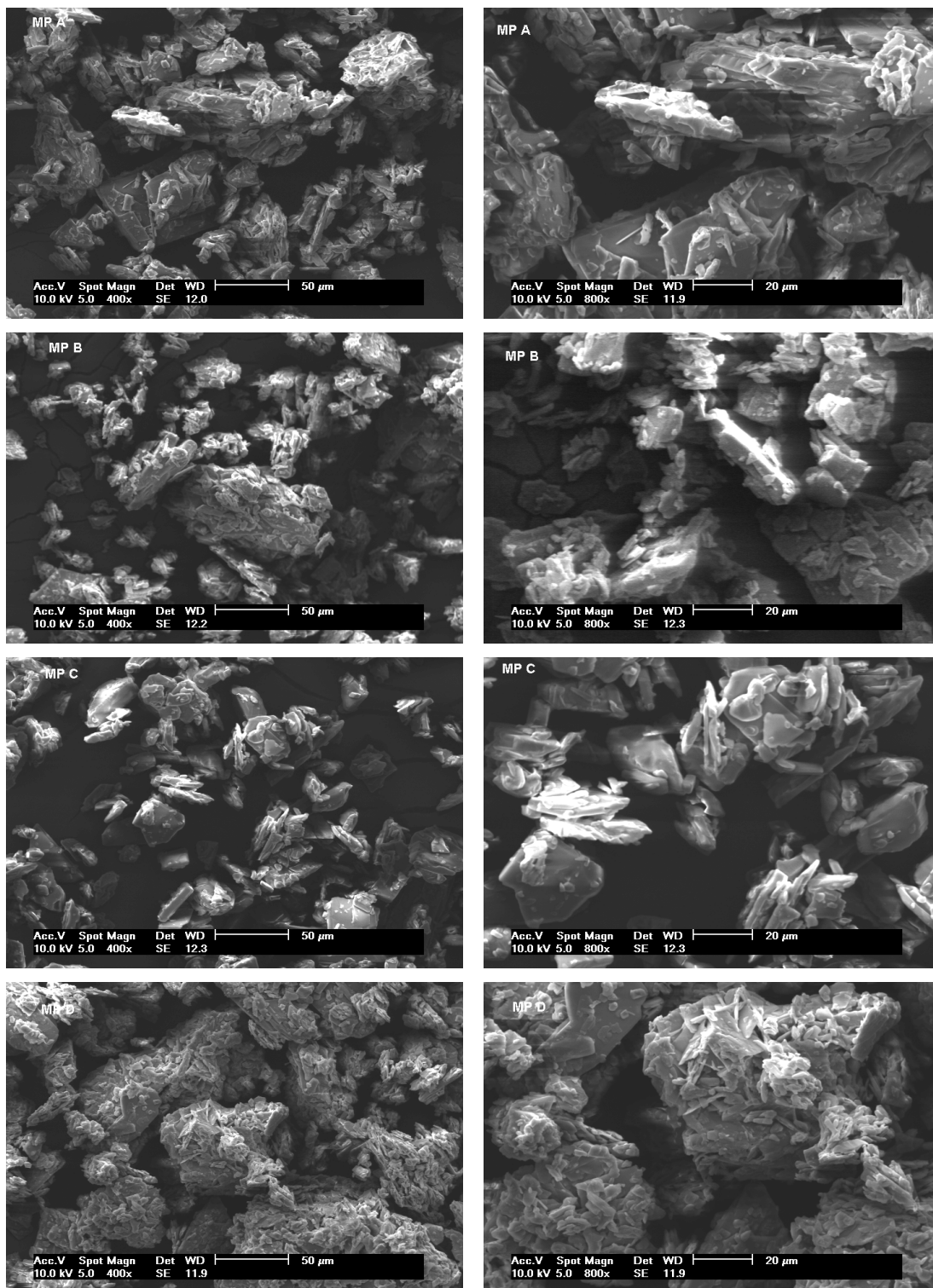


Figura 8. Fotomicrografias das MPs A, B, C e D no aumento de 400 e 800 x.

4.5 Doseamento

4.5.1 Titulação em meio não-aquoso

A determinação potenciométrica baseia-se no fato de que existe uma relação linear entre o pH de uma solução, a uma dada temperatura, e a energia expressa pela força eletromotriz de uma célula contendo os eletrodos indicadores e de referência. Durante uma titulação potenciométrica o ponto de equivalência é determinado seguindo a variação da diferença de potencial entre um sistema de dois eletrodos, mergulhados na solução a analisar em função da quantidade de titulante adicionado (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2005). O ponto de equivalência corresponde a uma variação brusca de potencial.

Para obter os resultados da titulação potenciométrica foi realizada a padronização do titulante ácido perclórico 0,1 M, em triplicata, para a obtenção do fator de correção. Além disso, os solventes orgânicos empregados neste doseamento apresentam coeficiente de expansão cúbica elevado em comparação com a água, que podem levar a variações na normalidade do titulante em função de variações na temperatura. A correção dos erros decorrentes de flutuações de temperatura durante as medidas volumétricas foi realizada através da correção direta do volume gasto na titulação à temperatura de padronização da solução titulante, utilizando a equação 3. Os volumes obtidos com a titulação foram corrigidos com o branco, visando descontar uma possível reação do titulante com a umidade atmosférica e com o diluente da amostra. O teor das MPs foi calculado com a equação 4, e estão representados na tabela 5 (KOROLKOVAS, 1984).

(equação 3)

$$V_c = V[1 + 0,0011 (t_0 - t)]$$

Onde **V_c** é o volume corrigido, **V** é o volume obtido com a titulação, **0,0011** é o coeficiente de expansão cúbica do ácido acético glacial, **t₀** é a temperatura da solução na padronização e **t** é a temperatura por ocasião da solução titulante.

(equação 4)

$$\text{Teor (\%)} = \frac{(V_{cA} - V_{cB}) \times Fc \times Eq \times 100}{m}$$

Onde V_{cA} é o volume corrigido da amostra, V_{cB} é o volume corrigido do branco, Fc é o fator de correção obtido com a padronização do titulante, Eq é o equivalente-grama do Difosfato de Primaquina descrito na monografia da farmacopéia, e m é a massa pesada em gramas.

Tabela 5. Resultados de teor obtidos pela titulação em meio não aquoso para todas as MPs de PQ.

AMOSTRAS	MP A	MP B	MP C	MP D
TEOR (%)* ± D.P.R.	98,8 ± 0,79	99,2 ± 1,33	101,1 ± 1,06	99,7 ± 1,71

* Média de três determinações.

A titulação em meio não aquoso, apesar de ser um método mais simples que os métodos cromatográficos, passível de ser realizado por pequenas indústrias e farmácias de manipulação, necessita de diversos cuidados no momento da realização, e a falta de atenção pode significar fontes de erros introduzidas pelo analista. As fontes de erros mais comuns estão relacionadas à padronização das soluções, medida de volumes do titulante, grau de variação do potencial (mV) no ponto de equivalência (dependente da constante de equilíbrio da reação) aos quais podem afetar a exatidão e a robustez do método. Além disso, pelo método titulométrico não se pode observar a presença de impurezas ou produtos de degradação inerentes ou não à matéria-prima.

4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os cromatogramas obtidos através das análises das 4 MPs e da SQR estão representados na figura 9. O teor (%) das MPs foi calculado através da equação 1, onde o pico principal das MPs apresentou o mesmo tempo de retenção do pico da SQR (Tabela 6).

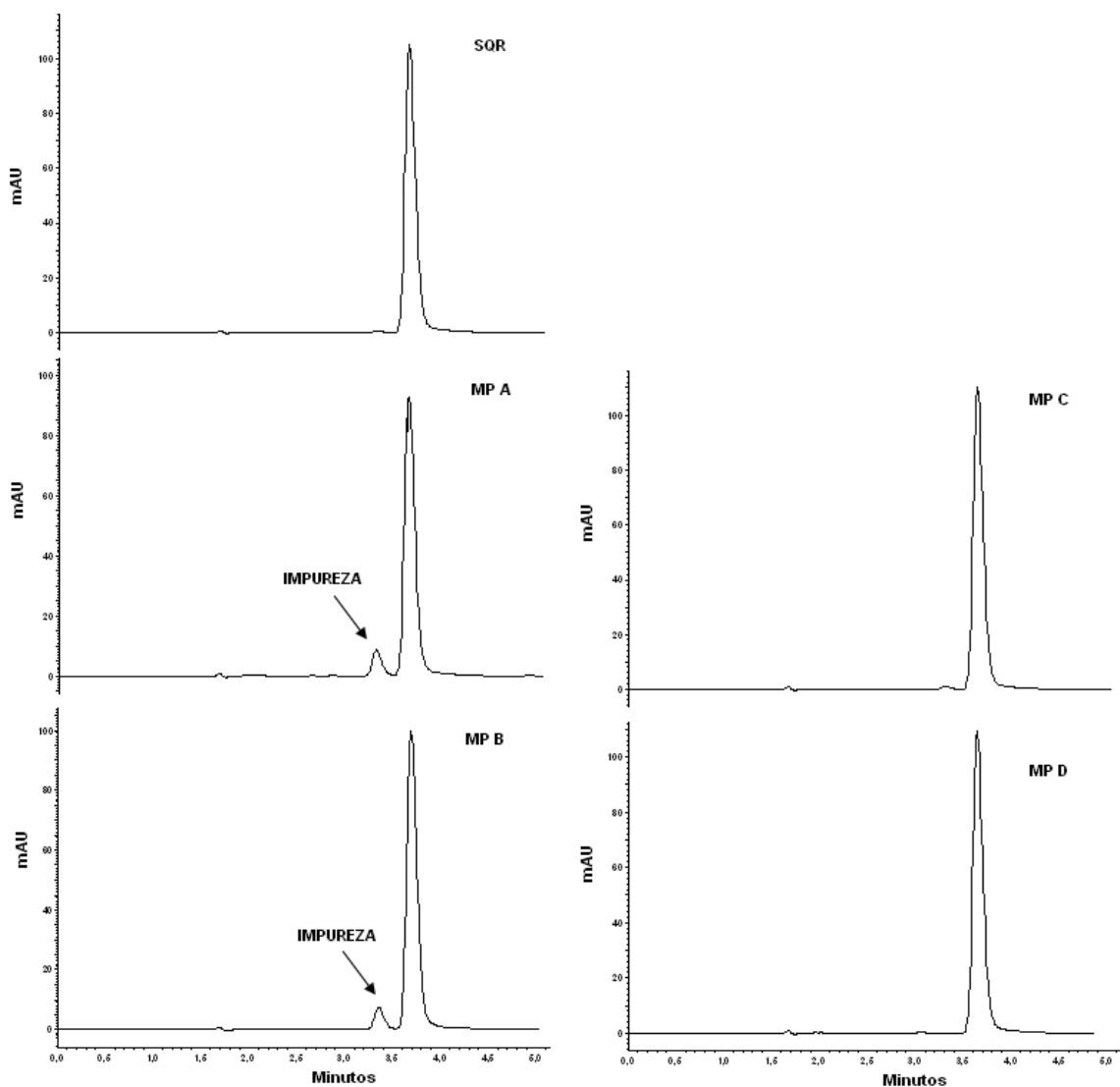


Figura 9. Cromatogramas obtidos a partir da SQR e das MPs A, B, C e D de PQ.

Tabela 6. Valores de teor (%) das MPs A, B, C e D de PQ em relação à SQR.

Matéria-prima de PQ	Teor (%) ^a ± D.P.R.
MP A	90,73 ± 2,47
IMPUREZA A ^b	7,58 ± 1,85
MP B	93,13 ± 1,25
IMPUREZA B ^b	6,61 ± 1,13
MP C	99,23 ± 1,67
MP D	98,08 ± 0,95
SQR	100,00 ± 0,46

^a Média de quatro injeções.

^b A impureza foi calculada em percentual em relação ao teor total, ou seja teor da impureza mais teor da MP (PQ).

Os resultados obtidos através do doseamento por CLAE mostraram que duas das quatro matérias-primas testadas apresentaram impureza. As MPs A e B apresentaram mais de 6,5 % de impureza, calculada em relação ao teor total (teor da impureza mais teor da PQ). O teor da PQ nestas MPs se mostrou inadequado, ou seja abaixo da faixa de 98,0-102,0 % preconizada. As MPs C e D não apresentaram impureza e o teor de ambas foi apropriado.

Dongre e colaboradores (2007) desenvolveram um método indicativo de estabilidade para determinação de substâncias relacionadas (quinocida) e quantificação de PQ por UPLC comparando com HPLC. Durante o estudo, foi observado que a quinocida elui muito próximo a PQ no comprimento de onda de 265 nm (DONGRE et al, 2007).

Apesar de não existir um padrão da quinocida comercialmente disponível, as impurezas presentes nas MPs A e B demonstraram possuir um tempo de retenção

muito próximo a PQ, sugerindo ser o isômero posicional quinocida, derivada do processo de síntese (figura 3). A impureza não é resultante do processo de degradação pois num estudo de degradação forçada do fármaco em solução desenvolvido por Dongre e colaboradores (2007), em ambiente ácido (HCl 0,1 N), básico (NaOH 0,1 N), oxidativo (30 % peróxido de hidrogênio), redutor (10% metabisulfito de sódio), fotolítico (UV e luz solar por 48 h), e de aquecimento (105 °C por 48 h), não foi observada a formação da quinocida como produto de degradação (DONGRE et al., 2007).

A quinocida, que também possui atividade antimalárica, demonstrou ser mais tóxica *in vitro* que a PQ num estudo onde se monitorou o crescimento de algas *Chlamydomonas reinhardtii*. A toxicidade foi avaliada pelo monitoramento do crescimento das células *C. reinhardtii* com o aumento da concentração de padrão de quinocida, padrão de PQ (contendo 0,3 % de quinocida), e PQ usado na indústria farmacêutica (contendo 5,8 % de quinocida). A produção e consumo de oxigênio foi escolhido como indicador de toxicidade. O efeito tóxico contra a alga mostrou que a quinocida é 2 vezes mais tóxica que a PQ contendo 5,8 % de quinocida, que é mais tóxica que a PQ contendo 0,3 % de quinocida (BRONDZ et al., 2004).

5 Conclusões

As matérias-primas analisadas demonstraram estar de acordo com as especificações em relação aos caracteres físicos, solubilidade, perda por dessecação, faixa de fusão e identificação. As curvas DSC demonstraram que todas as MPs fundiram próximas a 200 °C, entretanto as MPs A e B apresentaram uma T_{onset} inferior as MPs C e D, o que pode estar relacionado à pureza. Não foram encontradas diferenças entre as MPs nos espectros na região do IV e do UV/VIS. Os padrões de raio X foram semelhantes para todas MPs. A MP D apresentou cristais maiores que as outras MPs, evidenciados pelas fotomicrografias obtidas pelo MEV, aos quais podem interferir diretamente nas propriedades de fluxo e conseqüente processo de produção.

No doseamento, o teor para todas as MPs foi adequado quando se utilizou o método farmacopéico (titulação), demonstrando não ser suficientemente sensível

para detectar impurezas e obter o teor real. Pelo método cromatográfico pode-se detectar que as MPs A e B apresentaram a impureza quinocida e o teor abaixo do especificado.

Através dos resultados experimentais, a MP C foi selecionada entre as MPs pois apresentou qualidade e teor satisfatório para a produção dos comprimidos de liberação prolongada, estudo de estabilidade e avaliação *in vivo*.

A caracterização da matéria-prima é fundamental para a produção de um medicamento de qualidade, pois a quinocida pode ser encontrada comumente nas MPs de PQ, afetando diretamente as pessoas que ingerem o medicamento, e que podem sofrer devido a quantidades significantes de contaminantes tóxicos. Em 2003 e 2004 no Quality and Drug Information Program, documento publicado pela USP, verificou-se que 21% e 13 %, respectivamente, dos antimaláricos utilizados eram de má qualidade (USP, 2004), reforçando a necessidade do desenvolvimento de um procedimento simples para a determinação da pureza da PQ (BRONDZ; FIALKOV; AMIRAV, 2009).

***CAPÍTULO 3- ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DAS
MATÉRIAS-PRIMAS DE PRIMAQUINA***

1 Introdução

A estabilidade de uma matéria-prima ou de uma formulação farmacêutica pode ser definida como a capacidade do produto em permanecer com suas características químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas dentro dos limites especificados e dentro do prazo de validade. (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999; USP 30, 2007). Entende-se como prazo de validade o período de tempo compreendido entre a fabricação do produto farmacêutico até aquele em que sua potência não seja inferior a 90 %, desde que os produtos de degradação estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos e que a qualidade do produto esteja dentro do especificado (NUDELMAN, 1975; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2005).

Os estudos de estabilidade são necessários para que se possa garantir a pureza, a inocuidade, a potência e a eficácia do produto e estabelecer por quanto tempo, desde o momento de sua produção, estas características podem ser mantidas, bem como estabelecer as condições de estocagem (CARSTENSEN; RHODES, 2000; ICH, 2003; USP 30, 2007). Os resultados destes testes podem influenciar as especificações, os limites, e os métodos de análise para o fármaco (SIMON et al., 2004).

As reações químicas que prejudicam a estabilidade são reações de hidrólise, oxidação, redução, esterificação, descarboxilação e polimerização, podendo ocorrer em sistemas homogêneos ou heterogêneos. Estas reações químicas podem ser iniciadas ou aceleradas pelos fatores ambientais (temperatura, umidade, luz, gases atmosféricos), pH, contaminação microbiana, processo de produção, forma farmacêutica, propriedades físico-químicas de substâncias ativas e excipientes e embalagem (NUDELMAN, 1975; KOMMANABOYINA; RHODES, 1999; GENNARO, 2000; BRASIL, 2005). De todos os fatores envolvidos na degradação de fármacos, a temperatura é o mais importante porque fornece a energia de ativação necessária para a cisão das ligações químicas.

A instabilidade das formulações farmacêuticas pode ser detectada em alguns casos por uma mudança na aparência física, na cor, no odor e no gosto, enquanto em outros casos, podem ocorrer alterações químicas que não são evidentes e que

só podem ser determinadas por metodologias específicas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde pequenas quantidades de substâncias podem ser detectadas, resultando numa indicação sensivelmente confiável para estimar a estabilidade de produtos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; GENNARO, 2000).

A ICH determina a realização dos estudos de estabilidade de longa duração, estabilidade acelerada e testes de degradação forçada, para substâncias ativas e medicamentos, a fim de determinar o prazo de validade de fármacos e formas farmacêuticas (ICH, 2003). No Brasil, os estudos de estabilidade são classificados como estudos acelerados, estudos de acompanhamento ou estudos de longa duração (ICH, 2003; BRASIL, 2005).

Nas avaliações de longa duração as amostras são mantidas nas condições previstas de armazenagem (temperatura e umidade) pelo tempo proposto como prazo de validade do produto. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar este prazo e recomendar as condições de armazenamento (ICH, 2003; BRASIL, 2005). O estudo de estabilidade acelerado é projetado para acelerar a degradação química e mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas. De acordo com a Resolução N° 1 da ANVISA (2005), formas farmacêuticas sólidas em embalagem semi-permeável e impermeável devem ser submetidas a um estudo de estabilidade acelerado na temperatura de 40 ± 2 °C, por 6 meses, sendo que, o estudo com as embalagens semi-permeáveis devem ser submetidas a umidade relativa (UR) de $75 \% \pm 5 \%$. Conforme a legislação, o estudo de estabilidade deve ser executado com o produto farmacêutico em sua embalagem primária.

Os estudos de degradação forçada, ou de *stress* são usados para estabelecer a estabilidade intrínseca do fármaco. São realizados em condições mais severas do que as usadas no estudo de estabilidade acelerada. Podem indicar os produtos de degradação, bem como validar o uso de um método analítico para análise de amostras degradadas. Consistem em submeter o produto a condições drásticas de temperatura, umidade, oxidação, e ampla faixa de pH. Os estudos adicionais, tais como fotoestabilidade que se façam pertinentes de acordo com as propriedades do produto, poderão ser necessários para a comprovação da estabilidade de produtos farmacêuticos, e estão incluídos nos testes de degradação forçada (ICH, 2003; KLICK et al., 2005).

Além das resoluções disponíveis para a realização do estudo de estabilidade, as reações de degradação e os princípios de cinética química devem ser investigados. As reações de degradação em produtos farmacêuticos ocorrem com velocidade definida e são de natureza química, portanto ao considerar a estabilidade química de um produto farmacêutico, é preciso conhecer a ordem e a velocidade de reação (AULTON, 2005). A expressão da velocidade de reação é uma descrição da concentração do fármaco em relação ao tempo, enquanto que a ordem da reação permite definir esta variação da velocidade com a concentração dos reagentes (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Em geral as reações de degradação de produtos farmacêuticos são de zero ordem e de primeira ordem e, mais raramente de segunda ordem (CARSTENSEN; RHODES, 2000).

Nas reações de ordem zero a decomposição ocorre a uma velocidade constante, sendo independente da concentração de quaisquer dos reagentes. Nas reações de primeira ordem, a velocidade de reação é proporcional à concentração de um dos reagentes. As reações de segunda ordem se caracterizam por uma velocidade de reação proporcional a concentração de dois reagentes (NETZ; ORTEGA, 2002; FLORENCE; ATTWOOD, 2003). A substituição da constante de velocidade (K) na ordem apropriada da reação permite que a quantidade de degradação, após um determinado intervalo de tempo, seja calculada e determinada para a temperatura ambiente, determinando o K a 25 °C (K_{25}).

A energia de ativação (E_a) corresponde à energia mínima necessária para que uma reação ocorra. A relação quantitativa entre a temperatura, a E_a , e a constante de velocidade é traduzida pela equação de Arrhenius, representada pela equação 5.

(equação 5)

$$K(T) = A \times e^{\frac{-E}{RT}}$$

Onde K é a velocidade específica da reação, A representa o fator freqüência (ou fator pré-exponencial), E é a energia de ativação, R a constante geral dos gases e T a temperatura absoluta (Kelvin) (KHAWAM; FLANAGAN, 2005). A inclinação da reta de $\log K$ em função de $1/T$ traduz a E_a . A reta obtida a partir desta equação permite a predição da estabilidade dos produtos farmacêuticos pela extrapolação

dos dados do valor obtido a temperaturas elevadas. A equação de Arrhenius é válida para faixas de temperatura em que tanto A quanto E_a podem ser consideradas constantes.

Dessa forma, o objetivo deste capítulo foi determinar a cinética de reação pelo método de Arrhenius das MPs A, B, C e D e observar a influência da impureza quinocida na velocidade de degradação da PQ em estudo de degradação forçada nas temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C.

2 Metodologia

As MPs A, B, C e D de PQ foram expostas às temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C, com variação de ± 2 °C em estufas modelo Odontobrás (MOD-EL-1.4) e DeLeo (tipo 797). Todas as MPs foram analisadas no tempo zero antes do início dos estudos de degradação. As tomadas de amostras foram realizadas nos tempos 15, 29, 57, 86, 110, 145 e 187 dias na temperatura de 80 °C, nos tempos 8, 42 e 85 dias na temperatura de 100 °C e, nos tempos 3, 6, 7, 8, 10, 12 e 14 dias na temperatura de 120 °C. As amostras foram preparadas e analisadas conforme metodologia descrita no capítulo 2 (item 3.5.2).

Foram realizadas varreduras no espectrofotômetro UV (Cary 50 Bio, Varian, USA) com as mesmas soluções analisadas por CLAE para observar a possibilidade de absorção de algum produto de degradação das MPs em comprimento de onda distinto de 254 nm.

De acordo com os dados obtidos, a cinética de degradação foi determinada através da análise da ordem de reação, da constante de velocidade de reação (K) e da energia de ativação (E_a).

Para definir a ordem de reação, a quantidade de fármaco degradado nos intervalos de tempo especificados foi determinada e os dados foram distribuídos graficamente, plotando a concentração do fármaco em função do tempo (ordem zero), o logaritmo da concentração do fármaco em função do tempo (primeira ordem) e o inverso da concentração do fármaco em função do tempo (segunda ordem). A

partir do cálculo dos coeficientes de correlação (R^2), determinou-se a ordem de reação considerando a melhor reta obtida.

3 Resultados e Discussões

Os resultados das análises de teor (%) das MPs A, B, C e D de PQ nos tempos pré-estabelecidos nas temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C estão demonstrados nas tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

Tabela 7. Teor das MPs obtidos pelas análises em estufa a 80 °C.

Tempo (dias)	MP A	MP B	MP C	MP D
	Teor (%) * ± D.P.R.	Teor (%) * ± D.P.R.	Teor (%) * ± D.P.R.	Teor (%) * ± D.P.R.
0	90,73 ± 0,77	93,13 ± 0,67	99,23 ± 0,95	98,08 ± 1,48
15	90,20 ± 1,22	91,11 ± 0,98	98,71 ± 1,69	95,38 ± 1,57
29	89,78 ± 0,98	90,67 ± 1,33	98,32 ± 2,04	93,95 ± 1,66
57	88,41 ± 0,69	88,67 ± 1,49	97,39 ± 2,11	91,47 ± 0,69
86	87,55 ± 0,87	87,40 ± 1,11	96,66 ± 0,92	86,97 ± 0,83
110	86,63 ± 1,13	86,80 ± 1, 98	95,84 ± 0,76	84,72 ± 2,08
145	85,26 ± 1,02	82,65 ± 1,78	94,66 ± 1,23	81,91 ± 2,55
187	83,58 ± 1,48	80,62 ± 1,66	93,41 ± 1,78	76,08 ± 1,78

* Média de três determinações.

Tabela 8. Teor das MPs obtidos pelas análises em estufa a 100 °C.

Tempo (dias)	MP A Teor (%)* ± D.P.R.	MP B Teor (%)* ± D.P.R.	MP C Teor (%)* ± D.P.R.	MP D Teor (%)* ± D.P.R.
0	90,73 ± 1,29	93,13 ± 2,09	99,23 ± 2,31	98,08 ± 1,22
8	93,55 ± 1,36	91,47 ± 2,77	98,04 ± 2,12	89,97 ± 1,54
42	86,49 ± 1,20	85,12 ± 0,99	94,10 ± 1,29	66,70 ± 1,88
85	69,21 ± 1,55	73,34 ± 1,44	88,38 ± 0,77	32,53 ± 0,79

* Média de três determinações.

Tabela 9. Teor das MPs obtidos pelas análises em estufa a 120 °C.

Tempo (dias)	MP A Teor (%)* ± D.P.R.	MP B Teor (%)* ± D.P.R.	MP C Teor (%)* ± D.P.R.	MP D Teor (%)* ± D.P.R.
0	90,73 ± 0,96	93,13 ± 1,76	99,23 ± 0,76	98,08 ± 1,22
3	82,62 ± 0,66	90,20 ± 1,24	98,90 ± 0,98	88,40 ± 0,77
6	73,83 ± 1,22	81,78 ± 1,99	85,01 ± 1,45	60,57 ± 2,07
7	62,44 ± 1,57	67,47 ± 1,78	84,93 ± 2,09	17,81 ± 2,56
8	51,35 ± 1,98	55,01 ± 1,04	72,16 ± 1,25	15,80 ± 1,34
10	20,68 ± 0,78	29,76 ± 2,13	53,84 ± 1,58	3,62 ± 0,87
12	17,51 ± 2,11	19,43 ± 1,45	18,31 ± 2,66	---
14	4,22 ± 2,49	9,01 ± 2,55	2,71 ± 0,76	---

* Média de três determinações; --- não detectado.

De acordo com a tabela 7, verifica-se que a degradação de PQ foi maior para a MP D, na qual houve uma redução no teor de 22,0 %, seguida pela MP B, MP A e MP C, com redução de 12,51 %, 7,15 %, e 5,82 %, respectivamente. A MP C apresentou a menor taxa de degradação, mostrando-se relativamente estável a 80 °C. A MP D iniciou os estudos com o teor adequado para os padrões farmacopéicos (98,08 %), mas evidenciou maior susceptibilidade às reações de degradação, possivelmente relacionada a validade expirada. No final dos 187 dias todas as MPs apresentaram um tom alaranjado mais escurecido.

Na tabela 8, a degradação também foi maior para a MP D, seguida da MP A, B e C, com resultados de 65,55 %, 21,52 %, 19,79 % e 10,85 %, respectivamente.

Na temperatura de 120 °C (tabela 9) houve a degradação de aproximadamente 100 % para todas MPs. As MPs A e B degradaram em torno de 50 % em 8 dias, a MP C degradou 50 % em 10 dias e a MP D em 7 dias. No final dos 14 dias todas as MPs estavam completamente escurecidas.

As MPs A e B iniciaram o estudo com o teor inadequado, apresentando cerca de 6,5 % de impureza. A presença da impureza demonstrou em todas as tabelas (7, 8 e 9) acelerar as reações (taxas) de degradação em relação a MP C.

A avaliação da cinética química e da ordem das reações determina o conhecimento do perfil de degradação ou perfil de concentração-tempo de um fármaco ou medicamento (CARSTENSEN; RHODES, 2000). A partir dos resultados de análise de teor de PQ das MPs foram plotados os gráficos a fim de definir a ordem das reações. Gráficos de teor (%) *versus* tempo (dias), log do teor *versus* tempo (dias) e inverso do teor *versus* tempo (dias) foram construídos fornecendo os valores de coeficiente de correlação linear (R^2), nas temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C, e os valores de R^2 mais próximos a 1 definiram a ordem de reação (Tabela 10).

Tabela 10. Coeficiente de correlação (R^2) obtidos a partir dos gráficos construídos.

Estufa 80 °C	R^2 Zero ordem	R^2 Primeira Ordem	R^2 Segunda Ordem
MP A	0,99867	0,99838	0,99781
MP B	0,97887	0,97746	0,97518
MP C	0,99923	0,99902	0,99866
MP D	0,99429	0,99387	0,99048
Estufa 100 °C			
MP A	0,91147	0,90375	0,89486
MP B	0,99099	0,98472	0,97699
MP C	0,99899	0,99813	0,99681
MP D	0,99853	0,97639	0,92877
Estufa 120 °C			
MP A	0,92547	0,78969	0,50740
MP B	0,91463	0,82952	0,63855
MP C	0,85620	0,64322	0,40417
MP D	0,90019	0,80066	0,52010

Os maiores valores de R^2 para todas as MPs foram observados com a plotagem dos dados de teor (%) pelo tempo de estocagem, sugerindo que a degradação segue uma reação de zero ordem, onde a velocidade de degradação é independente da concentração dos reagentes em todas as temperaturas, ou seja, a

velocidade da reação de degradação é constante. Os valores de R^2 obtidos em alguns casos, foram muito próximos um ao outro, o que pode estar relacionado ao fato de que a degradação foi inferior a 50 %, e para uma definição exata da ordem de reação a degradação em todas as temperaturas testadas deve ser superior a 50 %.

Em estufa a 120 ° C os valores de R^2 para reação de zero ordem, mesmo sendo os maiores valores, não estão próximos a 1. Pelo gráfico demonstrado na figura 10 observa-se que os valores de teor das MPs até 6 dias de análise degradam numa dada inclinação que aumenta posteriormente, sugerindo que a degradação ocorre em duas etapas, onde a primeira etapa desencadeia a segunda de uma forma mais acelerada, provavelmente, devido às sucessivas reações que produzem intermediários que promovem sua auto-degradação.

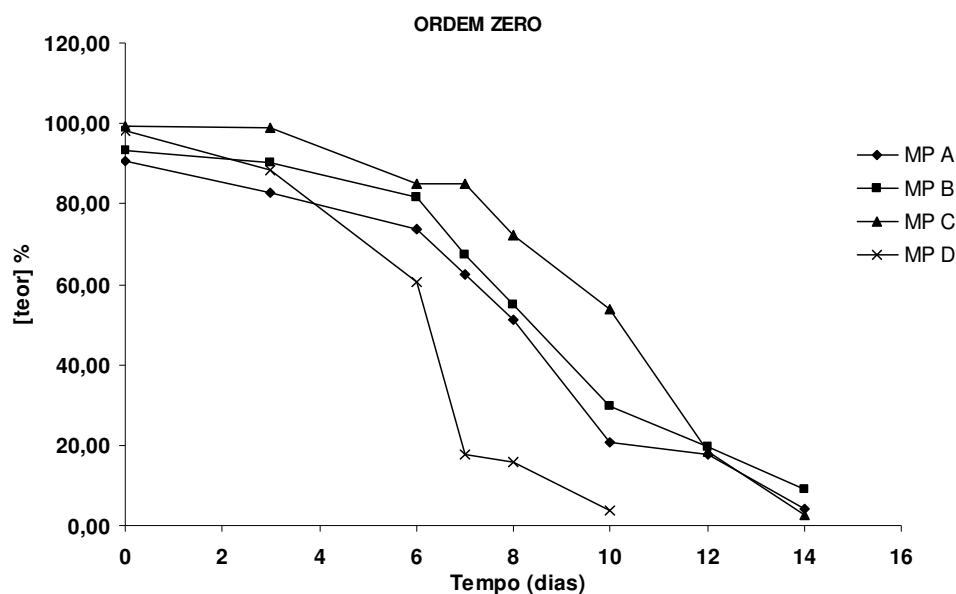


Figura 10 Gráfico representativo do teor (%) *versus* o tempo (dias) das MPs na temperatura de 120 °C.

Dessa forma, pelo método gráfico de Arrhenius, calculou-se a constante de velocidade (K), pela equação de ordem zero (equação 6).

(equação 6)

$$K = C_0^a - C^b / t$$

Onde C_0^a é a concentração do fármaco no tempo zero, e C^b é a concentração do fármaco após degradação por um tempo t .

Com os valores de K para cada temperatura analisada, plotou-se o gráfico de $\log K$ versus 1 sobre o inverso da temperatura (Kelvin), obtendo-se a equação da reta. Dessa forma, foi calculada a constante de velocidade na temperatura de 25 °C (K_{25}) pela extrapolação da equação, e a energia de ativação (E_a) pela equação 7.

(equação 7)

$$b = -E_a / (2,303 \times R)$$

Onde b é o coeficiente angular (x), e R é a constante universal dos gases perfeitos (1,987/cal °K).

Os valores de K para as temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C estão representados na tabela 11 para MP A, B, C e D. Os valores de K_{25} e de E_a estão representados na tabela 12 para todas as MPs.

Tabela 11. Valores de K obtidos para as temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C calculados para cada MP conforme equação de ordem zero.

T (°C)	MP A	MP B	MP C	MP D
	K	K	K	K
80	0,0382510	0,0668739	0,0311449	0,1176672
100	0,2531332	0,2328110	0,1276461	0,7711302
120	6,1795125	6,0084324	6,8944673	7,0057143

Tabela 12. Valores de K_{25} e de E_a obtidos para as MPs.

Matéria-prima PQ	K_{25} (dias ⁻¹)	E_a (cal/mol)
MP A	$3,1065 \times 10^{-6}$	-34853,6
MP B	$2,6984 \times 10^{-5}$	-30727,3
MP C	$1,2155 \times 10^{-6}$	-36865,7
MP D	$6,6470 \times 10^{-5}$	-28100,2

Pela tabela 12 observa-se que a maior E_a obtida foi para MP C, seguida pela MP A, B, e D, demonstrando que quanto mais elevado o valor da E_a , maior a energia mínima necessária para que ocorra uma reação de degradação, e maior a estabilidade frente ao calor. Em relação ao K_{25} , que representa a constante de velocidade de degradação a 25 °C, o menor K foi obtido para MP C, seguido pelas MPs A, B e D.

A partir dos resultados do K_{25} , poderia ser calculado o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) que equivale ao tempo necessário para que a concentração do fármaco seja a

metade do valor inicial e o $t_{90\%}$ que indica o tempo necessário para que ocorra uma redução de 10 % da concentração inicial do fármaco (prazo de validade). Entretanto, tais equações foram desenvolvidas para formulações líquidas, onde a velocidade de reação entre as moléculas é mais elevada, não se aplicando por vezes a formulações sólidas. No caso da PQ, que se mostrou relativamente estável a altas temperaturas, com alto valor de E_a , o prazo de validade calculado pelo método gráfico de Arrhenius não se aplica.

4 Conclusões

A MP C demonstrou maior estabilidade em todas as temperaturas analisadas. Apesar de iniciar o estudo com o teor adequado, a MP D apresentou maior velocidade de degradação, fato relacionado ao prazo de validade expirado que tornou a MP D mais susceptível as reações. As MPs A e B apresentaram uma estabilidade intermediária entre as MPs C e D, e demonstraram que a presença da impureza quinocida aumentou a velocidade de degradação quando relacionada a MP C.

Pelo método gráfico de Arrhenius, todas as MPs seguiram uma cinética de degradação de zero ordem, onde a velocidade de degradação é independente da concentração dos reagentes e ocorre de forma constante. A maior E_a e o menor K_{25} foram observados para a MP C, que comprovou maior estabilidade frente à temperatura.

***CAPÍTULO 4 – ESTUDO DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DA
MATÉRIA-PRIMA DE PRIMAQUINA (MP C) POR
TERMOGRAVIMETRIA***

1 Introdução

A análise térmica é um método de rotina para caracterização de fármacos e é usada para estudos de pré-formulação no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas (GIRON, 1998a; GIRON, 1998b; HUANG, et al., 2001; CIDES et al., 2006; SILVA et al., 2007; STULZER et al., 2008.) As técnicas de termogravimetria (TG) e de calorimetria exploratória diferencial (DSC) fornecem informações importantes sobre as propriedades físicas, análise cinética, formas polimórficas e estabilidade de materiais, durante o processo e armazenamento em função da temperatura (GIRON, 1998a; CIDES et al., 2006).

A decomposição térmica de fármacos por TG é de grande interesse no desenvolvimento de novos produtos, pois serve para determinar os parâmetros de decomposição cinética utilizando temperaturas elevadas. A temperatura pode intensificar as reações químicas, provendo energia suficiente (energia de ativação) requerida para quebrar as ligações químicas e iniciar o processo de decomposição (HUANG, et al., 2001; BURNHAM; DOLLIMORE; ALEXANDER, 2002). Na análise por TG, a massa da substância em função do tempo e temperatura é usada para assegurar a estabilidade térmica e degradação do fármaco, ao quais inclui a geração de dados cinéticos como energia de ativação (ARAÚJO et al., 2005). Uma das propostas da análise cinética de decomposição de sólido é determinar o mecanismo de reação e calcular os parâmetros de Arrhenius ou parâmetros cinéticos (HUANG et al., 2001). Dois métodos têm sido usados na investigação cinética de decomposição térmica de sólidos: método não isotérmico, onde a amostra é sujeita a um aumento de temperatura controlado; e método isotérmico, onde se utiliza um platô de aquecimento constante próximo da temperatura de decomposição da amostra (HALIKIA; NEOU-SYNGOUNA; KOLITSA, 1998). Os parâmetros cinéticos no estudo não isotérmico são calculados pela aplicação do método de Ozawa (OZAWA, 2000). No método isotérmico, o cálculo da energia de ativação é baseado na equação de Arrhenius (equação 5).

O objetivo deste capítulo foi investigar o mecanismo de decomposição da PQ por TG comparando os métodos isotérmico e não isotérmico sob atmosfera de nitrogênio e de ar.

2 Materiais

Para os estudos de análise térmica, foi utilizada a MP C, conforme estudo de caracterização.

3 Métodos

Os experimentos TG/DTG para análise da cinética de decomposição foram realizados numa termobalança TGA-50 da Shimadzu, usando cadinho de platina com aproximadamente 4 mg de amostra, sob atmosferas de nitrogênio e de ar, com um fluxo de 50 mL/ min.

O estudo cinético não isotérmico foi realizado a partir da aplicação do método de Ozawa (OZAWA, 2000). Nos experimentos dinâmicos, as razões de aquecimento usadas foram 2,5, 5, 10, 15, e 20 °C/ min até a temperatura de 600 °C.

Para o estudo cinético isotérmico, as curvas TG foram obtidas a partir do aquecimento das amostras até as temperaturas de 220, 215, 210, 205 e 200 °C. As curvas isotérmicas foram mantidas até que houvesse uma perda de massa de 8 % e os dados experimentais foram tratados com análise de regressão linear. A razão de aquecimento usada foi 10 °C/ min. O equipamento foi previamente calibrado com padrão de oxalato de cálcio.

4 Resultados e Discussões

Uma das propostas da análise cinética de decomposição dos sólidos é determinar o mecanismo de reação. O método não isotérmico é baseado no método de Ozawa, aos quais determina o valor de energia de ativação através de diversas curvas termogravimétricas obtidas em diferentes razões de aquecimento (OZAWA, 2000). Este método foi usado para obter os parâmetros cinéticos como energia de ativação, ordem de reação e fator pré-exponencial, pela equação 8.

(equação 8)

$$\lg\Phi = \lg [AE / Rg (\alpha)] - 2.315 - 0.4567 E/RT$$

Onde α é a fração decomposta, T é a temperatura, φ é a razão de aquecimento, E é a energia de ativação, A é o fator pré-exponencial e R é a constante geral dos gases (SANTOS et al., 2004).

Os dados cinéticos não-isotérmicos foram determinados pela plotagem da perda de massa *versus* a temperatura das cinco curvas TG nas diferentes razões de aquecimento em ambas as atmosferas. Os resultados demonstraram que os eventos são alterados para temperaturas mais elevadas conforme se aumentam as razões de aquecimento em ambas as atmosferas gasosas. A correlação no gráfico de Ozawa nas cinco razões de aquecimento em atmosfera de nitrogênio (Figura 11) foi adequada, enquanto que em ar uma precária correlação foi visualizada (Figura 12).

A ordem de reação e a E_a do processo foram determinadas pelo método de Ozawa aos quais plotou-se o log da razão de aquecimento *versus* $1/T$ (K). Os parâmetros cinéticos foram obtidos no método não isotérmico para o primeiro estágio de decomposição térmica, entre 208 e 258 °C (Tabela 13).

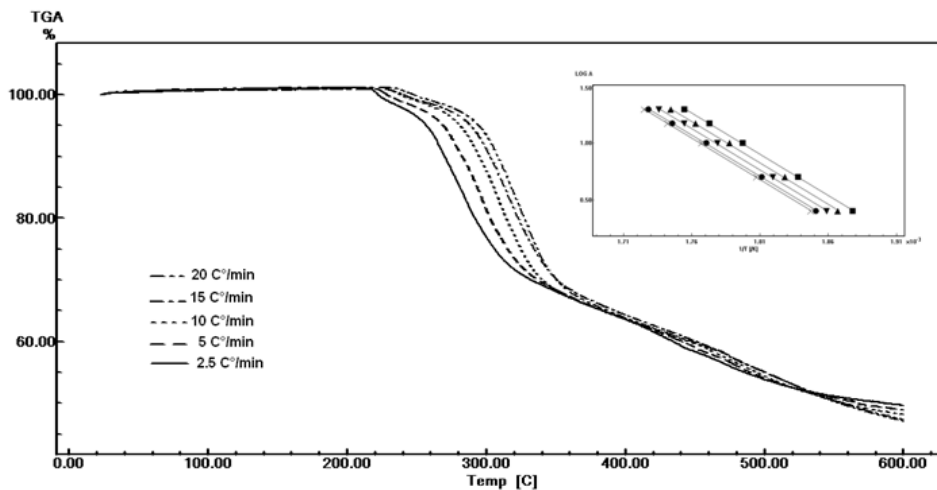


Figura 11. Curvas TG e gráfico de Ozawa obtidas a partir das cinco razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não isotérmico.

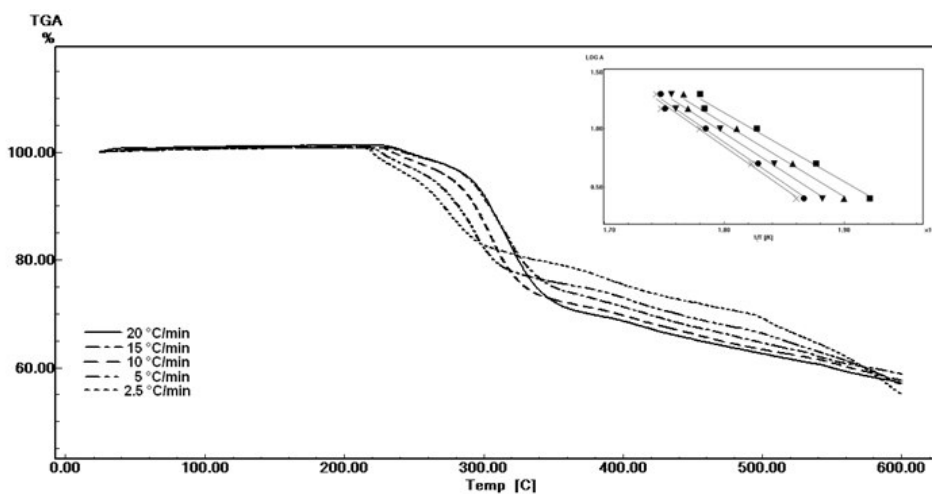


Figura 12. Curvas TG e gráfico de Ozawa de PQ obtidas a partir das cinco razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de ar no método não isotérmico.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos obtidos no método não isotérmico sob ambas as atmosferas.

Atmosfera	E_a	Fator de Frequência (A)	Ordem de reação
Nitrogênio	132,49 kJ/ mol	$1,490 \times 10^{11} \text{ min}^{-1}$	Zero ($n = 0$)
Ar	120,34 kJ/ mol	$1,141 \times 10^{10} \text{ min}^{-1}$	Zero ($n = 0$)

Nas condições isotérmicas (Figura 13 e 14) as curvas mostraram que a variação de perda de massa depende da temperatura. Quanto maior a temperatura, menor foi o tempo necessário para ocorrer a mesma perda de massa. As curvas foram usadas para obter o gráfico de $\ln t$ versus $1/T$ (K⁻¹) até um nível de conversão constante. A equação de regressão linear, coeficiente de correlação (R^2) e energia de ativação (E_a) estão representados na tabela 14.

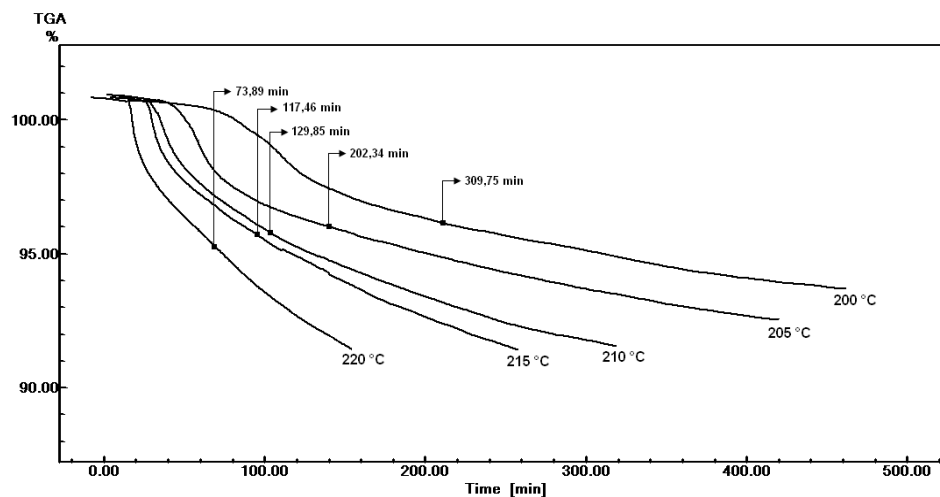


Figura 13. Curvas TG isotérmicas de PQ obtidas nas temperaturas 220, 215, 210, 205 e 200 °C sob atmosfera de nitrogênio.

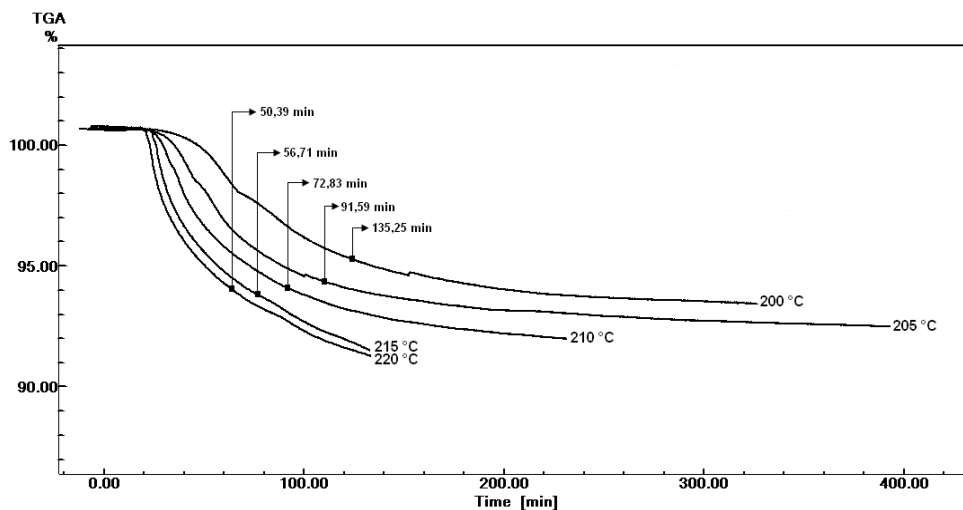


Figura 14. Curvas TG isotérmicas de PQ obtidas nas temperaturas 220, 215, 210, 205 e 200 °C sob atmosfera de ar.

Tabela 14. Parâmetros cinéticos obtidos no método isotérmico em ambas as atmosferas.

Atmosfera	Equação de regressão	R ²	E _a
Nitrogênio	Inclinação: -15,916 Intercepto: 27,964	0,9736	132,33 Kj/ mol
Ar	Inclinação: -11,469 Intercepto: 19,417	0,9702	95,35 Kj/ mol

A utilização das duas atmosferas é útil quando se quer avaliar se o fármaco estudado apresenta grupamentos sensíveis ao oxigênio. Quando se utiliza o nitrogênio, considerado inerte, a única fonte de degradação do fármaco é a temperatura, e quando se usa o ar como atmosfera têm-se além da temperatura, o oxigênio como fontes degradantes.

A comparação entre os métodos não isotérmicos e isotérmicos mostrou que não houve diferenças nos resultados de E_a sob atmosfera de nitrogênio. A decomposição ocorre através de uma cinética de zero ordem em ambos os métodos. Entretanto, sob ar sintético, os valores de E_a foram menores que em nitrogênio, pois a PQ possui grupamentos químicos passíveis de oxidação, que podem sofrer uma aceleração no processo de decomposição sob esta atmosfera.

5 Conclusões

A termogravimetria se mostrou uma técnica apropriada, simples e rápida para avaliar a ordem de reação de decomposição cinética da PQ através dos métodos não isotérmico e isotérmico. A decomposição térmica para ambos os métodos ocorreu em taxa constante, zero ordem e é independente da concentração dos reagentes. A atmosfera envolvida na análise influenciou os dados pois PQ demonstrou menor E_a sob atmosfera de ar, quando compara com a E_a obtida em nitrogênio, demonstrando grupamentos sensíveis a presença do oxigênio. Os resultados descritos neste capítulo podem ser visualizados na forma de artigo no apêndice 1.

***CAPÍTULO 5 – DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE
COMPRIMIDOS MATRICIAIS DE PRIMAQUINA***

1 Introdução

Os comprimidos vêm sendo as formas farmacêuticas mais utilizadas, contemplando o maior número de especialidades farmacêuticas. A liberação do fármaco a partir de comprimidos administrados por via oral consiste na desagregação da forma física e posterior dissolução do fármaco nos fluidos biológicos. A velocidade com que ocorre essa desintegração depende da composição da forma farmacêutica. Formas farmacêuticas de liberação imediata são aquelas que liberam rapidamente o fármaco, enquanto que as de liberação prolongada, modificada ou estendida liberam lentamente o fármaco (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2005).

A PQ encontra-se comercialmente disponível na forma de comprimidos de liberação imediata. A falta de adesão do paciente frente a tratamentos longos pode levar a concentrações sub-terapêuticas no plasma, promovendo o desenvolvimento de resistência do parasita (BAIRD; RIECKMANN, 2003). A resistência com terapia de 15 mg de PQ diariamente por 14 dias foi comprovada (BAIRD; HOFFMAN, 2004). Por outro lado, 30 mg/ dia de PQ têm demonstrado um efeito protetor principalmente contra *P. falciparum* e *P. vivax* (AL-BADR, 2005). Além disso, devido às suas características farmacocinéticas como curta meia-vida de eliminação e elevada toxicidade, foram desenvolvidos comprimidos matriciais de PQ/ POE com o objetivo de aumentar a eficácia do tratamento, reduzir as limitações das terapias existentes além da facilidade de produção e administração (CRUZ, 2006; CRUZ et al., 2008a).

Os comprimidos matriciais de PQ a base de POE foram desenvolvidos através do trabalho de mestrado denominado “Desenvolvimento e avaliação de matrizes de polióxido de etileno (POE) contendo o antimalárico primaquina”, o qual obteve apoio financeiro para o biênio 2006-2007 junto ao CNPq através do Edital MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT-DAF 54/2005. No desenvolvimento das formulações foram utilizados dois pesos moleculares (M_w 4×10^6 ou M_w 8×10^6 g/ mol) do POE nas quantidades de 30 % ou 60 %, para comparar a diferença no comportamento das formulações, e 52,60 mg de difosfato de PQ que corresponde a 30 mg de PQ base. O estudo de pré-formulação foi realizado verificando as características físico-químicas do fármaco e do polímero. Os excipientes para a formulação foram selecionados a partir de estudos de compatibilidade entre o fármaco-excipiente,

através da calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), e espectroscopia na região do infra-vermelho (IV) (Apêndice 1). As formulações foram avaliadas obtendo-se os resultados de ensaios de dissolução, estudo de imagens do polímero (intumescência e erosão), alcançando o mecanismo de liberação do fármaco pela matriz polimérica (CRUZ, 2006; CRUZ et al., 2008a).

Todas as formulações apresentaram um tempo de liberação de cerca de 8 h, seguindo um modelo de difusão não – Fickiana. A cinética de liberação do fármaco foi diretamente relacionada à intumescência e erosão das matrizes. As formulações preparadas com maior concentração do polímero mostraram baixa taxa de erosão, menor liberação do fármaco e maior taxa de intumescimento, quando comparadas com as matrizes contendo menor concentração do polímero (CRUZ, 2006).

A partir dos resultados da dissertação de CRUZ (2006), o objetivo deste capítulo foi produzir a formulação contendo 30 % do POE de 8×10^6 g/ mol com 30 mg de PQ para avaliação físico-química dos comprimidos produzidos e estudo de estabilidade frente a diferentes condições de temperatura (80 °C, 100 °C, 120 °C), câmara climática (40 °C, 75 % de umidade relativa) e câmara de luz UV ($\lambda = 254$ nm). Nas câmaras climática e de luz UV, os comprimidos produzidos foram expostos sem embalagem, em blíster e em frasco plástico âmbar. No estudo de estabilidade, além do teor, avaliou-se a dureza, peso médio e dissolução.

2 Materiais

Os comprimidos de liberação prolongada (CLPs) foram preparados com a MP C. O polióxido de etileno de 8×10^6 g/ mol foi adquirido da Sigma-Aldrich (Germany). A celulose microcristalina, Microcel® PH 200, foi doada pela Blanver. Os excipientes dióxido de silício coloidal, talco (32 mesh) e estearil fumarato de sódio foram doados pela Farmanguinhos.

3 Métodos

3.1 Preparação dos comprimidos

A formulação manteve um total de massa de 175 mg contendo 30 mg de PQ base. Os componentes da formulação foram pesados individualmente e misturados manualmente por 15 minutos. Para obtenção de uma granulometria mais uniforme, a mistura de pós foi passada por Agitador de Peneiras (Série 9904) com tamiz de malha de 350 μm . Misturou-se novamente. Os comprimidos foram obtidos por compressão direta em máquina de compressão excêntrica FABBE, utilizando jogo de punções de 8 mm, planos, sem sulcos. O ajuste do equipamento foi realizado manualmente ajustando a profundidade da câmara de compressão e a penetração da punção superior, de modo a controlar o peso e a dureza dos comprimidos. Durante o processo de compressão foram avaliados o peso em balança analítica (Shimadzu- AW 220) e a dureza dos comprimidos em durômetro (OFF Tec hardness tester, Galileo, Brasil).

3.2 Avaliação física dos comprimidos

3.2.1 Determinação do peso médio

A determinação do peso médio dos comprimidos foi realizada conforme metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (F. BRAS. IV, 1988), em balança Shimadzu (AW 220).

3.2.2 Determinação da dureza

A resistência ao esmagamento e ruptura dos comprimidos foi avaliada conforme metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (F. BRAS. IV, 1988).

3.2.3 Determinação da friabilidade

A friabilidade dos comprimidos foi avaliada conforme metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (F. BRAS. IV, 1988), em Friabilômetro Nova Ética (Mod 300).

3.2.4 Doseamento dos comprimidos

O teor do princípio ativo dos comprimidos foi determinado por CLAE, conforme metodologia descrita no capítulo 2 item 3.5.2. (CRUZ et al., 2008b).

Para o preparo da amostra, 20 comprimidos foram pesados, triturados e porções equivalentes a 20 mg de PQ (66,54 mg de massa de comprimido) foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL, adicionados de 25 mL de água. Levou-se o balão para sonicador por 30 minutos, completando o volume com água ultrapura. Dessa solução retirou-se uma alíquota de 1,25 mL, transferindo-a para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com água ultrapura, obtendo uma solução na concentração de 20 µg/ mL. O procedimento do preparo da amostra foi realizado em triplicata. Para o preparo da solução padrão foi dissolvida quantidade de PQ SQR, exatamente pesada, na fase móvel para obter solução de concentração próxima a 20 µg/ mL.

As soluções preparadas foram injetadas em triplicata no cromatógrafo, os cromatogramas foram registrados e foram obtidas as áreas dos picos principais. A quantidade, em %, de PQ encontrada nos comprimidos foi calculada através da equação 9.

(equação 9)

$$\text{Teor}_{\text{COMP}} = \frac{A_{\text{COMP}} \times \text{teor}_{\text{SQR}}}{A_{\text{SQR}}}$$

Em que **Teor_{SQR}** é igual a 100 %, **A_{SQR}** equivale a área do pico da SQR e a **A_{COMP}** é área do pico do comprimido.

Todos os valores de área utilizados foram na concentração de 20 µg/mL para ser feita uma relação direta entre padrão e amostra. O teor dos comprimidos deve estar entre 93,0 % e 107,0 % (F. BRAS. IV, 2000).

3.2.5 Uniformidade de conteúdo

Na uniformidade de conteúdo foram tomados 10 comprimidos, pesados e triturados individualmente. O doseamento de cada comprimido foi realizado separadamente com a finalidade de garantir a adequação do procedimento de mistura.

As soluções preparadas foram injetadas em triplicata no cromatógrafo, onde a quantidade em % de PQ encontrada em cada comprimido foi calculada através da equação 9. O teor dos comprimidos deve estar compreendido entre 93,0 % e 107,0 % (F. BRAS. IV, 2000).

3.3 Estudo de estabilidade dos comprimidos de liberação prolongada

O estudo de estabilidade dos CLPs contemplou: estudo de degradação forçada dos CLPs nas temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C; estudo de estabilidade acelerado em câmara climática e fotoestabilidade em câmara de luz UV, em três modos de exposição: CLPs sem embalagem, em blíster e em frascos plásticos âmbar.

O teor dos CLPs foi determinado por CLAE, conforme metodologia descrita no capítulo 2 item 3.5.2. (CRUZ et al., 2008b).

Varreduras no espectrofotômetro UV (modelo Cary 50 Bio, Varian, USA) foram realizadas com as mesmas soluções analisadas por CLAE para observar a possibilidade de formação de produto de degradação cuja absorção se daria em outro comprimento de onda distinto de 254 nm.

3.3.1 Estudo de degradação forçada a 80 °C, 100 °C e 120 °C

Os CLPs foram expostos livres de embalagem às temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C com variação de ± 2 °C, em estufas modelos Odontobrás (MOD-EL-1.4) e DeLeo (tipo 797). As tomadas de amostras foram realizadas nos tempos 15, 29, 57, 86, 110, 145 e 187 dias na temperatura de 80 °C, nos tempos 8, 42 e 85 dias na temperatura de 100 °C e, nos tempos 3, 6, 7, 8, 10, 12 e 14 dias na temperatura de 120 °C.

3.3.2 Estudo de estabilidade acelerada e de fotoestabilidade

Os comprimidos foram expostos em três modos de exposição: CLPs sem embalagem, em blíster e em frascos plásticos âmbar à temperatura de $40 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ e $75 \% \pm 5 \%$ de umidade relativa (UR) em câmara climática (Nova Ética 420 CLD) e à luz ultravioleta em câmara ultravioleta (com dimensões 100 x 16 x 16 cm,) espelhada internamente com lâmpada germicida Philips TUV - 254 nm de 30 W, 96 V com $400 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, durante o período de 6 meses, com análise do teor de fármaco nos tempos 0, 13, 31, 60, 89, 121, 145 e 170 dias.

A MP C também foi exposta as mesmas condições para observar se a presença dos excipientes nos CLPs influenciaria a degradação. A MP C foi analisada nos tempos 15, 29, 57, 8, 122 e 137 dias.

Outros parâmetros foram avaliados periodicamente, como aspecto físico, dureza, friabilidade e dissolução.

O processo de emblistagem foi realizado na Univille (Joinville) numa emblistadora Tecno Blister (São Paulo).

3.3.2.1 Ensaio de dissolução

Os ensaios de dissolução foram realizados nos CLPs sem embalagem, em blíster e em frascos plásticos, expostos às câmaras climática e de luz UV nos tempos 0, 60 e 136 dias, em equipamento Dissolution Tester VK 7000 multi-bath (n=6) (Varian, USA).

A metodologia de dissolução para os comprimidos de liberação prolongada foi desenvolvida e validada por Cruz (2006). O meio de dissolução utilizado para avaliar os CLPs foi o HCl 0,1 M (pH 1,19-1,21), mantido a 37 °C durante o ensaio. O aparato 1 (cesta) foi usado numa velocidade de 100 rpm. A amostragem foi manual, onde 10 mL de meio foram retirados em intervalos específicos, mantendo-se o volume constante do meio. As alíquotas foram imediatamente centrifugadas e as absorvâncias (ABS) medidas no espectrofotômetro UV.

Para análise do (%) dissolvido foi utilizado um Espectrofotômetro UV-VIS (Cary 50 Bio, Varian, USA), com cubetas de quartzo de 1 cm. O branco utilizado foi ácido clorídrico (HCl) 0,1 M.

O potenciômetro utilizado para medida do pH do meio foi o modelo 330i (WTW, Germany), o banho ultrassônico para deaeração dos meios foi o modelo USC (Unique, Brasil) e a centrífuga foi a Laboezentrifugen 2-15 (Sigma, Germany).

A solubilidade foi assegurada levando em consideração as condições *sink*, definida como o volume de meio três vezes maior para saturar a solução de PQ.

Os perfis de dissolução foram obtidos pela plotagem do percentual de PQ liberado *versus* o tempo. Ambas as amostras retiradas e o meio recolocado foram considerados nos cálculos. Para avaliar a diferença e a semelhança entre os perfis de dissolução obtidos foi utilizado um modelo matemático independente, como fator de diferença (f1 – equação 10) e o fator de semelhança (f2- equação 11) (MOORE; FLANNER, 1996; FDA, 1997; BRASIL, 2004). O fator de diferença calcula a diferença percentual entre os dois perfis de dissolução em cada ponto e pode ser calculado pela equação 10.

(equação 10)

$$f1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100 \%$$

Onde n é o número do tempo, R_t é o valor de referência da dissolução do grupo de tempo t e T_t é o valor do teste de dissolução do grupo de tempo t .

O fator de similaridade ($f2$) é um logaritmo recíproco da transformação da raiz quadrada da soma do erro quadrado e indica a média da similaridade da porcentagem entre os dois perfis, e é calculado de acordo com a equação 11.

(equação 11)

$$f2 = 50 \log \left\{ \left(1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right)^{-0,5} \times 100 \right\}$$

Onde n é o número de tempos de amostras da dissolução, R_t e T_t são os percentuais individuais liberados em cada tempo t para os dois perfis de dissolução.

A semelhança ou equivalência de dois perfis é observada quando os valores de $f1$ apresentarem-se entre 0 e 15 e os de $f2$, entre 50 e 100 (MOORE; FLANNER, 1996; FDA, 1997).

4 Resultados e Discussões

4.1 Avaliação física dos comprimidos

A média dos resultados relativos às propriedades físicas como peso médio, resistência ao esmagamento e friabilidade dos comprimidos obtida estão descritos na tabela 15.

Tabela 15. Testes físicos realizados com os CLPs.

Teste Físico	Resultado*	Desvio padrão	D.P.R.
Peso médio (mg)	171,99	5,311	3,08
Dureza (kgf)	6,37	0,508	7,97
Espessura (mm)	2,8	0,078	2,79
Friabilidade (%)	0,02	---	---

* Média de 20 comprimidos.

As avaliações destes parâmetros físicos fazem parte de controle de processo e de qualidade de comprimidos, pois estão diretamente relacionados com outras variáveis como o comportamento de dissolução.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1988), comprimidos com massa entre 80,0 e 250,0 mg podem apresentar uma variação máxima de $\pm 7,5\%$ em peso. Os comprimidos obtidos demonstraram estar dentro da faixa de 161,87 – 188,13 mg apresentando homogeneidade de peso.

A resistência ao esmagamento é definida como a resistência à ruptura sob pressão radial, sendo o valor mínimo aceitável de 3 Kgf. Os resultados obtidos estão de acordo com a especificação para a dureza, assim como para a friabilidade ($< 1,5\%$) (F. BRAS. IV, 1988).

4.1.1 Doseamento dos comprimidos

Os valores de teor de PQ dos comprimidos foram $94,45\% \pm 0,61\%$, representando a média de três determinações \pm D.P.R., estando de acordo com os limites farmacopéicos de $93,0\%$ a $107,0\%$. (F. BRAS. IV, 2000; USP 30, 2007).

4.1.2 Uniformidade de conteúdo

A uniformidade de conteúdo dos comprimidos mostrou estar dentro da faixa preconizada variando de 93-96 % (tabela 16). Os resultados indicaram que os processos de mistura e de compressão foram eficientes.

Tabela 16. Uniformidade do conteúdo de 10 comprimidos.

Comprimidos	Teor (%)* \pm D.P.R.
1	94,26 \pm 2,06
2	94,48 \pm 1,73
3	94,18 \pm 2,28
4	93,51 \pm 0,88
5	93,60 \pm 1,92
6	93,81 \pm 1,36
7	96,55 \pm 0,84
8	94,24 \pm 1,49
9	96,86 \pm 0,81
10	94,23 \pm 0,77
Média	94,57 \pm 1,24

* Média de três determinações.

4.2 Estudo de estabilidade dos comprimidos de liberação prolongada

4.2.1 Estudo de degradação forçada a 80 °C, 100 °C e 120 °C

Os resultados das análises de teor dos CLPs expostos as temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C nos tempos pré-determinados estão descritos na tabela 17.

Tabela 17. Teor (%) dos CLPs em estufa nas temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C.

Tempo (dias)	Estufa 80 °C Teor (%)* ± D.P.R.	Tempo (dias)	Estufa 100 °C Teor (%)* ± D.P.R.	Tempo (dias)	Estufa 120 °C Teor (%)* ± D.P.R.
0	94,45 ± 0,78	0	94,45 ± 1,22	0	94,45 ± 1,34
15	92,40 ± 0,69	8	88,22 ± 1,87	3	66,98 ± 1,56
29	91,87 ± 1,45	42	80,56 ± 2,39	6	39,88 ± 1,30
57	89,79 ± 1,98	85	38,68 ± 0,77	7	32,10 ± 1,76
86	88,22 ± 2,75	---	---	8	23,11 ± 2,68
110	86,36 ± 1,76	---	---	10	9,47 ± 2,45
145	83,01 ± 1,48	---	---	12	3,00 ± 0,76
187	81,04 ± 1,59	---	---	14	2,89 ± 1,75

* Média de três determinações.

Pela tabela 17 observou-se que os CLPs mantiveram-se relativamente estáveis a 80 °C, visto que passados 187 dias em estufa, degradaram cerca de 13

%. Em estufa a 100 °C houve uma degradação de 56 % em 85 dias e a 120 °C de aproximadamente 100 % em 14 dias.

A degradação nos CLPs a 80 °C, 100 °C e 120 °C foi maior do que a da matéria-prima (Tabela 7). A 80 °C e 100 °C a MP C degradou 6 % e 11 %, respectivamente. A 120 °C a MP C necessitou 10 dias para degradar 50 %, enquanto que para os CLPs um período menor do que 6 dias foram suficientes. A presença do polímero e dos excipientes acelerou o processo de degradação, indicando menor estabilidade da forma farmacêutica em relação ao fármaco.

A ordem de reação foi determinada plotando-se a concentração do fármaco em função do tempo (ordem zero), o logaritmo da concentração do fármaco em função do tempo (primeira ordem) e o inverso da concentração do fármaco em função do tempo (segunda ordem). Assim como as MPs, os maiores valores de R^2 para os CLPs foram encontrados com a plotagem dos dados de teor (%) pelo tempo de estocagem, sugerindo que a degradação segue uma reação de ordem zero, em todas as temperaturas.

A constante de velocidade (K) foi calculada pelo método gráfico de Arrhenius, seguindo a equação de ordem zero (equação 6) para cada temperatura analisada. O gráfico de $\log K$ versus $1/T$ foi plotado, obtendo-se a equação da reta que forneceu o K para temperatura de 25 °C (K_{25}) e a energia de ativação (E_a) que foi calculada pela equação 7. O K_{25} para os CLPs foi de $1,84 \times 10^{-5}$ dias⁻¹ e a E_a foi de -31165,7 cal/mol. Em relação a MP C ($K_{25} = 1,2155 \times 10^{-6}$ dias⁻¹; $E_a = -36865,7$ cal/mol), o K_{25} e a E_a foram menores, evidenciando a menor estabilidade dos comprimidos em relação à matéria-prima.

4.2.2 Estudo de estabilidade acelerada e de fotoestabilidade

Os resultados das análises de teor (%) dos CLPs e da MP C nos tempos pré-determinados nas câmaras climática e de luz UV estão demonstrados nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Teor (%) dos CLPs em câmara climática e câmara de luz UV.

Tempo (dias)	Câmara Climática (40 °C, 75% UR)			Câmara de luz UV		
	Teor (%)* ± D.P.R.			Teor (%)* ± D.P.R.		
	Sem embalagem	Blíster	Frasco	Sem embalagem	Blíster	Frasco
0	94,45 ± 0,74	94,45 ± 1,29	94,45 ± 1,02	94,45 ± 1,34	94,45 ± 2,33	94,45 ± 1,21
13	94,50 ± 0,97	93,89 ± 0,78	93,13 ± 1,13	95,71 ± 1,55	94,12 ± 2,45	93,65 ± 1,49
31	88,06 ± 1,33	91,72 ± 1,78	91,97 ± 1,44	93,89 ± 1,67	92,11 ± 2,11	92,67 ±1,92
60	83,79 ± 0,65	88,62 ± 2,55	86,60 ± 1,79	88,29 ± 1,98	88,56 ± 0,87	88,23 ± 2,05
89	81,83 ± 1,68	81,74 ± 2,53	83,44 ± 1,68	84,33 ± 1,34	84,15 ± 1,21	83,13 ± 2,07
121	73,25 ± 1,34	79,85 ± 1,65	80,74 ± 1,45	80,89 ± 1,22	81,16 ± 1,49	81,22 ± 1,87
145	69,46 ± 1,47	76,00 ± 1,46	76,15 ± 1,98	76,88 ± 0,79	77,01 ± 1,33	78,58 ± 1,26
170	64,78 ± 1,59	73,60 ± 0,78	71,87 ± 1,33	73,01 ± 2,58	75,96 ± 1,67	74,10 ± 0,73

* Média de três determinações.

Tabela 19. Teor (%) da MP C em câmara climática e câmara de luz UV.

Tempo (dias)	Câmara Climática (40 °C, 75% UR) Teor (%)* ± D.P.R.	Câmara de luz UV Teor (%)* ± D.P.R.
0	99,23 ± 2,33	99,23 ± 1,24
15	92,76 ± 2,55	92,45 ± 2,35
29	94,47 ± 1,76	94,02 ± 1,67
57	93,92 ± 1,93	93,95 ± 1,87
88	85,44 ± 0,68	85,80 ± 1,81
112	81,83 ± 1,22	83,48 ± 1,28
137	72,93 ± 1,75	81,46 ± 1,23

* Média de três determinações.

De acordo com a tabela 18, verificou-se que durante o período de análise (170 dias), os comprimidos expostos a diferentes condições apresentaram uma degradação semelhante. Os CLPs isentos de embalagem na câmara climática demonstraram uma degradação superior quando comparados aos resultados obtidos na câmara de luz UV, na ordem de 8,23 %. Na tabela 19, observa-se que o teor da MP C degradou de maneira similar aos CLPs nas duas condições de estudo. Na análise estatística por ANOVA, as diferenças na degradação tanto dos comprimidos isentos de embalagem, em blíster e em frascos plásticos âmbar nas câmaras climática e de luz UV, quanto da MP C não foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Os resultados de teor obtidos dos CLPs em estufa a 80 °C, e nas câmaras climática e de luz UV foram comparados para avaliar a influência da temperatura, umidade e luz. Após 187 dias de estudo a 80 °C os CLPs degradaram 13,41 %. Em câmara climática e de luz UV depois de 170 dias a degradação foi de 29,67 % e

21,44 %, respectivamente, demonstrando maior degradação num menor espaço de tempo (17 dias a menos de estudo). Os dados das análises de estabilidade demonstram que a degradação foi mais pronunciada na condição fornecida pela câmara climática a 40 °C e 75 % de umidade relativa, seguida pela câmara de luz UV, indicando que a umidade e a luz são os principais fatores degradantes em relação à temperatura de 80 °C. A PQ possui em sua estrutura química o grupamento éter no carbono 6 (figura 2) que constitui uma função orgânica sensível a hidrólise, por isso a presença de água/ umidade no ambiente acelerou a degradação.

Em relação ao aspecto físico, na primeira análise realizada (13 dias), os CLPs sem embalagem expostos as condições da câmara climática apresentavam um tom verde escuro, mesmo estando com o teor adequado. Nos blisters e nos frascos plásticos os CLPs encontravam-se fisicamente iguais ao início do estudo (Figura 15). Na câmara de luz UV depois de 13 dias de exposição os CLPs também se apresentavam adequados (Figura 16). No final do estudo, em 170 dias, todos os comprimidos mostravam-se mais escurecidos em relação ao tempo zero, tanto na câmara climática quanto na de luz UV. A MP C submetida à câmara climática mostrou-se bastante escurecida no final do estudo, demonstrando que o escurecimento dos CLPs está diretamente relacionado à reação do fármaco (Figura 17).

Conforme a Resolução RE nº 1 da ANVISA (2005) para fins de prazo de validade provisório de 24 meses aprova-se o relatório de estabilidade acelerado ou de longa duração de 12 meses que apresentar variação menor ou igual a 5,0 % do valor de análise, mantidas as demais especificações. Caso as variações de doseamento estejam entre 5,1 % e 10,0 % no estudo de estabilidade acelerado, reduz-se o prazo de validade provisório à metade, ou seja, será de 12 meses (BRASIL, 2005). O estudo de estabilidade deve ser executado com o produto farmacêutico em sua embalagem primária (BRASIL, 2005). O estudo de estabilidade acelerado dos CLPs demonstrou que em 170 dias, houve uma degradação superior a 10 % em todos os casos, não possibilitando, portanto, a adoção de um prazo de validade provisório de 12 meses. As embalagens testadas (blister e frasco plástico âmbar) não protegeram efetivamente os CLPs de potenciais agentes degradantes como a umidade e a radiação UV. Os CLPs sem embalagem submetidos à câmara

climática, já reprovariam no estudo de estabilidade acelerado nos primeiros 13 dias uma vez que a aparência física se mostrou alterada, fora dos padrões de qualidade. Os estudos de estabilidade acelerados, neste caso, devem ser realizados utilizando outros tipos de embalagem.

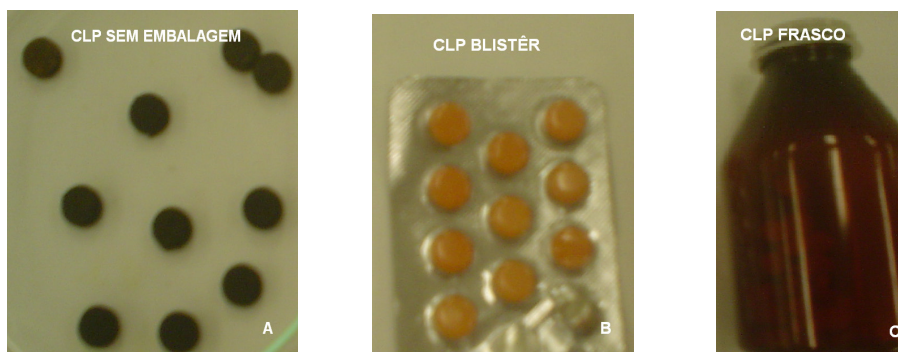


Figura 15. CLPs depois de 13 dias na câmara climática em (A) Sem embalagem; (B) Blíster; e (C) Frasco.

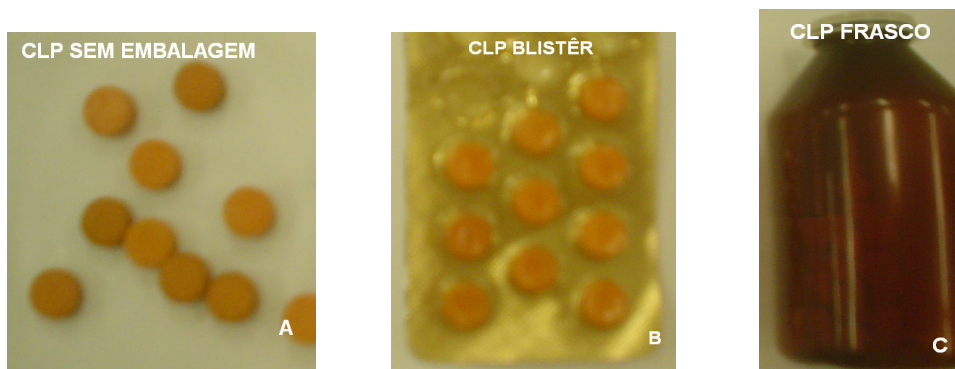


Figura 16. CLPs depois de 13 dias na câmara de luz UV em (A) Sem embalagem; (B) Blíster; e (C) Frasco.

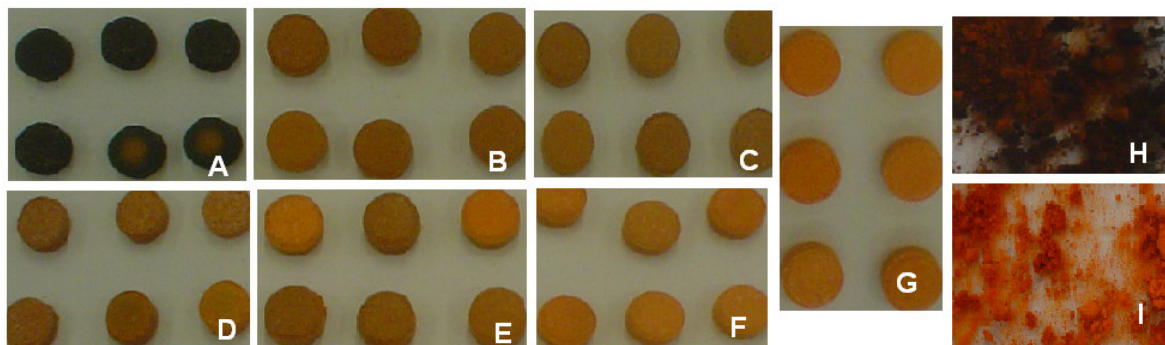


Figura 17. CLPs depois de 170 dias em condições de estresse nas câmaras climáticas: (A) sem embalagem; (B) blíster; (C) frasco, e nas câmaras de luz UV: (D) sem embalagem; (E) blíster; (F) frasco, e (G) tempo zero (sem degradação). MP C depois de 137 dias em condições de estresse nas câmaras climáticas (H) e câmara de luz UV (I).

A dureza dos CLPs foi avaliada antes, durante e ao final dos estudos de estabilidade nas câmaras climáticas e de luz UV. Um comprimido veiculado numa matriz frouxa, com dureza inadequada, afetará diretamente o controle da liberação do fármaco. Na figura 18, observa-se o gráfico representativo do perfil da dureza e mostra que os CLPs submetidos a 40 °C e 75 % de UR diminuiram mais de 50 % a resistência, enquanto que na câmara de luz UV os CLPs mantiveram a dureza inicial. Pelos estudos realizados percebeu-se que a redução da dureza pode ter sido influenciada pelo excesso de umidade da câmara climática, uma vez que o polímero utilizado para a produção das matrizes é intumescível, e a absorção de água é facilitada. Sendo assim, o excesso de umidade leva a uma desestabilização da matriz, podendo resultar num comportamento diferenciado *in vivo*.

Para avaliar essa desestabilização foram observados o peso médio dos CLPs (Tabela 20) e o comportamento de dissolução *in vitro*. Na ANOVA, o peso médio dos CLPs não foi alterado significativamente pela presença da água e da luz UV em todas as formulações ($p < 0,05$).

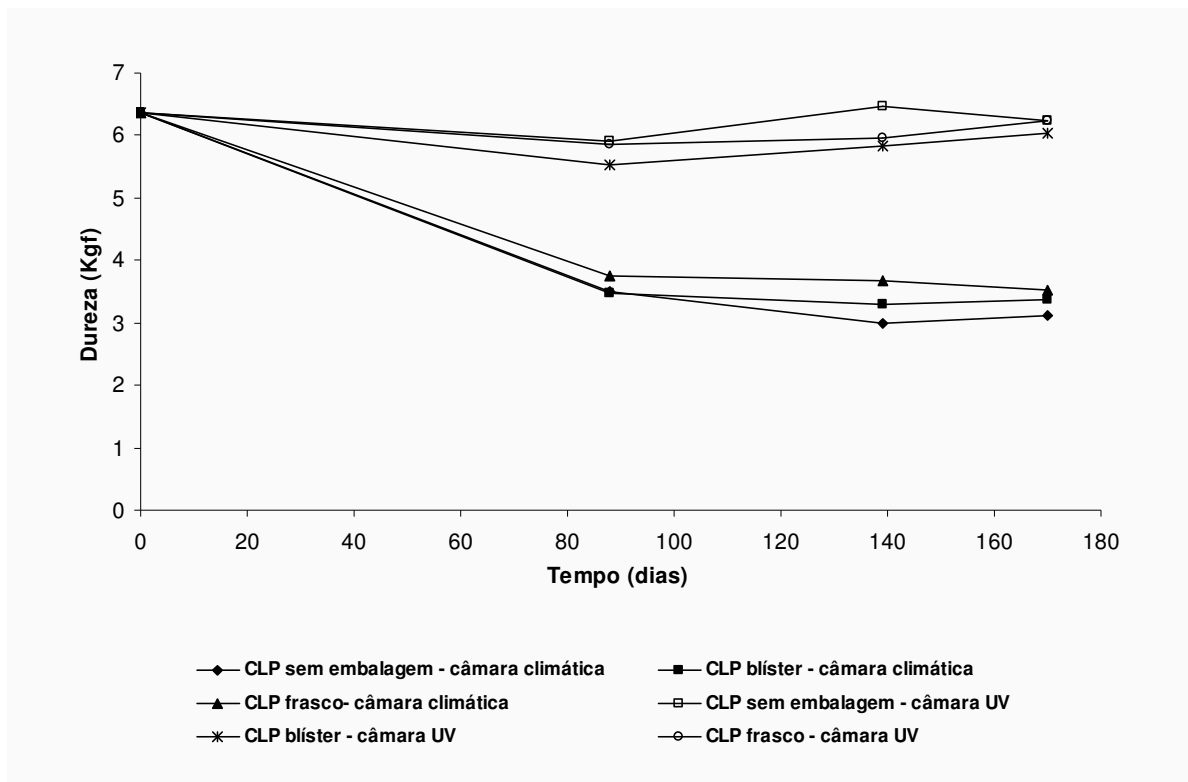


Figura 18. Dureza dos CLPs nas câmaras climáticas e UV, durante o estudo de estabilidade.

Tabela 20. Peso médio dos CLPs durante os estudos de estabilidade acelerada e fotoestabilidade.

Tempo (dias)	Câmara Climática Peso médio (mg)*			Câmara de luz UV Peso médio (mg)*		
	CLP sem embalagem	CLP blíster	CLP frasco	CLP sem embalagem	CLP blíster	CLP frasco
0	171,99	171,99	171,99	171,99	171,99	171,99
60	169,82	170,93	174,40	172,50	173,19	171,58
89	172,64	175,95	174,44	170,87	169,65	176,98
145	181,10	173,79	173,84	170,48	172,46	176,40
170	178,15	176,01	177,05	172,86	171,14	170,34

* Média de três determinações

4.2.2.1 Ensaio de dissolução

Os ensaios de dissolução dos CLPs nas câmaras climáticas e de luz UV foram realizados nos tempos 0, 60 e 136 dias, com o objetivo de avaliar se as condições de estresse poderiam influenciar no comportamento de liberação das matrizes. Na figura 19 observam-se os perfis no tempo zero (comprimidos sem degradação) e no final do estudo de estabilidade.

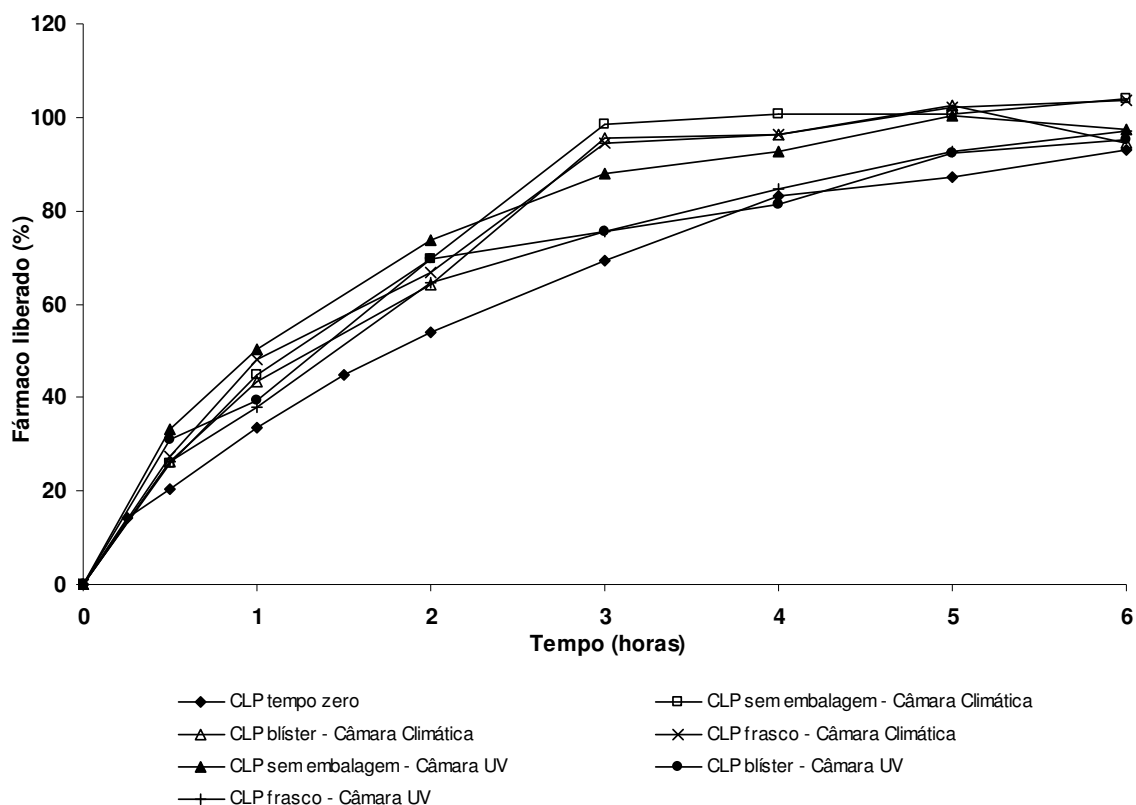


Figura 19. Perfis de dissolução dos CLPs obtidos no tempo zero e depois de 136 dias expostos na câmara climática e na câmara de luz UV, sem embalagem, nos blisters e nos frascos plásticos.

Pelo gráfico (Figura 19) observa-se que os CLPs expostos às condições de estresse apresentaram nos primeiros 30 minutos, um aumento na cedência do fármaco de cerca de 10 % em relação ao tempo zero. Os CLPs armazenados em câmara climática liberaram aproximadamente 100 % de PQ em apenas 3 h, enquanto os CLPs no tempo zero levaram cerca de 6 h para liberar 90 %. Os CLPs da câmara de luz UV nos blisters e nos frascos plásticos demonstraram um comportamento de liberação semelhante ao CLPs no tempo zero, enquanto os CLPs sem embalagem aceleraram a liberação do fármaco.

Para confirmar a semelhança e /ou diferença entre os perfis de dissolução foram comparados entre si os perfis no tempo zero e nos 136 dias, e nos 60 dias e 136 dias, através dos modelos matemáticos independentes f1 e f2 (Tabela 21).

Tabela 21. Perfis de dissolução das câmaras climáticas e de luz UV comparados entre si através de f1 e f2.

Câmara Climática (perfis comparados)	f1	f2
CLP sem embalagem (0 dias x 136 dias)	26,46	41,61
CLP blíster (0 dias x 136 dias)	23,16	44,41
CLP frasco (0 dias x 136 dias)	24,90	43,64
CLP sem embalagem (60 dias x 136 dias)	6,11	60,16
CLP blíster (60 dias x 136 dias)	4,54	56,77
CLP frasco (60 dias x 136 dias)	1,45	69,76
Câmara UV (perfis comparados)	f1	f2
CLP sem embalagem (0 dias x 136 dias)	25,99	43,58
CLP blíster (0 dias x 136 dias)	11,91	56,00
CLP frasco (0 dias x 136 dias)	9,56	63,36
CLP sem embalagem (60 dias x 136 dias)	2,11	75,72
CLP blíster (60 dias x 136 dias)	1,63	62,38
CLP frasco (60 dias x 136 dias)	5,34	64,90

Na tabela 21, pelos valores de f1 e f2, observou-se que os perfis no tempo zero e no final do estudo nos CLPs sem embalagem, blísters e frascos plásticos na câmara climática, assim como os CLPs sem embalagem na câmara de luz UV mostraram ser não equivalentes, confirmando o que foi observado na figura 19. Os perfis de dissolução de 60 dias e 136 dias foram semelhantes, em todas as comparações.

Os perfis de dissolução dos CLPs em câmara climática demonstraram um aumento na cedência na liberação do fármaco das matrizes, corroborando com os resultados obtidos na avaliação da dureza (Figura 18).

5 Conclusões

Os comprimidos de liberação prolongada desenvolvidos demonstraram estar com peso médio, dureza, friabilidade, teor e uniformidade de conteúdo adequado.

No estudo de degradação forçada, observou-se que a cinética de degradação ocorreu em zero ordem, como para a matéria-prima, mas os CLPs apresentaram menor E_a e maior K_{25} que a MP C, demonstrando que os componentes da formulação reduzem a estabilidade da PQ.

No estudo de estabilidade acelerada e fotoestabilidade, os comprimidos isentos de embalagem, em blíster e em frasco plásticos âmbar não apresentaram diferenças significativas na degradação, demonstrando que a embalagem não conteve a umidade e a luz envolvidas no estudo. A umidade influenciou o teor, o aspecto físico, a dureza e a dissolução dos CLPs durante o estudo, enquanto que a luz UV influenciou principalmente o teor. O excesso de umidade presente na câmara climática demonstrou ser o principal fator degradante dos comprimidos quando comparados com a luz e a temperatura. Durante o estudo houve uma redução maior que 10 % do teor dos CLPs em todas as condições testadas, não sendo obtido o prazo de validade provisório de 12 meses.

***CAPÍTULO 6 – DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E
APLICAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO***

1 Introdução

Para que um medicamento seja absorvido após a administração oral, o fármaco deve primeiramente ser liberado da forma farmacêutica na qual encontra-se veiculado. Isso depende da dissolução e solubilização do fármaco nas condições fisiológicas e da permeabilidade no sítio de absorção no trato gastrointestinal (FDA, 1997). Um medicamento quando administrado por via oral num organismo vivo passa pelas etapas biofarmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica, ilustradas na figura 20.

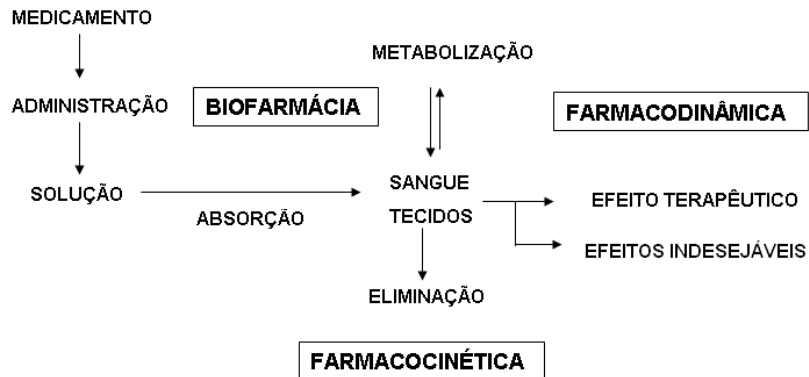


Figura 20. Etapas percorridas por um medicamento quando administrado por via oral (adaptada de SHARGEL; YU, 1999).

A biofarmácia considera a interrelação das propriedades físico-químicas do fármaco, a forma farmacêutica na qual está veiculado, a via de administração e a taxa e extensão da absorção sistêmica. Envolve fatores que influenciam (1) a proteção da atividade do princípio ativo no produto, (2) a liberação do fármaco do produto, (3) a taxa de dissolução no sítio de absorção e (4) a absorção sistêmica (SHARGEL; YU, 1999).

A farmacodinâmica refere-se à inter-relação entre a concentração do fármaco no sítio de ação (receptor) e a resposta farmacológica, incluindo efeitos bioquímicos e fisiológicos que influenciam a interação do fármaco com o receptor. A interação da

molécula do fármaco com o receptor causa o início de uma seqüência de eventos moleculares que resultam numa resposta farmacológica e/ou tóxica (SHARGEL; YU, 1999).

A farmacocinética é o caminho que o medicamento faz no organismo e estuda quantitativamente as etapas de absorção (logo após a administração), distribuição, biotransformação e excreção. Essas etapas ocorrem de forma simultânea. As principais variáveis farmacocinéticas são a biodisponibilidade, a velocidade de eliminação (dada por uma constante K_e), tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e volume de distribuição. As variações no tempo dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção são descritas através de metodologia matemática. A variável é a concentração dos fármacos e dos seus metabólitos nos diferentes tecidos e excreções do organismo. Esta concentração está correlacionada com a via de administração, com a dose empregada, com a eliminação e varia com o tempo de observação (SILVA, 2002).

O termo biodisponibilidade é, na verdade, uma contração de disponibilidade biológica e se refere à taxa e extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no sítio de ação do fármaco. Considerando-se que a quantidade do fármaco contida no fluido biológico está em equilíbrio dinâmico com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do princípio ativo em sangue total, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo (BRASIL, 2002a).

Para determinar a biodisponibilidade e estabelecer a bioequivalência de produtos farmacêuticos administrados em esquema de dose única, são recomendados os parâmetros farmacocinéticos (POLI, 1998):

- Área sob a curva de concentração de fármaco *versus* tempo (ASC).
- Concentração máxima atingida no plasma (C_{max}).
- Tempo necessário para atingir a concentração sanguínea máxima (t_{max}).
- Meia-vida de eliminação terminal ($t_{1/2}$).
- Constante de eliminação terminal (K_e).

Essas medidas são obtidas diretamente das curvas de concentração sanguínea *versus* tempo, construídas no estudo, conforme figura 21.

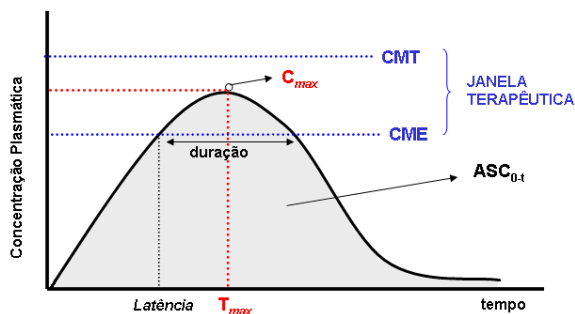


Figura 21. Curva representativa da concentração plasmática no tempo depois da administração oral de um fármaco (figura adaptada de SHARGEL; YU, 1999).

Na figura 21, está representada a concentração mínima tóxica (CMT) e a concentração mínima eficaz (CME). A CMT é considerada a concentração plasmática máxima segura para o paciente e abaixo da CME o fármaco não alcança o efeito terapêutico desejado. A porção ascendente do gráfico está relacionada à fase de absorção e a porção descendente está relacionada à fase de eliminação do fármaco. O período de latência (*onset time*) corresponde ao tempo requerido para o fármaco alcançar a CME e a duração da ação é a diferença entre a latência e o tempo para o fármaco voltar ao CME (SHARGEL; YU, 1999).

A biodisponibilidade absoluta é uma fração ou percentual da dose administrada de determinado fármaco que é absorvida intacta na circulação, ou seja, compara-se uma determinada via de administração com a via intravenosa que representa 100 % de absorção. A biodisponibilidade relativa é uma fração ou percentual de determinado fármaco que é absorvida intacta, a partir de uma forma farmacêutica, em comparação com a forma farmacêutica de referência. Através da biodisponibilidade relativa podem-se comparar duas formas farmacêuticas, avaliando o tipo de formulação na qual o fármaco está veiculado, a presença de excipientes, entre outros. Tanto a biodisponibilidade absoluta quanto a relativa pode-se calcular através da equação 12.

(equação 12)

$$f = \frac{\text{Dose (referência)} \times \text{ASC (teste)}}{\text{Dose (teste)} \times \text{ASC (referência)}} \times 100$$

Onde f é a fração da dose absorvida, o teste é o medicamento testado e, para as referências, são considerados o medicamento via intravenosa quando se quer obter a biodisponibilidade absoluta e para a biodisponibilidade relativa, o existente no mercado.

Através da comparação dos parâmetros farmacocinéticos padrões (ASC, C_{\max} , t_{\max}) entre as formulações (teste x referência) pelo emprego de análise estatística apropriada pode-se concluir sobre a biodisponibilidade relativa e bioequivalência de produtos farmacêuticos, avaliadas quanto à velocidade e extensão da absorção (POLI, 1998).

Certos aspectos da biodisponibilidade podem ter sérias repercussões clínicas. Os fármacos não absorvidos podem deixar o paciente sem medicação útil. As diferenças de absorção de um mesmo ingrediente ativo, provenientes de formas farmacêuticas de diferentes origens ou diferentes lotes de fabricação, levam os pacientes a ficar super ou submedicados. O resultado se reflete em insuficiência terapêutica ou no aparecimento de efeitos adversos graves, principalmente com fármacos que possuem correlação entre intensidade de efeito e concentração plasmática, ou que possuem baixo índice terapêutico (SILVA, 2002).

De uma perspectiva farmacocinética, dados de biodisponibilidade para uma dada formulação provem uma estimativa da fração relativa da dose oral administrada que é absorvida na circulação sistêmica quando comparada com os dados de biodisponibilidade de uma solução, suspensão, ou forma farmacêutica intravenosa. Além disso, os estudos de biodisponibilidade provem outras informações farmacocinéticas importantes relacionadas com a distribuição, eliminação, efeitos dos nutrientes na absorção dos fármacos, proporcionalidade da dose, linearidade na farmacocinética da substância ativa e de metabólitos inativos. Dados de biodisponibilidade podem prover informações indiretas sobre as propriedades de um

fármaco antes de entrar na circulação sistêmica, como permeabilidade e influência de enzimas pré-sistêmicas e/ ou transportadores. A performance *in vivo*, em termos de biodisponibilidade, pode ser considerada um aspecto da qualidade do produto que provem um link com a performance do produto usado na triagem clínica e a base de dados contém evidências de segurança e eficácia.

Conforme o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) de fármacos, a primaquina é um fármaco classe I, apresentando alta solubilidade e alta permeabilidade (FDA, 2001; LINDENBERG et al., 2004). Para fármacos com essas características, normalmente encontra-se uma boa correlação entre os dados de dissolução *in vitro* com os de biodisponibilidade *in vivo*. Incluem-se nessa categoria as formas farmacêuticas de liberação modificada que apresentam uma liberação *in vitro* do fármaco independente do meio de dissolução (FDA, 1997b; BRASIL, 2002b).

Na análise de matrizes complexas como fluídos biológicos, o objetivo é analisar um ou alguns compostos em uma matriz na qual está presente em concentrações muito baixas. Nestes casos, é necessário empregar uma série de etapas, como extração do analito da amostra, sua purificação para eliminação de potenciais contaminantes e interferentes, os quais podem comprometer o resultado analítico, concentração da amostra e separação empregando técnicas de separação e de detecção de alta resolução (LANÇAS, 2008).

Existem várias técnicas de extração, dependendo do estado físico, químico e a complexidade da amostra e dos compostos a serem extraídos. Na extração líquido-líquido duas fases imiscíveis são empregadas: uma fase A, a qual contém o soluto de interesse, e uma fase B a qual será colocada em contato com ela. Desta forma, ocorrerá uma distribuição do soluto entre as fases, e o componente poderá ser submetido a outro processo de extração ou analisado por CLAE. A situação experimental ideal seria aquela no qual o equilíbrio fosse altamente favorecido no sentido da transferência do soluto para a fase B. Essa técnica apresenta como principal desvantagem a baixa seletividade (LANÇAS, 2008).

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos da cromatografia líquida de baixa pressão. Os princípios da EFS são similares aos da extração líquido-líquido e envolvem a partição dos compostos entre duas fases. A EFS comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, denominada de cartucho de extração,

que possui um adsorvente específico para reter o analito de interesse, demonstrado na figura 22. Os diferentes mecanismos de retenção ou eluição são devidos às forças intermoleculares entre o analito e os sítios ativos na superfície do adsorvente. A solução contendo o analito de interesse é colocada no topo superior do cartucho e aspirada com pequeno vácuo ou pressionada levemente com uma seringa, de forma a penetrar no cartucho. Os compostos retidos na fase sólida podem ser removidos pela eluição com um solvente que possui alta afinidade pelos analitos (BERRUETA; GALLO; VICENTE, 1995; LANÇAS, 2008).

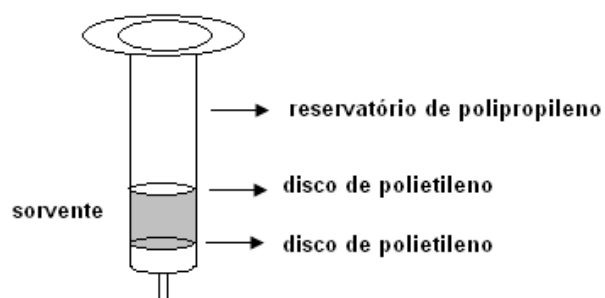


Figura 22. Desenho esquemático de um cartucho EFS.

Os mecanismos de separação em EFS são os mesmos da cromatografia líquida. A escolha da fase sólida apropriada depende da natureza do analito de interesse e da matriz na qual ele se encontra. Os principais mecanismos atualmente em uso em EFS são: adsorção; partição (fase normal e fase reversa); troca iônica; exclusão por tamanho. Essa técnica pode concentrar/enriquecer, isolar, e estocar amostras (LANÇAS, 2008).

As etapas envolvidas no procedimento experimental da EFS encontram-se ilustradas na figura 23.

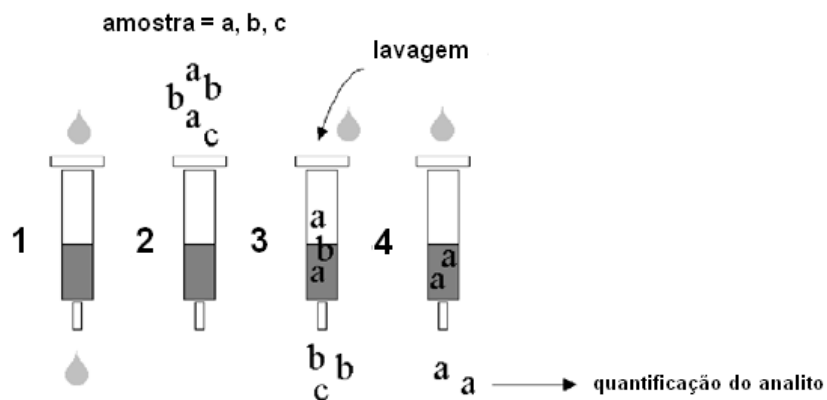


Figura 23. Etapas envolvidas no procedimento experimental da EFS: (1) condicionamento/ ativação do adsorvente (cartucho); (2) aplicação da amostra que deve ficar retida no adsorvente (etapa de sorção/ retenção), representada pelas letras “a”, “b” e “c”, onde “a” é o analito de interesse e “b” e “c” equivalem aos interferentes; (3) lavagem e remoção dos interferentes; (4) eluição dos analitos de interesse do adsorvente com solvente apropriado (etapa de desorção/ eluição). (Figura adaptada de BERRUETA; GALLO; VICENTE, 1995; LANZA; SELLEGREN, 2001).

Na literatura, alguns trabalhos para a determinação de PQ em matrizes biológicas estão disponíveis e encontram-se resumidos na tabela 22. Nestes trabalhos, não houve a contemplação de todos os parâmetros de validação, pois alguns artigos são mais antigos, onde as normas para desenvolvimento e validação de método bioanalítico não eram as mesmas. Dessa forma, Dua e colaboradores (1996) desenvolveram um método por CLAE para doseamento de PQ e carboxiprimaquina no plasma de pacientes com malária *vivax*, onde foram avaliados somente os parâmetros exatidão, precisão e recuperação. Outros trabalhos mais recentes, como o de Lal e colaboradores (2003), demonstram a validação de um método por CLAE para doseamento simultâneo de bulaquina e PQ no plasma de coelhos. Neste trabalho, os parâmetros da validação (reprodutibilidade, linearidade, recuperação, exatidão e precisão) e os estudos de estabilidade foram realizados somente para a Bulaquina e a taxa de recuperação para a PQ foi inferior a 55 % (LAL; MEHROTRA; GUPTA, 2003). Nitin e colaboradores (2003) também

desenvolveram um método por CLAE acoplado ao espectro de massas para quantificação simultânea de Bulaquina e PQ no plasma de macacos. A validação do método avaliou todos os parâmetros, mas a porcentagem de recuperação foi inferior a 60 % (NITIN et al., 2003).

Sendo assim, os objetivos deste capítulo contemplaram: desenvolver e validar metodologia bioanalítica para avaliação da PQ em plasma pelo método de extração em fase sólida; avaliar a biodisponibilidade relativa dos comprimidos de liberação prolongada desenvolvidos comparando com comprimidos de liberação imediata (existentes no mercado) em estudo experimental utilizando como modelo animal cães *Beagles*, determinando os principais parâmetros farmacocinéticos.

Tabela 22. Resumos de trabalhos de métodos desenvolvidos em matrizes biológicas para PQ encontrados na literatura.

Autor (ano)	Objetivo	Deteção	Tempo de Retenção PQ e Padrão Interno (PI)	Matriz	Condições cromatográfica: fase móvel (FM), fluxo e coluna	Tipo e Condições de Extração	Faixa de concentração; Limite de Quantificação (LQ) e Recuperação (%)
Singh e Vingkar (2007)	Avaliação da formulação, atividade antimalárica e biodistribuição de nanoemulsão lipídica de primaquina	UV $\lambda = 254$ nm	---	Plasma, tecidos do fígado, baco, pulmão, rins, coração e cérebro de ratos Wistar	FM: metanol; tampão fosfato pH 4,0; acetônitrila (5:4:1) Fluxo: 1 mL/min Coluna: C-18 Shodex (250 x 4,6 mm – 5 μ m)	Precipitação de proteínas Solvente de precipitação: acetônitrila	---
Cuong et al (2006)	Influência do sexo, comida ou suco de frutas na farmacocinética da primaquina em sujeitos saudáveis	UV $\lambda = 267$ nm	PQ = 7,3 min PI (6 metoxi-8-(3-amino-1-metilpropilaminoquinolino) = 5,6 min	Plasma Humano	FM: acetônitrila: água (30:70) com Reagente UV PIC B-5 5 mM (Waters) Coluna: Waters Symmetry C8 (150 x 3,9 mm) Fluxo: 0,6 mL/min	Baseado em Mihaly et al (1984)	LO = 5 ng/mL
Lal et al (2003)	Determinação de bulaquina e seu metabólito primaquina em plasma de coelhos	UV $\lambda = 261$ nm	Bulaquina = 8 min PQ = 11 min PI (3-bromo primaquina) = 13,5 min	Plasma de coelhos	FM: solvente A (65 %acetônitrila em tampão acetato de amônio 50 mM pH 6) e 35 % solvente B (tampão acetato de amônio 50 mM) – eluição gradiente Fluxo: 1 mL/min Coluna: % Spheri Cyano (220 x 4,6 mm- 5 μ m) Volume de injeção: 50 μ L	Líquido-Líquido Solvente de Extração: 2 vezes de 3 mL da mistura hexano: isopropanol: dimetil octilamina (98:2:0,1 v/v), misurados por 1 min A fase orgânica foi evaporada em evaporador. Resíduo reconstituído em 200 μ L em FM pH 7	Faixa = 20 – 1000 ng/mL LO = 20 ng/mL Recuperação=47-55%
Nitin et al (2003)	Determinação de bulaquina e seu metabólito primaquina em plasma de macacos	MS	Bulaquina = 1,7 min PQ = 4,5 min PI (3-bromo bulaquina) = 6,1 min	Plasma de macacos (<i>resus monkeys</i>)	FM: acetônitrila: tampão acetato de amônia 20 mM, pH 6 (50:50 v/v) Fluxo: 1 mL/min Coluna: 2 colunas Spheri Cyano conectadas em série (30 x 4,6 mm – 5 μ m) Volume de injeção: 20 μ L	Líquido-Líquido Solvente de Extração: 2 vezes de 1 mL da mistura hexano: acetato de etila: dimetil octilamina (90:10:0,5 v/v), misurados por 1 min A fase orgânica foi evaporada em evaporador. Resíduo reconstituído em 150 μ L em FM pH 7	Faixa (razão dos picos PQ/PI) = 3,91-1000 ng/mL LO= 3,91 ng/mL Recuperação= 55-60 %
Mayorga et al (1997)	Determinação dos níveis de primaquina em plasma de camundongos Swiss depois de administração transdêmica	UV $\lambda = 254$ nm	PI (cetprofeno)	Plasma de camundongos Swiss	FM: ácido monocloroacético 7,0 mM e ácido 1- decanosulfônico 0,5 mM; acetônitrila: metanol (66:24:20 v/v) Fluxo: 1,5 mL/min Coluna: C8 (125 x 4 mm – 5 μ m)	Precipitação de proteínas Solvente de precipitação: acetônitrila (0,2 mL)	---
Dua et al (1996)	Determinação de primaquina e carboxiprimaquina no plasma e em células sanguíneas em pacientes com <i>Plasmodium vivax</i>	UV $\lambda = 254$ nm	PQ = 12 min PI (6-metoxiprimaquina) = 8 min	Plasma e células sanguíneas humanas	FM: acetônitrila: metanol: ácido perclórico 1 M: água (30:9:1:95 v/v) Fluxo: 1,5 mL/min Coluna μ Bondapak RP C-18 (300 x 3,9 mm – 5 μ m) Volume de injeção: 20-250 μ L	Líquido-Líquido Solvente de Extração: hexano: acetato de etila (3:5:0,5 v/v) O solvente foi evaporado a 60°C em evaporador. Resíduo reconstituído com 100-250 μ L de FM	Faixa= 0,025- 100 μ g/mL LO = 10 ng/mL Recuperação= 99%

2 Materiais

Os comprimidos de liberação imediata (CLI) foram gentilmente doados pela Fundação Oswaldo Cruz/ Farmanguinhos (Rio de Janeiro, Brasil). A bromoprida, utilizada como padrão interno (PI), foi obtida da Sigma-Aldrich. Os comprimidos de liberação prolongada (CLP) utilizados foram os produzidos no capítulo 5. Metanol e acetonitrila grau HPLC foram obtidos da J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, Inc. USA). Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico. Para todas as análises, foi usada água ultrapura obtida do aparato Milli-Q®.

3 Métodos

3.1 Condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada num cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipado com bomba LC-10AD, detector SPD-10AV_{VP} UV/VIS, controlador SCL-10A_{VP}, degaseificador DGU-14A, forno CTO-10AS_{VP}, sendo a injeção da amostra realizada por uma válvula Rheodyne 7125 contendo *loop* de 20 µL. A detecção foi fixada em 254 nm e a área do pico integrada automaticamente pelo programa Shimadzu Class VP® V 6.14. Foi utilizada uma coluna Luna C₁₈ de fase reversa (Phenomenex, Torrance, USA), com 250 mm x 4.6 mm D.I. e tamanho de partícula de 5 µm, mantida a 35 ± 1 °C, e uma pré-coluna com 4,0 mm x 3,0 mm, do mesmo material da coluna, usada para proteger a coluna analítica. A fase móvel foi constituída por uma mistura de acetonitrila: metanol: água: ácido acético glacial (18:3,5:78:0,5; v/v), pH 2,75, e fluxo de 1 mL/ min. O volume de injeção foi de 20 µL para todas as amostras.

3.2 Preparo das soluções padrões e curva de calibração

A solução estoque de PQ foi preparada pesando 10 mg da SQR em balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com água, até obter uma solução de concentração de 400 µg/ mL. A solução estoque de bromoprida (PI) foi preparada pesando 10 mg de bromoprida em balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com 3 partes de metanol e 2 partes de água (3:2 v/v), até obter uma solução de concentração de 400 µg/ mL. Alíquotas da solução estoque de PQ foram diluídas com água para obter uma curva de calibração com as concentrações de 60, 50, 40, 30, 24, 12, 6, 3, e 1,5 µg/ mL.

O volume correspondente a 25 µL das soluções de PQ foi adicionado em 475 µL de plasma branco para preparar as soluções padrões de calibração na faixa de concentração de 75 - 3000 ng/ mL (75, 150, 300, 600, 1200, 1500, 2000, 2500, e 3000 ng/ mL). Foi preparado um “pool” de plasma das amostras de controle de qualidade (CQ) com as concentrações de 200 (baixo), 1300 (médio) e 2700 ng/ mL (alto), que foram divididas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até a análise.

3.3 Extração em fase sólida (EFS) da PQ contida no plasma

Para a análise de PQ, um total de 500 µL de plasma contaminado (475 µL plasma + 25 µL de solução de PQ ou água) foi transferido para tubos de vidro de 10 mL, seguido pela adição de 37,5 µL de solução de PI (200 µg/ mL de bromoprida em água), 50 µL de hidróxido de amônio e 200 µL de água. Todas as amostras foram misturadas em vórtex por 30 s. Então, 740 µL de amostras foram carregados em cartuchos (30 mg/ mL, Strata X, Phenomenex®) pré tratados com 1 mL de metanol para ativação e 1 mL de água para lavagem. Para extração das amostras de cartuchos foram usados dois volumes de 1 mL de uma mistura de metanol:acetonitrila:água:ácido acético glacial (60:30:10:0,1, v/v). O eluído foi evaporado até secagem a 60 °C sob pressão reduzida num concentrador speed-vac (Savant SPD 1010, Thermo Electron Corporation). As amostras foram reconstituídas com 250 µL de fase móvel e misturadas em vórtex por 1 min. Uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi injetada no sistema cromatográfico.

3.4 Validação do método

O processo de validação da metodologia analítica foi contemplado com os parâmetros de especificidade, recuperação, limites de quantificação e detecção, linearidade, exatidão e precisão intra e inter dias, e estabilidade na matriz biológica (FDA, 2001).

Antes de iniciar a validação, o intervalo da curva de calibração e as concentrações dos controles de qualidade foram pré-estabelecidos. Os parâmetros recuperação, precisão, exatidão e estabilidade foram avaliados em três diferentes concentrações: controle de qualidade baixo, médio e alto:

- Controle de qualidade baixo (CQB): menor ou igual a três vezes a concentração do limite de quantificação inferior.
- Controle de qualidade médio (CQM): concentração média entre o controle de qualidade baixo e alto.
- Controle de qualidade alto (CQA): de 75% a 90% da maior concentração da curva de calibração.

3.4.1 Especificidade

Para confirmar a especificidade e seletividade do método foram avaliadas seis amostras de matriz biológica de cães livre do fármaco, onde quatro foram de plasma branco normais, uma de plasma lipêmico (amostra de plasma uma hora após refeição) e uma hemolisado. As mesmas foram submetidas ao procedimento de extração e analisadas nas condições cromatográficas propostas para determinar a extensão dos componentes plasmáticos endógenos que poderiam interferir na análise de PQ e PI. Os resultados foram comparados com uma solução contendo 75 ng/ mL de PQ.

3.4.2 Linearidade (curva de calibração)

As curvas de calibração foram construídas a partir de amostras de plasma “branco” (processada sem PI), “normal” (processada com PI) e nove concentrações de PQ (incluindo o limite de quantificação) na faixa de 75 a 3000 ng/ mL. Para plotar o gráfico e obter a linearidade do método por regressão linear foi utilizado a razão da área do pico das concentrações das soluções de PQ e do PI *versus* a concentração nominal.

3.4.3 Limite de detecção (LD) e de quantificação inferior (LQI)

O LD foi determinado através da análise de concentrações conhecidas e decrescentes da solução padrão do fármaco em duplicata, até o menor nível detectado.

A determinação do LQI foi estabelecida por meio da análise de amostras de plasma contendo concentrações decrescentes de soluções de PQ até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (em quintuplicata).

3.4.4 Recuperação

A recuperação indica a eficiência da extração do fármaco e/ou seus metabólitos através de todo o processo de preparação de amostras. Esta, é estabelecida como a relação que existe entre a resposta de uma amostra extraída *versus* uma amostra não extraída.

Esse parâmetro foi avaliado comparando-se amostras submetidas ao processo de extração com aquelas que não sofreram o processo, mas foram adicionadas ao plasma branco submetido ao processo de extração. Este parâmetro foi analisado em três diferentes concentrações (CQB, CQM, CQA) e em sextuplicata.

3.4.5 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão intra e inter-dias, amostras CQ foram avaliadas em quintuplicata, num único dia e em três dias diferentes, respectivamente. Os resultados de precisão e exatidão foram expressos como D.P.R. Os resultados dos parâmetros de precisão e exatidão foram comparados com uma curva de calibração obtida no dia da avaliação destes parâmetros.

3.4.6 Estabilidade do fármaco na matriz biológica

3.4.6.1 Processamento das amostras biológicas

Após a coleta do sangue dos cães em frascos heparinizados, os mesmos foram centrifugados e separados em duplicatas contendo 2 mL de plasma em cada frasco. As duplicatas foram armazenadas à -20 °C. No momento da análise as amostras a serem processadas, no dia, foram descongeladas a temperatura ambiente e analisadas conforme a validação.

3.4.6.2 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Testou-se a estabilidade do padrão no plasma durante três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA) em triplicata, comparando os resultados com amostras recém-preparadas (ciclo zero).

Foram preparadas doze amostras de plasma de CQB, doze amostras de CQM e doze amostras de CQA, onde analisou-se três amostras de plasma de cada concentração (CQB, CQM, CQA) antes de congelá-las (ciclo zero) e, as demais foram congeladas por 12 horas a -20 °C. Descongelou-se todas as amostras a temperatura ambiente, tendo sido analisadas três amostras de cada concentração (ciclo 1). As demais amostras foram recongeladas por no mínimo 12 horas. Após

este período as mesmas foram descongeladas e analisadas três amostras de cada concentração (ciclo 2). As demais amostras foram novamente recongeladas por, no mínimo, 12 horas. Novamente as amostras foram descongeladas e analisadas (ciclo 3). Os resultados foram expressos calculando-se a precisão e a exatidão juntamente com uma curva de calibração preparada no dia de análise de cada ciclo. Os resultados da análise das amostras de cada ciclo foram comparados com os resultados das amostras recém-preparadas.

3.4.6.3 Estabilidade de curta duração

A estabilidade da PQ no plasma foi testada durante o tempo e dentro das condições de análise, utilizando-se as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA) em triplicata.

As amostras foram descongeladas e mantidas à temperatura ambiente durante 7 horas e submetidas ao processo de extração. Os resultados foram comparados com os resultados de amostras descongeladas e imediatamente processadas.

3.4.6.4 Estabilidade de longa duração

Avaliou-se o intervalo de tempo em que as amostras de plasma podem ficar armazenadas sem comprometer a estabilidade das mesmas, compreendendo o intervalo de tempo entre a coleta da primeira amostra e a análise da última (60 dias).

Para analisar a estabilidade do padrão na matriz biológica foram utilizadas as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA) em triplicata. Os resultados foram comparados com os de amostras recém-preparadas.

3.4.6.5 Estabilidade pós-processamento

A estabilidade da PQ na matriz biológica foi testada durante o tempo de espera para injetar, utilizando-se as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA) em triplicata.

Estas amostras foram submetidas ao processo de descongelamento natural, processo de extração e manutenção na temperatura sob qual o teste foi realizado durante 24 e 48 horas. Após este período foram analisadas, sendo os resultados comparados com os de amostras recém-processadas.

3.4.6.6 Análise dos resultados

As amostras foram consideradas estáveis quando não se observou desvio superior a 15% do valor obtido com as amostras recém-preparadas.

3.5 Estudo pré-clínico em cães

O estudo foi encaminhado previamente e aprovado pela Comissão de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da UFSC, sob protocolo PP00114.

3.5.1 Protocolo experimental

Seis cães da raça *Beagles* saudáveis, do sexo feminino entre 1 e 2 anos de idade, com peso entre 12,10 – 17,45 kg, foram utilizados para um estudo cruzado e aleatório, no qual cada animal recebeu dois tratamentos em períodos diferentes. Para tal, cada animal foi colocado em jejum por 14-16h previamente ao experimento, com suprimento de água *ad libitum*.

Durante o curso dos experimentos, cada cão recebeu por via oral as seguintes formulações acompanhadas de 40ml de água: quatro comprimidos

controles de liberação imediata (CLI) contendo 15 mg de PQ, produzidos pela FIOCRUZ, totalizando 60 mg de PQ; e, dois comprimidos testes de liberação prolongada (CLP) contendo 30 mg de PQ, totalizando também 60 mg. Um intervalo de descanso entre os experimentos, período denominado *washout*, que equivale entre 7 e 10 meias-vidas de eliminação para comparação dos perfis, foi empregado entre administrações subseqüentes em um mesmo cão. Durante o período experimental os animais não foram alimentados, com livre acesso à água.

As patas dos cães foram raspadas e a veia cefálica acessada utilizando-se um catéter n° 24. Amostras de sangue (3 mL) foram coletadas com seringa heparinizada, antes (tempo 0) e em períodos pré-determinados nos tempos de 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, 24 e 48 horas após a administração de CLP, e nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90 min., 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, e 6 horas após administração dos CLI.

As amostras foram imediatamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e armazenadas a -20°C até a análise. O protocolo experimental foi realizado observando-se o regulamento institucional para pesquisa experimental.

3.5.2 Metodologia analítica

Após a administração dos CLIs e CLPs aos cães, as amostras coletadas foram submetidas ao processo de EFS, conforme descrito no item 3.3 deste capítulo e determinadas por CLAE. As curvas de calibração foram obtidas nos dias das análises para obter as concentrações plasmáticas de PQ.

3.5.3 Cálculo das concentrações

A equação da curva de calibração foi determinada por regressão linear baseada no método dos mínimos quadrados. A curva de calibração foi traçada lançando-se no eixo "x" as concentrações nominais das soluções padrões *versus* a razão (R) entre as alturas dos picos correspondentes ao fármaco e ao PI. As concentrações de PQ nas "amostras desconhecidas" foram calculadas pelo emprego

da equação ($y = ax + b$), onde x é a concentração do fármaco no plasma (ng/ mL), y é a razão (R) entre a altura do pico do fármaco e a altura do pico do padrão interno, a é a inclinação da reta e b é o valor do intercepto.

3.5.4 Análise farmacocinética e estatística

As curvas individuais de concentração plasmática do fármaco em função do tempo foram construídas lançando-se no eixo y as concentrações de PQ encontradas no plasma dos animais e no eixo x os tempos em que as amostras foram coletadas. A concentração plasmática máxima observada (C_{max}) e o tempo necessário para atingí-la (t_{max}) foram obtidos a partir de cada curva.

As áreas sob as curvas (ASC) das concentrações individuais de PQ *versus* tempo de 0 a 48 horas ($ASC_{[0-48]}$) e ao infinito ($ASC_{[0-\infty]}$) foram calculadas para cada animal empregando-se o método trapezoidal, onde para os cálculos ao infinito extrapola-se a parte terminal da curva, expressa por uma relação entre a última concentração medida C_k e a constante de velocidade de eliminação do fármaco (K_e), $ASC_{[0-\infty]} = C_k/K_e$. A K_e foi estimada para cada animal, pelo cálculo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se as concentrações (log transformadas multiplicada por -2,303) que compõem a fase de decaimento terminal. O tempo de meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) foi derivado do K_e onde $t_{1/2} = \ln 2/K_e$. Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos com o auxílio do programa Pharmakit (JOHNSTON; WOOLLARD, 1983).

A biodisponibilidade relativa (f_{rel}) foi calculada através da equação 12, onde foi considerado como “teste” o CLP produzido e como “referência” o CLI disponíveis no mercado.

Os parâmetros farmacocinéticos preliminares foram analisados pelo teste t de Student e intervalo de confiança de 90%, e os parâmetros das duas formulações foram comparadas por ANOVA (dados log transformados, com $p < 0,05$).

A bioequivalência das duas formulações CLP e CLI foi avaliada por ANOVA (dados log transformados) e o cálculo dos intervalos de confiança (IC 90%) para a razão entre as médias dos valores log-transformados para C_{max} e $ASC_{[0-\infty]}$ das

formulações teste e referência, foi obtido com auxílio do programa de computador “Bioequivalence Program for two-Period Crossover Studies”, versão 3.4, de Herman P. Winjand.

4 Resultados e Discussões

4.1 Desenvolvimento do método

O desenvolvimento do método bioanalítico foi baseado nas características de estabilidade do fármaco no fluido biológico (plasma) e nas soluções de trabalho empregadas, e seguiu as recomendações do FDA (2001), BRASIL (2002a) e BRASIL (2003). O procedimento foi validado previamente *ex vivo* antes dos comprimidos serem administrados aos cães.

A partir do levantamento bibliográfico realizado, três métodos foram testados para doseamento da PQ no plasma, por precipitação de proteínas, por extração líquido – líquido e por extração sólido-líquido (denominado extração em fase sólida). O plasma utilizado para o estudo foi o proveniente de cães *Beagles*, pois os CLPs foram testados posteriormente nessa espécie.

As condições cromatográficas utilizadas para os métodos de precipitação de proteínas e extração líquido-líquido foram detecção em 254 nm, coluna RP C₁₈A Merck (150 x 4,6 mm - 5 µm), e fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila, metanol, ácido perclórico 1 M e água (26:5:0,8:68,2, v/v), com fluxo de 1,0 mL/ min.

4.1.1 Precipitação de proteínas

O método de quantificação de PQ por precipitação de proteínas foi realizado testando os solventes de precipitação acetonitrila ou metanol, adicionados numa quantidade equivalente de plasma contaminado com solução de PQ. Essa mistura foi agitada em vórtex, centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi

injetado no sistema cromatográfico. O método mostrou-se prático e rápido, porém não obteve bons resultados. A recuperação alcançada foi insatisfatória (cerca de 10 %) e apareceram picos interferentes com tempo de retenção semelhante ao da PQ. Esses resultados foram relacionados ao fato de que a fase móvel utilizada não tinha a presença de agentes de pareamento iônico (ácido sulfônico ou dodecanosulfônico), comuns a esse tipo de extração, que facilitam a resolução e separação dos picos de interesse (MAYORGA et al., 1997).

4.1.2 Extração líquido-líquido

No desenvolvimento do método por extração líquido-líquido foram testados diferentes solventes de extração e basificadores. As amostras utilizadas foram amostra branco (475 µL plasma + 25 µL água), amostra contaminada (475 µL plasma + 25 µL de solução de PQ a 200 µg), amostra recuperação (475 µL plasma + 25 µL água, e depois do congelamento, filtrou-se para tubos que continham 25 µL de sol de PQ a 200 µg seca). Para PI foram testados fármacos como atenolol, mefloquina, cloroquina, metoclopramida, amoxicilina, bromoprida e fluconazol. A base foi adicionada para favorecer a extração, pois em pH alcalino a PQ está na forma não ionizada facilitando sua passagem para o solvente orgânico. Foi utilizada amônia concentrada nas quantidades de 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL, 2 mL e hidróxido de sódio 2 N nas quantidades de 50 µL, 100 µL, 200 µL. Foram avaliadas as taxas de recuperação obtidas com os solventes hexano, hexano: acetato de etila (87,5:12,5, v/v), hexano: clorofórmio (66:34, v/v), hexano: clorofórmio (50:50, v/v), hexano: clorofórmio: acetato de etila (45:45:10, v/v), hexano: diclorometano (87,5:12,5, v/v), hexano: isopropanol (98:2, v/v), éter: diclorometano (80:20, v/v), clorofórmio, heptano e heptano: clorofórmio (66:34, v/v). O tempo de extração (agitação em vórtex), para se obter melhor recuperação também foi avaliado e testou-se uma extração de 3 min, duas extrações de 2 min, duas extrações de 3 min, e três extrações de 3 min. A solução de reconstituição testada para o extraído foi a água (250 µL) e a fase móvel (250 µL ou 200 µL).

No procedimento a amostra (branco, contaminada ou recuperada) foi adicionada com o PI, misturada em vórtex por 30 s, adicionada de base, misturada

em vórtex por 30 s, adicionada de 3 mL de solvente de extração, misturada em vórtex, centrifugada a 3.000 rpm por 10 min e congelada em nitrogênio líquido. A fase orgânica foi filtrada e transferida para tubo limpo (ou contendo a solução de PQ seca, no caso da amostra recuperada), e a fase aquosa foi novamente extraída. A fase orgânica foi evaporada até a secagem sob pressão reduzida em Speed Vac Concentrator (Savant SPD 1010, Thermo Electron Corporation). O resíduo seco foi reconstituído com solução de reconstituição e injetado no sistema CLAE.

O solvente extrator foi o primeiro parâmetro definido e foi selecionado baseando-se nas características de especificidade e recuperação máxima para o fármaco e o PI e recuperação mínima dos interferentes presentes na matriz biológica. O heptano juntamente com 50 µL de amônia concentrada, apresentou os melhores resultados (maior taxa de extração, menor interferência de proteínas plasmáticas). Para otimização do método, observou-se o número e tempo de extrações. Com duas extrações aumentou-se a eficiência em mais de 30 %, em relação à somente uma extração. Com três extrações não se observou melhora significativa na eficiência, com aumento do tempo para realizar as análises, portanto duas extrações de 3 minutos cada foram suficientes. Para reconstituição do extraído, os melhores resultados foram obtidos utilizando 250 µL de fase móvel. A cloroquina foi o PI mais adequado, pois possui características físico-químicas e estrutura química semelhantes à PQ. O método desenvolvido obteve uma eficiência de extração de aproximadamente 70% correlacionando com os tubos teste de recuperação. Entretanto, ao longo das análises, o método demonstrou-se não linear, pouco sensível e não reprodutível, sendo inapropriado para as próximas etapas de validação e avaliação do perfil plasmático *in vivo* dos CLPs desenvolvidos. Adicionalmente, esse método teve elevado consumo de solvente e de tempo para o preparo das amostras. Dessa forma, houve a necessidade de desenvolver um novo método, se optando assim pela EFS.

4.1.3 Extração em fase sólida (EFS)

As condições cromatográficas foram otimizadas para prover uma aceitável resolução dos analitos presentes no plasma. Para obter a melhor condição

cromatográfica diferentes colunas e fase móvel consistindo de diferentes proporções de acetonitrila, metanol, água e diferentes pHs foram testados para prover suficiente seletividade e sensibilidade num curto espaço de tempo para a separação. Modificadores como ácido acético e ácido perclórico foram testados. O melhor sinal para PQ e PI foi alcançado usando acetonitrila: metanol: água: ácido acético (18: 3,5: 78: 0,5; v/v), pH 2,75, com um fluxo de 1 mL/ min numa coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm – 5 µm). Essas condições proveram uma boa resolução de PQ (tempo de retenção = 9,5 min) e PI (tempo de retenção= 4 min) observados nos cromatogramas.

Devido à natureza complexa do plasma, um pré-tratamento da amostra foi necessário para remover proteínas e interferentes potenciais antes da análise. EFS foi adotada porque é uma técnica que pode concentrar e purificar a amostra. A mistura de solventes para extração de metanol: acetonitrila: água: ácido acético (60:30:10:0,1, v/v) foi a mais apropriada resultando numa alta eficiência de extração e baixa interferência de proteínas. Dessa forma, o sistema CLAE com detecção UV e extração em fase sólida foram empregados devido às altas taxas de recuperação, precisão e exatidão alcançadas dos analitos de interesse.

4.2 Validação do método

4.2.1 Especificidade

A comparação dos cromatogramas do plasma branco, do plasma branco hemolisado, plasma branco lipêmico e do plasma contaminado (na concentração de 75 ng/ mL) não indicou a presença significativa de interferentes e substâncias endógenas, tanto para a PQ quanto para o PI (Figura 24).

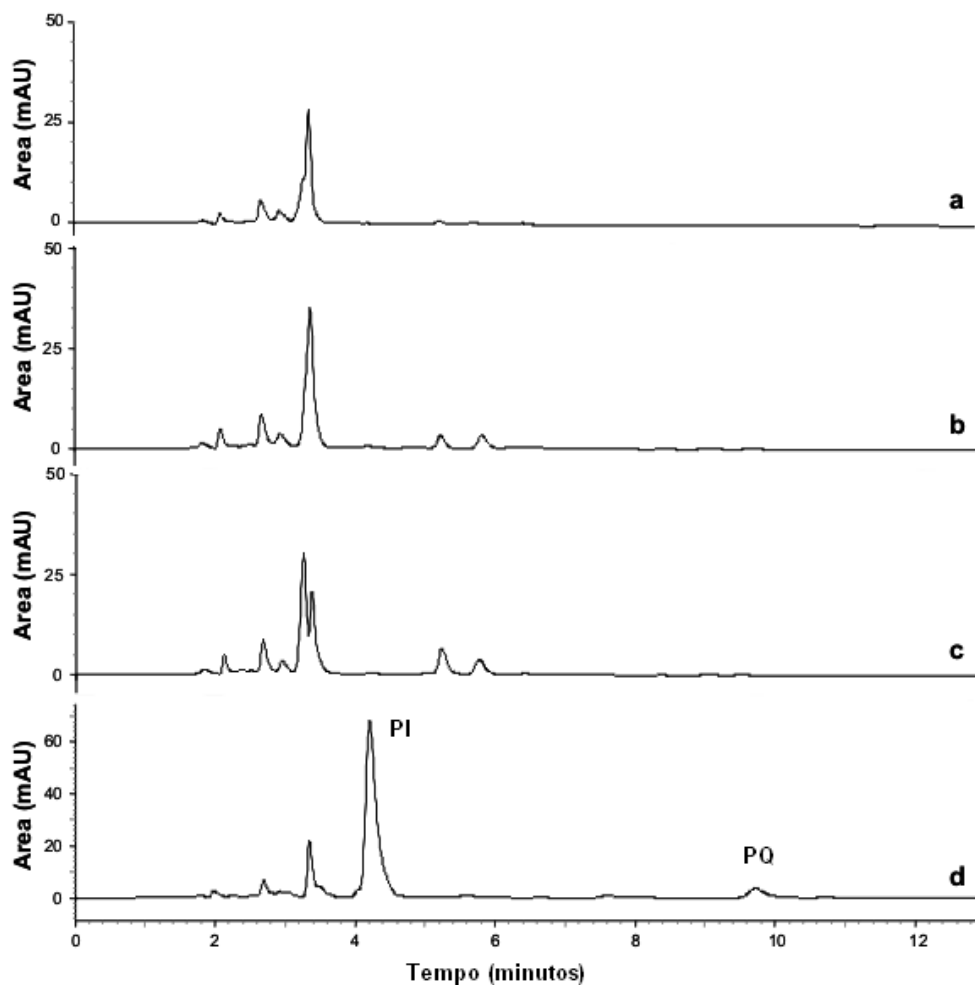


Figura 24. Cromatogramas obtidos para análise da especificidade do método de diferentes plasma de cães *Beagles* (A) Plasma branco; (B) Plasma lipêmico; (C) Plasma hemolisado; (D) Plasma contendo 75 ng/ mL de PQ e 15 µg/ mL de PI (bromoprida). Condições analíticas: coluna C₁₈ (250 x 4.6 mm - 5 µm), fase móvel: acetonitrila:metanol:água:ácido acético (18:3.5:78:0.5; v/v), pH 2,75, 254 nm.

4.2.2 Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação inferior (LQI)

A linearidade foi avaliada por seis determinações de nove concentrações na faixa de 75- 3000 ng /mL para PQ. O coeficiente de correlação linear (R^2)

encontrado foi de 0,999, sendo superior a 0,98, conforme as especificações do FDA (2001), indicando linearidade adequada da curva de calibração (Figura 25).

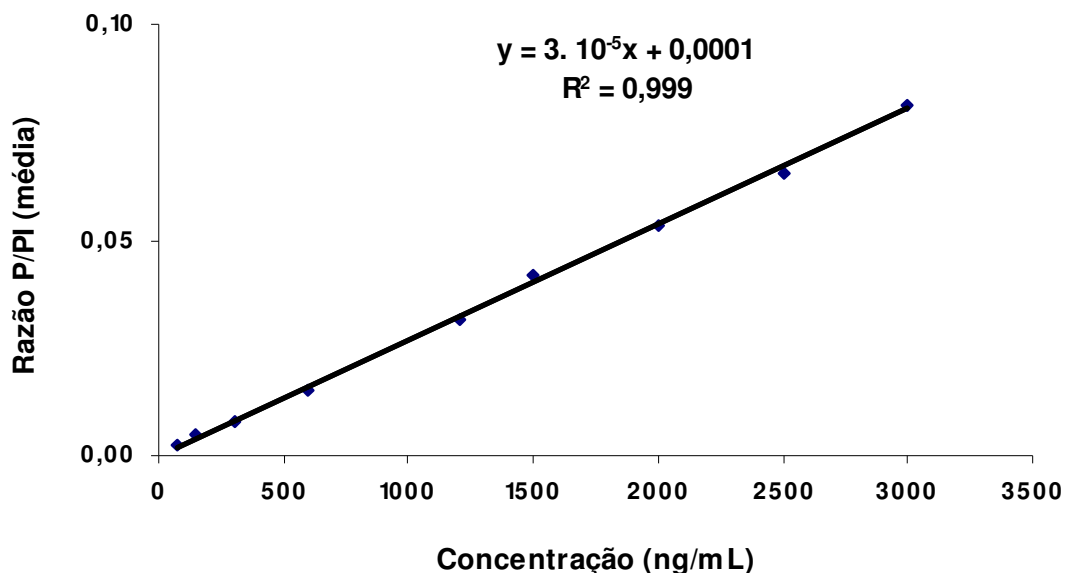


Figura 25. Curva de calibração média da PQ obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta.

O LQI é a menor concentração do analito capaz de ser quantificável com precisão e exatidão de $\pm 20\%$, ou seja, o D.P.R. deve ser no máximo 20% e a exatidão deve estar na faixa de 80% a 120% (FDA, 2001). O LQI encontrado no delineamento experimental foi de 75 ng/ mL com precisão de 10,33% e exatidão de 110,33 %, enquanto o LD foi de 40 ng/ mL e, não se observou interferência significativa de componentes endógenos do plasma branco no tempo de retenção da PQ e do PI.

Na curva de calibração, o D.P.R. encontrado entre as repetições foi menor que 15% para todos os pontos, inclusive para o limite de quantificação, onde aceita-se até 20%.

4.2.3 Recuperação

A média das taxas de recuperações para os três níveis de concentrações das amostras CQ foi de 98,38% para PQ e $99,01 \pm 11,23$ (D.P.R.) para PI (Tabela 23), e o D.P.R. foi inferior a 15 % em todas as concentrações, conforme as recomendações do FDA (2001).

Tabela 23. Recuperação de PQ depois do procedimento de extração.

PQ *	Concentração nominal (ng/ mL)	% Recuperação \pm D.P.R.
CQB	200	$88,61 \pm 13,24$
CQM	1300	$110,83 \pm 10,28$
CQA	2700	$95,70 \pm 10,88$

* Média de seis repetições

4.2.4 Precisão e exatidão

Para a exatidão intra-dia foram obtidos valores entre 101,51 % e 104,13 % com uma precisão de 6,77 – 9,76 %. Para a exatidão inter-dia foram encontrados valores entre 103,39 % e 107,21 % com D.P.R. de 6,81- 9,21 % (Tabela 24). Os D.P.R.s dos CQs não excederam 15% da concentração nominal para as três concentrações analisadas (CQA, CQM, CQB), inclusive para o LQI, de acordo com o FDA (2001), indicando que o método possui adequada repetibilidade e reprodutibilidade.

Tabela 24. Precisão e exatidão intra e inter dias para a determinação de PQ em plasma de cães.

Concentração nominal PQ (ng/ mL)	Concentração média encontrada (ng/ mL)^a	D.P.R.	Exatidão (%)		
Precisão e Exatidão intra- dia					
200	208,25	9,76	104,13		
1300	1319,57	6,77	101,51		
2700	2798,62	8,55	103,65		
Precisão e Exatidão inter- dias					
Concentração nominal PQ (ng/ mL)	Dia	Concentração média encontrada (ng/ mL)^b	Média^c	D.P.R.	Exatidão (%)
200	1	227,95	214,42	6,81	107,21
	2	206,01			
	3	209,31			
1300	1	1468,85	1345,18	7,94	103,48
	2	1280,02			
	3	1285,88			
2700	1	3020,13	2791,94	9,21	103,39
	2	2712,56			
	3	2641,93			

^a Média de seis repetições; ^b Média de cinco repetições; ^c Média de três dias

4.2.5 Estabilidade do fármaco na matriz biológica

A estabilidade do fármaco em fluídos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica, do material de acondicionamento, do tempo e temperatura de estocagem. As condições de realização dos ensaios de estabilidade reproduzem as reais condições de manuseio e análise das amostras após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise (BRASIL, 2003).

Como apresentado na tabela 25, a PQ foi estável no plasma por até 7 h em temperatura ambiente (estabilidade de curto prazo) e após três ciclos de congelamento e descongelamento, demonstrando que amostras de plasma de cães podem ser descongeladas e recongeladas sem comprometer a integridade das mesmas. As amostras de plasma de PQ demonstraram estabilidade por até 60 dias a -20 °C (estabilidade a longo prazo). Os resultados obtidos mostraram, ainda, que as amostras extraídas podem ser analisadas até 48 h com aceitável precisão e exatidão.

Tabela 25. Resultados da estabilidade de PQ em plasma de cães.

Estabilidade	Concentração ciclo zero (ng/ mL)^a	Concentração encontrada depois da armazenagem (ng/ mL)^a	D.P.R.	Bias^b (%)
Longo prazo (60 dias)	203,44	212,19	10,18	4,30
	1288,43	1310,39	5,66	1,70
	2829,80	2652,41	4,83	-6,27
Curto prazo (7 h)	203,44	231,58	6,32	13,83
	1288,43	1417,11	4,10	9,99
	2829,80	3132,60	8,19	10,70
Amostras processadas (depois de 48 h)	203,44	198,60	9,87	-2,38
	1288,43	1169,45	6,00	-9,23
	2829,80	2587,61	7,62	-8,56
Três ciclos de congelamento- descongelamento	203,44	223,64	9,61	9,92
	1288,43	1408,74	4,52	9,34
	2829,80	2894,56	8,61	2,28

^a Média de três repetições; ^b Bias = (concentração medida – concentração nominal/ concentração nominal) x 100.

4.3 Estudo pré-clínico em cães – Análise farmacocinética

Para validar uma metodologia analítica, avaliar a variabilidade, otimizar a coleta das amostras em intervalos apropriados e prover outras informações, um estudo piloto pode ser usado com um número pequeno de sujeitos ou animais. Para produtos de liberação prolongada, o estudo piloto pode ajudar a determinar o programa de amostragem para avaliar o início e o tempo de ação do medicamento (FDA, 2002). O plasma perfunde todos os tecidos do corpo, incluindo os elementos do sangue, por isso, considera-se que o fármaco no plasma está em equilíbrio dinâmico com os tecidos e qualquer mudança na concentração do fármaco no plasma reflete as modificações das concentrações do fármaco nos tecidos (SHARGEL; YU, 1999).

A tabela 26 apresenta as médias dos principais parâmetros farmacocinéticos derivados das curvas de concentração plasmática de PQ *versus* tempo, ilustradas na figura 26, para os CLIs e CLPs. Na determinação destes parâmetros usa-se a média geométrica e não a aritmética, pois os valores log transformados facilitam os cálculos da fase de eliminação dos medicamentos.

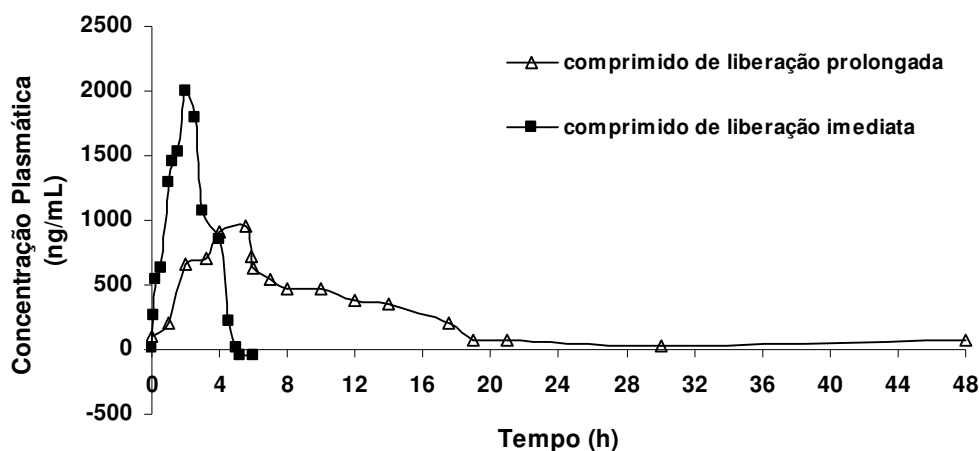


Figura 26. Curva de concentração plasmática de CLI e CLP de PQ em função do tempo (h), obtidas da média de 6 cães *Beagles* que receberam por via oral uma dose de 60 mg de PQ.

Tabela 26. Valores dos parâmetros farmacocinéticos de CLI e de CLP obtidos de 6 cães *Beagles* após ingestão de 60 mg de PQ.

PARÂMETROS	CLI (referência)	CLP (teste)
ASC_[0-48] (ng h/ mL)		
Média Geométrica	5269,58	10671,65
I. C. 90 %	4095 – 6782	9769 – 11657
ASC_[0-∞] (ng h/ mL)		
Média Geométrica	5324,25	12123,37
I. C. 90 %	4152 – 6827	11291 – 13017
C_{max} (ng/ mL)		
Média Geométrica	2347,14	999,78
I. C. 90 %	2005 – 2748	765 – 1306
K_e (h⁻¹)		
Média Geométrica	1,041	0,054
I. C. 90 %	0,907 - 1,195	0,049 - 0,060
T_{1/2} (h)		
Média Geométrica	0,666	12,797
I. C. 90 %	0,580 - 0,764	11,552 - 14,178
T_{max} (h)		
Média Aritmética	1,63	4,38
I.C. 90 %	1,22 - 2,03	3,95 - 4,80

* I.C. – Intervalo de confiança

Pelos resultados demonstrados na tabela 25, observou-se que a ASC para os CLP foi muito maior do que para os CLI, enquanto que a concentração plasmática máxima foi maior para os CLI. Como o esperado a K_e para o CLP foi menor do que para o CLI, pois a eliminação depende da velocidade de absorção. Para que o fármaco seja absorvido, necessita ser liberado da forma farmacêutica, e no CLP a liberação da PQ foi controlada pela matriz hidrofílica, tornando mais lenta a absorção e conseqüentemente a eliminação. O mesmo raciocínio é feito para o t_{1/2}, já que o CLP permanece por mais tempo na circulação e esses valores são calculados a

partir da K_e . O aumento da ASC do CLP demonstra um aumento na extensão da absorção e da ação, o maior t_{max} demonstra uma menor velocidade de absorção e o menor C_{max} pode sugerir uma menor toxicidade da PQ, possivelmente com uma menor incidência de resistência do plasmódio ao medicamento.

Todos os parâmetros farmacocinéticos das duas formulações foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), quando comparados entre si.

A partir dos valores de ASC obtidos, a biodisponibilidade relativa (f_{rel}) da formulação teste (CLP) em relação à referência (CLI) foi calculada e obteve-se o valor de 227,7 %. Esse resultado da f_{rel} obtido indica que o CLP aumenta e melhora eficientemente a biodisponibilidade da PQ. A possível menor biodisponibilidade do CLI não está relacionada à baixa solubilidade da PQ nos fluídos biológicos e nem a baixa permeabilidade, pois a PQ é um fármaco classe I, mas pode estar relacionada à rápida distribuição aos tecidos e metabolização da PQ.

Para nos certificarmos que a dose administrada oralmente através do comprimido de liberação prolongada foi 100 % biodisponível, seria necessário comparar a ASC do CLP com a ASC da PQ via intravenosa, o que forneceria o valor da biodisponibilidade absoluta.

A bioequivalência de diferentes formulações do mesmo fármaco envolve a equivalência com respeito à velocidade e extensão da absorção. Duas formulações cujas velocidades e extensão de absorção diferem em -20 % / +25 % ou menos, geralmente são consideradas bioequivalentes (considerando-se o intervalo de confiança de 90 %). O uso de -20 % / +25 % como regra é baseado na decisão médica de que muitos fármacos que apresentam essa diferença na concentração do ingrediente ativo no sangue não serão clinicamente diferentes, ou seja, o efeito terapêutico no paciente será o mesmo (MALINOWSKI, 2000; BRASIL, 2002b). Os estudos de bioequivalência normalmente são conduzidos em seres humanos, para comparação de formulações que possuem equivalência química (mesma dosagem) e mesma forma de liberação, como por exemplo, medicamentos similares e genéricos comparados com o medicamento de referência (inovador).

Mesmo assim neste capítulo, foram conduzidos estudos de bioequivalência entre os comprimidos de liberação prolongada e os comprimidos de liberação imediata de PQ em cães, com o objetivo de aprofundarmos o entendimento das

diferenças entre as duas formulações. Os resultados obtidos da não bioequivalência já eram esperados, devido às diferenças entre as formulações.

Na tabela 27, encontram-se os resultados das razões entre os CLPs e CLIs de PQ, dos parâmetros farmacocinéticos $ASC_{[0-\infty]}$ e C_{max} , e das diferenças individuais de t_{max} .

Tabela 27. Análise estatística das razões individuais entre grupos da $ASC_{[0-\infty]}$ e C_{max} e das diferenças individuais de t_{max} para a PQ.

CLP/CLI		
$ASC_{[0-\infty]}$	Média Geométrica	I.C. 90%
% razão	227,70	156,1 - 332,2
C_{max}	Média Geométrica	I.C. 90%
% razão	42,60	28,48 – 63,70
t_{max}	Média Aritmética	I.C. 90%
diferença (h)	2,75	2,23 – 3,27

* I.C. – Intervalo de Confiança

Pela análise estatística paramétrica, a média geométrica das razões individuais Teste/Referência (CLP/CLI) foi de 227,7 % (I.C. 156,1 – 332,3) para $ASC_{[0-\infty]}$, e 42,6 % (I.C.) para C_{max} . A média aritmética das diferenças individuais (CLP/ CLI) de t_{max} (2,10 h), foi estatisticamente diferente de “zero”, pois o I.C. 90 % destas diferenças não inclui o valor de “zero”. Esses resultados demonstram que os CLPs apresentaram uma extensão na absorção de aproximadamente 200 % maior que os CLIs, observado pela razão CLP/CLI da $ASC_{[0-\infty]}$, enquanto que a velocidade de absorção dos CLPs em relação aos CLIs foi aproximadamente 50 % menor que os CLIs, observado pela razão CLP/CLI da C_{max} . Portanto as duas formulações não

são bioequivalentes, nem em relação à extensão e nem em relação à velocidade de absorção, pois os I.C. 90 % demonstraram estar fora do intervalo de 80-125 %.

5 Conclusões

O método cromatográfico desenvolvido e validado associado ao procedimento de EFS demonstrou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade na faixa de concentração estudada. A metodologia proposta foi efetivamente aplicada para quantificar a PQ no plasma dos cães, e mostra-se apropriada para estudos farmacocinéticos clínicos futuros.

No estudo farmacocinético, a formulação de liberação prolongada alcançou os objetivos pois apresentou maior ASC, relacionada à maior extensão da absorção e da ação, menor flutuação nos níveis plasmáticos, maior t_{max} , relacionado a uma menor velocidade de absorção e menor C_{max} , que pode sugerir uma menor toxicidade da formulação. Todos os parâmetros farmacocinéticos obtidos do CLP e do CLI foram estatisticamente diferentes. A biodisponibilidade relativa do CLP em relação ao CLI foi calculada e obteve-se o valor de 227,7 %, indicando que o CLP aumenta a biodisponibilidade da PQ. As duas formulações demonstraram ser não bioequivalentes em relação à extensão e velocidade de absorção.

Os resultados descritos neste capítulo podem ser visualizados na forma de artigo no apêndice 2.

A malária é uma doença negligenciada que mata milhões de pessoas anualmente. Para a cura radical e prevenção das recaídas a PQ é o antimalárico de escolha. Devido a relato de casos de resistência dos plasmódios e efeitos adversos, o desenvolvimento de uma forma farmacêutica de liberação prolongada de primaquina é ideal para otimização do esquema terapêutico e para redução das limitações das terapias existentes.

O controle de qualidade da matéria-prima e do produto acabado é primordial para fornecer um medicamento em condições ideais para o tratamento e cura da malária.

Na qualificação de matérias-primas de PQ, observou-se que duas das quatro MPs analisadas estavam com o teor abaixo do preconizado, e apresentaram mais de 6,5 % de impureza. A cromatografia líquida de alta eficiência foi o método (não oficial) utilizado para detecção da impureza. Devido aos relatos na literatura, sugere-se que a impureza é o isômero de posição quinocida, derivada do processo de síntese, que possui atividade antimalárica, entretanto, com toxicidade superior a primaquina. Pela titulação potenciométrica, método oficial para doseamento do fármaco, foram obtidos resultados adequados de teor, o que comprova ser um método pouco sensível, incapaz de diferenciar pequenas alterações na estrutura do princípio ativo.

As matérias-primas foram expostas em estufa às temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C. As quatro MPs analisadas demonstraram uma cinética de degradação de ordem zero. A presença de impureza demonstrou relacionar-se a uma menor estabilidade, podendo influenciar no prazo de validade do produto final. A descrição de um método oficial faz-se indispensável para a separação da impureza além da disponibilidade comercial do padrão quinocida, e qualificação de fornecedores.

A decomposição da MP C foi avaliada por termogravimetria (TG) e a reação de degradação ocorreu numa cinética de ordem zero, estando de acordo com os resultados obtidos em estufa. A degradação foi maior em ambiente oxidativo (ar) do que em ambiente inerte (nitrogênio), com menor valor de energia de ativação (E_a). Os valores de E_a obtidos em estufa (-36865,7 cal/ mol) comparados aos da análise térmica sob atmosfera dinâmica de ar pelos métodos não isotérmico e isotérmico (120,34 kJ/ mol; 95,35 KJ/ mol) mostraram disparidade, pois quanto maior a

temperatura menor a energia necessária para que a degradação ocorra e, na TG utilizou-se temperaturas mais elevadas.

Os comprimidos de liberação prolongada foram produzidos com 30 % de POE de 8×10^6 Da e com a MP C. A formulação apresentou peso médio, dureza, friabilidade e teor adequados. O estudo de degradação forçada foi avaliada em estufa às temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C. O estudo de estabilidade acelerado foi realizado em câmara climática a 40 °C e 75 % de UR e em câmara de luz UV, expondo os comprimidos sem embalagem, em blíster e em frascos plásticos âmbar, por 6 meses. Nas avaliações em estufa, a reação de degradação para a formulação ocorreu em ordem zero, como nas MPs. Entretanto, os comprimidos demonstraram degradação superior à MP devido à presença do polímero e excipientes. No estudo de estabilidade acelerado os comprimidos degradaram mais do que 10 % em todas as condições testadas, demonstrando que os materiais de acondicionamento não foram suficientes para proteger a formulação da umidade e da luz. A umidade, principal fator degradante, influenciou o aspecto físico, a dureza e a dissolução dos comprimidos. Esses resultados sugerem o estudo em outro tipo de embalagem, como frascos de vidro âmbar, contendo sílica para diminuir a influência da umidade e da luz na degradação da PQ.

A avaliação *in vivo* dos comprimidos contou com o desenvolvido e a validação de método cromatográfico bioanalítico, bem como um procedimento de extração em fase sólida, para a determinação de PQ em plasma de cães *Beagles*. Os resultados de validação mostraram que o método otimizado apresentou-se linear, específico, preciso, exato e estável na faixa de concentração plasmática utilizada. O método proposto foi empregado com sucesso para a quantificação de PQ no plasma de cães e mostra-se apropriado para estudos farmacocinéticos clínicos.

Os comprimidos de liberação imediata e os comprimidos de liberação prolongada de PQ demonstraram perfis plasmáticos completamente diferentes. Os comprimidos de liberação prolongada demonstraram maior ASC, relacionada à maior extensão de absorção e ação, menor C_{max} e maior T_{max} , resultados esperados para matrizes poliméricas. A formulação desenvolvida demonstrou prolongar a liberação do princípio ativo por mais de 10 h, alcançando os objetivos propostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTONEN, J.; ALLESØ, M.; MIRZA, S.; KORADIA, V.; GORDON, K.C.; RANTANEN, J. Solid form screening – A review, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 23–37, 2009.

AL-BADR, A.A. Primaquine diphosphate: comprehensive profile. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 32, p. 153 – 207, 2005.

ALLEN, L.V.J.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. 8 ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 595, 738.

ALVING, C.R.; STECK, E.A.; CHAPMAN JR., W.L.; WAITS, V.B.; HENDRICKS, L.D.; SWARTZ JR., G.M.; HANSON, W.L. Liposomes in leishmaniasis: therapeutic effects of antimonial drugs, 8-aminoquinolines and tetracycline. **Life Sciences**, v. 26, p. 2231-2238, 1980.

ARIAS, A.E.; CORREDOR, R.A. Low response of Colombian strain of *Plasmodium vivax* to classical antimalarial therapy. **Tropical Medicine Parasitology**, v. 40, p. 21-23, 1989.

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

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed., Artmed: São Paulo, 2005. p. 677

BAIRD, J.K.; RIECKMANN, K.H. Can primaquine therapy for *vivax* malaria be improved? **Trends Parasitology**, v. 19, n. 3, p. 115–120, 2003.

BAIRD, J.K.; FRYAUFF, D.J.; HOFFMAN, S.L. Primaquine for prevention of malaria in travelers. **Clinical Infections Diseases**, v. 37, p. 1659 – 1667, 2003.

BAIRD, J.K.; HOFFMAN, S.L. Primaquine therapy for malaria. **Clinical Infections Diseases**, v. 39, p. 1336- 1345, 2004.

BALAKRISHNAN, B.; JAYAKRISHNAN, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds, **Biomaterials**, v. 26, p. 3941–3951, 2005.

BALLANTYNE, B.; LEUNG, H.W.; HERMANSKY, S. J.; FRANTZ, S. W. Subchronic, chronic, pharmacokinetic and genotoxicity studies with polyox® water soluble resin. **Toxicology Letters**, v. 95, p. 46-47, 1998.

BALLARD, B.E. An overview of prolonged action drug dosage forms. In: ROBINSON, J.R. (Ed.) **Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems**, v. 6, p. 1-69, 1978.

BERRUETA, L.A; B. GALLO, B.; VICENTE, F. A. Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments. **Chromatographia**, v. 40, n. 7/8, p. 474-483, 1995.

BHADRA, A.; YADAV, K.; BHADRA, S.; JAIN, N.K. Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 221-233, 2005.

BHATIA, S.C. et al. Pharmacokinetics of primaquine in patients with *P. vivax* malaria. **European Journal Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 205-210, 1986.

BONATO, P.S.; BORTOCAN, R.; GAITANI, C.M.; PAIAS, F.O.; IHA, M.H.; LIMA, R.P. Enantiomeric resolution of drugs and metabolites in polysaccharide and proteinbased chiral stationary phases. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 190-199, 2002.

BORISSOVA, R.; LAMMEK, B.; STJARNKVIST, P.; SJOHOLM, I. Biodegradable microspheres 16. Synthesis of primaquine-peptide spacers for lysosomal release from starch microspheres. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 84, p. 249-255, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE N° 310, de 1° de setembro de 2004. **Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 12 de novembro 2008.

BRASIL (a). Ministério da educação. Resolução Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Manual de boas práticas de Biodisponibilidade e Bioequivalência**. Distrito Federal: Dupligráfica, 2002a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08 junho 2008.

BRASIL (b). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE nº 482, de 19 de março de 2002b. **Guia para estudos de correlação in vitro in vivo**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08 junho 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE N° 1, de 29 de julho de 2005. **Guia para a realização de estudos de estabilidade**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08 junho 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução Executiva No. 899 de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08 junho 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2008 – RENAME**. Brasília – DF. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08 janeiro 2009.

BRITISH PHARMACOPOEIA 2007, CD-ROM, version 11.0, 2007.

BRITISH PHARMACOPOEIA, 1988, HMSO, London, 1990, p. 1252 (Adendo).

BRITISH PHARMACOPOEIA, vol. I, HMSO, London, 1993, p. 541.

BRITISH PHARMACOPOEIA, 1993, HMSO, London, 1997, p. 2015 (Adendo)

BRONDZ, I.; MANTZILAS, D.; KLEIN U.; EKEBERG D.; HVATTUM E; LEBEDEVA, M.; MIKHAILITSYN, F. S.; SOULEIMANOV, G. D.; ROE, J. Nature of the main contaminant in the anti malaria drug primaquine diphosphate: a qualitative isomer analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 800, p. 211 – 223, 2004.

BRONDZ, I.; KLEIN U.; EKEBERG, D.; MANTZILAS, D.; E. HVATTUM, E.; SCHULTZ, H.; MIKHAILITSYN, F.S. **Asian Journal Chemistry**, v. 17, p. 1678–1688, 2005.

BRONDZ, I.; EKEBERG, D.; BELL, D.S.; ANNINO, A.R.; HUSTAD, J.A.; SVENDSEN, R.; VLACHOS, V.; OAKLEY, P.; LANGLEY, G.J.; MOHINI, T.; AMAURYF C. G.; MIKHALITSYN, F. Nature of the main contaminant in the drug

primaquine diphosphate: SFC and SFC–MS methods of analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 937–944, 2007.

BRONDZ, I.; FIALKOV, A.B.; AMIRAV, A. Analysis of quinocide in unprocessed primaquine diphosphate and primaquina diphosphate tablets using gas chromatography–mass spectrometry with supersonic molecular beams. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 824–829, 2009.

BURNHAM, L.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K.S. Kinetic study of the drug acetazolamide using thermogravimetry. **Thermochimica Acta**, v. 392-393, p. 127-133, 2002.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and practices**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 2000.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention - **Malaria**. In: The Yellow Book. Health Information for International Travel, 2003-2004. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/travel/diseases/malaria/index.htm>>. Acesso em: 20 maio 2008.

CEESAY, S.J.; CASALS-PASCUAL, C.; ERSKINE, J.; ANYA, S.E.; DUAH, N.O.; FULFORD, A.J.C.; SESAY, S.S.S; ABUBAKAR, I.; DUNYO, S.; SEY, O.; PALMER, A.; FOFANA, M.; CORRAH, T.; BOJANG, K.A.; WHITTLE, H.C.; GREENWOOD, B.M.; CONWAY, D.J. Changes in malaria indices between 1999 and 2007 in The Gambia: a retrospective analysis. **The Lancet**, v. 372, p. 1545–1554, 2008.

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

CLARKE'S Analysis of Drug and Poisons, Pharmaceutical Press: London. Eletronic version, 2004.

CLYDE, D.F. Clinical problems associated with the use of primaquine as a tissue schizontocidal and gametocytocidal drug. **Bulletin World Health Organization**, v. 59, p. 391-395, 1981.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; PEPPAS, N.A. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. **Pharmaceutical Science Technology Today**, v. 3, p. 198-204, 2000.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. XLIX, n. 4, p. 181-190, 1999.

CRUZ, A.P. **Desenvolvimento e avaliação de matrizes de polióxido de etileno contendo o antimalárico primaquina**. 2006. 155p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2006.

CRUZ, A.P.; BERTOL, C.D.; STULZER, H.K.; MURAKAMI, F.S.; COSTELLA, F.T.; ROCHA, H.V.A.; SILVA, M.A.S. Swelling, erosion, and release behavior of PEO/primaquine matrix tablets. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 7, p. 413-418, 2008a.

CRUZ, A.P.; BERTOL, C.D.; MURAKAMI, F.S.; SILVA, M.A.S. Development and Validation of RP-HPLC Method for Determination of Primaquine in Extended Release Tablets. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 3, p. 415-418, 2008b.

CUONG, B.T.; BINH, V.Q.; DAI, B.; DUY, D.N.; LOVELL, C.M.; RIECKMANN, K.H.; EDSTEIN, M.D. Does gender, food or grapefruit juice alter the pharmacokinetics of primaquine in healthy subjects? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, n. 6, p. 682–689, 2006.

DHAWAN, S.; DHAWAN, K.; VARMA, M.; SINHA, V.R. Applications of poly(ethylene oxide) in drug delivery systems Part II. **Pharmaceutical Technology**, sep., p. 72-79, 2005.

DING, X.; ALAN, W.G.A.; ROBINSON, J.R. Extended-Release and Targeted Drug Delivery Systems. In: TROY, D. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 21 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 939-964.

DOHERTY, J.F.; DAY, J.H.; WARHURST, D.C.; CHIODINI, P.L. Treatment of *Plasmodium vivax* malaria-time for a change? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 76, 1997.

DONGRE, V. G.; KARMUSE, P.P.; NIMBALKAR, M.M.; SINGH, D.; KUMAR, A. Application of GC–EI-MS for the identification and investigation of positional isomer in primaquine, an antimalarial drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 111–116, 2005.

DONGRE, V.G.; KARMUSE, P.P.; RAO P.P.; KUMAR, A. Development and validation of UPLC method for determination of primaquine phosphate and its impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 236-242, 2008.

DRUG POINTS SYSTEM/ **Micromedex**. Disponível em: <<http://www.dotlib.com.br>>. Acesso em: 18 maio 2008.

DRUGDEX DRUG EVALUTION/ **Micromedex**. Disponível em: <<http://www.dotlib.com.br>>. Acesso em: 18 maio 2008.

DUA, V.K.; KAR, P.K.; SARIN, R.; SHARMA, V.P. High-performance liquid chromatographic determination of primaquine and carboxyprimaquine concentrations in plasma and blood cells in *Plasmodium vivax* malaria cases following chronic dosage with primaquina. **Journal of Chromatography B**, v. 675, p. 93-98, 1996.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, CD-ROM, 2001.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals – Part 1. **PSTT**, v. 1, n. 5, p. 191-199, 1998a.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals – Part 2. **PSTT**, v. 1, n. 6, p. 262-268, 1998b.

ELDERFIELD, R.C.; GENSLER, W.J.; HEAD, J.D.; HAGEMAN, H.A.; KREMER, C.B.; WRIGHT, J.B.; HOLLEY, A.D.; WILLIAMSON, B.; GALBREATH, J.; WIELDERHOLD III, L.; FLOHARDT, R.; KUPCHAN, S.M.; WILLIAMSON, T.A.; BIRATEIN, O. Alkylaminoalkyl Derivates of 8-Aminoquinoline. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, n. 8, p. 1524-1529, 1946.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte II. Primeiro fascículo. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA 8, CD-ROM, 2005.

FDA- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Guidance for Industry, Dissolution Testing for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms**. Rockville, 1997. p. 1–17. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 08 junho 2008.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Electronic Orange Book Query**. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 08 junho 2008.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Guidance for Industry: Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of in vitro/ in vivo correlations**. Rockville, 1997 (b). p. 1–27. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 08 junho 2008.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – **Guidance for industry, Bioanalytical Method Validation**. Rockville, 2001. p. 1–25. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 08 junho 2008.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Guidance for Industry, Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations**. Rockville, 2002. p. 1 – 27. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 08 junho 2008.

FERREIRA, E.I. Antimaláricos. In: SILVA, P. Farmacologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1163.

FLETCHER, K.A.; BARTON, P.F.; KELLY, J.A. Studies on the mechanism of oxidation in the erythrocyte by metabolites of primaquina. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 37, n. 13, p. 2683-2690, 1988.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, p. 732.

GASCON, J.; ARCE, J.E.G.; MENENDEZ, C.; VALLS, M.E.; CORACHAN, M. Poor response to primaquine in two cases of *Plasmodium vivax* malaria from Guatemala. **Tropical Geography Medicine**, v. 46, p. 32-33, 1994.

GASPAR, R.; PRAT, V.; ROLAND, M., Nanoparticles of polyisohexylcyanoacrylate (PIHCA) as carriers of primaquine: formulation, physico- chemical characterization and acute toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 68, p. 111-119, 1991.

GENNARO, A. R. **Remington. The science and practice of pharmacy**. 20 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 2077.

GREEN, M. D.; D'SOUZA, M. J.; HOLBROOK, J. M.; WIRTZ, R. A. In vitro and in vivo evaluation of albumin-encapsulated primaquine diphosphate prepared by nebulization into heated oil. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 4, p. 433 – 444, 2004.

HALIKIA, I.; NEOU-SYNGOUNA, P.; KOLITSA, D. Isothermal kinetic analysis of the thermal decomposition of magnesium hydroxide using thermogravimetric data. **Thermochimica Acta**, v. 320, p. 75-88, 1998.

HEARD, C.M.; MONK, B.V.; MODLEY, A.J. Binding of primaquine to epidermal membranes and keratin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, p. 237-244, 2003.

- HOFSTEENG, J.; CAPUANO, A.; ALTSZULER, R.; MOORE, S. Carrier-linked primaquine in the chemotherapy of malaria. **Journal of Medical Chemistry**, v. 29, p. 1765-1769, 1986.
- HUANG, Y.; CHENG, Y.; ALEXANDER, K.; DOLLIMORE, D. The thermal analysis study of the drug captopril. **Thermochimica Acta**, v. 367-368, p. 43-58, 2001.
- ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **Q1A (R2) Stability testing of new drugs substances and products**, 2003.
- IDOWU, O.R.; PEGGINS, J.O.; BREWER, T.G. Side-chain hydroxylation in the metabolism of 8-aminoquinoline antiparasitic agents. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 23, n. 1, p. 18-27, 1995.
- JEANS, C.W.; HEARD, C.M. A therapeutic dose of primaquine can be delivered across excised human skin from simple transdermal patches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 189, p.1-6, 1999.
- JOHNSTON, A.; WOOLLARD, R.C. Stripe: an interactive computer software program for the analysis of drug pharmacokinetics. **Journal of Pharmacol Methods**, v. 9, p. 193-199, 1983.
- KALINKOVA, G. N. Infrared spectroscopy in pharmacy. **Vibrational spectroscopy**, v. 19, p. 307-320, 1999.
- KATZUNG, B.G. **Basic & clinical pharmacology**. 7th. ed. Stamford: Appleton & Lange, 1998. p. 1151.
- KHAN, M.Z.I. Recent trends and progress in sustained or controlled oral delivery of some water soluble drugs: morphine salts, diltiazem and captopril. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 21, n. 9, p. 1037-1070, 1995.
- KHAWAM, A.; FLANAGAN, D. R. Role of isoconversional methods in varying activation energies of solid-state kinetics I. isothermal kinetic studies. **Thermochimica Acta**, v. 429, p. 93–102, 2005.
- KLASCO R.K. **DRUGDEX® System**. Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado, 2005. Disponível em: <<http://www.dotlib.com.br>>. Acesso em: 18 maio 2008.
- KLICK, S.; MUIJSELAAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; DE GRIEND, C. S.; SOMSEN, G. W.; DE JONG, G. J. Towards a generic approach of stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, Iselin, p. 48-65, 2005.
- KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-868, 1999.
- KOROLKOVAS, A. Análise Farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1984.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico** Guanabara. Ed. 2004/2005 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- LABHASETWAR, V.D.; DORLE, A.K. Nanoparticles - a colloidal drug delivery system for primaquine and metronidazole. **Journal of Controlled Release**, v. 12, p. 113-119, 1990.

- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2001. p. 1517.
- LAL J.; MEHROTRA N.; GUPTA, R. C. Analysis and pharmacokinetics of bulaquine and its major metabolite primaquine in rabbits using an LC-UV method- a pilot study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 141-150, 2003.
- LANÇAS, F.M. Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica**, v. 0, n. 0, p. 17-44, 2008.
- LANZA, F.; SELLERGREN, B. The application of molecular imprinting technology to solid phase extraction. **Chromatographia**, v. 53, p. 599-611, 2001.
- LEE, T.W.-Y.; ROBISON, J.R. Controlled-Release Drug-Delivery Systems. In: GENNARO, A.R. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 20 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 903-929.
- LEMKE, T. Antiparasitics agents. In: WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins 2002. p. 875-876.
- LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J.B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 265-278, 2004.
- LÓPES-ANTUÑANO, F. J. Is primaquine useful and safe as true exo-erythrocytic merontocidal, hypnozoitocidal and gametocidal antimalarial drug? **Salud Pública de México**, v. 41, n. 5, p. 410-419, 1999.
- LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.
- MALINOWSKI, H.J. Bioavailability and Bioequivalence Testing. In: GENNARO, A.R. **Remington: The science and practice of pharmacy**. 20 ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000, p. 1000.
- MARTIN, A. Physical pharmacy. 4ed. Baltimore: Lippincott Williams, 1993.
- MAYORGA, P.; PUISIEUX, F.; COUARRAZE, G. Formulation study of a transdermal delivery system of primaquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 132, p. 71-79, 1996.
- MAYORGA, P.; DEHARO, E.; PUISIEUX, F.; COUARRAZE, G. Interpretation and prediction of plasma levels of primaquine following transdermal delivery in swiss mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 155, p. 99-107, 1997.
- MBELA, T.K.M.; POUPAERT, J.H.; DUMONT, P. Poly(diethylmethylidene malonate) nanoparticles as primaquine delivery system to liver. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 79, p. 29-38, 1992.
- MOORE, J.W.; FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical Technology**, v. 20, n. 6, p. 64-74, 1996.
- MORRIS, A.; KEE, W.J.; BRAIN, K.R.; HEARD, C.M.; WATKINSON, A.C. Vehicle effects in the permeation of primaquine across human skin in vitro. In: Brain, K. R.; James, V.J.; Walters, K. Perspectives in Percutaneous Penetration, **STS Publishing Cardiff.**, v. 5b, p. 180-182, 1998.

- MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**, 2005. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 16 novembro 2008.
- MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tópicos de saúde - Malária**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 16 novembro 2008.
- MS, FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE e FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Terapêutica da Malária**, 2001. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 01 dezembro 2008.
- MURAKAMI, F. S.; LANG, K.L.; MENDES, C.; CRUZ, A.P.; CARVALHO FILHO, M.A.S.; SILVA, M.A.S. Physico-chemical solid-state characterization of omeprazole sodium: Thermal, spectroscopic and crystallinity studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 72-80, 2009.
- NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de Físico-Química**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 299.
- NISHI, K.K.; JAYAKRISHNAN, A. Preparation and in vitro evaluation of primaquine conjugated gum arabic microspheres. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1489-1495, 2004.
- NITIN M.; RAJANIKANTH M.; LAL J.; MADHUSUDANAN K.P.; GUPTA R.C. Liquid Chromatography – tandem mass spectrometric assay with a novel method of quantitation for the simultaneous determination of bulaquine and its metabolite, primaquine, in monkey plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 793, p. 253 – 263, 2003.
- NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de Medicamentos**. 1 ed. Buenos Aires, El Ateneo, 1975. p. 179.
- OZAWA, T. Thermal analysis — review and prospect. **Thermochemica Acta**, v. 355, p. 35-42, 2000.
- PASTRANA, Y. C.; RIVERA, A. B.; ENRIQUE, T. E.; CARABALLO, I. Caracterización farmacocinética de formulaciones orales de liberación sostenida. Factores que influyen en el perfil farmacocinético. **Acta Pharmaceutica Bonaerense**. v. 19, n. 1, p. 25-34, 2000.
- PETRALANDA, I. Quality of antimalarial drugs and resistance to *Plasmodium vivax* in Amazonian region. **The Lancet**, v. 345, p. 1433, 1995.
- PIRSON, P.; STEIGER, R.F.; TROUET, A.; GILLET, J.; HERMAN, F. Primaquine liposomes in the chemotherapy of experimental murine malaria. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 74, p. 383-391, 1980.
- POLI, A. Estudos farmacocinéticos sobre o diclofenaco, flurbiprofeno, nitroflurbiprofeno e roxitromicina através da cromatografia líquida de alta eficiência. 1998. 128p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.
- PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 3, 1996. p. 806.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 765-781.
- RODRIGUES Jr, J.M.; FESSI, H.; BORRIES, C.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.-Ph. Primaquine-loaded poly(lactide) nanoparticles: physicochemical study and acute

tolerance in mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v.126, p. 253-260, 1995.

ROMBO, L.; EDWARDS, G.; WARDS, S.A.; ERIKSSON, G.; LINDQUIST, L.; LINDBERG, A.; RUNEHAGEN, A.; BJORKMAN, A.; HYLANDER, N.O. Seven patients with relapses of *P. vivax* or *P. ovale* despite primaquine treatment. **Tropical Medicine Parasitology**, v. 38, p. 49-50, 1987.

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

SIMON, P.; VEVERKA, M.; OKULIAR, J. New screening method for the determination of stability of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, p. 21-26, 2004.

SAKS, S.R.; GARDNER, L. B. The pharmacoeconomic value of controlled-release dosage forms. **Journal of Controlled Release**, v. 48, p. 237-242, 1997.

SHARGEL, L.; YU, A.B.C. **Applied Biopharmaceutics e Pharmacokinetics**. 4 ed. New York: McGraw Hill, 1999. p. 29, 31, 33.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 25, 26, 27, 42.

SILVA, M.A.S.; KELMANN, R.G.; FOPPA, T.; CRUZ, A.P.; BERTOL, C.D.; SARTORI, T.; GRANADA, A; CARMIGNAN, F; MURAKAMI F.S. Thermoanalytical study of fluoxetine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 2, p. 463- 467, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1979. p. 66.

SINGH, K. K.; VINGKAR, S.K. Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 347, p. 136–143, 2008.

SCHMIDT, L.H.; ALEXANDER, S.; ALLEN, L.; RASCO, J. Comparison of the Curative Antimalarial Activities and Toxicities of Primaquine and Its *d* and *l* Isomers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 12, p. 51-60, 1977.

STJARNKVIST, P. Biodegradable microspheres: XIV. Effect of microparticle-bound primaquine on *L. donovani* in mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 96, p. 23-32, 1993.

STENSRUD, G.; SANDE, S.A.; KRISTENSEN, S.; SMISTAD, G. Formulation and characterisation of primaquine loaded liposomes prepared by a pH gradient using experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 198, p. 213-228, 2000.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V. O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: Aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Revista Brasileira de Bioquímica**, v. 31, p. 63-70, 1995.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P. G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. C. Considerações biofarmacêuticas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.35, n.1, p. 1-11, 1999.

STULZER, H.K.; RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.M.; MATOS, J.S.R.; SILVA, M.A.S. Compatibility studies between captopril and pharmaceutical excipients used in tablets formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, n. 1, p. 323–328, 2008.

SWEETMAN, S. **Martindale: The Complete Drug Reference**. London: Pharmaceutical Press. Electronic version, Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado, (06/2005). Disponível em: <<http://www.dotlib.com.br>>. Acesso em: 18 maio 2008.

TALWAR, N.; JAIN, N.K. Erythrocyte based delivery system of primaquine: in vitro characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 9, n. 3, p. 357-364, 1992.

TRACY, J.W.; WEBSTER JÚNIOR, L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1069-1095.

USP DI – United States Pharmacopeia. **Drug Information**. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginformation.html>>. Acesso em: 08 junho 2005.

USP – THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30 ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2007.

USP – THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, Drug Quality and Information Program, Mekong Malaria Initiative. Antimalarial Drug Quality Monitoring and Evaluation, US Agency for International Development, Washington, DC, 2004.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Primaquine revisited six decades after its discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 937-953, 2009.

VÁSQUEZ-VIVAR, J.; AUGUSTO, O. Oxidative activity of primaquine metabolites on rat erythrocytes in vitro and in vivo. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 309-316, 1994.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997.

VILA-JATO, J.L. **Tecnología Farmacéutica: Formas Farmacéuticas**, v. 2. Síntesis: Madrid, 2001. p. 591.

VISCASILLAS, A. et al. Sistemas matriciales hidrófilos. **Indústria Farmaceutica**, jul./ago., p. 47-54, 1996.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. London: Churchill Livingstone, 2003. p. 337.

WEST, A. R. **Solid State Chemistry and its Applications**. Chinchester: John Wiley & Sons Ltd., 1984. p. 734.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION TECHNICAL REPORT SERIES - **Malaria Vector Control and Personal Protection**. n. 936, 2006. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 15 novembro 2006a.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION/ GLOBAL MALARIA PROGRAMME PUBLICATIONS. **Guidelines for the treatment of malaria**. 2006. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 15 novembro 2006b.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global malaria control and elimination: report of a technical review, 2008.** Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 15 janeiro 2008a.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Reports 2008.** Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 15 janeiro 2008b.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION/ ROLL BACK MALARIA DEPARTMENT. **Global Malaria Action Plan for a Malaria Free World.** Disponível em: <<http://rbm.who.int>>. Acesso em: 15 fevereiro 2009.

YANG, L.; VENKATESH, G.; FASSIHI, R., Characterization of compressibility and compactibility of poly(ethylene oxide) polymers for modified release application by compaction simulator. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 85, p. 1085–1090, 1996.

APÊNDICE 1

Artigo Submetido: *Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions*

Jornal: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*

Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions

C. D. Bertol¹, A. P. Cruz¹, H. K. Stulzer¹, F. S. Murakami¹, M. A. S. Silva¹

¹ Laboratório de Controle de Qualidade, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário Trindade, bloco K, 3º andar, Brasil, Florianópolis, SC, CEP 88040-900.

To whom correspondence should be addressed.

E-mail: charibertol@yahoo.com.br

Abstract

Primaquine is the drug of choice for the radical cure of *Plasmodium vivax* malaria, and currently being administered in solid dosage form. In this study the compatibility studies were carried out using differential scanning calorimetry, thermogravimetry and fourier transformed infrared. Non-isothermal and isothermal methods were employed to investigate kinetic parameters under nitrogen and air atmospheres using thermogravimetry. The DSC investigations obtained by physical mixtures showed slight alterations in the melting temperatures of primaquine with some excipients. The FT-IR confirmed the possible interactions obtained by DSC for the physical mixtures with PQ and lactose, magnesium stearate and mannitol. The results showed that the thermal decomposition followed a zero order kinetic in both atmospheres in non isothermal method. The activation energy in both methods using nitrogen was similar, and in air atmosphere the activation energy decreased.

Keywords: thermoanalysis, primaquine, compatibility, kinetics, TG, DSC

Introduction

Primaquine (PQ) (Figure 1) that corresponds to 8-aminoquinoline is used to prevent relapses of malaria and in prophylaxis of individuals returning from malaria's areas. It is the drug of choice for the radical cure of *Plasmodium vivax* malaria, although has serious side effects, for example, acute hemolysis in patients with glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency, methemoglobinemia, and severe gastrointestinal disturbances [1,2]. Thus, the development of controlled release dosage form has been investigated to improve the treatment efficacy and reduce the limitations of existing therapies [3-6].

Figure 1

The successful formulation of a stable and effective solid dosage form depends on careful selection of the excipients. The most drugs intended for oral administration requires formulation with excipients to allow adequate administration, to facilitate the manufacture of the product, to increase the stability of the formulation, for aesthetic reasons or for identification [7,8].

The thermal analysis is a routine method for drugs characterization and is useful in the pre formulation stage in the development of solid dosage forms [9-14].

Thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC) techniques gives important information about the physical properties, kinetic analysis, polymorphic forms and stability of materials, as well as to assess its compatibility with excipients [15-20] during processing and storage [9,11] as a function of temperature.

The thermal decomposition of drugs is interesting to predict the degradation rates at marketing temperatures from data collected on accelerated processes that are studied at elevated temperatures. The temperature may be increases the chemical reactions, providing sufficient energy (activation energy) required to break chemical bonds and starts the decomposition process [10,21].

The main purpose of the present study was to evaluate the compatibility of PQ with common pharmaceutical excipients used in solid dosage forms as well to investigate the decomposition mechanism of PQ by TG analysis using isothermal and non-isothermal methods under nitrogen and air atmosphere

Experimental

Materials

The PQ raw material was kindly donated by Fundação Oswaldo Cruz/ Farmanguinhos (state purity: 98.5 %). The excipients used were hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) of viscosity grade K15M (Methocel K15M Premium), acryl-eze®, microcrystalline cellulose (Avicel Ph-102), starch, magnesium stearate, lactose, colloidal silicon dioxide (Aerosil, Galena), poly ethylene oxide (POE) of molecular weight grade 8.10⁶ Da (Sigma Aldrich), talc, stearic acid, tribasic calcium phosphate, glyceryl monostearate, mannitol, povidone, sodium stearyl fumarate and stearyl alcohol.

Methods

Differential Scanning Calorimetry Analysis (DSC)

The DSC curves were obtained in a DSC- 60 cell (Shimadzu) using aluminum crucibles with about 2 mg of samples, under dynamic nitrogen atmosphere (50 mL min⁻¹). The temperature range was 25 °C to 600 °C at heating rate of 10 °C min⁻¹. An empty aluminum pan was used as reference. DSC analysis have been performed using sample of PQ, single excipients, binary mixtures formed by PQ and only one excipient 1:1 (w/w) with all excipients samples. The DSC cell was calibrated with indium (mp 156.6 °C; $\Delta H_{fus} = 28.54 \text{ J g}^{-1}$) and zinc (mp 419.6 °C).

Thermogravimetric analysis (TG)

The TG/DTG experiments were measured on Shimadzu thermobalance TGA – 50 in temperature range from 25 °C to 600 °C, using platinum crucibles with approximately 4 mg of sample, under dynamic N₂ atmosphere (50 mL min⁻¹). TG analysis have been using sample of PQ, single excipients, binary mixtures formed by PQ and only one excipient 1:1 (w/w) with all excipients samples. The equipment was previously calibrated with calcium oxalate standard.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

FT-IR spectra was recorded on a Perkin-Elmer Model 1600 apparatus using KBr discs in the range of 4000 - 400 cm⁻¹. The sample of PQ and the excipients (1:1) used were lactose, magnesium stearate, stearyl alcohol, sodium stearyl fumarate, glyceryl monostearate, mannitol and stearic acid.

Kinetic studies

The non-isothermal kinetic study was performed by application of Ozawa method [13]. In dynamic experiments, the heating rates used were 2.5, 5, 10, 15, and 20 °C min⁻¹ to target temperature of 600 °C under nitrogen and air atmosphere with the flow rate of 50 mL min⁻¹.

The isothermal studies were evaluated by holding different samples isothermally at 220, 215, 210, 205 and 200 °C under nitrogen and air atmosphere at flow rate of 50 mL min⁻¹. The isothermal holding was monitored based on the time to mass loss of 8 % degradation and the experimental data were treated applying linear regression analysis. The heating rate used was 10 °C min⁻¹.

Results and Discussion

The DSC curve of PQ shows a single sharp endothermic peak corresponding to the melting event in the range between 201 – 208 °C ($T_{peak} = 206.57$ and $\Delta H_{fusion} = -83.93 \text{ J/g}$) [22,23], followed by decomposition process. The result was confirmed by TG/DTG analysis, which the thermal decomposition process of PQ occurs in three stages in the following temperature range and mass loss: 208 – 258 °C ($\Delta m = 3.3\%$), 258 – 370 °C ($\Delta m = 33\%$) and 307 – 900 °C ($\Delta m = 38.6\%$) (figure 2).

Figure 2

Compatibility studies

The selection of adequate excipients for the formulation should be based on the characteristic of the drug and its compatibility and stability with other components.

The DSC and TG curves of binary mixture (1:1) of drug and the following excipients: HPMC, colloidal silicon dioxide, talc, starch, tribasic calcium phosphate, acryl-eze®, POE, povidone and microcrystalline cellulose are showed in figure 3, 4, 5 and 6.

The thermal profiles of the mixture can be considered as a superposition of the curves of the PQ and excipients. The DSC and TG curves showed an endothermic peak corresponding to the primaquine's melting point followed by exothermic events characteristic of decomposition process. The thermal behavior of PQ was not modified in the binary mixtures, suggesting no interaction with these excipients.

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

The compatibility study of the drug and the following excipients: lactose, magnesium stearate, stearyl alcohol, sodium stearyl fumarate, glyceryl monostearate, mannitol and stearic acid are showed in the figure 7 and 8. The DSC curves demonstrated differences in the thermal profile of the PQ, such as absence of drug's melting event. The TG curves demonstrated that excipients influence the decomposition process of the PQ by displacing the T_{onset} of the first mass loss event at a lower temperature than the isolated PQ.

The interactions between PQ and lactose might be physical in nature which can be attributed to similar melting's temperature ranges (205 – 215 °C). In this binary mixture the melting point of the drug was decreased of 208 to 120 °C. In fact, similar results were observed for other amines and amides, such as glimepiride [9], glipizide [24] and glibenclamide [25].

Differences in the thermal curves of other drugs with magnesium stearate were described by others authors [14,25,26].

The drug's endothermic peak was extended in the DSC curves with the excipients stearyl alcohol, sodium stearyl fumarate and stearic acid, which were attributed to PQ dissolution in the melted excipient.

Figura 7

Figura 8

The TG and DSC dates obtained in the compatibility studies were demonstrated in table 1.

Table 1

In 1940s, the (IR) infrared spectroscopy becomes another technique utilized in the characterization of solid-solid interactions [27]. The FT-IR spectroscopy was used as supplementary technique in order to investigate the possible chemical interaction between drug-excipient and to confirm the results obtained by the thermal analysis.

The FT-IR spectrums obtained with the PQ and the excipients sodium stearyl fumarate, glyceryl monostearate, stearic acid, stearyl alcohol (figure 9) demonstrated that the characteristic PQ stretching bands were maintained, indicating that no occurs chemical interactions between PQ and these compounds.

Figure 9

In figure 10 can be observed the FT-IR spectrums of physical mixtures between PQ and lactose, magnesium stearate and mannitol. The band in 1050 cm^{-1} , characteristic of axial deformation C-O of PQ, expanded or moved about 10 cm^{-1} in physical mixtures of drug and these excipients, indicating a intermolecular links and possible chemical incompatibility. The FT-IR spectrums for the physical mixture between PQ/ lactose and PQ/ mannitol suggest chemical interactions. The amine group presented in PQ can react chemically with OH group presented in these excipients by hydrogen bonds.

Figure 10***Kinetic studies of PQ***

One of the main purposes of kinetic analysis of solid decomposition is to determine reaction mechanisms. The results obtained in the PQ kinetics investigation using isothermal and non isothermal methods were similar. However, it was observed a rather difference in the activation energy obtained under nitrogen and synthetic air demonstrated that the atmosphere involved in assay presented influence on the data.

The non-isothermal kinetic data were determined by plotting mass loss *versus* temperature of five TG curves at different heating rates in both atmospheres. The results demonstrate that TG curves in nitrogen and air atmosphere are shifted for higher temperatures when heating rates increases with a good correlation in Ozawas plot at five heating rates in nitrogen (figure 11) and a low correlation in air (figure 12).

The order of reaction and the activation energy (E_a) of process were determined by Ozawa's method in which plots slope of log heating rate *versus* $1/T$ [9,13]. The kinetics parameters obtained in non-isothermal method for the first stage of thermal decomposition was around 208 to 258 °C (Table 2).

Figure 11**Figure 12****Table 2**

Under isothermal conditions the curves (figure 13 and 14) showed that the mass loss variation depends on the temperature. As higher temperature in the assay smaller will be the time necessary to occur the same mass loss. The curves were used to obtain the graphic of $\ln t$ *versus* $1/T$ (K⁻¹) at a constant conversion level. The regression linear equation, correlation coefficient and activation energy (E_a) were represented in table 3.

Figure 13**Figure 14****Table 3**

The comparison between isothermal and non isothermal methods in nitrogen atmosphere shows good agreement for both values of activation energy. The decomposition kinetics for both methods occurs in constant rate, zero order, and it is independent of the reactants concentrations.

In the other hand, using air atmosphere in both methods the activation energy values was lower than nitrogen. In fact, PQ has a chemical group that suffers oxidation, therefore under synthetic air atmosphere undergoes acceleration in the decomposition process.

Conclusion

The thermoanalysis proved to be a suitable technique to evaluate the thermal behaviour of PQ. The methods, non isothermal and isothermal are necessary to obtain a concept description of the decomposition kinetics process. The decomposition kinetics for both occurs in constant rate, zero order, and is independent of the concentration of the reactants. In the compatibility studies, the results demonstrated the applicability of DSC as a fast screening tool for excipients at the early stages of a preformulation process. The FT-IR completes the DSC studies. The excipients lactose, magnesium stearate and mannitol showed a possible chemical incompatibility. The present work will contribute to select the appropriated excipients in order to formulate a safe and stable PQ solid dosage form.

References

1 L. S. Goodman, A. G. Gilman, J. G. Hardman and L. E Limbird, Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill, New York 2001, p.1984.

- 2 D. F. Clyde, *Bull. World Health Org.*, 59 (1981) 391.
- 3 A. Bhadra, K. Yadav, S. Bhadra and N. K. Jain, *Inter. J. Pharm.*, 295 (2005) 221.
- 4 R. Gaspar, V. Prat and M. Roland, *Inter. J. Pharm.*, 68 (1991) 111.
- 5 M. D. Green, M. J. D'Souza, J. M. Holbrook and R. A. Wirtz, *J. Microencap.*, 21 (2004) 433.
- 6 P. Mayorga, F. Puisieux and G. Couarraze, *Inter. J. Pharm.*, 132 (1996) 71.
- 7 K. Jackson, D. Young and S. Pant, *Research Focus.*, 3 (2000) 336.
- 8 P. Mura, M. T. Faucci, A. Manderioli and L. Ceccarelli, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 151.
- 9 L.C.S. Cides, A.A.S. Araújo, M. Santos-Filho and J. R. Matos, *J. Therm. Anal. Cal.*, 84 (2006) 441.
- 10 Y. Huang, Y. Cheng, K. Alexander and D. Dollimore, *Therm. Acta*, 367 (2001) 43.
- 11 D. Giron, *PSTT*, 1 (1998) 191.
- 12 D. Giron, *PSTT*, 1 (1998) 262.
- 13 M. A. S. Silva, R. G. Kelmann, T. Foppa, A. P. Cruz, C. D. Bertol, T. Sartori, A. Granada, F. Carmignan and F. S. Murakami, *J. Therm. Anal. Cal.*, 87 (2007) 463.
- 14 H. K. Stulzer, P. O. Rodrigues, T. M. Cardoso, J. S. R. Matos and M. A. S. Silva, *J. Therm. Anal. Cal.*, 91 (2008) 323.
- 15 L. V. J. Allen, N. G. Popovich and H.C. Ansel, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia 2005, p. 738.
- 16 M.E. Aulton, *Delineamento de formas farmacêuticas*, Artmed: São Paulo 2005, p. 677.
- 17 A. R. Gennaro, *Remington's The Pharmaceutical Sciences and Practice of Pharmacy*, Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins 2004, p. 2077.
- 18 P. Mura, P. Gratteri and M.T. Faucci, *J. Therm. Anal. Cal.*, 68 (2002) 541.
- 19 Kiss, D.; Zelkó, R.; Novak, Cs.; Éhen, Zs. *J. Therm. Anal. Cal.*, 84 (2006) 447.
- 20 Bruni, G.; Amici, L.; Berbenni, V.; Marini, A.; Orlandi, A., *J. Therm. Anal. Cal.*, 68 (2002) 561.
- 21 L. Burnham, D. Dollimore and K. S. Alexander, *Therm. Acta*, 392 (2002) 127.
- 22 A. A. Al-Badr, *Prof. Drug Subst. Excip. and Rel. Method.*, 32 (2005) 153.
- 23 *British Pharmacopoeia 3ed.*, London 1999.
- 24 R. K. Verna and S. Garg, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38 (2005) 633.
- 25 G. G. G. Oliveira, H.F.G. Ferraz and J.S.R. Matos, *J. Therm. Anal. Cal.*, 79 (2005) 267.
- 26 S. Lerdkanchanaporn, D. Dollimore and K. S. Alexander, *Therm. Acta*, 284 (1996) 115.
- 27 D. E. Bugay, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 48 (2001) 43.

Table 1. Onset and peak temperatures of fusion events and onset temperature of decomposition observed in the DSC and TG curves of PQ and binary mixtures with excipients.

Samples	DSC		TG
	T_{onset} (fusion) (°C)	T_{peak} (fusion) (°C)	T_{onset} (decomposition) (°C)
Drug			
Primaquine (PQ)	201.1	206.6	208.1
Drug/excipients	---	---	---
HPMC K15M	200.4	204.6	209.1
Colloidal silicon dioxide	199.6	206.1	210.1
Talc	199.6	203.6	213.1
Starch	200.9	205.1	213.8
Tribasic calcium phosphate	201.6	206.1	214.5
Acryl-eze®	192.6	201.1	207.3
POE 8.10 ⁶ Da	200.9	203.6	209.1
Povidone	193.6	201.2	210.1
Microcrystalline cellulose	199.7	204.3	209.1
Lactose	*	*	120.7
Magnesium stearate	*	*	150.5
Stearyl alcohol	201.0	204.4	140.1
Sodium stearyl fumarate	*	*	190.0
Glyceryl monoestearate	*	*	140.3
Mannitol	*	*	184.2
Stearic acid	*	*	155.1

* Values not calculated due to absence of drug's melting event or undefined peak.

Table 2. Kinetic parameters obtained in non-isothermal method under both atmospheres.

Atmosphere	Activation energy (E_a)	Frequency factor (A)	Order reaction
Nitrogen	132.49 kJ.mol ⁻¹	1.490 x 10 ¹¹ min ⁻¹	Zero ($n = 0$)
Air	120.34 kJ.mol ⁻¹	1.141 x 10 ¹⁰ min ⁻¹	Zero ($n = 0$)

Table 3. Kinetic parameters obtained in isothermal method in both atmospheres.

Atmosphere	Regression equation	Correlation coefficient (r^2)	Activation energy (E_a)
Nitrogen	Slope: -15.916 Intercept: 27.964	0.9736	132.33 kJ.mol ⁻¹
Air	Slope: -11.469 Intercept: 19.417	0.9702	95.35 kJ.mol ⁻¹

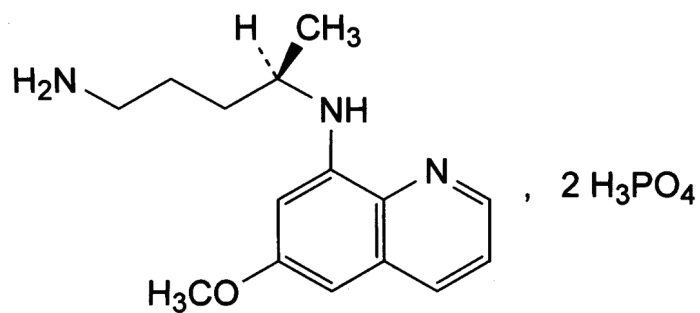


Figure 1. Structural formula of primaquine.

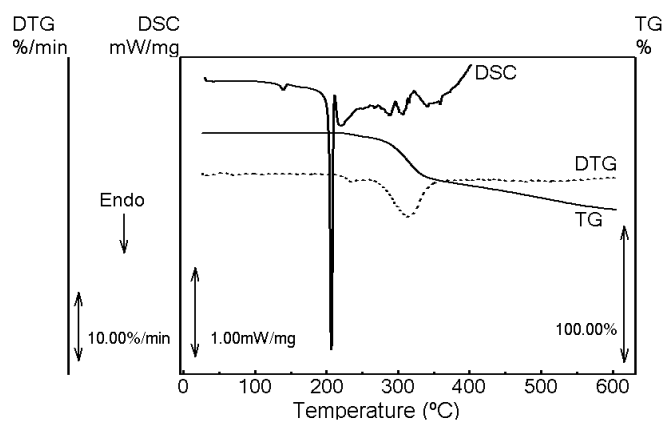


Figure 2. DSC and TG/DTG curves of PQ under nitrogen atmosphere.

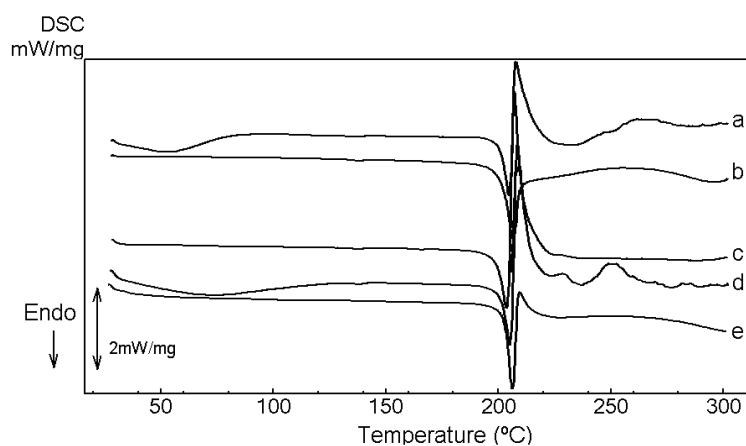


Figure 3. Stacked overlay of DSC curves of physical mixtures: (a) PQ/ HPMC; (b) PQ/ colloidal silicon dioxide; (c) PQ/ talc; (d) PQ/ starch; (e) PQ/ tribasic calcium phosphate.

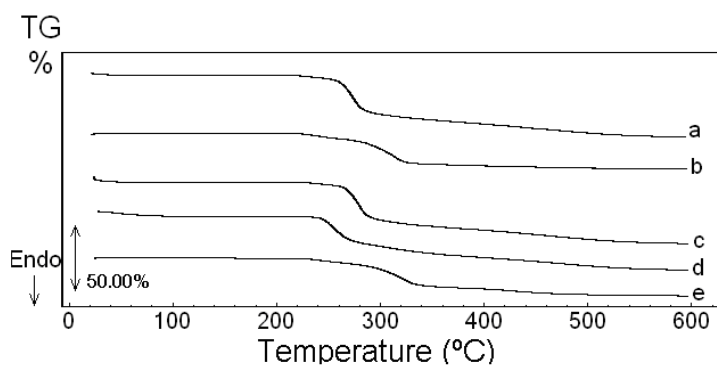


Figure 4. Stacked overlay of TG/DTG curves of physical mixtures: (a) PQ/ HPMC; (b) PQ/ colloidal silicon dioxide; (c) PQ/ talc; (d) PQ/ starch; (e) PQ/ tribasic calcium phosphate.

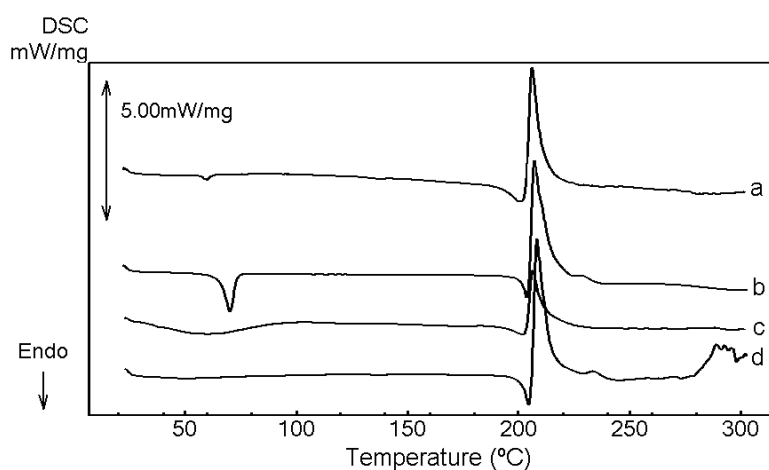


Figure 5. Stacked overlay of DSC curves of physical mixtures: (a) PQ/ acryl eze; (b) PQ/ POE; (c) PQ/ povidone; (d) PQ/ microcrystalline cellulose.

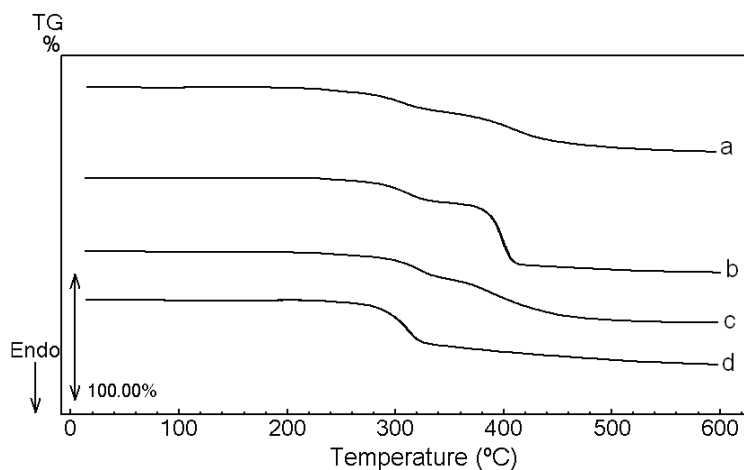


Figure 6. Stacked overlay of TG/DTG curves of physical mixtures: (a) PQ/ acryl eze; (b) PQ/ POE; (c) PQ/ povidone; (d) PQ/ microcrystalline cellulose.

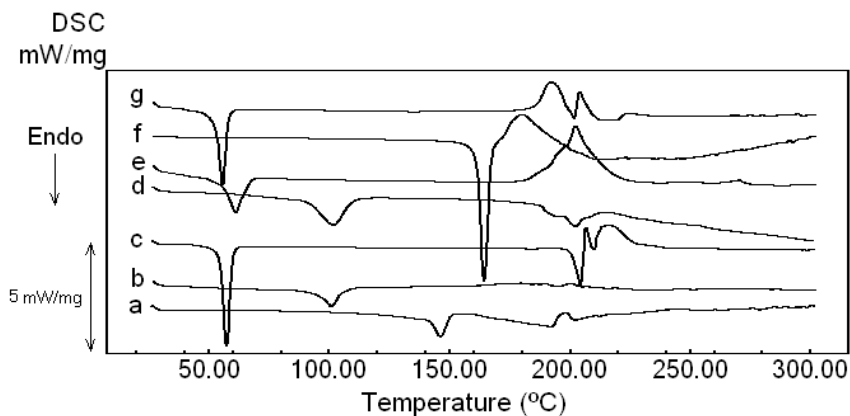


Figure 7. Stacked overlay of DSC curves of physical mixtures: (a) PQ/ lactose; (b) PQ/ magnesium stearate; (c) PQ/ stearyl alcohol; (d) PQ/ sodium stearyl fumarate; (e) PQ/ glyceryl monostearate; (f) PQ/ mannitol; (g) PQ/ stearic acid.

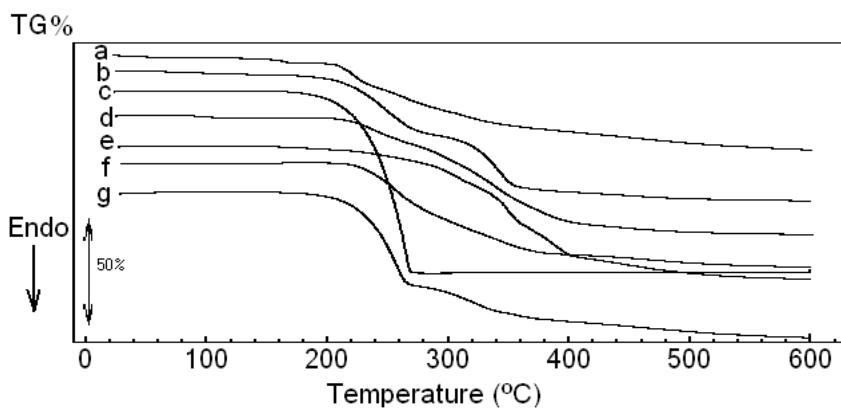


Figure 8. Stacked overlay of TG/DTG curves of physical mixtures: (a) PQ/ lactose; (b) PQ/ magnesium stearate; (c) PQ/ stearyl alcohol; (d) PQ/ sodium stearyl fumarate; (e) PQ/ glyceryl monostearate; (f) PQ/ mannitol; (g) PQ/ stearic acid.

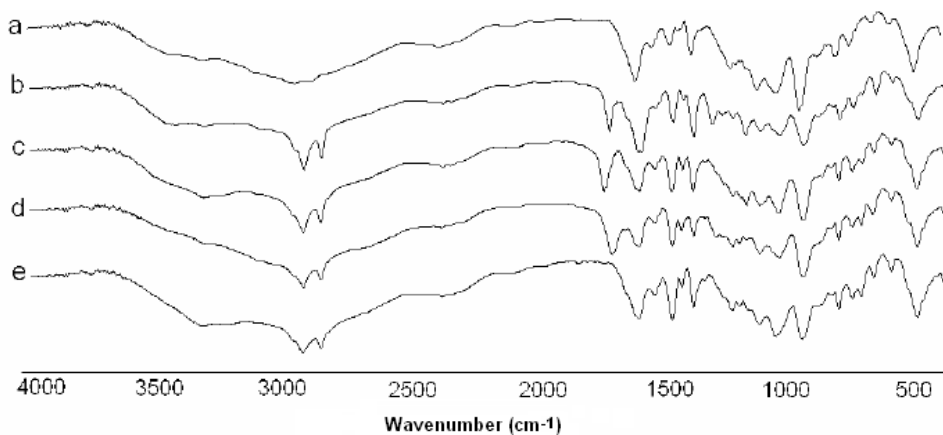


Figure 9. FTIR spectra of physical mixtures: (a) PQ, (b) PQ/ sodium stearyl fumarate; (c) PQ/ glyceryl monostearate; (d) PQ/ stearic acid; (e) PQ/ stearyl alcohol.

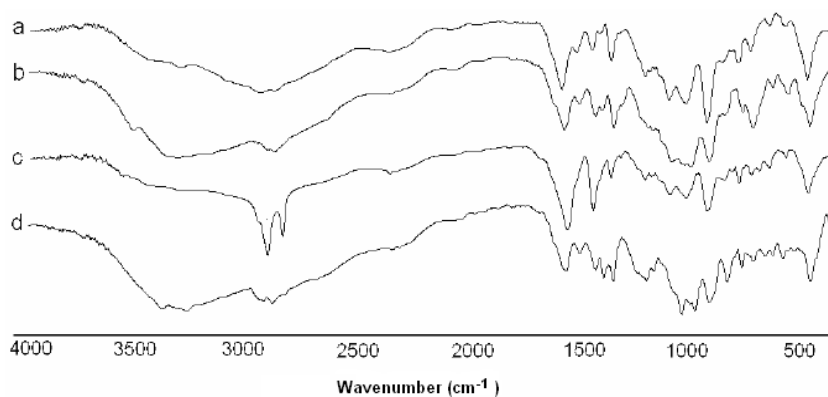


Figure 10. FTIR spectra of physical mixtures: (a) PQ; (b) PQ/lactose; (c) PQ/ magnesium stearate; (d) PQ/ mannitol.

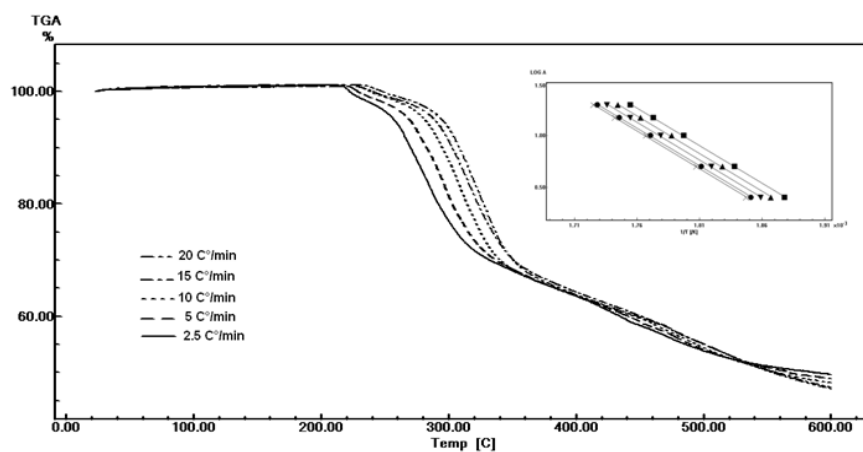


Figure 11. TG curves and Ozawa's plot of PQ obtained at five heating rates under dynamic nitrogen atmosphere in non isothermal method.

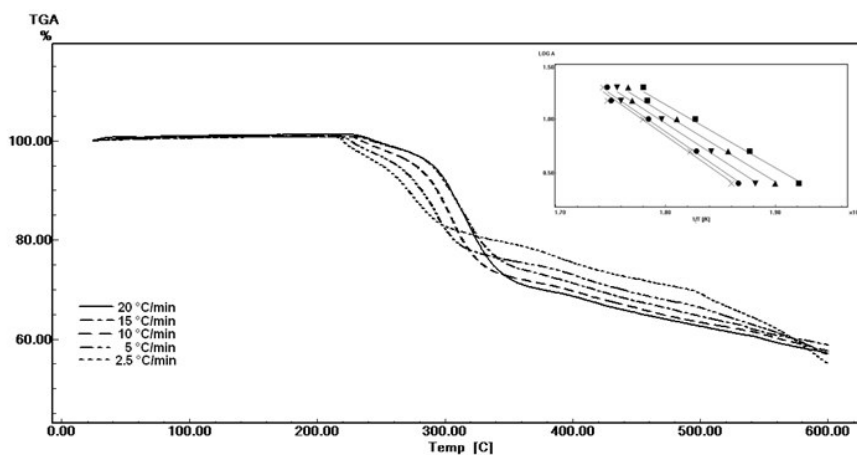


Figure 12. TG curves and Ozawa's plot of PQ obtained at five heating rates under dynamic air atmosphere in non isothermal method.

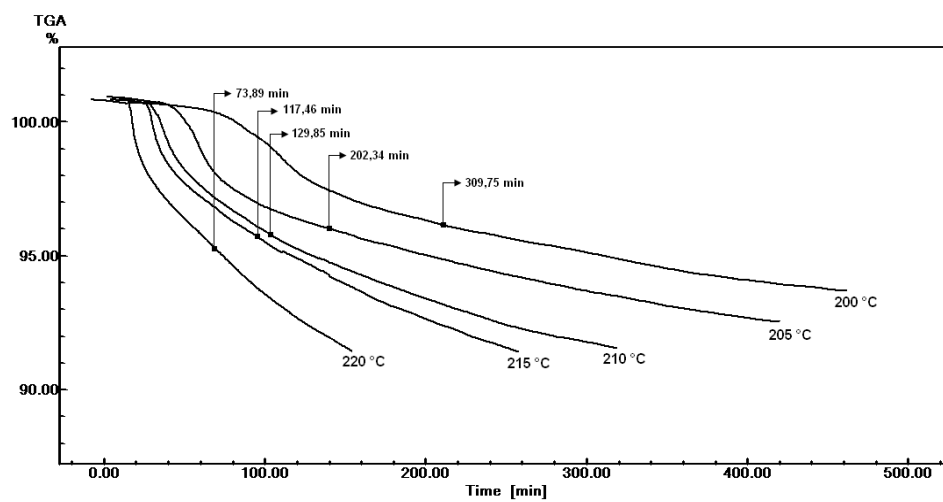


Figure 13. Isothermal TG curves of PQ obtained between at 220, 215, 210, 205 and 200 °C under nitrogen atmosphere.

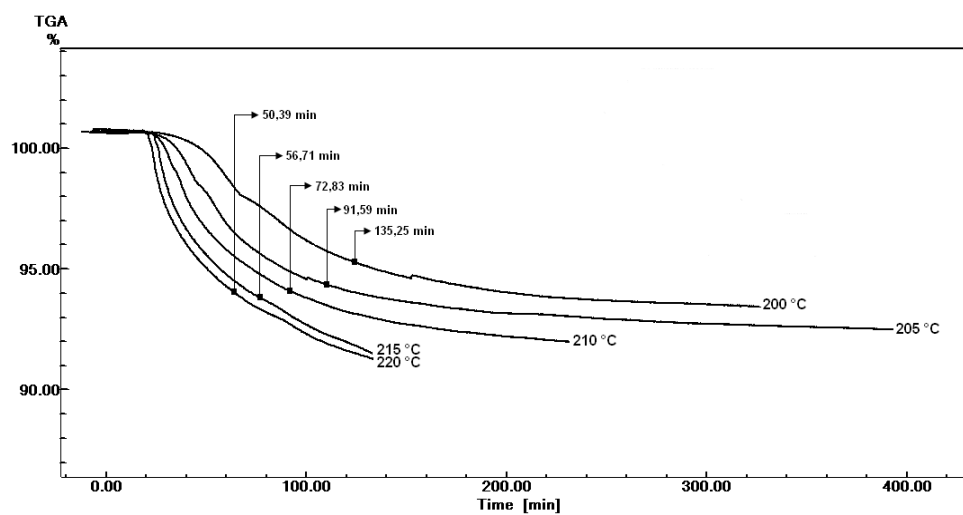


Figure 14. Isothermal TG curves of PQ obtained between at 220, 215, 210, 205 and 200 °C under air atmosphere.

APÊNDICE 2

Artigo Submetido: *Development and Validation of a SPE –LC Method for Determination of Primaquine Extended Release Tablets in Beagle Dog Plasma*

Jornal: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*

Development and Validation of a SPE – LC Method for Determination of Primaquine Extended Release Tablets in Beagle Dog Plasma

Charise D. Bertol*, Paulo R. Oliveira, Gislaïne Kuminek, Gabriela S. Rauber, Ariane P. Cruz, and Marcos A. S. Silva

Department of Pharmaceuticals Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Shortened version of the title: SPE determination of primaquina

*Correspondence: Charise D. Bertol, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Trindade, Bloco K, sala 207, Florianópolis – SC, Brazil, 88040-900. E-mail: charibertol@yahoo.com.br

Abstract: A bioanalytical liquid chromatographic (LC) method was developed and validated for determination of primaquine extended release tablets in beagle dog plasma. Primaquine and bromopride (internal standard, IS) were extracted from plasma by solid-phase extraction (SPE). Chromatographic separation was achieved on a C₁₈ analytical column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile:methanol:water:acetic acid (18:3.5:78:0.5; v/v), pH 2.75 as mobile phase and UV detection at 254 nm. The mean extraction recoveries for primaquine and IS were 98.38 and 99.01 %, respectively. Method validation investigated parameters such as linearity (75–3000 ng mL⁻¹), precision, accuracy, specificity, and stability, giving results within the acceptable range. The proposed method was successfully applied to the quantitation of primaquine in dog plasma, thus demonstrating that the plasmatic profile of extended release tablets was improved in comparison with immediate release tablets.

Keywords: Liquid chromatography, Solid-phase extraction, Primaquine, Beagle dog plasma, Method validation, Extended release tablets

INTRODUCTION

Malaria is a tropical disease, confined to underdeveloped regions of the globe, which has been traditionally neglected by the pharmaceutical industries and represents a serious world health problem.^[1,2] Primaquine (PQ), [8-(4-amino-1-methylbutyl) amino]-6-methoxyquinoline, is effective against the liver stages of all types of malaria parasites. It is used to provide radical cure of *P. vivax* and *P. ovale* malaria and it has causal prophylactic activity.^[1,3] The mechanism of action of PQ seems to be related to the disruption of the parasite mitochondrial membrane due to the generation of oxidative stress in the parasitized cells.^[3] However, PQ has several adverse side-effects and its toxicity has become a serious problem. The most important adverse side-effects are hemolytic anemia in patients with G6PD deficiency, abdominal pain, nausea, vomiting, methaemoglobinaemia, and leukocytosis.^[4]

PQ is readily absorbed from the gastrointestinal tract. Peak plasma concentrations occur around 1–2 h after oral administration and then decline, with a reported elimination half-life of 3–6 h. It is widely distributed into body tissues and rapidly metabolized in the liver.^[5] Due to the low plasmatic half-life, the treatment of malaria with PQ requires frequent administrations, thereby intensifying the adverse side-effects.^[1,2] To reduce these undesired effects some researchers have suggested different routes for the administration of PQ, such as transdermal therapeutic systems,^[6,7] encapsulation in nanoparticles^[8] or liposomes,^[9] and emulsification,^[10] among others. However, none of the above alternative routes have stepped forward to clinical applications.^[2] Thus, extended release tablets have been developed in order to improve the treatment efficacy and to reduce the limitations of existing therapies.^[11]

Unfortunately, serum can not be injected directly on the LC columns with exception of small amounts injected on special columns such as shielded hydrophobic phase, wide pore, and molecular sieve columns. In order to analyze drugs and endogenous small molecules present in serum, these compounds have to be extracted either by liquid or solid phase.^[12] LC methods with liquid-liquid extraction have been reported for the determination of PQ in biological fluids with UV^[13,14] and MS detection.^[15] PQ has amphiphatic character with two pKas (pKa 3.2 and 10.4),^[9] which provides low

recovery rates by conventional extraction methods, such as liquid-liquid extraction.^[14,15] Considering the polar nature of the analyte, solid-phase extraction (SPE) has been proven to be an effective and highly preferred technique.^[16] SPE can also enhance sensitivity by pre-concentration and reduce the interferences in complex samples, such as biological fluids samples.^[17]

However, a LC method with solid-phase extraction has not been reported for the determination of PQ in biological matrices, therefore, the aim of this study was to develop and to validate a LC method for the determination of PQ in beagle dog plasma for pharmacokinetic studies of extended and immediate release tablets.

EXPERIMENTAL

Reagents and Chemicals

PQ reference standard was purchased from U.S Pharmacopeia (Rockville, MD, USA), raw material and immediate release tablets were kindly donated by Fundação Oswaldo Cruz/Farmanguinhos (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), bromopride (internal standard, IS) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The excipients used were: polyethylene oxide (PEO) with molecular weight (M_w) of 8×10^5 g/mol (Sigma Aldrich), microcrystalline cellulose (Avicel[®] PH-102; Blanver, Cotia, SP, Brazil), colloidal silicon dioxide (Aerosil[®], Galena, Campinas, SP, Brazil) and talc (Charles B Chrystal Co., Inc., New York, NY, USA). HPLC-grade methanol and acetonitrile were obtained from J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, Inc. NJ, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all the analyses, ultrapure water was obtained from Milli-Q[®] apparatus (Millipore, Bedford, MA, USA).

Preparation of extended release tablets

Extended release tablets were prepared by direct compression of the physical mixtures of 52.60 mg of PQ phosphate (corresponding to 30 mg of PQ free base), 30 % of hydrophilic polymer PEO and excipients, with a total mass of 175 mg.^[11]

Apparatus and Chromatographic Conditions

The LC analysis was performed on a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with a LC-10AD pump, SPD-10AV_{VP} UV detector, SCL-10A_{VP} system controller, DGU-14A degasser, CTO-10AS_{VP} column oven, and the sample injection was performed via a Rheodyne 7125 valve with a 20 μ L loop. The detector was set at 254 nm and peak areas were integrated automatically by Shimadzu Class VP[®] V 6.14 software program. The experiments were carried out on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, CA, USA) Luna C₁₈ column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), maintained at 35 ± 1 °C. A security guard holder (4.0 mm x 3.0 mm I.D.) was used to protect the analytical column. The mobile phase consisted of acetonitrile:methanol:water:acetic acid (18:3.5:78:0.5; v/v), pH 2.75, and it was eluted isocratically at a 1.0 mL min⁻¹ flow rate. The injection volume was 20 μ L for both standard and samples.

Standard Solutions and Calibration Curves

The stock solution of PQ was prepared by weighing 10 mg of reference standard into a 25 mL volumetric flask and diluting to volume with water, obtaining a concentration of 400 μ g mL⁻¹. Bromopride (IS) stock solution was also made at a final concentration of 400 μ g mL⁻¹ into a 25 mL volumetric flask with methanol:water (3:2, v/v). An appropriate aliquot of PQ stock solution was diluted with water to obtain the calibration standards solutions with the concentrations of 1.5, 3, 6, 12, 24, 30, 40, 50, and 60 μ g mL⁻¹.

An aliquot of 25 μ L was taken from each PQ standard solutions and added in 475 μ L of blank dog plasma to prepare the calibration standards in the concentration range of 75 - 3000 ng mL⁻¹ (75, 150, 300, 600, 1200, 1500, 2000, 2500, and 3000 ng mL⁻¹). The quality control (QC) samples were prepared in pooled plasma, with the concentrations of 200 (low), 1300 (medium) and 2700 ng mL⁻¹ (high), and then divided in aliquots that were stored at -20 °C until analysis.

Plasma Extraction

For the analysis of PQ, a total of 500 μL of the spiked plasma was transferred to a 10 mL glass tube, followed by addition of 37.5 μL of IS solution ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), 50 μL of ammonia hydroxide, and 200 μL of water. All samples were mixed by vortex agitation for 30 s. Then, 740 μL of samples were loaded onto cartridges (Phenomenex Strata X, 30 mg mL^{-1}) pretreated with methanol (1 mL) and water (1 mL). The extraction of PQ from cartridges was performed with two volumes (1 mL each) of a mixture containing methanol:acetonitrile:water:acetic acid (60:30:10:0.1, v/v). The eluate was evaporated to dryness at 60 °C under reduced pressure in a speed-vac concentrator (Savant SPD 1010, Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA). The samples were reconstituted with 250 μL of mobile phase and mixed by vortex agitation for 1 min. A 20 μL aliquot of each sample was injected into the LC system.

Bioanalytical Method Validation

The method was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, recovery, accuracy, precision, lower limit of quantitation (LLOQ), limit of detection (LOD), and stability studies, according to the FDA guidelines.^[19] Specificity was assessed using six blank dog plasma samples, randomly selected (including hemolysed and lipemic plasma), that were subjected to the extraction procedure and chromatographed to determine the extent to which endogenous plasma components could interfere in the analysis of PQ or the IS. The results were compared to a solution containing 75 ng mL^{-1} of PQ (LLOQ). The calibration curves were constructed from a blank sample (plasma sample processed without IS), a zero sample (plasma processed with IS) and nine concentrations of PQ, including the LLOQ, ranging from 75 to 3000 ng mL^{-1} . The peak area ratio of the drug to the IS against the respective standard concentrations was used for plotting the graph and the linearity evaluated by a least square regression analysis. The acceptance criteria for each calculated standard concentration was not more than 15 % deviation from the nominal value, except for the LLOQ which was set at 20 %. The recovery was evaluated by the mean of the response of QC samples, each one added of 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the IS, dividing the mean of the extracted sample by the mean of the unextracted sample (spiked with the extracted blank plasma residues) at the same concentration level. To evaluate the inter-day precision and accuracy, QC samples were analyzed together with one independent calibration standard curve for 3 days, while intra-day precision and accuracy were evaluated through analysis of the QC samples in six replicates, in the same day. Inter- and intraday precision were expressed as relative standard deviation (RSD). The evaluation of precision and accuracy was based on the criteria^[19] that the RSD of each concentration level should be within $\pm 15\%$ of the nominal concentration, except for the LLOQ, for which it should be within $\pm 20\%$. The lowest standard concentration on the calibration curve should be accepted as the limit of quantification if the following conditions are met: the analyte response at the LLOQ should be at least five times the response compared to blank response and analyte peak (response) should be identifiable, discrete and reproducible with a precision of 20 % and accuracy of 80–120 %. The limit of detection (LOD) was defined by the concentration with a signal-to-noise ratio of 3. The stability of PQ in dog plasma was evaluated after each storage period and related to the initial concentration as zero cycle (samples that were freshly prepared and processed immediately). The samples were considered stable if the deviation (expressed as percentage bias) from the zero cycle was within $\pm 15\%$. The freeze-thaw stability of PQ was determined at QC samples ($n=3$) over three freeze-thaw cycles within 3 days. In each cycle, the frozen plasma samples were thawed at room temperature for 2 h and refrozen for 24 h. After completion of each cycle the samples were analyzed and the results compared with that of zero cycle. The short-term stability was evaluated using three aliquots each of the unprocessed QC samples kept at room temperature (25 ± 5 °C) for 7 h, and then analyzed. For the processed sample stability, three aliquots each one of the low, medium and high QC samples were processed and placed at room temperature and analyzed after 24 and 48h. For the long-term stability analysis of PQ, three aliquots of each QC samples were frozen at -20 °C for 60 days and then analyzed.

Pharmacokinetics study in beagle dogs - Analysis of Extended and Immediate Release Tablets

Six beagle dogs (female), weighting from 12.10 to 17.45 kg, were divided in two groups of three dogs each. The first group received an oral administration of extended release tablets (ERT) and the second group received immediate release tablets (IRT), with 200 ml of water, after an overnight fast. After the *wash out* period, corresponding to seven half-time elimination, the first group received the IRT and the second group received the ERT. Animals had access to water and food 4 h after drug administration. Blood samples (3 mL) were collected into heparinized tubes before tablet

administration and at different time points: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 30, and 48 h for ERT, and 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, and 6 h for IRT. The plasma was immediately separated by centrifugation and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

The PQ plasma concentration–time profile graph was plotted and the pharmacokinetic parameters were estimated using a computer software program Pharmkit.^[20] Pharmacokinetic parameters were calculated using the log trapezoidal rule with extrapolation of the terminal slope to infinity by log-linear regression.

RESULTS AND DISCUSSION

Method Development

The chromatographic conditions were optimized to provide acceptable resolution of the analytes present in the plasma. For the selection of the best wavelength detection a PDA detector was used. To obtain the best chromatographic conditions different columns and mobile phases consisting of different proportions of acetonitrile-methanol-water and pH were tested. Modifiers such as acetic acid and perchloric acid were also evaluated. The best signal was achieved using acetonitrile:methanol:water:acetic acid (18: 3.5: 78: 0.5; v/v), pH 2.75, with a flow rate of 1 mL min^{-1} in a C_{18} analytical column. This conditions provided good resolution of PQ (retention time = 9.5 min) and IS (retention time = 4.0 min), without interference from plasmatic compounds.

Due to the complex nature of plasma, a sample pre-treatment is often needed to remove plasmatic proteins and potential interferences prior to analysis. Currently, the most widely employed biological sample preparation methodologies are protein precipitation (PPT), liquid–liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE). As PPT procedure has advantages such as simplicity and universality for drug molecules in plasma, an initial approach was based on PPT with methanol or acetonitrile. However, this technique resulted in strong interferences from the sample matrix and low recoveries for PQ. LLE was tested with different extraction solvents and proportions, but the results showed low reproducibility and recovery, additionally to a high consumption of solvents and time for sample preparation. SPE was adopted since this technique can either purify or concentrate the sample. The mixture of methanol:acetonitrile:water:acetic acid (60:30:10:0.1, v/v) was found to be the most suitable extraction solvent due to high extraction efficiency and low plasmatic interference.

Method Validation

Linearity was evaluated by six determinations of nine concentrations in the range of 75 - 3000 ng mL^{-1} for PQ. The values of the determination coefficient ($r^2 = 0.999$, $y = 2.67 \cdot 10^{-5}x + 0.0001$), indicated significant linearity of the calibration curves for the method. The LLOQ was evaluated in an experimental assay and was found to be 75 ng mL^{-1} with precision of 10.33 % and accuracy of 110.33 %, and the LOD was found to be 30 ng mL^{-1} . Comparison of the blank and spiked dog plasma (75 ng mL^{-1}) chromatograms indicated that no significant interferences peaks were detected from endogenous substances (Figure 1).

FIGURE 1

The mean (six replicates \pm RSD %) extraction recoveries for the three concentration levels of the QC samples were 88.61 ± 13.24 for low, 110.83 ± 10.28 for medium, 95.70 ± 10.88 for high QC, and 99.01 ± 11.23 % for IS.

The intra-day accuracy of the method was within 101.51 and 104.13 % with a precision of 6.77–9.76 %. The inter-day accuracy was within 103.39 and 107.21% with RSD of 6.81–9.21% (Table 1). The data show that the method possesses adequate repeatability and reproducibility.

TABLE 1

As shown in Table 2, PQ was stable in neat plasma for up to 7 h at room temperature (short term) and also after three freeze-thaw cycles, demonstrating that dog plasma samples could be thawed and refrozen without compromising the integrity of the samples. Plasma samples of PQ were stable for at least 60 days at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (long-term). The results demonstrated that extracted samples could be analyzed up to 48 h with acceptable precision and accuracy.

TABLE 2

Method Application

The method was successfully applied for the determination of PQ in dog plasma, after a single oral administration of ERT (60 mg) and IRT (60 mg) and the plasma concentration-time profile is shown in Figure 2. C_{max} of ERT and IRT was found to be 954.27 and 2001.9 ng mL⁻¹, respectively. T_{max} of ERT and IRT were reached 5.5 and 2 h after oral administration, respectively. The area under curve (AUC)_(0→∞) for ERT was 9782.19 (ng h mL⁻¹) and for IRT was 5336.52 (ng h mL⁻¹). The new formulation (ERT) showed an increased AUC with lower C_{max} , indicating a higher extension of PQ absorption. The medium residence time for ERT was 10.29 h and 2.22 h for IRT. The elimination constant K_e (h⁻¹) was 0.081 for ERT and 0.36 for IRT, demonstrating that the lower K_e is related to the controlled release of ERT, and therefore slower PQ absorption.

FIGURE 2

CONCLUSION

A precise and accurate LC method, with a solid phase extraction procedure, was developed and validated for the determination of PQ in beagle dog plasma. The results of the validation studies showed that the optimized method presented linearity, specificity, precision, accuracy, and stability over the entire range of significant therapeutic plasma concentration. The proposed method was successfully applied to the quantification of PQ in dog plasma. The *in vivo* study demonstrated that the AUC of the new extended release formulation was increased with lower fluctuation in the PQ plasmatic level.

REFERENCES

1. World Malaria Report (2008), World Health Organization, Switzerland, available in: <<http://www.who.int/en/>>
2. Vale, N.; Moreira, R.; Gomes, P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, *in press*. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.08.011
3. Baird, J.K.; Fryauff, D.J.; Hoffman, S.L. Primaquine for prevention of malaria in travelers. *Clin. Infect. Dis.* 2003, 37, 1659-1667.
4. Hofsteenge, J.; Capuano, A.; Altszuler, R.; Moore, S. Carrier-linked primaquine in the chemotherapy of malaria. *J. Med. Chem.* 1986, 29, 1765-1769.
5. Guidelines for the treatment of malaria (2006) World Health Organization, Switzerland, available in: <<http://www.who.int/en>>
6. Mayorga, P.; Puisieux, F.; Couarraze, G. Formulation study of a transdermal delivery system of primaquine. *Int. J. Pharm.* 1996, 132, 71-79.
7. Jeans, C.W.; Heard, C.M. A therapeutic dose of primaquine can be delivered across excised human skin from simple transdermal patches. *Int. J. Pharm.* 1999, 189, 1-6.
8. Rodrigues Jr, J.M.; Fessi, H.; Bories, C.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.-Ph. Primaquine-loaded poly(lactide) nanoparticles: physicochemical study and acute tolerance in mice. *Int. J. Pharm.* 1995, 126, 253-260.
9. Stensrud, G.; Sande, S.A.; Kristensen, S.; Smistad, G. Formulation and characterisation of primaquine loaded liposomes prepared by a pH gradient using experimental design. *Int. J. Pharm.* 2000, 198, 213-228.
10. Dierling, A.M.; Cui, Z. Targeting primaquine into liver using chylomicron emulsions for potential vivax malaria therapy. *Int. J. Pharm.* 2005, 303, 143-152.
11. Cruz, A.P.; Bertol, C.D.; Stulzer, K.H.; Murakami, F.S.; Costella, F.T.; Silva, M.A.S. Swelling, erosion, and release behavior of PEO/primaquine matrix tablets. *Pharm. Chem. J.* 2008, 42 (7), 413-418.
12. Shihabi, Z.K. Analyte Recovery from Deproteinized Serum for HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2008, 31, 3159-3168.
13. Dua, V.K.; Kar, P.K.; Sarin, R.; Sharma, V.P. High-performance liquid chromatographic determination of primaquine and carboxyprimaquine concentrations in plasma and blood cells in *Plasmodium vivax* malaria cases following chronic dosage with primaquina. *J. Chrom. B.* 1996, 675, 93-98.

14. Lal, J.; Mehrotra, N.; Gupta, R.C. Analysis and pharmacokinetics of bulaquine and its major metabolite primaquine in rabbits using an LC-UV method- a pilot study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 141-150.
15. Nitin, M.; Rajanikanth, M.; Lal, J.; Madhusudanan, K.P.; Gupta, R.C. Liquid Chromatography – tandem mass spectrometric assay with a novel method of quantitation for the simultaneous determination of bulaquine and its metabolite, primaquine, in monkey plasma. *J. Chrom. B.* 2003, 793, 253-263.
16. Pathak, S.M.; Kumar, A.R.; Musmade, P.; Udupa, N. A simple and rapid high performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the estimation of fexofenadine in rat plasma - Application to preclinical pharmacokinetics. *Talanta.* 2008, 76, 338-346.
17. Idris, A.M.; Alnajjar, A.O. Exploiting sequential injection analysis technique to automate on-line sample treatment and quantitative determination of morphine in human urine. *Talanta.* 2008, 77, 522-526.
18. Lanza, F.; Sellergren, B. The application of molecular imprinting technology to solid phase extraction. *Chromatographia.* 2001, 53, 599- 611.
19. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug administration, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, 2001
20. Johnston, A; Woolard, R.C. Stripe: an interactive computer software program for the analysis of drug pharmacokinetics. *J. Pharmacol. Methods.* 1983, 9, 193- 199.

Table 1. Intra-day and inter-day precision and accuracy data of Primaquine in beagle dog plasma.

Nominal Concentration (ng mL ⁻¹)	Mean concentration found (ng mL ⁻¹)	Precision (RSD %)	Accuracy (%)
Intra-day ^a			
200	208.25	9.76	104.13
1300	1319.57	6.77	101.51
2700	2798.62	8.55	103.65
Inter-day ^b			
200	214.42 ^c	6.81	107.21
1300	1345.18 ^c	7.94	103.48
2700	2791.94 ^c	9.21	103.39

^a Mean of six replicates

^b Mean of Five replicates

^c Mean of three days

Table 2. Stability of Primaquine in beagle dog plasma.

Stability	Zero cycle concentration (ng mL ⁻¹) ^a	Concentration found after storage (ng mL ⁻¹) ^a	RSD (%)	Bias (%) ^b
Long term (60 days)	203.44	212.19	10.18	4.30
	1288.43	1310.39	5.66	1.70
	2829.80	2652.41	4.83	-6.27
Short term (7 h)	203.44	231.58	6.32	13.83
	1288.43	1417.11	4.10	9.99
	2829.80	3132.60	8.19	10.70
Processed samples (after 48 h)	203.44	198.60	9.87	-2.38
	1288.43	1169.45	6.00	-9.23
	2829.80	2587.61	7.62	-8.56
Three freeze-thaw cycles	203.44	223.64	9.61	9.93
	1288.43	1408.74	4.52	9.34
	2829.80	2894.56	8.61	2.29

^a Mean of three replicates

^b Bias = (measured concentration - nominal concentration / nominal concentration) x 100

Figure captions

Figure 1. Chromatograms obtained for specificity test. a) Blank dog plasma; b) Lipemic dog plasma; c) Hemolysed dog plasma; d) PQ (LLOQ, 75 ng mL⁻¹) and IS (bromopride 15 µg mL⁻¹) dog plasma. Analytical conditions: C₁₈ column (250 x 4.6 mm - 5 µm), mobile phase: acetonitrile:methanol:water:acetic acid (18:3.5:78:0.5; v/v), pH 2.75, 254 nm.

Figure 2. Mean plasma concentrations after a single 60 mg oral dose administration of ERT (extended release tablets) and IRT (immediate release tablets) of PQ to six beagle dogs.

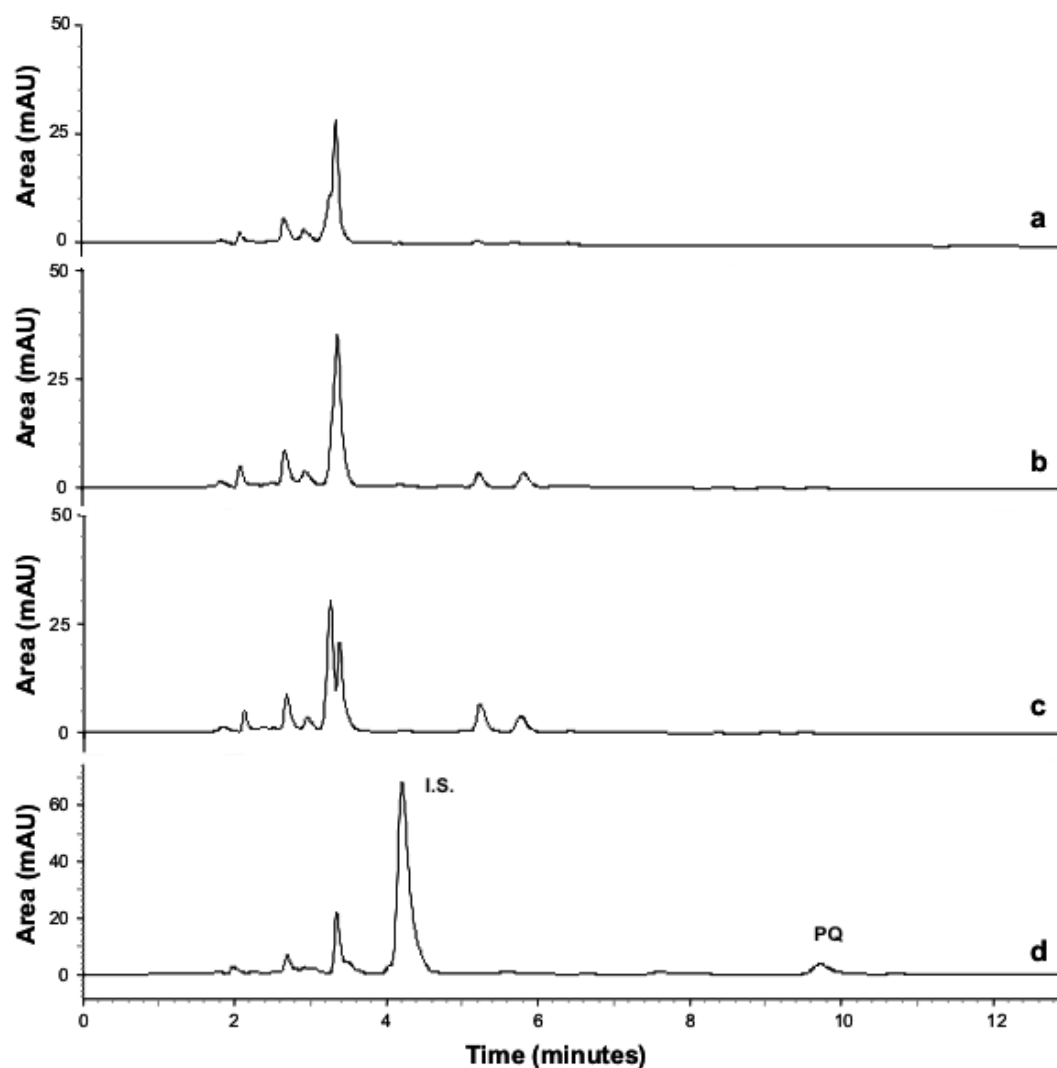


Figure 1. Chromatograms obtained for specificity test. a) Blank dog plasma; b) Lipemic dog plasma; c) Hemolysed dog plasma; d) PQ (LLOQ, 75 ng mL⁻¹) and IS (bromopride 15 µg mL⁻¹) dog plasma. Analytical conditions: C₁₈ column (250 x 4.6 mm - 5 µm), mobile phase: acetonitrile:methanol:water:acetic acid (18:3.5:78:0.5; v/v), pH 2.75, 254 nm.

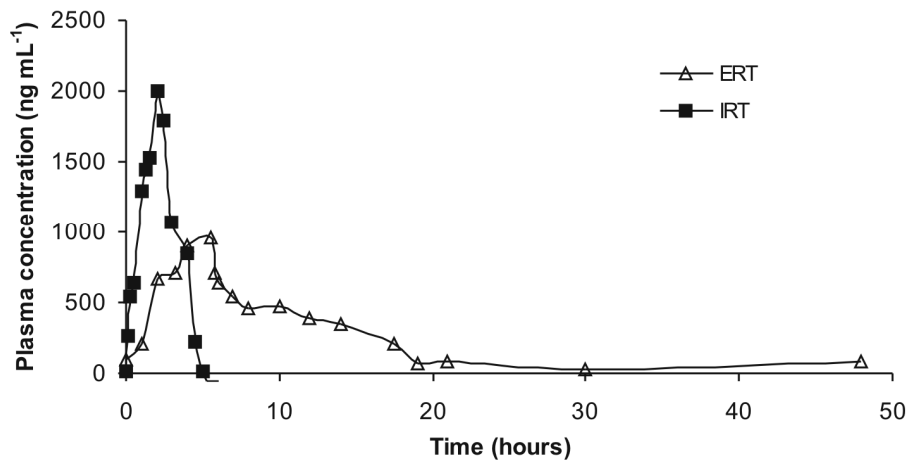


Figure 2. Mean plasma concentrations after a single 60 mg oral dose administration of ERT (extended release tablets) and IRT (immediate release tablets) of PQ to six beagle dogs.