

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Determinação do Prazo de Validade do Medicamento
Carbocisteína Xarope**

Dissertação de Mestrado

Josélia Larger Manfio

PORTO ALEGRE, 2005.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Determinação do Prazo de Validade do Medicamento
Carbocisteína Xarope**

JOSÉLIA LARGER MANFIO

PORTO ALEGRE, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Determinação do Prazo de Validade do Medicamento
Carbocisteína Xarope

Dissertação apresentada por
Josélia Larger Manfio para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Mestrado Profissionalizante em Desenvolvimento Tecnológico e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e aprovada em 11 de janeiro de 2005, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Ana Maria Bergold
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Cardoso Gonçalves
Universidade Federal de Santa Maria

M276d Manfio, Josélia Larger
 Determinação do prazo de validade do medicamento carbocisteína xarope / Josélia Larger Manfio – Porto Alegre: UFRGS, 2004.
 - 92 p.:il, tab., graf.

 Dissertação (mestrado profissionalizante). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

 1.Carbocisteína. 2. Medicamentos: prazo de validade. 3.Estabilidade de medicamentos. I Steppe, Martin. II. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável: Margarida Maria C.F. Ferreira – CRB10/480

AGRADECIMENTOS

À Prati, Donaduzzi na pessoa do Dr Luiz Donaduzzi pelo patrocínio e conseqüente viabilização da realização deste trabalho.

Ao professor doutor Martin Steppe por acreditar na viabilidade e importância deste trabalho bem como pelo seu aceite como orientador.

Aos meus colegas do mestrado profissionalizante Silvana, Graça, Gabriela, Fernanda, Eneida, Carlos e Leandro, obrigada pela amizade, apoio e principalmente a oportunidade de troca de idéias e experiências.

À Susana, minha querida colega e grande amiga, pelo apoio e amizade.

Aos meus colegas da Prati, Donaduzzi, em especial a Patrícia, Mônica, Ana Maria, Anelise e Alexandre, que além de me apoiarem, me substituíram no trabalho durante minhas ausências, apresentaram sugestões, me auxiliaram nas determinações analíticas.

Aos professores do Pós-Graduação, pelo apoio, orientação e troca de experiências.

Às irmãs carmelitas da Igreja Nossa Senhora do Carmo – POA, pela hospedagem, carinho e orações durante a realização deste trabalho.

À minha família, em especial ao Marco, pela compreensão e carinho mesmo nas ausências.

A todos aqueles que mesmo aqui não citados, colaboraram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância do tema.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Características físico-químicas.....	5
3.2. Aspectos farmacológicos.....	5
3.3. Metodologia analítica de doseamento da carbocisteína.....	6
3.4. Estudo de estabilidade.....	7
3.5. Estabilidade da carbocisteína.....	12
4. CAPÍTULO I. ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA.....	14
4.1 Introdução.....	15
4.2 Materiais.....	15
4.3 Análises.....	15
4.3.1 Identificação.....	15
4.3.1.1 Resultados.....	16
4.3.2 Análise da perda por dessecação.....	17
4.3.2.1 Resultados.....	18
4.3.3 Determinação de impurezas.....	18
4.3.3.1. Cinzas sulfatadas.....	18
4.3.3.2 Sulfatos.....	19
4.3.3.3 Cloretos.....	19
4.3.3.4 Resultados.....	20
4.3.4 Determinação do teor de carbocisteína por volumetria.....	20
4.3.4.1 Resultados.....	21
4.4 Discussão.....	21

5. CAPÍTULO II. ANÁLISE DO PRODUTO CARBOCISTEÍNA XAROPE.....	22
5.1 Introdução.....	23
5.2 Produto farmacêutico.....	23
5.3 Avaliação das características organolépticas.....	23
5.4 Identificação da carbocisteína.....	24
5.4.1 Resultados.....	25
5.5 Determinação do pH.....	27
5.5.1 Resultados.....	27
5.6 Determinação da densidade.....	27
5.6.1 Resultados.....	28
5.7 Determinação de contaminantes microbiológicos.....	28
5.7.1 Teste para fungos.....	28
5.7.1.1 Preparo do meio de cultura – PDA.....	28
5.7.1.2 Ensaio.....	29
5.7.1.3 Resultado.....	29
5.7.2 Teste para bactérias.....	29
5.7.2.1 Preparo do meio de cultura – RICO.....	29
5.7.2.2 Ensaio.....	30
5.7.2.3 Resultado.....	30
5.7.3 Pesquisa de patógenos.....	30
5.7.3.1 Preparo do caldo de enriquecimento.....	30
5.7.3.2 Ensaio.....	30
5.7.3.3 Resultado.....	31
5.8 Determinação do teor de carbocisteína.....	31
5.8.1 Fase móvel.....	32
5.8.2 Equipamento.....	32
5.8.3 Preparo da solução padrão.....	32
5.8.4 Preparo das amostras.....	33
5.8.5 Ensaio.....	33
5.8.6 Cálculo.....	33
5.9 Validação.....	33
5.9.1 Linearidade.....	33
5.9.1.1 Resultados.....	34
5.9.2 Precisão.....	35

5.9.2.1 Resultados.....	36
5.9.3 Exatidão.....	36
5.9.3.1 Resultados.....	37
5.9.4 Limites de Quantificação e Detecção.....	37
5.9.4.1 Resultados.....	37
5.9.5 Robustez.....	38
5.9.5.1 Resultados.....	38
5.9.6 Especificidade.....	40
5.9.6.1 Resultados.....	40
5.10 Discussão.....	42
6. CAPÍTULO III. ESTABILIDADE TÉRMICA.....	45
6.1 Introdução.....	46
6.2 Parte experimental.....	46
6.2.1 Estudo de estabilidade acelerado.....	46
6.2.2 Condições do estudo.....	47
6.2.3 Metodologia analítica.....	47
6.3 Resultados.....	48
6.3.1 Propriedades organolépticas.....	48
6.3.2 Análise microbiológica.....	49
6.3.3 Avaliação do pH.....	49
6.3.4 Determinação do teor de carbocisteína.....	50
6.3.5 Alterações observadas durante o estudo de estabilidade acelerado.....	52
6.4 Determinação da ordem de reação.....	52
6.4.1 Resultados.....	52
6.5 Aplicação da equação de <i>Arrhenius</i>	56
6.5.1 Resultados.....	56
6.5.1.1 Cálculo de ΔE através da constante de degradação a 40 e 60 °C.....	56
6.5.1.2 Cálculo de ΔE através da constante de degradação a 40 e 70 °C.....	56
6.5.1.3 Cálculo de ΔE através da constante de degradação a 60 e 70 °C.....	56
6.5.2 Cálculo da constante de degradação (k_{25}) à temperatura ambiente (25 °C), através da equação de <i>Ahrrenius</i>	57
6.5.2.1 Resultados.....	57

6.6 Prazo de validade.....	58
6.6.1 Resultados.....	58
6.7 Discussão.....	58
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química da carbocisteína.....	5
Figura 2.	Representação gráfica da velocidade da reação: ordem zero.....	8
Figura 3.	Representação gráfica da velocidade da reação: primeira ordem.....	9
Figura 4.	Representação gráfica da velocidade da reação: segunda ordem.....	10
Figura 5.	Rota de síntese da carbocisteína.....	13
Figura 6.	Espectro de absorção padrão da carbocisteína na região do infravermelho.....	17
Figura 7.	Espectro de absorção da carbocisteína (matéria-prima) na região do infravermelho.....	17
Figura 8.	Cromatograma da solução padrão de carbocisteína.....	26
Figura 9.	Cromatograma da solução amostra de carbocisteína.....	26
Figura 10.	Representação gráfica da curva padrão da carbocisteína obtida por CLAE.....	35
Figura 11.	Sobreposição dos cromatogramas da solução padrão e placebo do xarope de carbocisteína.....	41
Figura 12.	Cromatograma do xarope de carbocisteína a 70 °C (21 dias).....	41
Figura 13.	Alteração de cor (da esquerda para a direita): carbocisteína xarope (amostra retém); carbocisteína xarope (mar/04); carbocisteína xarope a 50 °C.....	48
Figura 14.	Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico da concentração x tempo a 40 °C.....	53
Figura 15.	Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do log da concentração x tempo a 40 °C....	53
Figura 16.	Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do inverso da concentração x tempo a 40 °C.....	53
Figura 17.	Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico da concentração x tempo a 60 °C.....	54
Figura 18.	Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do log da concentração x tempo a 60 °C....	54
Figura 19.	Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do inverso da concentração x tempo a 60 °C.....	54

Figura 20.	Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico da concentração x tempo a 70 °C.....	55
Figura 21.	Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do log da concentração x tempo a 70 °C.....	55
Figura 22.	Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do inverso da concentração x tempo a 70 °C.....	55
Figura 23.	Cromatograma do lote 101A de carbocisteína xarope.....	63
Figura 24.	Cromatograma do lote 202 A de carbocisteína xarope.....	63
Figura 25.	Cromatograma da carbocisteína (pico principal) xarope exposta à condições drásticas.....	64
Figura 26.	Cromatograma padrão da L-cistina.....	65
Figura 27.	Cromatograma padrão da L-cisteína.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Freqüências de absorção na região do infravermelho características para carbocisteína e suas respectivas atribuições.....	16
Tabela 2.	Resultados do doseamento por volumetria em meio não aquoso da carbocisteína matéria-prima.....	21
Tabela 3.	Identificação por CLAE da carbocisteína xarope.....	27
Tabela 4.	Áreas dos cromatogramas obtidos para a curva padrão do método cromatográfico proposto para o doseamento da carbocisteína.....	34
Tabela 5.	Análise de variância dos dados determinados para construção da curva padrão de carbocisteína, utilizando método por CLAE em fase reversa com detecção em 240 nm.....	35
Tabela 6.	Valores obtidos no doseamento de carbocisteína pelo método em CLAE de fase reversa com detecção em 240 nm.....	36
Tabela 7.	Avaliação da exatidão do método de doseamento da carbocisteína por CLAE em fase reversa e detecção em 240 nm.....	37
Tabela 8.	Teste de robustez do método de doseamento de carbocisteína por CLAE em fase reversa cujo comprimento de onda UV-VIS de detecção foi alterado.....	38
Tabela 9.	Teste de robustez do método de doseamento de carbocisteína por CLAE em fase reversa cuja concentração da fase móvel foi alterada.....	39
Tabela 10.	Teste de robustez do método de doseamento de carbocisteína por CLAE em fase reversa cujo pH da fase móvel foi alterado.....	39
Tabela 11.	Teste de robustez do método de doseamento de carbocisteína por CLAE em fase reversa cujo fluxo da fase móvel foi alterado	39
Tabela 12.	Teste de robustez do método de doseamento de carbocisteína por CLAE fase reversa onde foram utilizados diferentes lotes de colunas analíticas.....	40
Tabela 13.	Avaliação do pH das amostras de xarope de carbocisteína a 40 °C.....	49
Tabela 14.	Avaliação do pH das amostras de xarope de carbocisteína a 50 °C.....	49
Tabela 15.	Avaliação do pH das amostras de xarope de carbocisteína a 60 °C.....	50
Tabela 16.	Avaliação do pH das amostras de xarope de carbocisteína a 70 °C.....	50

Tabela 17.	Teor de carbocisteína nas amostras a 40 °C.....	51
Tabela 18.	Teor de carbocisteína nas amostras a 50 °C.....	51
Tabela 19.	Teor de carbocisteína nas amostras a 60 °C.....	51
Tabela 20.	Teor de carbocisteína nas amostras a 70 °C.....	52
Tabela 21.	Valores de k' observados nos gráficos do log da concentração <i>versus</i> tempo de cada temperatura avaliada.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

BPFC – Boas Práticas de Fabricação e Controle de Qualidade

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

UV – Ultra Violeta

ICH – International Conference on Harmonisation

USP – United States Pharmacopeia

LQ – Limite de Quantificação

DPR – Desvio Padrão Relativo

RESUMO

Palavras chaves: 1.Carbocisteína, 2.Medicamentos: prazo de validade. 3. Estabilidade de medicamentos.

A carbocisteína é um mucolítico utilizado nos tratamentos sintomáticos das infecções respiratórias, comercializado sem prescrição médica. Cabe ao produtor garantir a qualidade, eficiência e segurança do produto durante o período de validade. A fim de determinar o prazo de validade do produto farmacêutico realizou-se o estudo de estabilidade acelerado, onde através de fatores extrínsecos buscou-se a degradação do fármaco. *Arrhenius* propôs uma equação através da qual é possível determinar a energia de ativação presente em uma reação química e correlacionou a cinética química à temperatura. O prazo de validade do xarope de carbocisteína foi determinado através da aplicação do método de *Arrhenius*. A metodologia de análise do produto foi validada quanto a linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e especificidade. Amostras da preparação farmacêutica foram submetidas à degradação térmica nas temperaturas de 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C. A partir dos resultados analíticos aplicou-se a equação de *Arrhenius* e o método gráfico que determinaram um prazo de validade de 109,28 dias para o produto armazenado em condições ideais de temperatura, a 25 °C.

ABSTRACT

Keywords: 1.Carbocysteine, 2.Medicine: shelf life. 3.Stability of medicines.

Carbocysteine has been currently used as a mucolytic agent in adjunctive therapy of respiratory tract infections. The pharmaceutical industry is responsible for quality, safety and efficiency of the product during its shelf life. Shelf life can be determined through an accelerated stability study where the degradation of the drug is managed with the extrinsic factors.

According to *Arrhenius*, there is a relationship between temperature and chemical kinetic. The shelf life of carbocysteine syrup was determined with the *Arrhenius* method. The syrup assay method has been validated. The linearity, precision, accuracy, detection limit, quantitation limit, selectivity and robustness were evaluated. The samples were exposed to drastic conditions at 40 °C, 50 °C, 60 °C and 70 °C just to accelerate the degradation. The results were analyzed with the *Arrhenius* equation and through the graphical method. The proposed shelf life of carbocysteine syrup was 109.28 days when the dosage form is stored in appropriated conditions, 25 °C.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância do Tema

A Indústria Farmacêutica continua sendo um setor vital no ciclo da assistência a saúde, na pesquisa e na elaboração de produtos que mantenham e restitua a saúde. Na década de 70 presenciou-se uma evolução nos conceitos relacionados com a segurança e controle de qualidade destes produtos (REMINGTON,1987).

De acordo com o prescrito nas normas de Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) para a indústria farmacêutica (ANVISA, 2003¹), o controle de qualidade é responsável pela avaliação de todos os insumos, material de embalagem, produtos em processo e produtos finais. Este departamento também monitora a qualidade da área física e equipamentos no setor produtivo.

Mais do que análises físico-químicas, microbiológicas ou biológicas, este setor monitora a qualidade, segurança e eficácia de todos os medicamentos oferecidos à população. Estas características devem permanecer constantes desde o dia em que o medicamento é produzido até o término do seu prazo de validade. Neste contexto, o estudo de estabilidade torna-se relevante dentro do controle de qualidade de medicamentos.

Nas últimas décadas a avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos tem recebido especial atenção tanto pelos órgãos fiscalizadores quanto pelas empresas produtoras. Os primeiros devido a um fator óbvio, a eficácia e segurança na utilização do medicamento, sob uma ótica fiscalizadora e regulatória; além deste ponto de vista, a questão econômica, pois o custo de um desvio de qualidade é bastante elevado tornando-se ainda mais dispendioso no caso de devolução ou recolhimento do mercado. Já os últimos visando além da eficácia e da segurança, também a qualidade do produto, sob a visão das BPFC. É dever do fabricante assegurar a qualidade do produto o

que implica em conhecimento do mesmo garantido através de criteriosa pesquisa.

A literatura descreve várias maneiras de avaliar a estabilidade de um produto farmacêutico. Considerando os principais fatores responsáveis pela degradação de um produto farmacêutico é possível acelerar esta degradação visando estipular o prazo de validade do produto, ou seja, período de vida útil (NUDELMAN, 1975; LACHMAN, 2001).

Os estudos de estabilidade térmica acelerada baseiam-se na exposição do produto à temperaturas elevadas que aceleram a cinética química responsável pela degradação do produto. Através de equações matemáticas é possível extrapolar os dados obtidos no estudo de estabilidade acelerada para as condições ideais de armazenamento do produto – *shelf life* (tempo de prateleira).

Apesar dos avanços tecnológicos no estudo de estabilidade dos produtos farmacêuticos, a legislação vigente reconhece a avaliação da estabilidade de um produto realizado a $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $90\% \pm 5\%$ de umidade durante 90 dias ou $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade durante 180 dias como indicativos do prazo de validade provisório de um produto (ANVISA, 2002).

O prazo de validade de um produto farmacêutico é determinado a partir da avaliação do estudo de estabilidade acelerada. Com base neste relatório, na ocasião do registro do produto é solicitado o prazo de validade provisório. A validade definitiva é confirmada somente através do estudo de estabilidade de longa duração, onde as amostras são mantidas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $70\% \pm 5\%$ de umidade e analisadas durante o período de validade proposto (ANVISA, 2002).

A carbocisteína é comercializada na forma de xarope e solução oral, sem prescrição médica. Em pesquisa ao banco de dados da ANVISA obteve-se 28 registros deste produto. Seu efeito mucolítico deve-se ao grupo tiólico livre que atua diretamente sobre as mucoproteínas, abrindo as ligações dissulfeto e diminuindo a viscosidade do muco. Também tem a capacidade de aumentar a

síntese da sialomucina, constituinte fundamental do muco brônquico, de que depende a propriedade reológica do mesmo.

A avaliação da estabilidade acelerada da carbocisteína xarope visando à previsão do prazo de validade deste produto vem de encontro à escassez de informações a respeito do mesmo na literatura oficialmente utilizada como referência no Brasil. Através do desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e da aplicação do método de *Arrhenius* determinou-se o prazo de validade do produto carbocisteína na forma farmacêutica xarope.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o prazo de validade da carbocisteína 50 mg/ml xarope através do estudo de estabilidade acelerada e aplicação do método de *Arrhenius*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar e avaliar qualitativamente e quantitativamente a matéria-prima carbocisteína.
- b) Otimizar metodologia analítica em CLAE para o doseamento do xarope contendo carbocisteína.
- c) Validar a metodologia analítica desenvolvida.
- d) Efetuar o estudo de estabilidade acelerado do xarope de carbocisteína 50 mg/ml em quatro temperaturas distintas, coletando as amostras periodicamente e analisando-as conforme metodologia previamente validada.
- e) Estipular o prazo de validade do produto através da aplicação da Equação de *Arrhenius*.
- f) Comparar os resultados obtidos através de *Arrhenius* com a estabilidade acelerada discutida na legislação vigente.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características físico-químicas

Pó cristalino branco, praticamente insolúvel na água, no álcool e no éter. A carbocisteína dissolve-se nas soluções diluídas dos ácidos minerais e dos hidróxidos dos metais alcalinos (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002).

Quimicamente corresponde ao ácido (2-R)-2-amino-3-[(carboximetil)sulfanil] propanóico, $C_5H_9NO_4S$, cuja massa molecular é 179,2 (Figura 1).

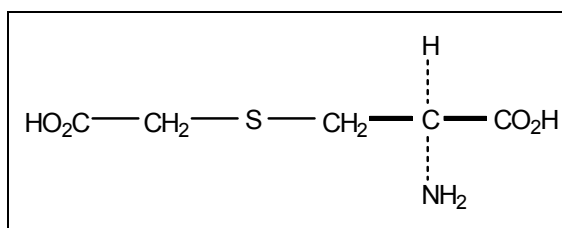


Figura 1. Estrutura Química da Carbocisteína.

3.2 Aspectos farmacológicos

A carbocisteína é indicada como adjuvante no tratamento de bronquites agudas e crônicas, insuficiência respiratória crônica, rinites, sinusites e laringites (KOROLKOVAS, 1999). Devido ao seu efeito fluidizante é utilizada em muitos países nos casos de bronquite em pacientes infantis (CHALUMEAU, 2002).

O efeito mucolítico da carbocisteína deve-se ao grupo tiólico livre que atua diretamente sobre as mucoproteínas abrindo as ligações dissulfeto e diminuindo a viscosidade do muco. Também tem a capacidade de aumentar a síntese da sialomucina, constituinte fundamental do muco brônquico, de que depende a propriedade reológica do mesmo (KOROLKOVAS, 1999).

O fármaco é rápida e completamente absorvido pelo trato gastrointestinal, atingindo efeito máximo em até 2 horas após a administração. A carbocisteína parece distribuir-se bem no tecido pulmonar e no muco respiratório, sugerindo ação local. É metabolizada através da acetilação, descarboxilação e sulfoxidação. É eliminada na forma inalterada e de metabólitos (entre os quais o ácido tioglicólico) pela urina (KOROLKOVAS, 1999).

Em doses altas podem ocorrer gastralgias, náuseas e diarreias. A carbocisteína está contra-indicada nos casos de hipersensibilidade a carbocisteína, à pacientes com úlcera gástrica e a recém-nascidos com menos de 30 dias (KOROLKOVAS, 1999).

3.3 Metodologia analítica de doseamento da carbocisteína

Através de levantamento bibliográfico realizado observou-se o número reduzido de publicações referentes a carbocisteína.

No entanto, segundo a literatura consultada, a carbocisteína presente em preparações farmacêuticas pode ser quantificada por volumetria de neutralização, através da simples dissolução da amostra em hidróxido de sódio 0,1N e posterior titulação com ácido clorídrico 0,1 M utilizando vermelho de metila como indicador. Análise da amostra sem carbocisteína (branco) é efetuada paralelamente. Neste ensaio, cada ml de ácido clorídrico 0,1 M equivale a 17,92 mg de carbocisteína. A volumetria de neutralização em meio não-aquoso também constitui uma alternativa de quantificação através da dissolução da amostra em ácido fórmico e posterior titulação com ácido perclórico e *oracet blue* como indicador, onde cada ml de ácido perclórico é equivalente a 17,92 mg de carbocisteína (SETHI, 1997).

A carbocisteína pode ser determinada por espectrofotometria no UV-VIS através da reação do grupamento sulfidril com p-benzoquinona cujo produto é detectável em 352 e 500 nm. Este método é simples, sensível e seletivo, não sofrendo interferências de aminoácidos, uréia, sais e excipientes presentes em formulações farmacêuticas (ZAIA, 1999).

A determinação de mucolíticos como n-acetilcisteína, carbocisteína e metilcisteína pode ser realizada através de CLAE, utilizando-se como fase móvel ácido hexano-sulfonato de sódio 5 mM (pH 2,9), acetonitrila e metanol (98,6:0,8:0,6), com detecção em 220 nm, coluna μ Bondapak ODS (30 cm X 3,9 mm I.D.; 10 μ m; Waters), injeções de 10 μ l, fluxo de 1 ml/min nas concentrações de 0,05 a 3,0 mg/ml. Através destas condições analíticas a carbocisteína apresentou um tempo de retenção entre 4 e 5 minutos. Este método apresentou-se linear com o $r= 0,9999$, exatidão superior a 98,2% e DPR menor que 1%. (TSAI, 1995).

Tratando-se de metodologia para doseamento deste fármaco em preparações farmacêuticas, Suntornsuk descreve método por CLAE, utilizando acetonitrila e tampão de fosfato monobásico de sódio, pH 2,0 (1:99 v/v), coluna Inersil ODS-3V C18 (250 X 4,6 mm 5 μ m) e detecção em 240 nm. As amostras foram preparadas nas concentrações entre 0,8 a 25,6 mg/ml. Este método apresentou-se linear, preciso e exato (SUNTORNUSUK, 2001).

Ainda por CLAE foi descrito método cuja fase móvel era constituída por tampão de fosfato monobásico de potássio 0,01M e acetonitrila (75:25), coluna Spherisorb NH₂ (150 x 4 mm, 5 μ m) e detecção por espectrofotometria no UV em 220 nm. Através deste método a carbocisteína apresentava tempo de retenção de 6 minutos. Foi avaliado também a presença de dois contaminantes oriundos da degradação térmica deste produto. Os mesmos foram evidenciados no cromatograma apresentando tempos de retenção inferiores a carbocisteína (MELUCCI, 1987).

3.4 Estudo de estabilidade

Através da aplicação de alguns princípios físico-químicos é possível extrapolar os resultados obtidos a partir de condições de armazenamento exageradamente drásticas na intenção de prever a estabilidade por períodos prolongados em condições ideais de armazenamento (LACHMAN, 2001).

A degradação de medicamentos é provocada por reações de natureza química com velocidades definidas, dependentes da concentração de reagentes, da temperatura, do pH, da radiação ou da presença de catalizadores. Desta forma, a cinética química deve ser considerada a fim de que o estudo seja efetivo e eficiente (NUDELMAN, 1975; LACHMAN, 2001).

Através da determinação da ordem da reação é possível verificar a variação da velocidade da reação em função da concentração dos reagentes. Desta forma, na sua maioria, as reações de degradação dos produtos farmacêuticos ocorrem de acordo com reações de ordem zero, primeira ordem ou de pseudoprimera ordem (NUDELMAN, 1975; LACHMAN, 2001).

Reações de ordem zero são aquelas onde a velocidade de reação é independente da concentração da substância reativa e sim de um outro fator como solubilidade ou absorção da luz em reações de fotossensibilidade. Em estudos de estabilidade nos quais a reação de degradação é de ordem zero, o gráfico da concentração "C" em função do tempo "t" é uma reta com inclinação igual a "k" (Figura 2). O valor de "k" corresponde a concentração do fármaco em função do tempo e o intercepto da reta para "t" igual a zero é igual à constante na equação (NUDELMAN, 1975; LACHMAN, 2001).

Equação correspondente à velocidade de reação de ordem zero assim como sua derivada estão representadas a seguir:

$$C = C_0 - k.t \rightarrow k = (C_0 - C) / t$$

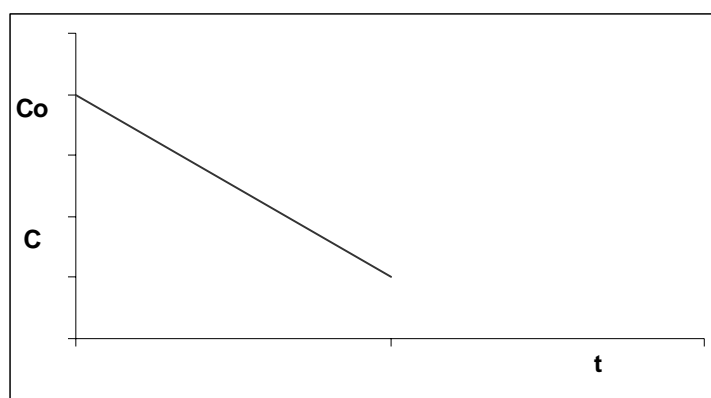


Figura 2. Representação gráfica da velocidade da reação: ordem zero.

Reações de primeira ordem são as aquelas em que as velocidades de reação são diretamente proporcionais à concentração do reagente, onde o produto decompõe-se em um ou mais produtos. As reações de primeira ordem podem ser representadas pelo gráfico do logaritmo da concentração “log C” em função do tempo “t” (Figura 3). Através da aplicação da equação a representação gráfica pode ser linearizada (NUDELMAN, 1975; LACHMAN, 2001).

A equação correspondente a velocidade de reação de primeira ordem e sua derivada estão representadas a seguir:

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \rightarrow k = \log C/C_0 (2,303/ t)$$

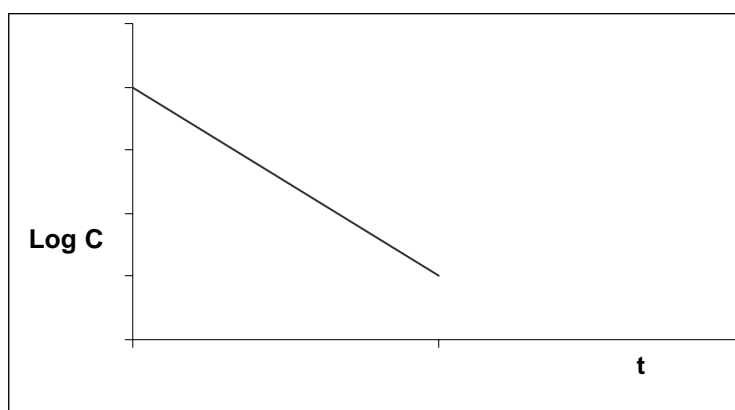


Figura 3. Representação gráfica da velocidade da reação: primeira ordem

Reações de segunda ordem são aquelas em que a velocidade da reação é proporcional à concentração de dois reagentes, ou à segunda potência da concentração de um deles (Figura 4).

A equação correspondente a velocidade de reação de segunda ordem e sua derivada estão representadas a seguir:

$$1/C = 1/C_0 + k \cdot t \rightarrow k = 1/t (1/C - 1/C_0)$$

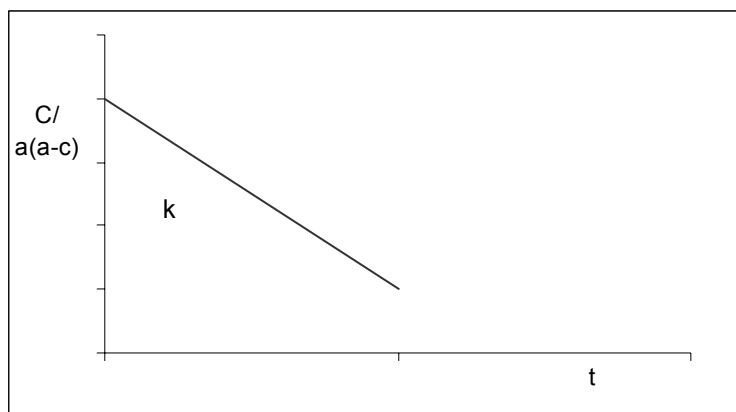


Figura 4. Representação gráfica da velocidade da reação: segunda ordem, onde “a” corresponde à concentração inicial e “c” a concentração após tempo t.

Esta ordem de reação não é comum em produtos farmacêuticos, no entanto, são estudadas em função das reações de pseudo primeira ordem.

Reações de pseudo primeira ordem são aquelas reações de segunda ordem (dependente da concentração de dois reagentes) que aparentam ser de primeira ordem. Em casos onde um reagente encontra-se em excesso ou é mantido em concentração constante, a velocidade de reação é determinada em função de um dos reagentes, já que o segundo reagente não provoca alteração significativa na concentração do primeiro. Como exemplo deste tipo de cinética de reação pode-se citar a hidrólise de um éster (NUDELMAN, 1975; LACHMAN, 2001).

Em situações como soluções saturadas onde a concentração dos reagentes permanece constante enquanto houver excesso de reagente não solubilizado tem-se uma reação de pseudo ordem zero. Reações de pseudo ordem zero ocorrem quando em uma suspensão a decomposição da parte solubilizada não é controlada através da difusão (KEDOR-HACKMANN, 1998).

A temperatura encontra-se intimamente ligada a velocidade de reação. A elevação da temperatura acelera a maioria das reações de degradação dos produtos farmacêuticos. Desta forma, através de estudos de estabilidade acelerada em temperaturas elevadas é possível verificar a degradação de fármacos e prever a validade de prateleira dos produtos (NUDELMAN, 1975).

A literatura descreve vários métodos para o estudo de estabilidade acelerada, como por exemplo, o método empírico, método de *Tootill*, método das tabelas de estabilidade, método do coeficiente de temperatura e o método de *Arrhenius* (NUDELMAN, 1975).

O método de *Arrhenius* relaciona a temperatura com a cinética da reação. O prazo de validade de um produto pode ser determinado através do estudo da cinética química observada em três temperaturas e extrapolação a condição ambiente ideal, ou seja, 25 °C. Os valores relativos a energia de ativação são obtidos através da Equação de *Arrhenius* (NUDELMAN, 1975).

Para garantir a eficiência da aplicação deste método é importante a correta avaliação da ordem da reação, o correto monitoramento das temperaturas utilizadas no estudo, além da degradação mínima de 50% do fármaco (NUDELMAN, 1975).

Existem ainda situações em que estatisticamente o método de *Arrhenius* poderá não ser válido em função principalmente de erros experimentais como a avaliação imprecisa do teor do fármaco e determinações incorretas das constantes de degradação, k (SOME, 1999). Por outro lado, podem ocorrer casos em que estatisticamente o método de *Arrhenius* é perfeitamente aplicável, mas a avaliação da estabilidade não corresponde a realidade. No caso da avaliação da estabilidade do fármaco *mitonafide* o método de *Arrhenius* aplica-se perfeitamente na forma farmacêutica líquida, porém, o mesmo não ocorre na forma farmacêutica sólida. Existem situações em que o mecanismo de degradação se altera a partir de uma determinada temperatura, conhecida como temperatura crítica. No caso do *mitonafide*, na forma farmacêutica sólida, a temperatura crítica é 80 °C. Em temperaturas superiores o método de *Arrhenius* não é aplicável. Este mesmo fenômeno é observado no estudo de estabilidade da fenilbutazona comprimido (GIL-ALEGRE, 2001).

Existem pelo menos três situações em que a aplicação do método de *Arrhenius* pode ser incorreta: evaporação do solvente, baixa umidade e conseqüente baixa solubilidade de oxigênio no ar (afetando a estabilidade de

fármacos sensíveis a umidade ou oxigênio) e em sistemas dispersos onde a viscosidade é reduzida a medida que a temperatura aumenta (LACHMAN, 2001).

3.5 Estabilidade da carbocisteína

Mesmo apresentando diferentes rotas de síntese, a carbocisteína tem sua origem no aminoácido cisteína que sofre oxidação originando a cistina, que após reações catalizadas por zinco em meio ácido ou alcalino e reação com ácido monocloroacético resulta na carbocisteína (Figura 5). Desta forma, as reações de oxidação são importantes, pois podem estar relacionadas às reações de degradação deste composto. Além da oxidação, a cisteína é suscetível a outros processos de degradação como reações de β -eliminação e de racemização (UCKO, 1992).

Em relação à oxidação, a cisteína contém grupamentos tiólicos (grupos sulfidríla) que podem ser oxidados formando dissulfetos (pontes dissulfeto). Estes compostos naturalmente sofrem ligação cruzada e ligam-se covalentemente a proteínas ou cadeias polipeptídicas intra e intermolecularmente. Dissulfetos podem ser formados pela oxidação direta da cisteína (2 cisteínas formam a cistina), pelas reações tiólico-dissulfeto ou ainda catalizadas por traços de cobre e ferro. A estabilidade relativa da cisteína reduzida depende do potencial redox. A alteração do pH para o caráter ácido reduz a reatividade oxidativa dos grupamentos tiólicos. Aquecimento e pH alcalino provocam a destruição dos grupamentos dissulfeto. Por exemplo, em pH 9 e a 50 °C, forma-se um composto atípico “cross-linked” em hirudina, resultando em uma molécula de menor atividade. (CARSTENSEN e RHODES, 2000; UCKO, 1992).

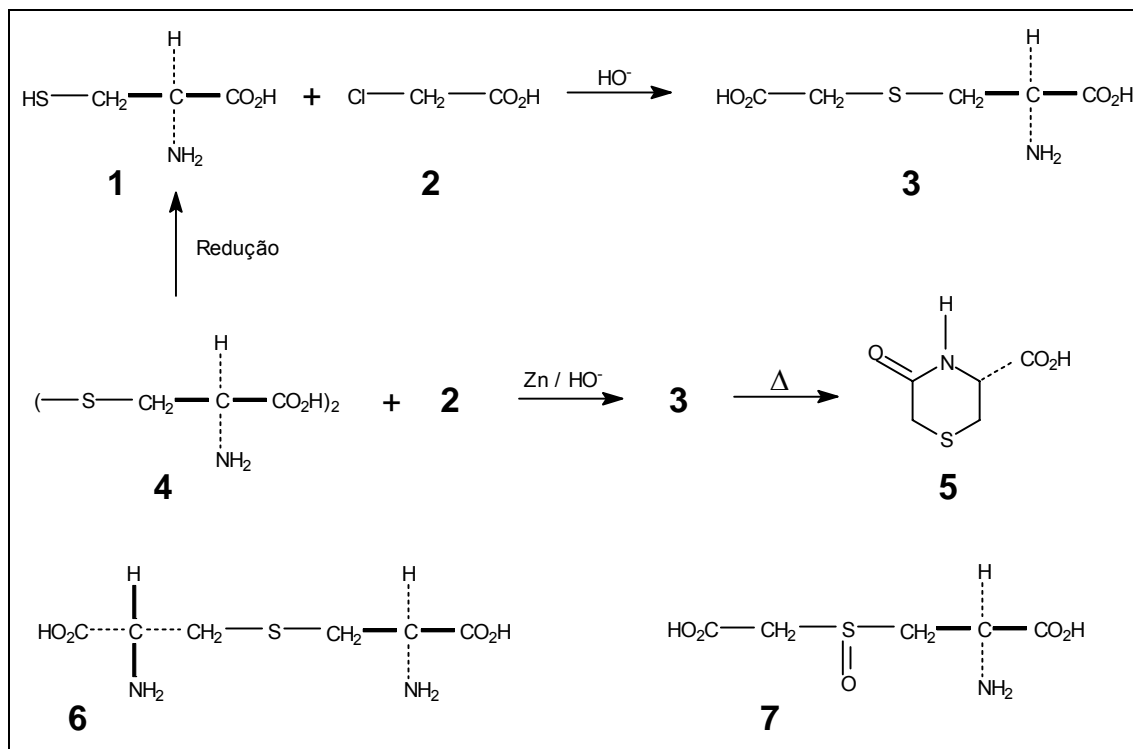


Figura 5. Rota de síntese da carbocisteína, onde 1- L-cisteína, 2- ácido cloroacético, 3-carbocisteína, 4- L-cistina, 5- Ácido tiomorfolínico 6- lantionina e 7 – sulfóxido de carbocisteína (HARTKE, 1996).

Em estudos de fotodegradação, a radiação ionizante e não ionizante pode causar a inativação da cisteína. Esta é particularmente suscetível a radiação não ionizante, como luz UV. Normalmente observa-se os produtos de fotodegradação em presença de oxigênio, pH neutro, soluções aquosas ou ainda na ruptura da ligação dissulfeto. Na carbocisteína a ligação S-S não é observada, logo, acredita-se que a molécula apresenta melhor estabilidade frente a fotodegradação da cisteína (CARSTENSEN e RHODES, 2000).

A carbocisteína apresenta melhor estabilidade em solução cujo pH esteja entre seis e sete. Como prováveis produtos de degradação foram caracterizados o ácido tiomorfolínico, a alanina e a lantionina (HARTKE, 1996).

4.1 Introdução

A indicação de um medicamento em um determinado tratamento é conseqüência da sua eficácia correlacionada com sua inocuidade e da sua conformidade com suas especificações de identidade, atividade e pureza (KOROLKOVAS, 1988). O controle de qualidade da matéria-prima, das embalagens, do produto semi-elaborado e do produto final normalmente utiliza especificações e metodologias descritas nos códigos oficiais. Neste estudo, a metodologia analítica relativa à matéria-prima é baseada na literatura. A metodologia analítica e especificações da especialidade farmacêutica estão baseados em publicações científicas, características físico-químicas do fármaco e métodos gerais descritos nos códigos oficiais.

4.2 Materiais

- Substância química de referência (SQR)

Carbocisteína (padrão primário – Farmacopéia Européia), lote 1a e validade indeterminada, foi cedido pela Indústria Farmacêutica Prati, Donaduzzi & Cia Ltda, para realização deste estudo.

- Matéria-prima: carbocisteína

A matéria-prima carbocisteína é de procedência espanhola, do laboratório Moehs Produtos Químicos. Foi utilizado o lote 1927, fabricado em abril de 2003, cuja validade é de abril de 2008.

4.3 Análises

4.3.1 Identificação

A identificação da matéria-prima carbocisteína foi realizada conforme descrito na Farmacopéia Européia. Foi realizada a identificação por espectrofotometria na região do infravermelho. O espectro de absorção na

região do infravermelho foi obtido em espectrofotômetro FTIR SHIMADZU, modelo 8001.

Em um gral de ágata foi realizada a mistura de 200 mg de brometo de potássio (dessecado a 105 °C, por duas horas) e 2,0 mg de Carbocisteína (o lote 1927). Esta mistura foi transferida para um molde especial e prensada até formar um disco transparente.

4.3.1.1 Resultados

As atribuições das frequências principais características da carbocisteína estão apresentadas na Tabela 1.

O espectro de absorção do padrão da carbocisteína na região do infravermelho descrito na literatura bem como o espectro da matéria prima estão apresentados nas Figuras 6 e 7 respectivamente.

Tabela 1. Frequências de absorção na região do infravermelho características para carbocisteína e suas respectivas atribuições.

Grupos funcionais	Frequências (cm ⁻¹)
COO ⁻	Banda de estiramento assimétrico em 1410
CO	Banda correspondente à carbonila em 1710
⁺ NH ₃	Banda assimétrica oriunda do estiramento da ligação C-NH ₃ de amina primária 3200-2800

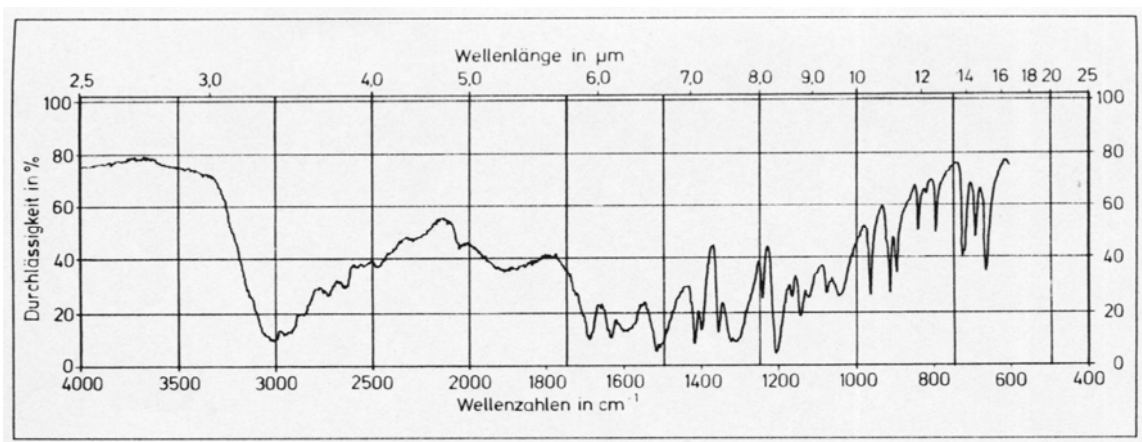


Figura 6. Espectro de absorção padrão da carbocisteína na região do infravermelho (HARTKE, 1996).

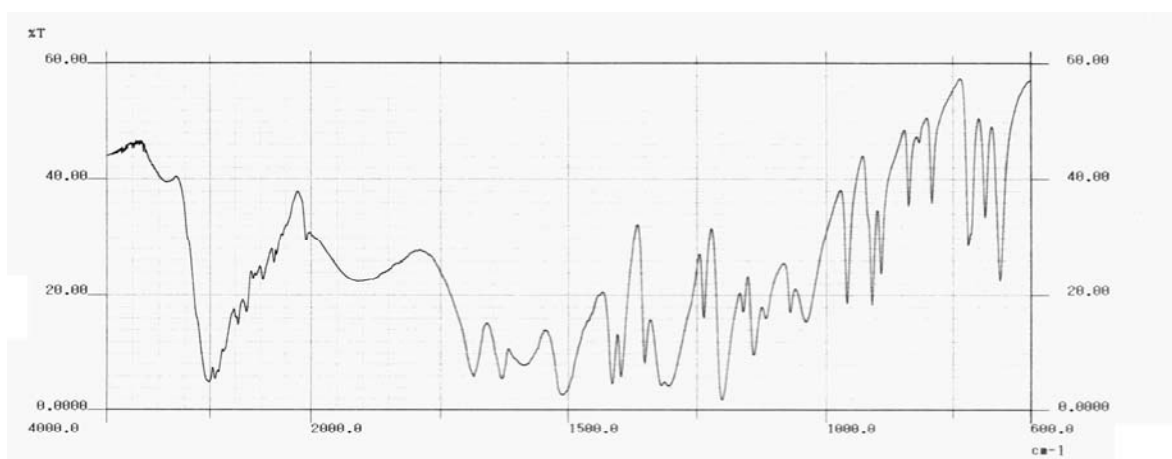


Figura 7. Espectro de absorção da carbocisteína (matéria-prima) na região do infravermelho.

4.3.2 Análise da perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação corresponde ao teor de umidade presente na amostra. Esta avaliação é importante para determinar o valor real de fármaco presente na matéria prima.

A perda por dessecação foi determinada através de balança analítica com aquecimento através de infravermelho a 110°C. De acordo com a especificação oficial, não deve ser superior a 0,5% (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002)

A carbocisteína foi analisada em triplicata. Amostras de 1 g de carbocisteína matéria-prima foram transferidas para a balança com infravermelho e analisadas sob a temperatura de 110 °C durante dez minutos. Após análise foi determinada a perda por dessecação.

4.3.2.1 Resultados

O lote analisado de carbocisteína matéria-prima apresentou 0,4 % de umidade conforme método apresentado no item anterior relativo à perda por dessecação.

4.3.3 Determinação de impurezas

A determinação de impurezas é considerada um ensaio-limite qualitativo que visa verificar a presença ou ausência de impurezas específicas na matéria-prima. Neste tipo de procedimento analítico devem-se controlar certos aspectos que podem interferir na precisão dos resultados: especificidade do ensaio, sensibilidade do mesmo e imperícia do analista (KOROLKOVAS, 1988).

4.3.3.1 Cinzas sulfatadas

A presença de cinzas sulfúricas foi determinada em 1,0 g de amostra exatamente pesada. A amostra foi transferida para o cadinho tarado e a esta foi adicionado 2 ml de ácido sulfúrico diluído R. A amostra foi aquecida primeiramente em banho-maria e depois em uma mufla a 600 °C até o desaparecimento das partículas negras. A amostra foi retirada da mufla e após arrefecimento, foi adicionado algumas gotas de ácido sulfúrico diluído R. Repetiu-se o processo de incineração. Após dois minutos, a amostra foi retirada da mufla e após arrefecimento foi adicionado a esta algumas gotas de

solução de carbonato de amônio R. Este último foi evaporado através de uma banho-maria e a amostra foi incinerada novamente. Após dois minutos, a amostra foi retirada da mufla, arrefecida e pesada. Este último procedimento foi repetido até a obtenção de peso constante da amostra (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002).

4.3.3.2 Sulfatos

A contaminação por sulfatos foi avaliada através da análise de 0,5 g da amostra. A amostra foi dissolvida em 5 ml de ácido clorídrico e diluída para 15 ml com água. Foi preparada uma solução contendo 10 ppm de sulfato (SO_4^-) R1. A 1,5 ml desta solução adicionou-se 1 ml da solução de cloreto de bário R a 250 g/l. Esta solução foi agitada e deixada em repouso por 1 minuto. Adicionou-se posteriormente 15 ml da solução amostra e 0,5 ml de ácido acético R. A solução padrão foi preparada nas mesmas condições utilizando-se 1,5 ml de solução a 10 ppm de sulfato (SO_4) R em vez da solução amostra. Após 5 minutos, foi observada a opalescência das soluções. A solução amostra deve apresentar opalescência inferior a da solução padrão (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002).

4.3.3.3 Cloretos

A presença de cloretos foi avaliada a partir de 33 mg de amostra dissolvida em 5 ml de ácido nítrico diluído e diluída com água para o volume de 15 ml (solução I). A 15 ml da solução I foi adicionado 1 ml de ácido nítrico diluído. Esta solução foi transferida para um tubo de ensaio contendo 1 ml de solução de nitrato de prata R2. Foi preparado um solução padrão nas mesmas condições utilizando-se uma mistura de 10 ml de solução a 5 ppm de cloreto (Cl^-)R e 5 ml de água destilada. Os tubos contendo as soluções foram observados contra um fundo escuro (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002).

4.3.3.4 Resultados

Segundo a Farmacopéia Européia (2002), a matéria-prima carbocisteína não deve apresentar mais do que 0,3% de cinzas sulfúricas, 0,15% de cloretos e 0,03 % de sulfatos. O lote analisado quanto à presença de cinzas sulfúricas, cloretos e sulfatos apresentou-se dentro dos limites especificados para esta matéria-prima.

4.3.4 Determinação do teor de carbocisteína por volumetria

O doseamento da carbocisteína pode ser efetuado através de volumetria em meio não aquoso. A Farmacopéia Européia (2002) descreve metodologia analítica que correlaciona o volume de ácido perclórico com a quantidade de carbocisteína presente na amostra, determinando o ponto final por potenciometria. O teor de carbocisteína presente na amostra deve estar compreendido entre 98,5 % e 101,0 %.

Este método foi modificado visando substituir a detecção do ponto final da titulação por potenciometria pela utilização de um indicador. Esta alteração foi comprovada através da comparação dos resultados analíticos obtidos a partir da análise de amostras de SQR de carbocisteína de teor conhecido. Os resultados obtidos foram avaliados quanto à precisão e exatidão comprovando-se que a alteração do indicador não alterou a eficiência do método.

Cerca de 0,150 g da amostra previamente dessecada a 105 °C por 2 horas, foram dissolvidos em 10 ml de ácido fórmico anidro R com leve aquecimento e agitado até completa dissolução. À amostra foi adicionado 50 ml de ácido acético anidro R e 6 gotas do indicador *oracet blue* B. A amostra foi titulada com ácido perclórico 0,1 N até a viragem do azul para o rosa claro. Foi preparado um branco da mesma maneira. Cada ml de ácido perclórico 0,1 N corresponde a 17,92 mg de carbocisteína em relação a substância anidra. O teor da amostra foi calculado através da equação:

$$C = (V - V_b) \times 1792 \times F_c / M \text{ (mg)}$$

Onde C: concentração da amostra; V: volume de titulante consumido na titulação da amostra; Vb: volume do titulante consumido na titulação do branco; Fc: fator de correção; M: massa da amostra em mg.

4.3.4.1 Resultados

A matéria-prima de carbocisteína foi analisada em triplicata e os valores relativos à percentagem de carbocisteína presentes na amostra encontram-se dentro do especificado pela Farmacopéia Européia (2002) conforme Tabela 2.

Tabela 2. Resultados do doseamento por volumetria em meio não aquoso da carbocisteína matéria-prima.

Amostras	Concentração (%)	Média (%)	CV%
1	99,65	99,84	0,34
2	100,23		
3	99,64		

4.4 Discussão

A análise da carbocisteína matéria-prima foi realizada conforme metodologia analítica descrita na Farmacopéia Européia (2002). Os resultados descritos nos itens 4.3.1.1, 4.3.2.1, 4.3.3.4 e 4.3.4.1 indicam que o lote de matéria-prima escolhida apresenta qualidade satisfatória para a sua utilização no preparo do xarope a ser utilizado no estudo de estabilidade, visto que os valores obtidos estão de acordo com as especificações farmacopéicas.

O procedimento analítico relativo ao doseamento sofreu adaptação quanto à detecção do ponto de viragem da titulação no sentido de facilitar a visualização do ponto final da reação e determinar de forma precisa a análise quantitativa do fármaco.

5.1 Introdução

Durante a pesquisa bibliográfica realizada foram encontradas poucas publicações referentes à carbocisteína na forma farmacêutica xarope, o que somado a inexistência da monografia deste produto nos compêndios oficiais, justifica a importância do desenvolvimento de metodologia analítica para esta especialidade farmacêutica.

Neste capítulo será apresentada metodologia analítica para o controle de qualidade deste produto, na qual para a determinação do teor optou-se por desenvolver um método por CLAE visando principalmente a posterior realização do estudo de estabilidade acelerada.

Ainda neste capítulo será apresentada a validação do método de determinação do teor de carbocisteína em xarope por CLAE, incluindo a análise estatística dos resultados obtidos.

5.2 Produto farmacêutico

Carbocisteína 50 mg/ml xarope adulto foi acondicionado em frascos de 100 ml de vidro âmbar lacrados com tampas VIC 23.

Cada ml contém:

Carbocisteína.....50 mg

Excipientes: sacarina sódica, ácido cítrico, metilparabeno, hidróxido de sódio, ciclamato de sódio, glicerina, álcool etílico, essência de canela, essência de rum, corante caramelo e água deionizada.

5.3 Avaliação das características organolépticas

A avaliação das características organolépticas do produto constitui um importante indício da qualidade do mesmo. Alterações de cor estão relacionadas a alterações de pH, desvio de qualidade durante o processo produtivo e inclusive degradação do fármaco.

Alterações no odor ou sabor podem ser provocadas por contaminação microbiológica ou reações de degradação.

O xarope de carbocisteína é um líquido límpido de coloração levemente acastanhada, sabor adocicado e odor característico de rum.

5.4 Identificação da carbocisteína

A identificação do fármaco presente na formulação farmacêutica é de suma importância no controle de qualidade do produto final. Normalmente estes procedimentos baseiam-se na identificação de funções químicas ou determinados grupos químicos presentes no fármaco, resultando em precipitações, desprendimento de gás, reações coloridas ou desaparecimento de cor (KOROLKOVAS, 1988).

- Identificação por formação de composto corado

A amostra foi dissolvida em solução diluída de hidróxido de sódio, adicionada de nitroprussiato de sódio 25 g/l, desenvolveu-se a coloração vermelha que se torna castanho em minutos (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002).

- Identificação por CLAE

Através da comparação do tempo de retenção do pico principal observado no cromatograma da solução padrão e da solução amostra, respeitadas as mesmas condições analíticas, é possível efetuar a identificação da amostra. As condições cromatográficas foram as mesmas descritas Suntornsuk (2001).

Equipamento:

Shimadzu HPLC 10 AD VP, bomba LC-10ATVP, degaseificador DGU-14A, injetor automático SIL-10AF, detector SPD-10AVP UV e sistema de registro SCL 10 AVP.

Coluna cromatográfica: Coluna de fase reversa octadecilsilano C18 – Chromolith Performance RP 18-e (100 x 4,6 mm, 5 µm) – MERCK®.

Fluxo: 1,5 ml/min

Detecção: 240 nm

Condições Analíticas:

Fase móvel: Acetonitrila e solução tampão fosfato monobásico de sódio 10 mM (1:99).

Solução padrão: foram dissolvidas 50 mg de carbocisteína padrão, exatamente pesadas, em 1 ml da solução de NaOH 1N, em balão volumétrico de 25 ml, o volume foi completado com fase móvel, a fim de obter uma solução de concentração 2 mg/ml.

Solução amostra: Alíquota de 1ml do xarope foi transferida (equivalente a 50 mg de carbocisteína) para um balão volumétrico de 25 ml, cujo volume foi completo com fase móvel. O cromatograma da amostra foi comparado com o obtido para a solução padrão.

5.4.1 Resultados

Na identificação por método qualitativo foram preparadas três amostras e realizado procedimento conforme descrito no item 5.4. Nas três amostras observou-se a formação da coloração vermelha que em minutos tornou-se castanha (reação com nitroprussiato de sódio).

Na identificação por CLAE foram comparados os tempos de retenção de uma solução padrão (Figura 8) e três amostras de xarope de carbocisteína (Figura 9).

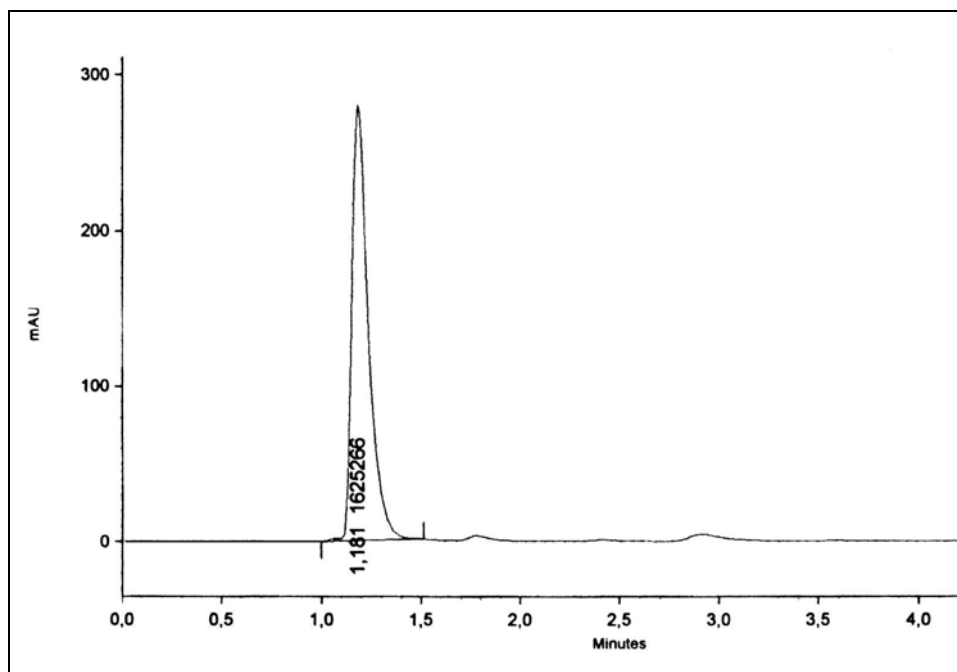


Figura 8. Cromatograma da solução padrão de carbocisteína. Fase móvel ACN:Tampão Fosfato de sódio 10 mM (1:99), detecção em 240 nm, fluxo 1,5 ml/min, coluna C 18 – Chromolith Performance RP 18e (100 x 4,6mm, 5 µm).

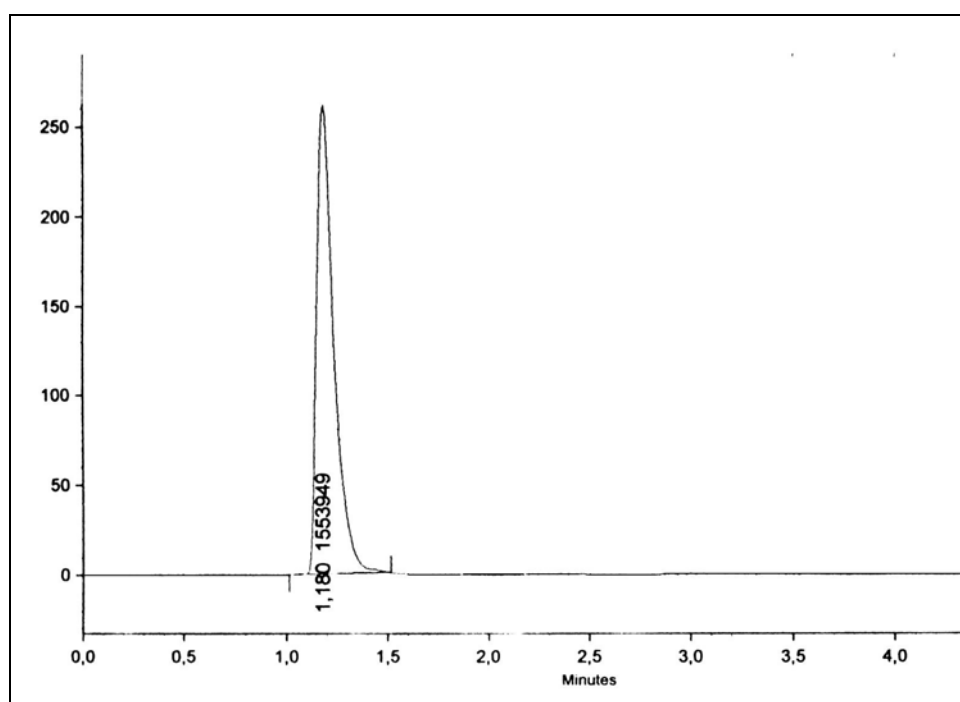


Figura 9. Cromatograma da solução amostra de carbocisteína. Fase móvel ACN:Tampão Fosfato de sódio 10 mM (1:99), detecção em 240 nm, fluxo 1,5 ml/min, coluna C 18 – Chromolith Performance RP 18e (100 x 4,6mm, 5 µm).

Na Tabela 3 encontram-se descritos os respectivos tempos de retenção.

Tabela 3. Identificação por CLAE da carbocisteína xarope.

Amostra	Tempo de retenção (min)	Média	DPR
1	1,21		
2	1,21	1,21	0,21
3	1,21		

5.5 Determinação do pH

O pH da carbocisteína xarope foi avaliado através do método potenciométrico, baseado na mudança do potencial de uma célula galvânica (KOROLKOVAS, 1988).

O eletrodo do potenciômetro foi previamente aferido com uma solução padrão de pH igual a 4,0 e outra de pH igual a 7. (F. BRAS. IV, 1988). Cerca de 10 ml da amostra foram transferidas para um béquer de 50 ml. A amostra foi analisada em triplicata.

5.5.1 Resultados

As amostras de carbocisteína xarope apresentaram um valor médio de pH de 5,63.

5.6 Determinação da densidade

A densidade relativa foi determinada conforme metodologia analítica descrita na F. BRAS. IV, 1988. Na determinação da densidade foi utilizado um picnômetro de 5 ml previamente calibrado. A densidade relativa é dada pela equação seguinte:

$$d = \frac{\text{Peso do picnômetro cheio} - \text{peso do picnômetro vazio}}{x}$$

x

Onde d: densidade e x: massa de água.

5.6.1 Resultados

Variações observadas na densidade relativa de um produto líquido podem indicar alterações no processo produtivo. A densidade também é utilizada na determinação do volume de envase, onde através da equação:

$$d = m / v$$

Onde d: densidade relativa, m: massa de líquido contida no frasco e v: volume de líquido acondicionado no frasco (F. BRAS.IV, 1988).

O lote experimental de carbocisteína xarope apresentou a densidade média de 1,07 g/ml. O volume de envase foi determinado através do método descrito na F. BRAS. IV (1988).

Conforme a F. BRAS.IV, 1998, a faixa de variação permitida para volumes de 100 ml é de 98,5 a 101,5 ml. O volume médio obtido apresentou variação de 0,5 ml, dentro da faixa de variação especificada pela Farmacopéia.

5.7 Determinação de contaminantes microbiológicos

O produto acabado sofre análise microbiológica para determinar a quantidade de microrganismos viáveis totais e verificar a ausência de patógenos. Este procedimento está baseado no “Método de contagem em placa” descrito na metodologia para “Contagem de microrganismos viáveis em produtos que não necessitam cumprir os testes de esterilidade”, da F. BRAS. IV (1988). A pesquisa de patógenos baseia-se no “Método geral para pesquisa de patógenos” descrito no mesmo compêndio oficial. O limite máximo permitido para bactérias e para fungos é de 100 UFC/ml.

5.7.1 Teste para fungos

5.7.1.1 Preparo do meio de cultura – PDA (ágar batata dextrosado)

Foram diluídos 39,0 g de Agar Batata Dextrosado em água para 1000 ml. O meio foi aquecido em microondas até a completa dissolução. O meio

líquido foi transferido para um erlenmeyer de 250 ml, com tampão de algodão e papel alumínio. A esterilização foi realizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos. No momento do uso, o meio de cultura foi fundido em microondas e mantido em banho maria a 45 °C ± 2 °C.

5.7.1.2 Ensaio

As amostras foram diluídas em tampão fosfato pH 7,2 contendo 1% de polissorbatato 80, utilizado para neutralizar o conservante presente na formulação. As alíquotas foram transferidas para placas de Petri. Em seguida, a amostra foi homogeneizada no meio de cultura, movimentando as placas em forma de oito. As placas foram incubadas a 28 °C por cinco dias. As amostras foram analisadas em triplicata (F. BRAS.IV, 1988).

5.7.1.3 Resultado

As amostras foram observadas no intervalo de três e cinco dias de incubação. Não foi observado o crescimento microbiológico nas placas analisadas.

5.7.2 Teste para bactérias

5.7.2.1 Preparo do meio de cultura - RICO

Foram dissolvidos 6,0 g de peptona, 3,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de glicose e 12,0 g de ágar em água q.s.p. 1000 ml. Para facilitar a dissolução utilizou-se o microondas. O meio líquido foi transferido para erlenmeyers de 250 ml, com tampão de algodão e papel alumínio e esterilizados a 121 °C por 15 minutos em autoclave. No momento do uso, o meio de cultura foi fundido em microondas e mantido em banho maria a 45 °C ± 2 °C.

5.7.2.2 Ensaio

As amostras foram diluídas em tampão fosfato pH 7,2 contendo 1% de polissorbato 80, utilizado para neutralizar o conservante presente na formulação. As alíquotas foram transferidas para placas de Petri. Em seguida, a amostra foi homogeneizada no meio de cultura, movimentando as placas em forma de oito. As placas foram incubadas a 35 °C por 2 dias. As amostras foram analisadas em triplicata (F. BRAS.IV, 1988).

5.7.2.3 Resultado

As amostras foram observadas no intervalo de 24 e 48 horas de incubação. Não foi observado o crescimento microbiológico nas placas analisadas.

5.7.3 Pesquisa de patógenos

5.7.3.1 Preparo do caldo de enriquecimento – Caldo Rico

Foram dissolvidos 6,0 g de peptona, 3,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de glicose em água q.s.p. 1000 ml. Em microondas foram aquecidos até completa dissolução. Em tubos de ensaio foram dispersos 5 ml de caldo. Os tubos contendo tampa de algodão e papel alumínio foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos em autoclave. Posteriormente foram armazenados em geladeira até momento do uso.

5.7.3.2 Ensaio

Amostras preparadas conforme item 5.7.2.2 foram transferidas para tubos de ensaio contendo caldo rico. Em seguida foram incubadas a 35-37 °C durante 24-48 horas. As amostras foram analisadas em triplicata.

5.7.3.3 Resultados

As amostras observadas no intervalo de 24 e 48 horas de incubação não apresentaram crescimento microbiológico. Desta forma, não foi realizado o repique nos meios seletivos para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e *Escherichia coli*.

5.8 Determinação do teor de carbocisteína

A metodologia analítica empregada no doseamento dos fármacos normalmente baseia-se em reações químicas características de determinados grupos funcionais, íons ou radicais. No entanto, é importante verificar se os demais constituintes da formulação não causam interferência nestas reações (KOROLKOVAS, 1988).

É importante destacar que a metodologia analítica a ser desenvolvida para o doseamento da carbocisteína em xarope poderá ser utilizada no controle de qualidade do mesmo, mas principalmente, no estudo de estabilidade.

Desta forma, optou-se pelo desenvolvimento de metodologia analítica em CLAE, devido a precisão, sensibilidade e principalmente pela possibilidade de separação de excipientes e produtos de degradação.

O desenvolvimento desta metodologia foi fundamentada na revisão bibliográfica realizada e nas características físico-químicas do fármaco e da especialidade farmacêutica.

A cromatografia é uma técnica de separação de componentes de uma mistura. Os métodos analíticos por CLAE são preferidos para as análises quantitativas devido sua especificidade ao fármaco ou associação de fármacos analisados (SWARBRICK E BOYLAN, 2002).

5.8.1 Fase móvel

Transferiram-se 2,7598 g de fosfato monobásico de sódio para um balão volumétrico de 2 litros e dissolveu-se esta substância com água ultrapura. O pH

foi corrigido com ácido clorídrico HCl 0,1N para 2. O volume foi completado com água ultrapura para 2 litros. Após homogeneização o tampão foi utilizado para preparar a fase móvel.

Em uma proveta para preparação de fase móvel foram pipetados exatamente 10 ml de acetonitrila grau cromatográfico e o restante do volume de 1 litro foi completado com o tampão recém preparado. A fase móvel foi filtrada e degaseificada através de uma membrana GS em éster de celulose com 0,22 μ de poro, 47 mm de diâmetro, branca, lisa e hidrofílica (Millipore[®]).

5.8.2 Equipamento

O sistema cromatográfico utilizado foi um Shimadzu HPLC 10 AD VP, bomba LC-10ATVP, degaseificador DGU-14A, injetor automático SIL-10AF, detector SPD-10AVP UV e sistema de registro SCL 10 AVP. A separação foi efetuada em temperatura ambiente através de uma coluna de fase reversa Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, 5 μ m, com pré-coluna constituída pela mesma fase estacionária da coluna. A detecção foi realizada em 240 nm.

5.8.3 Preparo da solução padrão

Os cromatogramas das amostras foram diretamente comparados com os cromatogramas obtidos para as soluções padrão preparadas a cada análise.

Transferiram-se exatamente 50 mg de carbocisteína para um balão volumétrico de 25 ml. Posterior solubilização com 1 ml de NaOH 1 N, o volume foi completado com fase móvel, a fim de obter uma solução de concentração 2 mg/ml. A solução padrão foi filtrada em filtro de 0,22 μ m (Millipore[®]) antes da análise cromatográfica.

5.8.4 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas através de simples diluição com vidraria volumétrica devidamente calibrada.

Alíquota de 1ml do xarope (equivalente a 50 mg de carbocisteína) foi transferida para um balão volumétrico de 25 ml, cujo volume foi completado com fase móvel. A solução amostra foi filtrada em filtro de 0,22 µm (Millipore®) antes da análise cromatográfica.

5.8.5 Ensaio

Após estabilização da linha de base, foram realizadas injeções da solução padrão (em duplicata) e das soluções amostra (em duplicata).

5.8.6 Cálculo

Para fins de cálculo foi identificado no cromatograma da solução padrão o pico e tempo de retenção correspondente a carbocisteína. Foi realizada a média das áreas obtidas através da análise em duplicata da solução padrão.

A concentração da carbocisteína presente na formulação foi determinada através da seguinte equação:

$$Ca = (Aa \times Cp) / Ap$$

Onde Ca: concentração da amostra; Aa: área do pico da amostra; Cp: concentração conhecida do padrão e Ap: área do pico do padrão.

5.9 Validação

5.9.1 Linearidade

A curva padrão foi realizada com cinco concentrações da solução padrão: 1mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml e 3,0 mg/ml. Em balões volumétricos de 25 ml foram adicionados 25 mg, 37,5 mg, 50 mg, 62,5 mg e 75 mg de carbocisteína padrão secundário. Posteriormente, as soluções foram dissolvidas em 1 ml de NaOH 1N. O volume foi completado com fase móvel, para obtenção das concentrações descritas anteriormente.

A linearidade do método proposto foi verificada através da análise das áreas totais dos picos obtidos utilizando o método dos mínimos quadrados e análise da variância (ANOVA).

5.9.1.1 Resultados

A Tabela 4 apresenta os valores de áreas absolutas obtidas para curva padrão, através de CLAE com leitura a 240 nm.

A linearidade do método foi determinada através do cálculo da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados (Figura 10).

Tabela 4. Áreas dos cromatogramas obtidos para a curva padrão do método cromatográfico proposto para o doseamento da carbocisteína.

Concentração (mg/ml)	Área *	Área média	DPR **
1,0	760454 760609 768171	763078	0,57
1,5	1120121 1119392 1136603	1125372	0,86
2,0	1508018 1511760 1511391	1510390	0,13
2,5	1885528 1888622 1893310	1889153	0,20
3,0	2275463 2275445 2273853	2274920	0,04

* Cada valor corresponde a média de três determinações.

** Desvio padrão relativo

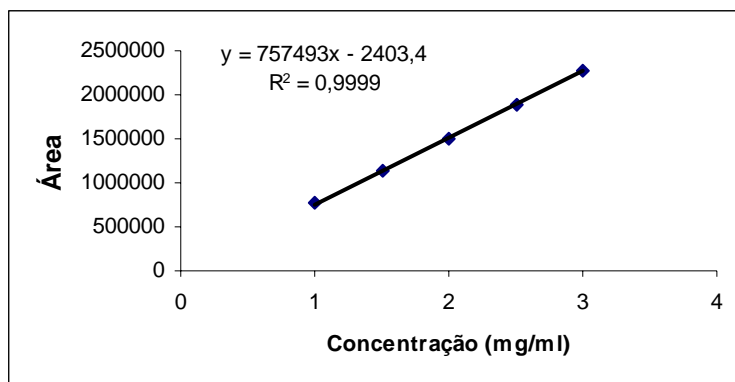


Figura 10. Representação gráfica da curva padrão de carbocisteína obtida por CLAE de fase reversa, detecção em 240 nm.

A Tabela 5 apresenta a ANOVA utilizada para avaliar os resultados obtidos na elaboração da curva padrão do método apresentado. Verifica-se que não existe desvio significativo da linearidade dos dados utilizados para uma probabilidade menor ou igual a 0,05.

Tabela 5. Análise de variância dos dados determinados para construção da curva padrão de carbocisteína, utilizando método por CLAE em fase reversa com detecção em 240 nm.

Fontes de Variação	gl	SQ	QM	F
Entre	4	4,304E+12	1,076E+12	15,371339
Regressão	1	4,303E+12	4,303E+12	61,478137 *
Desvio	3	505409645	168469882	0,0024067
Dentro	10	7E+11	7E+10	
Total	14	4,304E+12		

* significativo para $p < 0,05$

5.9.2 Precisão

A precisão foi avaliada quanto à repetibilidade dos resultados das amostras analisadas. Foram preparadas seis amostras (2 mg/ml) que foram comparadas diretamente frente a uma solução padrão preparada em paralelo. As soluções amostra e padrão foram injetadas em duplicata.

O desvio padrão relativo (DPR), que não deve ser superior a 2%, foi calculado através da equação descrita na seqüência.

$$\text{DPR} = (\text{desvio padrão} / \text{concentração média experimental}) \times 100$$

5.9.2.1 Resultados

Na Tabela 6 encontram-se os resultados das seis amostras analisadas em duplicata para determinar a repetibilidade do método analítico.

Tabela 6. Valores obtidos no doseamento de carbocisteína pelo método em CLAE de fase reversa com detecção em 240 nm.

Amostras	Concentração (mg/ml)*	Percentual (%)	Média	DPR
1	2,05	102,84	103,09	0,34
	2,06	103,34		
2	2,09	104,76	104,12	0,87
	2,07	103,48		
3	2,08	104,02	104,86	1,13
	2,11	105,70		
4	2,07	103,42	104,17	1,02
	2,10	104,92		
5	2,07	103,50	103,25	0,34
	2,06	103,00		
6	2,08	103,96	105,03	1,44
	2,12	106,10		

* Cada valor corresponde a média de duas determinações.

O teor médio obtido para a carbocisteína foi de 104,09% com DPR = 1,01.

5.9.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da taxa de recuperação. Foram preparadas três amostras onde foram adicionadas quantidades pré-determinadas do padrão para que estas amostras apresentassem a

concentração teórica de 105, 110 e 115%. Foram realizadas três determinações de cada amostra. De acordo com a resolução RE 899, o limite de variação permitida para a exatidão é de 98 a 102% (ANVISA, 2003). A exatidão do método foi avaliada através da equação a seguir:

$$E = (\text{concentração experimental} / \text{concentração teórica}) \times 100$$

5.9.3.1 Resultados

Na Tabela 7 encontram-se as áreas médias obtidas para as três concentrações analisadas, isto é, amostra adicionada de 5%, 10% e 15% de padrão. A exatidão foi calculada através da equação descrita no item 5.9.3.

Tabela 7. Avaliação da Exatidão do método de doseamento da carbocisteína por CLAE em fase reversa e detecção em 240 nm.

Áreas	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)*	Exatidão
1617515	105,00	106,52	101,44
1660357	110,00	109,34	99,40
1739831	115,00	114,57	99,62

*Cada valor corresponde a três determinações.

5.9.4 Limites de quantificação e detecção

Os limites de quantificação e detecção foram calculados a partir da curva de calibração obtida experimentalmente utilizando-se as seguintes equações:

$$LD = (\text{desvio padrão do intercepto da reta} \times 3,3) / \text{inclinação da reta}$$

$$LQ = (\text{desvio padrão do intercepto da reta} \times 10) / \text{inclinação da reta}$$

5.9.4.1 Resultados

O método apresentou limite de detecção igual a 36,41 µg/ml e limite de quantificação igual a 110,35 µg/ml.

5.9.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da análise de uma amostra equivalente à concentração de 100 % de analito sob condições analíticas alteradas propositalmente. A amostra foi relacionada com um padrão analisado em condições normais do método a fim de verificar-se a precisão e exatidão do resultado sob condições diversas ao preconizado no método.

Segundo a RE 899 (ANVISA, 2003) o método é considerado robusto quando mesmo diante das variações arbitrárias, os resultados se mantiverem precisos e exatos. Desta forma, em cada variação avaliada foram calculadas a precisão e exatidão através das equações apresentadas nos itens 5.9.2 e 5.9.3, respectivamente.

Na seqüência encontram-se os resultados obtidos para as amostras analisadas sob diferentes comprimentos de onda, concentração, fluxo e pH da fase móvel bem como os diferentes lotes de coluna cromatográfica.

5.9.5.1 Resultados

As Tabelas 8, 9, 10, 11, e 12 ilustram os resultados obtidos na avaliação dos diferentes parâmetros na análise da robustez do método por CLAE.

Tabela 8. Teste de robustez do método de doseamento de carbocisteína por CLAE em fase reversa cujo comprimento de onda UV-VIS de detecção foi alterado.

Amostra * (mg/ml)	235 nm	243 nm	247 nm
1	1,86	2,10	2,06
2	1,86	2,09	2,06
3	1,88	2,09	2,07
Média	1,87	2,09	2,06
Desvio padrão	0,5949	0,1544	0,2088
Precisão	0,6366	0,1476	0,2026
Exatidão	93,45	104,59	103,08

*concentração teórica 2mg/ml

Tabela 9. Teste de robustez do método de doseamento de carbocisteína por CLAE em fase reversa cuja concentração da fase móvel foi alterada.

Amostra (mg/ml)	97: 3	96: 4	98: 2
1	1,96	2,02	2,01
2	1,97	2,02	2,00
3	1,98	2,01	2,01
Média	1,97	2,02	2,01
Desvio padrão	0,0132	0,0015	0,0021
Precisão	0,6694	0,0749	0,1067
Exatidão	98,61	100,82	100,34

*concentração teórica 2mg/ml

Tabela 10. Teste de robustez do método de doseamento de carbocisteína por CLAE em fase reversa cujo pH da fase móvel foi alterado.

Amostra (mg/ml)	pH 1,7	pH 2,3	pH 1,5
1	1,93	2,05	1,97
2	1,93	2,01	1,96
3	1,93	2,06	1,94
Média	1,93	2,04	1,95
Desvio padrão	0,0036	0,0241	0,0155
Precisão	0,1850	1,1804	0,7928
Exatidão	96,54	101,89	97,69

*concentração teórica 2mg/ml

Tabela 11. Teste de robustez do método de doseamento de carbocisteína por CLAE em fase reversa cujo fluxo da fase móvel foi alterado.

Amostra (mg/ml)	1,00 ml/min	1,2 ml/min	1,7 ml/min
1	1,95	1,97	2,00
2	1,95	1,96	2,00
3	1,96	1,97	1,98
Média	1,96	1,97	1,99
Desvio padrão	0,0019	0,0018	0,0096
Precisão	0,0996	0,0909	0,4807
Exatidão	97,77	98,35	99,69

*concentração teórica 2mg/ml

Tabela 12. Teste de robustez do método de doseamento de carbocisteína por CLAE em fase reversa com diferentes lotes de colunas analíticas.

Amostra (mg/ml)	Lote 1	Lote 2	Lote 3
1	1,96	1,96	1,96
2	1,96	1,96	1,95
3	1,95	1,96	1,96
Média	1,96	1,96	1,96
Desvio padrão	0,0035	0,0009	0,0057
Precisão	0,1766	0,0464	0,2898
Exatidão	97,76	98,19	97,80

*concentração teórica 2mg/ml

5.9.6 Especificidade

A especificidade foi avaliada através da análise de amostra contendo o fármaco, amostras do placebo e amostras do xarope de carbocisteína exposto a 70 °C. Esta última avaliação visa a determinar a interferência de picos de degradação no pico de carbocisteína bem como verificar se o método é capaz de detectar tais substâncias.

5.9.6.1 Resultados

O grande desafio na análise de preparações farmacêuticas é evitar a interferência dos demais excipientes. A CLAE constitui uma ferramenta importante, pois a separação entre fármaco e excipientes é facilitada através do desenvolvimento de métodos compatíveis com as características da amostra a ser analisada.

Na Figura 11 é possível observar que os excipientes da formulação não interferem no pico da carbocisteína.

No cromatograma do xarope de carbocisteína exposto a 70 °C não houve interferência de picos de degradação no pico do fármaco (Figura 12).

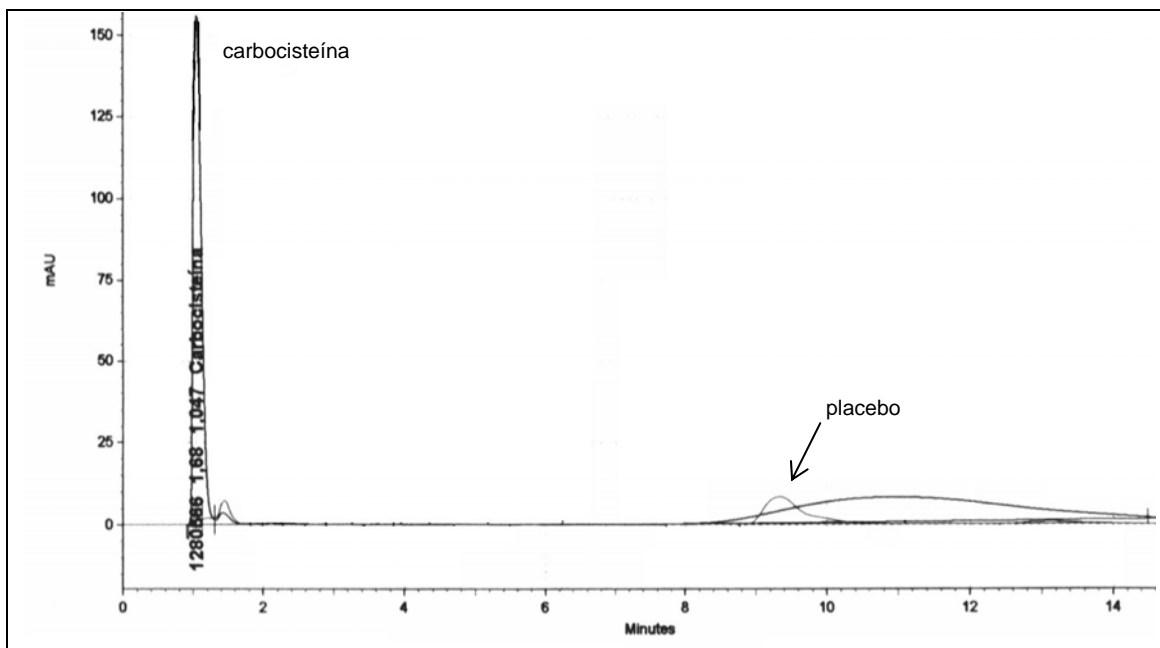


Figura 11. Sobreposição dos cromatogramas da solução padrão e placebo do xarope de carbocisteína. Fase móvel ACN:Tampão Fosfato de sódio 10 mM (1:99), detecção em 240 nm, fluxo 1,5 ml/min, coluna C 18 - Chromolith Performance RP 18e (100 x 4,6mm, 5 µm).

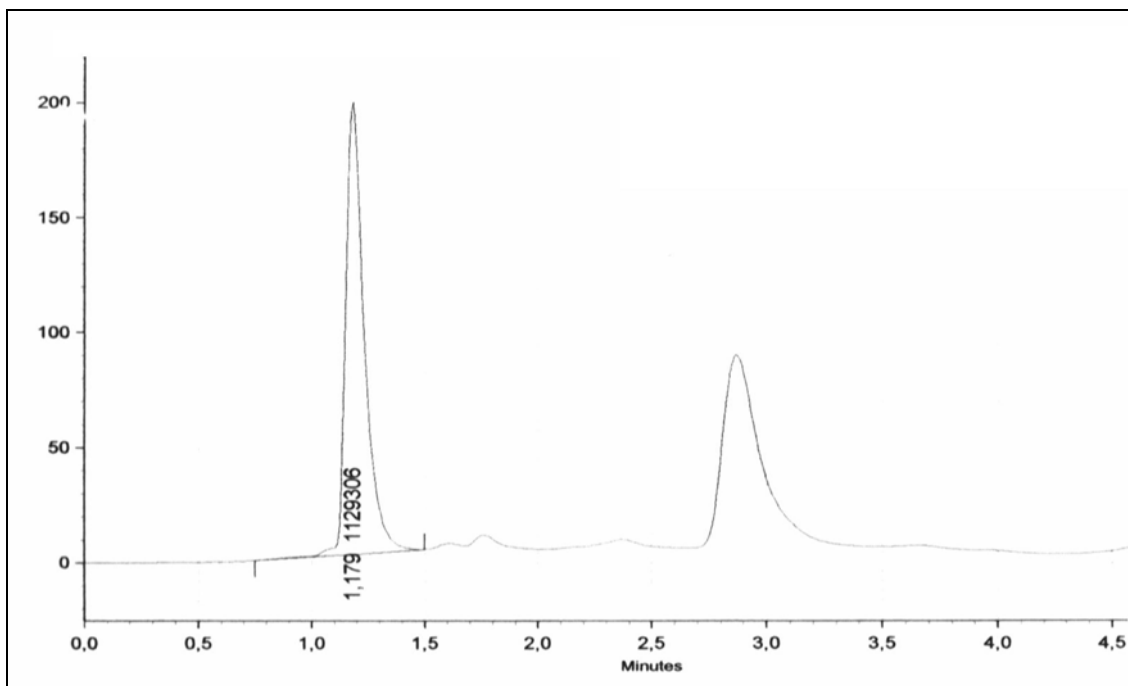


Figura 12. Cromatograma do xarope de carbocisteína a 70 °C (21 dias). Condições cromatográficas idênticas às condições exibidas na Figura 11.

5.10. Discussão

Na ausência da monografia do produto carbocisteína xarope na literatura oficial, tomando como base o preconizado na literatura através dos métodos gerais, foram otimizadas a metodologia analítica e especificações para o produto carbocisteína xarope. Os resultados obtidos nas análises efetuadas comprovam a qualidade físico-química e microbiológica do xarope produzido (F. BRAS. IV, 1988).

O xarope de carbocisteína apresenta pH levemente ácido visando à prevenção da contaminação microbiana. O limite de variação permitido para este medicamento é de 4,5 a 6,5. Cerca de 0,2 g de carbocisteína dissolvidas em 20 ml de água isenta de dióxido de carbono apresenta valor de pH entre 2,8 a 3,0 (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002). O xarope apresentou pH mais alto em relação à matéria-prima em função da melhor solubilização do fármaco em hidróxido de sódio.

Na avaliação da qualidade microbiológica do produto o método empregado foi baseado na F. BRAS. IV (1988), no entanto, os meios de cultura empregados foram adaptados. O meio RICO apresentado, formulado a partir das necessidades básicas das células bacterianas, apresenta uma fonte de carbono, nitrogênio e água. O PDA é comumente utilizado em pesquisas de controle ambiental e também atende as necessidades básicas de fungos e/ou leveduras. Estas adaptações foram avaliadas através da utilização simultânea do meio RICO e PDA em paralelo aos meios de cultura preconizados pela F. BRAS. IV (1988). Não foram observadas variações nos resultados em ambas avaliações.

O método analítico escolhido para o doseamento da carbocisteína foi inicialmente proposto por Suntornsuk (2001). Este método foi adaptado em relação à coluna analítica, que ao invés da Inersil ODS-3V (250 x 4,6mm e 5µm) foi utilizada uma Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, 5 µm. As demais condições, como fase móvel, detecção e fluxo foram mantidas. O

método apresentou-se linear, preciso e exato assim como o anteriormente proposto (SUNTORNSUK, 2001).

Observando-se os cromatogramas obtidos verifica-se que o tempo de retenção da carbocisteína é pequeno (1,10 minutos), o que sugere uma baixa afinidade pela fase estacionária o que poderia prejudicar a análise. No entanto, sob eluição isocrática, tempos de retenção entre 2 e 6 minutos são considerados ótimos e, normalmente, valores entre 1 e 10 são considerados normais (SWARBRICK e BOYLAN, 2002).

Ainda, é possível verificar nos cromatogramas a simetria dos picos formados (1,5) e a ausência de interferentes como os excipientes presentes na formulação e eventuais produtos de degradação (Figuras 11 e 12).

A linearidade do método foi comprovada através da equação da reta, calculada através do método dos mínimos quadrados, cujo coeficiente linear obtido foi 0,9999 e também através da ANOVA. A análise estatística comprovou a regressão linear nas concentrações utilizadas e a ausência do desvio da linearidade.

A precisão foi avaliada através da repetibilidade na análise de seis amostras. O DPR calculado (1,01) é considerado satisfatório, pois segundo a RE 899, admitem-se valores de DPR de até 2,0. (ANVISA, 2003²).

A exatidão calculada através da porcentagem de recuperação em amostras adicionadas de quantidades de padrão conhecidas também foi considerada satisfatória. Os valores variaram de 99,40 a 101,44%, encontrando-se dentro da variação permitida pela RE 899 (ANVISA, 2003²).

Nas alterações provocadas arbitrariamente visando testar a robustez do método, percebe-se que a precisão e a exatidão do método variaram conforme o tipo de alteração efetuada. A detecção foi avaliada através de pequenas modificações no comprimento de onda de leitura, nas quais o método manteve sua precisão, mas não a exatidão. Mesmo diante das alterações expressivas

da concentração da fase orgânica e fluxo da fase móvel, o método manteve-se preciso e exato. A variação de pH proposta sugere que o método não é preciso e exato em valores de pH inferiores a 2,0. Destaca-se que valores abaixo de 2,0 também não são recomendados, pois podem danificar a coluna analítica. A utilização de diferentes colunas não determinou alterações significativas na precisão e exatidão do método. Portanto, parâmetros como pH da fase móvel e comprimento de onda precisam ser monitorados visando garantir a exatidão do método analítico.

O método descrito foi considerado preciso, exato, linear e específico a partir da validação realizada. No entanto, observando-se os parâmetros cromatográficos como número de pratos teóricos e fator capacidade (k') verifica-se a necessidade de que os mesmos sejam melhor avaliados a fim de não comprometerem o método analítico.

Finalmente com base nos dados obtidos é possível afirmar que o método otimizado encontra-se validado e poderá ser aplicado com segurança na análise de carbocisteína na forma farmacêutica xarope nos ensaios de rotina do controle de qualidade.

CAPÍTULO III – ESTABILIDADE TÉRMICA

6.1 Introdução

Foi demonstrado experimentalmente que a velocidade da reação é influenciada pela temperatura. Isto ocorre porque, para reagir, a molécula necessita de uma determinada energia de ativação (ΔE). O aumento da temperatura poderá fornecer a quantidade de energia para que a molécula possa reagir. É importante ainda ressaltar que apenas uma região mínima da molécula é capaz de absorver calor, esta é conhecida pelo fator Boltzmann e $e^{-\Delta E/RT}$ (KEDOR-HACKMANN, 1998).

Portanto, quanto maior a necessidade de energia para ativação, menor o número de moléculas que absorvem esta energia e mais lenta a velocidade de reação em uma determinada temperatura.

Em 1889, *Arrhenius* apresentou a seguinte equação para a relação entre a temperatura e a cinética de reação:

$$\log K = \text{Log } A - (\Delta E / 2,303 \cdot RT)$$

Onde K: constante de velocidade de reação; A: fator de freqüência; ΔE : energia de ativação; R: constante dos gases perfeitos (1,987); T: temperatura absoluta (em Kelvin).

6.2 Parte experimental

6.2.1 Estudo de estabilidade acelerado

O aumento da temperatura é um dos fatores que permite acelerar a cinética de degradação das substâncias químicas. Esta condição é, sem dúvida, a mais utilizada em estudo de estabilidade tanto de fármacos como de preparações farmacêuticas. Normalmente associam-se condições drásticas de umidade à temperatura elevada (USP, 27). Segundo o ICH (1996) existem

quatro zonas climáticas internacionais. A determinação de cada zona foi baseada em dados de temperatura e umidade relativa do ar, obtidos ao ar livre e em locais de armazenamento (KEDOR-HACKMANN, 1998) *.

O estudo de estabilidade acelerado é uma ferramenta muito útil no desenvolvimento e registro de preparações farmacêuticas, pois permite estipular um prazo de validade provisório para as mesmas. A validade provisória é confirmada através do estudo de estabilidade de longa duração também sob condições de temperatura e umidade definidas.

6.2.2 Condições do estudo

Um lote experimental do produto carbocisteína xarope adulto foi preparado especificamente para realização do estudo de estabilidade. O produto foi envasado em frascos de vidro que, após identificação, foram armazenados em três estufas (QUIMIS[®]), previamente estabilizadas com as seguintes temperaturas: 40 °C, 50 °C, 60 °C e posteriormente a 70 °C.

Três frascos de xarope foram analisados em duplicata, em cada tempo e a cada temperatura de armazenamento. O cronograma de retirada de amostras foi rigorosamente cumprido. As amostras retiradas da estufa foram estabilizadas à temperatura ambiente e imediatamente analisadas.

6.2.3 Metodologia analítica

As amostras submetidas à degradação térmica foram avaliadas quanto às propriedades organolépticas, pH, teor de carbocisteína e presença de contaminantes microbiológicos.

O pH foi medido através de método potenciométrico conforme descrito no item 5.5.

*KEDOR-HACKMANN, Érika Rosa Maria. Apostila **Estabilidade de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos**. Universidade de São Paulo, 1998.

O teor de carbocisteína foi avaliado através de método por CLAE desenvolvido e validado conforme exposto anteriormente. Os cromatogramas foram impressos e avaliados quanto ao teor observado nas amostras e à evidência ou não da formação de produtos de degradação.

As amostras foram submetidas à avaliação microbiológica, conforme metodologia anteriormente apresentada, para verificar a presença de contaminantes microbiológicos que poderiam ser responsáveis pela degradação do produto ou das alterações organolépticas observadas nas amostras.

6.3 Resultados

6.3.1 Propriedades organolépticas

Sob as condições anteriormente citadas o produto apresentou alteração de cor, com mudança da cor amarela original para o castanho escuro e alteração do odor original de canela e rum para um odor desagradável. A alteração de cor pode ser visualizada através da Figura 13, que compara amostra produzida em agosto de 2001, mantida no retém a 25°C (amostra de referência futura), amostra produzida em março de 2004 e, por último, amostra submetida a 50 °C (ao término do estudo).

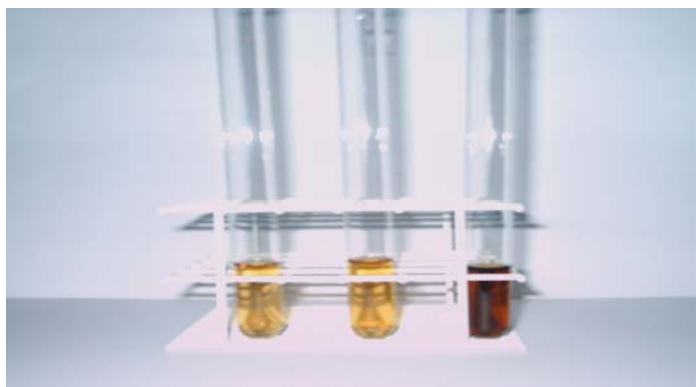


Figura 13. Alteração de cor (da esquerda para a direita): carbocisteína xarope (amostra retém); carbocisteína xarope (mar/04); carbocisteína xarope a 50 °C.

6.3.2 Análise microbiológica

Sob as condições citadas no item 5.7, o produto foi avaliado quanto à presença de contaminantes microbiológicos. As amostras analisadas não apresentaram contaminação microbiológica de acordo com o método utilizado. Este dado comprova a eficiência do conservante utilizado na formulação.

6.3.3 Avaliação do pH

Os valores indicados nas Tabelas 13, 14, 15 e 16 correspondem à análise do pH das amostras submetidas a 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C.

Tabela 13. Avaliação do pH das amostras de xarope de carbocisteína a 40 °C.

Dias	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Desvio Padrão
0	5,63	5,63	5,63	5,63	0,00
72	5,65	5,62	5,59	5,62	0,03
81	5,60	5,63	5,60	5,61	0,02
90	5,47	5,50	5,51	5,49	0,02
100	5,56	5,59	5,60	5,58	0,02
110	5,55	5,56	5,54	5,55	0,01
120	5,46	5,45	5,42	5,44	0,02

Tabela 14. Avaliação do pH das amostras de xarope de carbocisteína a 50 °C.

Dias	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Desvio Padrão
0	5,63	5,63	5,63	5,63	0,00
12	5,63	5,62	5,61	5,62	0,01
24	5,49	5,41	5,61	5,50	0,10
54	5,50	5,32	5,50	5,44	0,10
72	5,56	5,59	5,58	5,58	0,02
84	5,54	5,56	5,53	5,54	0,02
96	5,49	5,61	5,60	5,57	0,07

Tabela 15. Avaliação do pH das amostras de xarope de carbocisteína a 60 °C.

Dias	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Desvio Padrão
0	5,63	5,63	5,63	5,63	0,00
3	5,41	5,41	5,50	5,44	0,05
6	5,69	5,80	5,69	5,73	0,06
12	5,70	5,60	5,47	5,59	0,12
18	5,31	5,31	5,40	5,34	0,05
27	5,58	5,39	5,59	5,52	0,11
30	5,53	5,51	5,51	5,52	0,01

Tabela 16. Avaliação do pH das amostras de xarope de carbocisteína a 70 °C.

Dias	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Desvio Padrão
0	5,61	5,81	5,10	5,51	0,37
3	5,64	5,02	5,19	5,28	0,32
5	5,65	5,71	5,32	5,56	0,21
9	5,63	5,71	5,84	5,73	0,11
11	5,61	5,63	5,65	5,63	0,02
15	5,61	5,63	5,65	5,63	0,02
21	5,66	5,63	5,65	5,65	0,02

6.3.4 Determinação do teor de carbocisteína

O doseamento da carbocisteína foi realizado através de método analítico por CLAE previamente validado de acordo com o item 5.9. As amostras foram analisadas em duplicata, totalizando seis determinações para cada tempo. Os dados estão ilustrados nas Tabelas 17, 18, 19 e 20. Os resultados de cada amostra correspondem à média da determinação em duplicata. Foi calculada a média das três amostras, apresentando o resultado em porcentagem e concentração de carbocisteína em mg/ml.

Tabela 17. Teor de carbocisteína nas amostras a 40 °C.

Dias	Amostra 1 (%)	Amostra 2 (%)	Amostra 3 (%)	Média (%)	Concentração (mg/ml)
0	104,67	104,67	104,67	104,67	52,34
72	94,82	95,21	95,04	95,02	47,51
81	87,23	85,58	85,06	85,96	42,98
90	81,73	75,26	74,06	77,01	38,51
100	74,00	72,78	72,65	73,14	36,57
110	71,21	71,46	71,34	71,33	35,67
120	58,93	55,05	57,50	57,16	28,58

Tabela 18. Teor de carbocisteína nas amostras a 50 °C.

Dias	Amostra 1 (%)	Amostra 2 (%)	Amostra 3 (%)	Média (%)	Concentração (mg/ml)
0	104,67	104,67	104,67	104,67	52,34
12	100,05	99,97	100,30	100,11	50,05
24	99,33	99,12	98,41	98,95	49,47
54	95,44	95,18	95,99	95,54	47,77
72	94,82	95,21	94,39	94,80	47,40
84	89,09	87,74	87,62	88,15	44,07
96	86,80	86,02	85,61	86,14	43,07

Tabela 19. Teor de carbocisteína nas amostras a 60 °C.

Dias	Amostra 1 (%)	Amostra 2 (%)	Amostra 3 (%)	Média (%)	Concentração (mg/ml)
0	108,09	108,43	108,53	108,35	54,18
3	100,86	103,51	102,68	102,35	51,17
6	87,08	86,50	87,91	87,16	43,58
12	86,06	85,51	85,70	85,76	42,88
18	72,79	72,06	68,87	71,24	35,62
27	69,46	68,04	66,14	67,88	33,94
30	57,27	64,05	64,08	61,80	30,90

Tabela 20. Teor de carbocisteína nas amostras submetidas a 70 °C.

Dias	Amostra 1 (%)	Amostra 2 (%)	Amostra 3 (%)	Média (%)	Concentração (mg/ml)
0	101,43	102,87	103,80	102,70	51,35
3	82,23	88,89	88,92	86,68	43,34
5	82,23	83,66	85,55	83,81	41,91
9	81,24	79,33	77,41	79,32	39,66
11	49,29	62,23	58,52	56,68	28,34
15	51,40	47,60	48,85	49,28	24,64
21	44,12	41,84	46,02	43,99	21,99

6.3.5 Alterações observadas durante o estudo de estabilidade acelerado

A alteração de cor e de odor foi avaliada através da preparação da solução placebo do xarope e de soluções de cada um dos excipientes separadamente. As amostras foram colocadas em estufa a 70 °C durante 25 dias e avaliadas periodicamente quanto às propriedades organolépticas.

6.4 Determinação da ordem da reação

A ordem de reação foi determinada a partir dos dados obtidos no estudo de degradação acelerada do xarope de carbocisteína submetido às temperaturas de 40 °C, 60 °C e 70 °C.

Os dados relativos às amostras acondicionadas a 50 °C foram excluídos devido à baixa degradação da carbocisteína durante o período de armazenamento.

6.4.1 Resultados

Na seqüência estão apresentados os gráficos das temperaturas avaliadas.

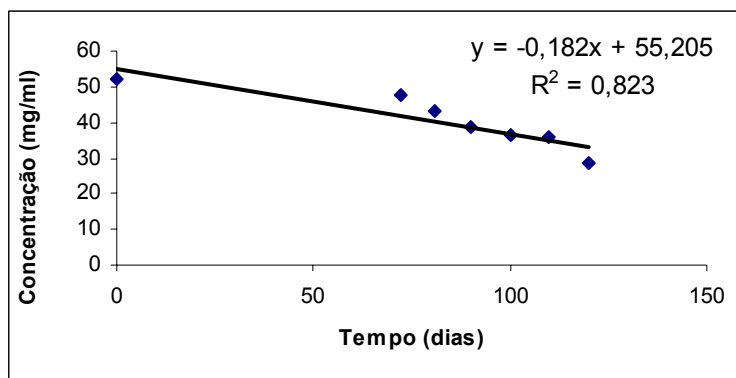


Figura 14. Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico da concentração X tempo a 40 °C.

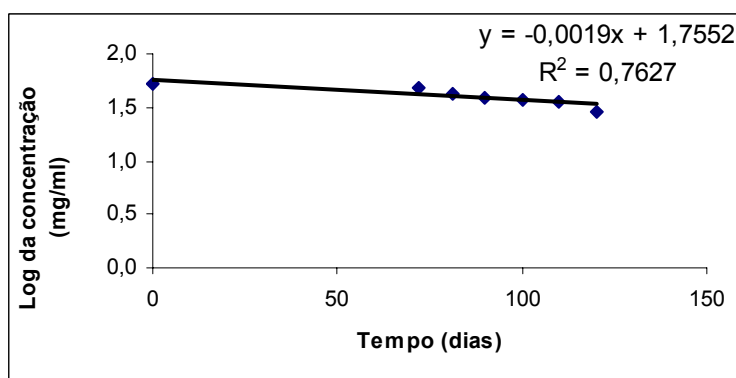


Figura 15. Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do log da concentração X tempo a 40 °C.

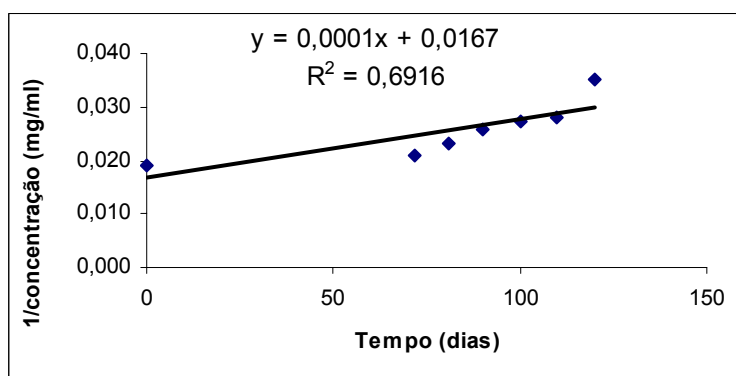


Figura 16. Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do inverso da concentração X tempo a 40 °C.

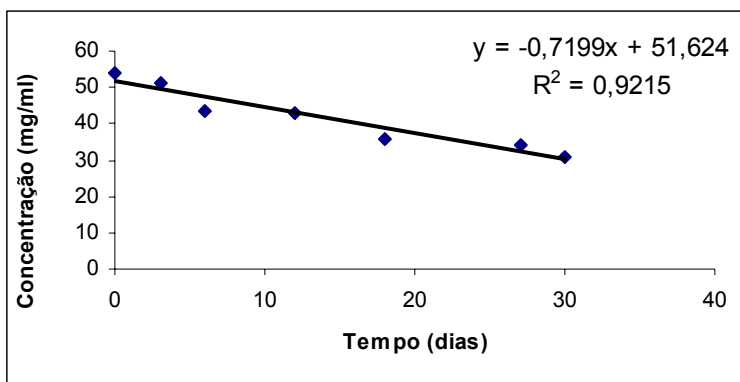


Figura 17. Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico da concentração X tempo a 60 °C.

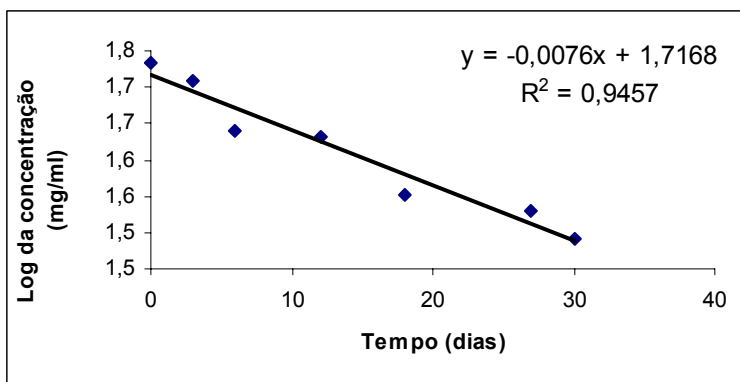


Figura 18. Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do log da concentração X tempo a 60 °C.

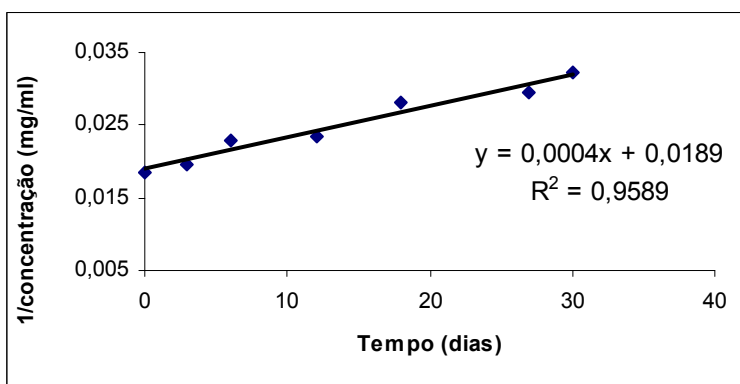


Figura 19. Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do inverso da concentração X tempo a 60 °C.

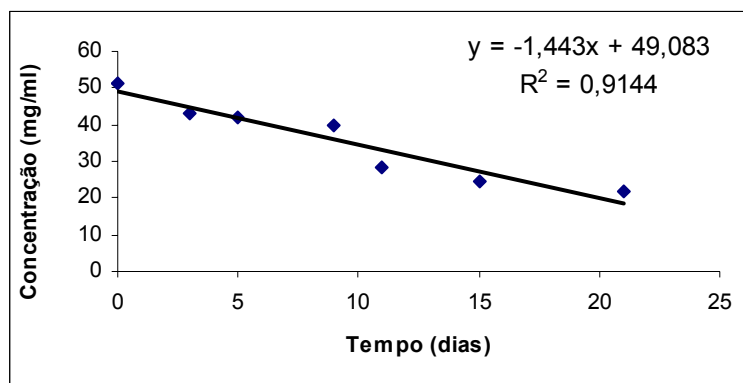


Figura 20. Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico da concentração X tempo a 70 °C.

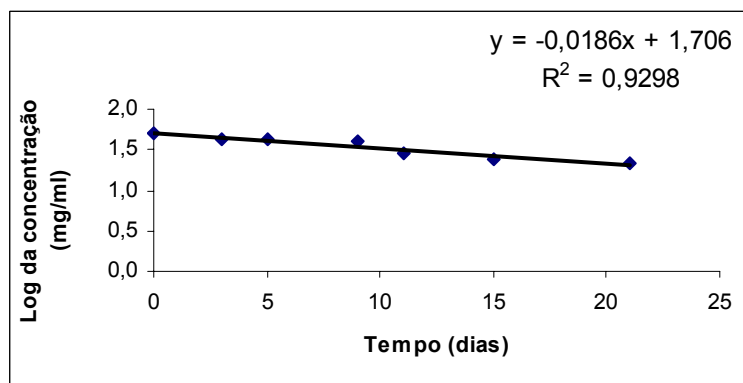


Figura 21. Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do log da concentração X tempo a 70 °C.

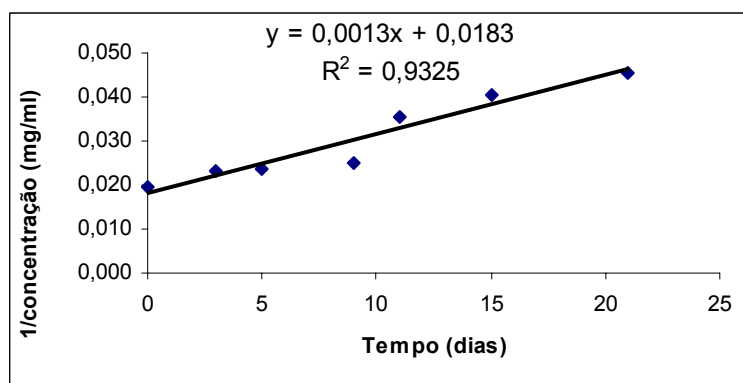


Figura 22. Perfil cinético da degradação do xarope de carbocisteína através do gráfico do inverso da concentração X tempo a 70 °C.

Os valores obtidos das inclinações das retas dos gráficos do log da concentração X tempo foram utilizados para determinar o prazo de validade do produto. A Tabela 21 exibe os valores de k' para cada temperatura após aplicação da equação: valor da inclinação = $k' / 2,303$.

Tabela 21. Valores de k' obtidos a partir das inclinações dos gráficos log da concentração *versus* tempo de cada temperatura avaliada.

Temperatura	k'
40 °C	0,0044
60 °C	0,0175
70 °C	0,0428

6.5 Aplicação da equação de Arrhenius

A equação de Arrhenius foi empregada para determinar a energia de ativação (ΔE) nas diferentes temperaturas avaliadas.

$$\log k_2/k_1 = \Delta E / 2,303 R \times (T_2 - T_1 / T_2 \times T_1)$$

Onde R: 1,987 (constante dos gases) e T: temperatura em Kelvin

6.5.1 Resultados

6.5.1.1 Cálculo de ΔE através da constante de degradação a 40 e 60 °C.

$$\Delta E = \log 0,0175/0,0044 \times 2,303R \times (333 \times 313 / 333 - 313)$$

$$\Delta E = 0,5995 \times 4,57 \times 5.211,45$$

$$\Delta E = 14.279,92$$

6.5.1.2 Cálculo de ΔE através da constante de degradação a 40 e 70 °C.

$$\Delta E = \log 0,0428/0,0044 \times 2,303R \times (343 \times 313 / 343 - 313)$$

$$\Delta E = 0,9879 \times 4,57 \times 3.578,73$$

$$\Delta E = 16.158,40$$

6.5.1.3 Cálculo de ΔE através da constante de degradação a 60 e 70 °C.

$$\Delta E = \log 0,0428/0,0175 \times 2,303R \times (343 \times 333/ 343 - 333)$$

$$\Delta E = 0,3887 \times 4,57 \times 11.421,9$$

$$\Delta E = 20.289,40$$

6.5.2 Cálculo da constante de degradação (k_{25}) à temperatura ambiente (25 °C), através da equação de *Ahrrenius*.

A determinação da constante de degradação à temperatura ambiente (25 °C) é importante para o cálculo do $T_{90\%}$, tempo necessário para que o teor do fármaco apresente uma degradação de 10%, ou o doseamento do fármaco corresponda a 90% do valor relativo ao tempo zero.

6.5.2.1 Resultados

A partir da média da energia de ativação obtida (ΔE) foi determinada a constante de degradação a 25 °C (k_{25}) através da equação de *Ahrrenius*. A constante k_1 foi substituída por uma das constantes de degradação k , previamente calculadas. O valor de K_{25} foi determinado com base nas constantes de degradação a 40, 60 e 70 °C.

$$\Delta E \text{ médio} = 16.909,24$$

$$\log k_{25}/k_{40} = - (\Delta E/ 2,303 \cdot 1,987) \times (1/298 - 1/313)$$

$$\log k_{25}/k_{40} = - (16.909,24/4,57) \times 1,6 \times 10^{-4}$$

$$\log k_{25}/k_{40} = - 0,5920$$

$$k_{25} = 0,2551 \times 0,0044$$

$$k_{25} = 0,0011$$

$$\log k_{25}/k_{60} = - (\Delta E/ 2,303 \cdot 1,987) \times (1/298 - 1/333)$$

$$\log k_{25}/k_{60} = - (16.909,24/4,57) \times 3,47 \times 10^{-4}$$

$$\log k_{25}/k_{60} = - 1,2839$$

$$k_{25} = 0,052 \times 0,0175$$

$$k_{25} = 0,00091$$

$$\log k_{25}/k_{70} = - (\Delta E / 2,303 \cdot 1,987) \times (1/298 - 1/343)$$

$$\log k_{25}/k_{70} = - (16.909,24/4,57) \times 4,60 \times 10^{-4}$$

$$\log k_{25}/k_{70} = - 1,7020$$

$$k_{25} = 0,0198 \times 0,0428$$

$$k_{25} = \mathbf{0,0009}$$

$$k_{25} \text{ médio} = \mathbf{0,00097}$$

6.6 Prazo de validade

O prazo de validade da carbocisteína xarope foi calculado a partir da cinética de degradação. No caso de uma reação de primeira ordem (pseudo primeira ordem), o prazo de validade pode ser determinado através do cálculo do $T_{90\%}$ segundo a equação descrita na seqüência.

$$T_{90\%} = 0,106 / k_{25}$$

6.6.1 Resultados

O valor de $T_{90\%}$ calculado a partir da média dos k_{25} determinados com base nas constantes de degradação obtidos a 40, 60 e 70 °C está indicado abaixo.

$$k_{25} = 0,00044$$

$$T_{90\%} = 0,106 / 0,00097$$

$$T_{90\%} = 109,28 \text{ dias}$$

6.7 Discussão

O histórico do estudo de estabilidade de medicamentos remonta as inspeções realizadas às antigas boticas francesas em 1352. No entanto, no Brasil, a primeira normatização do estudo de estabilidade refere-se à RE 391 de 1999, onde duas condições de estudo de estabilidade acelerada são

apresentadas como avaliação prévia para solicitação de prazo de validade provisório de dois anos.

A literatura científica salienta a importância do estudo de estabilidade de preparações farmacêuticas como garantia da qualidade, eficácia e segurança da administração das mesmas. Vários métodos são sugeridos na predição do prazo de validade, no entanto, o método de *Arrhenius* é um dos mais utilizados, pois permite a verificação de forma mais completa da cinética de degradação.

A carbocisteína xarope é um mucolítico utilizado como adjuvante no tratamento de doenças do aparelho respiratório. É comercializado sem prescrição médica, encontrando-se disponível no mercado em 28 diferentes produtos comerciais. O prazo de validade dos produtos comercializados à base de carbocisteína é de dois anos (ANVISA,2004¹).

A aplicação do método de *Arrhenius* exige a determinação da degradação do fármaco em três temperaturas drásticas. É considerada condição imprescindível que o fármaco seja sujeito à degradação térmica e que esta degradação seja pelo menos superior a 50 % (NUDELMAN, 1975).

A avaliação prévia da degradação térmica da carbocisteína foi realizada pelo período de 30 dias a 70 °C onde se pretendia inicialmente verificar se a temperatura, como fator extrínseco, era capaz de acelerar a reação de degradação do fármaco de escolha. A segunda observação a ser realizada referia-se ao percentual de degradação do fármaco que deveria ser de pelo menos 50 % (NUDELMAN, 1975). A avaliação prévia permitiu visualizar a degradação da carbocisteína em cerca de 40 % em relação ao teor inicial. A partir deste percentual evidenciou-se a possibilidade deste fármaco apresentar degradação superior a 50% quando avaliado por um período de tempo superior ao da avaliação prévia.

O produto foi preparado no laboratório de pesquisa e desenvolvimento da empresa patrocinadora a partir das orientações fornecidas pela mesma. O xarope de carbocisteína foi acondicionado em embalagens de vidro âmbar,

devidamente lacradas e identificadas. As amostras foram armazenadas em estufas estabilizadas em 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C.

Para análise do xarope de carbocisteína, submetido à degradação térmica, foram avaliadas as propriedades organolépticas, pH, teor de carbocisteína e contagem microbiológica. Quanto às propriedades organolépticas foram observadas alterações de cor e odor do xarope nas quatro condições avaliadas. No entanto, através de avaliação posterior ao estudo de estabilidade acelerado (item 6.3.5), comprovou-se que a coloração castanha adquirida sob temperatura drástica era oriunda da degradação do corante caramelo utilizado na formulação. O odor desagradável das amostras submetidas às temperaturas elevadas está relacionado à degradação do aroma de canela.

O pH das amostras expostas às condições drásticas de temperatura não sofreu variações significativas. Desta forma, este parâmetro físico-químico não é um indicativo do processo de degradação do fármaco.

A avaliação da presença de contaminação microbiológica em preparações líquidas é de suma importância no estudo de estabilidade. A contaminação microbiológica está intimamente relacionada aos processos de fermentação e conseqüente formação de gás, alteração de cor, pH e degradação do fármaco (NUDELMAN, 1975). Durante o período analisado e de acordo com a metodologia empregada, não foi evidenciada contaminação microbiológica nas amostras de carbocisteína xarope. Desta forma, descarta-se a possibilidade de degradação do fármaco, bem como alteração de cor e odor oriundos da contaminação microbiana.

A avaliação do teor da carbocisteína apresentou degradação significativa em três das quatro condições avaliadas. Na temperatura de 40 °C, o produto foi avaliado no período de 120 dias apresentando uma degradação final na ordem de 43%. A 50 °C, o xarope foi analisado durante 96 dias, apresentando uma degradação na ordem de 14%. Na condição de 60 °C, o produto foi avaliado durante 30 dias, apresentando uma degradação da ordem

de 39 %. Finalmente, na temperatura de 70 °C, o produto apresentou uma degradação de 57% quando avaliado durante o período de 21 dias. Observa-se que a 50 °C, o percentual de degradação não foi significativo como nas demais condições. A velocidade de degradação foi mais lenta nesta temperatura. Assim sendo, os dados relativos à temperatura de 50 °C não foram utilizados para avaliação da cinética de degradação.

A partir dos resultados obtidos na análise de teor de carbocisteína nas amostras submetidas às condições drásticas, foram elaborados gráficos distintos para cada temperatura, visando determinar a ordem da reação de degradação: concentração *versus* tempo; log da concentração *versus* tempo e inverso da concentração *versus* tempo.

Com base nos valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos, sugere-se que a cinética de degradação segue uma reação de segunda ordem, como pode ser observado nas representações gráficas relativas ao inverso da concentração *versus* tempo. No entanto, esta observação é válida apenas para as temperaturas de 60°C e 70°C, já que a 40 °C evidencia-se uma reação de ordem zero.

Segundo Nuldeman (1975) uma reação pode ser de pseudo primeira ordem, se, sendo de segunda ordem, a concentração de um dos constituintes for muito elevada. Quase todas as reações de solvólise e de oxidação são deste tipo. Na prática, sempre que possível, deve-se trabalhar em condições de pseudo primeira ordem, já que eventuais erros são menores e o tratamento de uma reação de primeira ordem é mais simples que uma de segunda ordem (NUDELMAN, 1975).

A partir dos valores de k' foram determinados os valores de ΔE através da equação de *Arrhenius*. O ideal é que estes resultados sejam semelhantes, mesmo diante de diferenças significativas nas temperaturas avaliadas (KEDOR-HACKMANN, 1998). A partir do ΔE médio foi determinado o K_{25} , imprescindível para a determinação do $T_{90\%}$. Este parâmetro corresponde ao tempo de vida útil ou período em que o medicamento apresenta estabilidade.

Através da determinação do $T_{90\%}$ obteve-se um período de estabilidade de 109,28 dias para o produto carbocisteína xarope.

O método de Arrhenius, assim como outros descritos na literatura, é aplicado nos estudos de estabilidade acelerada visando a determinar a validade provisória de um produto farmacêutico. O prazo de validade definitivo será determinado unicamente a partir dos dados de estabilidade de longa duração em condições de temperatura e umidade pré-estabelecidos.

A aplicação de método de *Arrhenius* no conjunto de resultados obtidos no estudo de estabilidade da carbocisteína xarope a 40 °C, 60 °C e 70 °C não corroborou na predição do prazo de validade deste produto.

A carbocisteína comercializada na forma de xarope apresenta um prazo de validade de 2 anos. Análises efetuadas em formulações sob estudo de estabilidade de prateleira, em temperatura e umidade ambiente não controladas (sujeitas as variações climáticas) comprovam a estabilidade deste produto. Em especial o lote 101A fabricado em setembro de 2001 foi analisado em novembro de 2004 e apresentou 100,23% de carbocisteína. O lote 202A fabricado em fevereiro de 2002 foi analisado em novembro de 2004 e apresentou 101,72% de carbocisteína. Nas Figuras 23 e 24 podem ser visualizados os cromatogramas dos lotes 101 A e 202 A contendo o pico da carbocisteína e indicando a ausência de produtos de degradação.

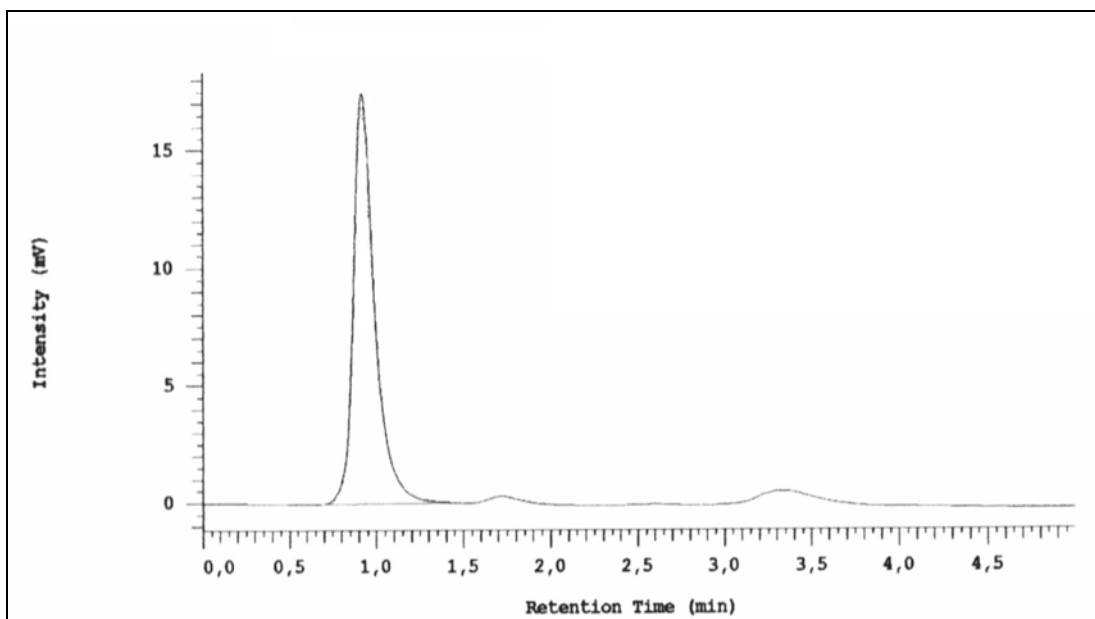


Figura 23. Cromatograma do lote 101 A de carbocisteína xarope 50 mg/ml. Fase móvel ACN:Tampão Fosfato de sódio 10 mM (1:99), detecção em 240 nm, fluxo 1,5 ml/min, coluna C 18 – Chromolith Performance RP 18e (100 x 4,6mm, 5 µm)

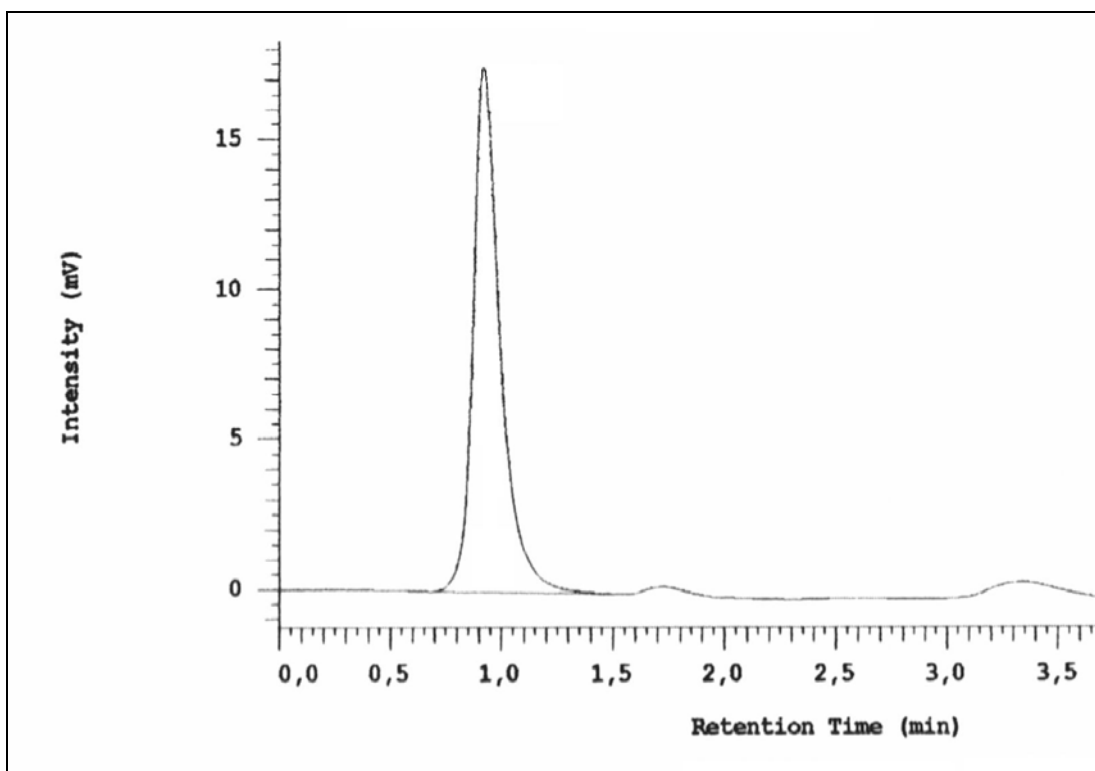


Figura 24. Cromatograma do lote 202 A de carbocisteína xarope 50 mg/ml. Condições cromatográficas idênticas às condições exibidas na Figura 23.

No caso específico deste estudo, a literatura relata situações onde o método de *Arrhenius* pode não ser aplicável ao estudo de estabilidade acelerada de medicamentos. Uma das hipóteses corresponde à baixa umidade do ar que afeta a solubilidade do oxigênio. Este dado é particularmente importante para fármacos sensíveis a reações de oxidação (LACHMAN, 2001).

Nos cromatogramas relativos às condições de 60 e 70 °C, foi detectado um pico posterior ao pico principal da carbocisteína. Desta forma, com base nas informações relativas à rota de síntese deste composto, buscou-se identificar o pico de degradação observado. A síntese da carbocisteína emprega a *L*-cisteína, constituída por duas moléculas de cistina. Ambas substâncias foram analisadas através do método empregado na análise da carbocisteína para verificar se o tempo de retenção seria igual ao do produto de degradação. De acordo com a Figura 25, o produto de degradação exibido no cromatograma abaixo não corresponde à *L*-cistina ou a *L*-cisteína, cujos cromatogramas podem ser visualizados nas Figuras 26 e 27 respectivamente.

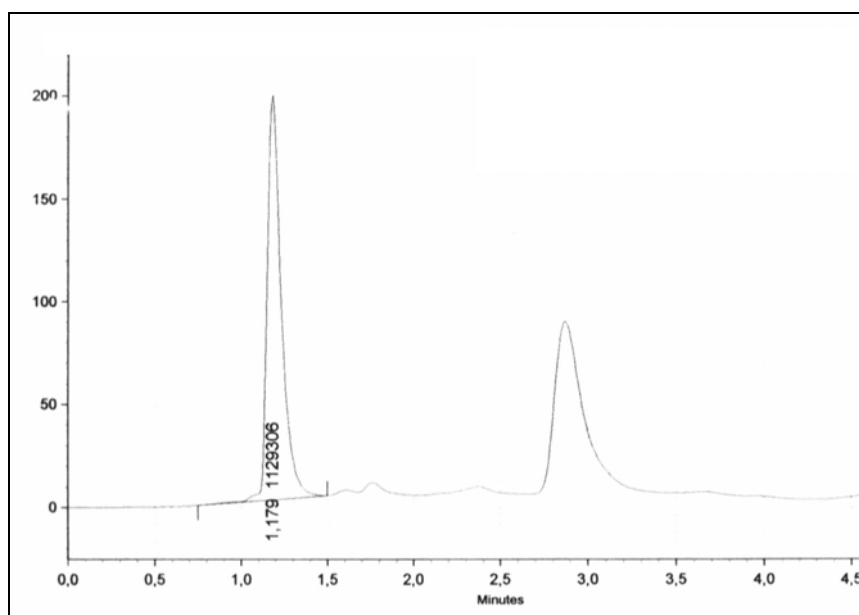


Figura 25. Cromatograma da carbocisteína (pico principal) xarope exposta à condições drásticas. Condições cromatográficas idênticas às condições exibidas na Figura 23.

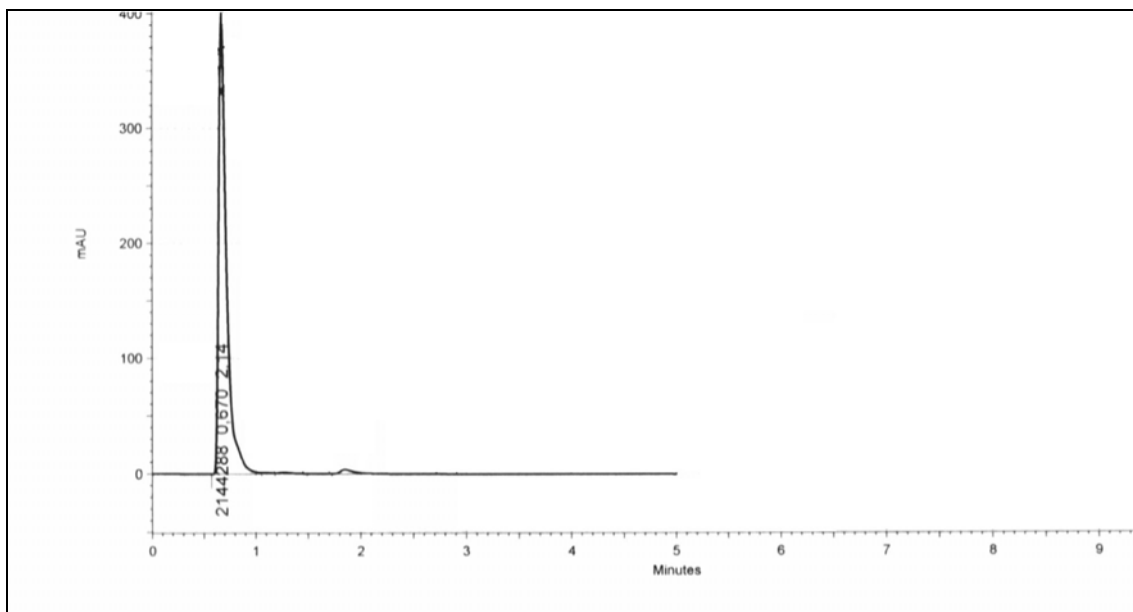


Figura 26. Cromatograma padrão da L-cistina. Fase móvel ACN:Tampão Fosfato de sódio 10 mM (1:99), detecção em 240 nm, fluxo 1,5 ml/min, coluna C 18 – Chromolith Performance RP 18e (100 x 4,6mm, 5 µm).

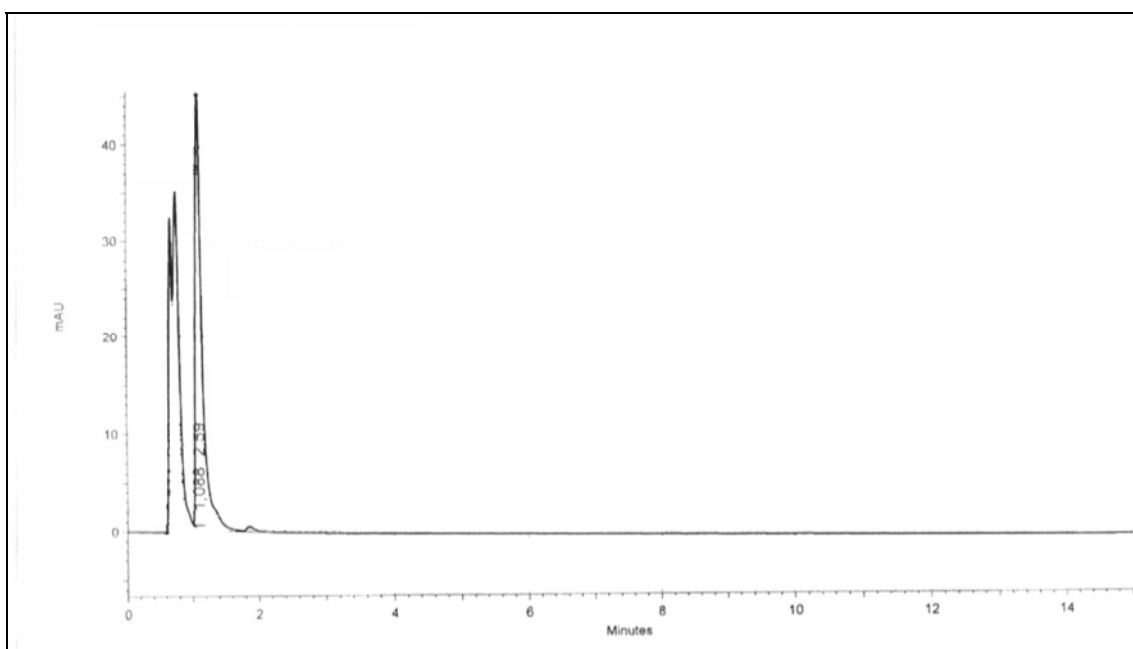


Figura 27. Cromatograma padrão da L-cisteína. Fase móvel ACN:Tampão Fosfato de sódio 10 mM (1:99), detecção em 240 nm, fluxo 1,5 ml/min, coluna C 18 – Chromolith Performance RP 18e (100 x 4,6mm, 5 µm)

Apesar dos tempos de retenção da L-cistina e da L-cisteína apresentarem valores muito próximos ao da carbocisteína verifica-se que o pico do fármaco não sofre influência destas substâncias mesmo em condições extremas de temperatura. Cabe salientar ainda que a concentração de carbocisteína apresentou declínio significativo nestas condições.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A matéria-prima de carbocisteína foi analisada quali e quantitativamente através da adaptação às condições laboratoriais da metodologia descrita na Farmacopéia Européia (22).

O método analítico otimizado para a determinação da carbocisteína em xaropes apresentou-se linear, preciso, exato, específico e robusto, permitindo a correta determinação deste fármaco.

A carbocisteína xarope apresenta alteração significativa no teor do fármaco quando exposta às temperaturas elevadas. Simultaneamente ocorreram alterações na cor e odor da preparação em consequência de alterações do corante e essência utilizados na formulação respectivamente.

Nos cromatogramas analíticos foi observada a presença de produto de degradação. Foi investigada a possibilidade desta substância tratar-se de *L*-cisteína ou *L*-cistina, ambas precursoras da carbocisteína. No entanto estas não apresentavam o mesmo tempo de retenção observado no produto de degradação em temperaturas elevadas.

A cinética de degradação da carbocisteína corresponde a uma reação de pseudo primeira ordem.

O prazo de validade para a formulação estudada é de 109,28 dias, o que não corresponde à validade de dois anos dos produtos à base de carbocisteína comercializados no Brasil.

De acordo com a resolução RE 560 (ANVISA, 2002), a predição do prazo de validade de dois anos pode ser realizada avaliando-se o produto na condição drástica de $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $90\% \pm 5\%$ de umidade ou $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $70\% \pm 5\%$. No presente estudo ficou nítida a diferença na degradação observada nas quatro temperaturas analisadas. Desta forma é perfeitamente

questionável se a predição da validade baseada em apenas uma temperatura é suficientemente segura.

Esta problemática pode ser resolvida através da aplicação do método de *Arrhenius* que avalia a degradação em pelo menos três temperaturas que, através de uma equação matemática, extrapola o observado nas temperaturas drásticas para a temperatura ambiente.

Por fim, conclui-se que o método de *Arrhenius* é uma ferramenta útil na estimativa do prazo de validade de preparações farmacêuticas, observadas suas limitações como: degradação mínima de 50 % do teor de substância ativa, controle absoluto das temperaturas estudadas e precisão e exatidão na determinação do teor do fármaco.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 391, 1999. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 21 mar.2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 560, 2002. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 21 mar.2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 210, 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 21 de mar. 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 899, 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 06 de jun. 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.Consulta a banco de dados. . Disponível em <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta>. Acesso em 06 de jun. 2004¹.

CARSTENSEN, Jeans T. e RHODES, C.T. Drug Stability – Principles and Practices. 3ª ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 2000. p 553-578.

CHALUMEAU, M., CHÉRON, G., ASSATHIANY, R., MOULIN, F., BAVOUX, F., BRÉART, G., PONS, G. **Fluidifiants bronchiques dans les infections respiratoires aiguës du nourrisson: un problème pharmacoépidémiologique?** Archives de Pédiatrie 9 (2002) 1128-1136.

DEF – DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas Ltda, 2002. p 259-260.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 4th ed. S.I. 2002. Quality of Medicines of the Council of Europe, 2002. p.756-757

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

GIL-ALEGRE, M.E., BERNABEU, J.A., CAMACHO, M.A., TORRES-SUAREZ, A.I., **Statistical evaluation for stability studies under stress storage conditions**, Farmaco 56 (2001) 877-883.

HARTKE, Hartke, Murtschler, Rücker e Wichtl. Kommentar zum Deutschen Arzneibuch, 1996.

ICH – **International Conference on Harmonisation.** Validation of analytical methods: definitions and terminology. ICH Steering Committee, Switserland, 1996.

KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica.** Rio de Janeiro: Guanabara S.A, 1988.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara.** 1999/2000 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 11, p.11.4-11.5.

LACHMAN, Leon, Lieberuan, H.A., Kanig, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica** . Vol 2. Lisboa: Fundação Calouse Gulben Kian,2001.

MELUCCI, Charles K., Lyman, Gary W., Bond, Arthur D., Johnson, Raymond N. **Determination of S-carboxymethylcysteine in syrup formulations by high-performance liquid chromatography**. Journal of Chromatography, 391 (1987) 321-324.

NUDELMAN, Norma Sbarbati. **Estabilidad de Medicamentos**. Montevideo:Libreria El Ateneo Editorial,1975.

REMYNGTON. Alfonso R. Genaro. **Farmacía**. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1987.

SETHI, P.D. **Quantitative analysis of drugs in pharmaceutical formulations**. 3ª ed. CBS Publishers and Distributors. New Delhi, 1997.pg 442.

SOME, Issa T., BOGAERTS, Philippe, HANUS, Raymond, HANOCQ, Michael, DUBOIS, Jacques, **Incorporating batch effects in the estimation of drug stability parameters using an Arrhenius model**. Int. J. Pharm. 184(1999) 165-172.

SUNTORNUSUK, Leena. **Direct determination of s-carboxymethyl-l-cysteine in syrups by reversed-phase high-performance liquid chromatography**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 25 (2001) 165-170.

SWARBRICK, James, BOYLAN, James C.. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. vol 1. 2ª ed. Marcel Dekker, Inc. New York, p.414-425, 2002.

Tsai, F.Y., Chen, C.J., Chien, C.S. **Determination of the cysteine derivatives N-acetylcysteine, S-carxymethylcysteine and methylcysteine in pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography**. Journal of Chromatography A, 697 (1995) 309-315.

USP 27. **The United States Pharmacopeia**. 27 th. Ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004.

UCKO, David A., **Química Para as Ciências da Saúde**. 2ª ed, Ed. Manole Ltda. São Paulo, 1992, pg 444-445.

ZAIA, Dimas A.M., Ribas, K.C.L., Zaia, C.T.B.V. **Spectrophotometric determination of cysteine and or carbocysteine in a mixture of amino acids, shampoo, and pharmaceutical products using p-benzoquinone**. Talanta 50 (1999) 1003-1010.