



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM
MEDICAMENTOS

SAID GONÇALVES DA CRUZ FONSECA

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PEDIÁTRICAS CONTENDO
TUBERCULOSTÁTICOS

NATAL – RN

2015

SAID GONÇALVES DA CRUZ FONSECA

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PEDIÁTRICAS CONTENDO
TUBERCULOSTÁTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Nervo Raffin

Co-orientadora: Profa. Dra. Helena Lutécia Luna Coelho

NATAL - RN
2015

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Fonseca, Said Gonçalves da Cruz.

Desenvolvimento de formulações pediátricas contendo
tuberculostáticos / Said Gonçalves da Cruz Fonseca. - Natal,
2015.

164f.: il.

Tese (Doutorado)-Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação
Tecnológica em Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Nervo Raffin.

Coorientadora: Profa. Dra. Helena Lutécia Luna Coelho.

1. Pediatria - Tese. 2. Tuberculose - Tese. 3. Rifampicina -
Tese. 4. Comprimido dispersível - Tese. 5. Suspensão - Tese. 6.
Pó para reconstituição - Tese. I. Raffin, Fernanda Nervo. II.
Coelho, Helena Lutécia Luna. III. Título.

RN/UF/BSCCS

CDU 615.011

SAID GONÇALVES DA CRUZ FONSECA

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PEDIÁTRICAS CONTENDO
TUBERCULOSTÁTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 07 de Dezembro de 2015

Profa. Dra. Fernanda Nervo Raffin (orientadora)

Profa. Dra. Helena Lutécia Luna Coelho

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito

Prof. Dr. Luis Carlos Rey

Profa. Dra. Mirian Parente Monteiro

Este trabalho é dedicado às famílias, à minha (mãe, pai (in memoriam), irmãos, esposa, filhos), aos tantos outros irmãos em Deus com os quais convivemos no dia-a-dia, e aos muitos outros que nem chegaremos a conhecer.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Fernanda Nervo Raffin, que concordou e participou efetivamente da orientação desta tese e dos trabalhos resultantes deste grandioso e valoroso esforço.

À Profa. Dra. Helena Lutécia Luna Coelho, que desde o início incentivou, orientou, confiou, cobrou, demonstrando sempre muita disposição em prol da realização do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Tulio Accioly Lima e Moura por estar sempre pronto a ajudar, e ter efetivamente ajudado sempre que foi solicitado, desde a participação na banca de seleção, fornecimento de insumos, discussões, disponibilização de recursos laboratoriais, até a permanente irradiação de energia positiva.

Aos Professores do Departamento de Farmácia da UFC, especialmente às chefes do departamento, Profa. Francisca Maria Barros Souza e Profa. Mirian Parente Monteiro.

À Profa. Marta Maria de França Fonteles, ex coordenadora do PPgDITM-CE, com quem pude dividir desafios e despesas.

À ex Diretora da Farmácia-Escola, Profa. Dra. Janete Eliza de Sá Soares e aos demais colegas dos setores de produção e de controle de qualidade.

Ao Coordenador do Centro de Desenvolvimento de Ensaios Farmacêuticos (CEDEFAR), Prof. Luis Carlos Brígido de Moura.

À Profa. Mary Anne Medeiros Bandeira, Profa. Teresa Maria Pontes de Carvalho e Profa. Romélia Pinheiro, por disponibilizarem seus espectrofotômetros, sem os quais não poderia ter realizado o desenvolvimento e validação da metodologia analítica.

Ao professor Alejandro Pedro Ayala e sua equipe do departamento de física da UFC, especificamente Dra. Luciana Pinho Pessoa, Jéssica de Castro Fonseca e Silmara, pelo apoio nas análises de DRX, IR, Raman e microscopia.

Aos colegas do laboratório de Farmacotécnica com quem dividi responsabilidades, alegrias, de trabalho e sobre os quais derramei frustrações.

Aos anjos e anjas que se colocaram no meu caminho na qualidade de monitores, orientandos de TCC e os demais alunos.

Finalmente e sobre tudo, a Deus, que permitiu todos os arranjos necessários para disponibilizar a realização deste e de tantos outros trabalhos que visam o bem comum.

RESUMO

A disponibilidade de formulação pediátrica para tratamento de tuberculose é uma realidade para os países da Ásia e da África, mas ainda não ocorre em outros países que apresentam considerável incidência dessa enfermidade. Considerando a situação da necessidade global por medicamentos para uso em pediatria e especificamente por este tipo de produto para o tratamento da tuberculose, cuja associação de ativos representa um grande desafio, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de formulações orais contendo rifampicina, isoniazida e pirazinamida em dose fixa combinada para uso em pediatria. Iniciou-se com a caracterização físico-química dos insumos ativos (identificação por IV, UV e CLAE, determinação do teor por CLAE e UV, densidade aparente e ângulo de repouso). Em seguida foi realizada a avaliação da compatibilidade térmica dos insumos ativos com diferentes excipientes (DSC e TG); o desenvolvimento de veículo voltado para o emprego como carreador de fármacos para uso oral em pediatria com o mínimo de componentes, em baixas concentrações, selecionando-os dentre os insumos considerados seguros para crianças (avaliando viscosidade, pH, palatabilidade, estabilidade física e microbiológica). Foi desenvolvida e validada metodologia analítica espectrofotométrica para uso no doseamento e perfil de dissolução concomitante dos três fármacos nos produtos desenvolvidos, além de estudos de pré-formulação através da densidade aparente e ângulo de repouso dos fármacos isolados e das suas misturas com aerosil, granulação com diferentes polímeros e seu efeito na liberação da rifampicina, estabilidade da rifampicina em função do pH, revestimento e microencapsulação da rifampicina com quitosana, até finalmente o desenvolvimento das formulações sólidas orais sob a forma de pó para reconstituição e comprimido dispersível contendo dose fixa combinada dos fármacos supra-citados. Foram avaliados a viscosidade, pH, teor dos fármacos e estabilidade das preparações reconstituídas, bem como peso médio, dureza, tempo de desintegração, perfil de dissolução e friabilidade dos comprimidos. O método de Ozawa foi empregado em estudos cinéticos de DSC para estimar o fator de frequência, a energia de ativação e a ordem das reações que levam à degradação das formas farmacêuticas sólidas. As duas formas farmacêuticas sólidas quando dispersas em água, resultaram em suspensão pseudo-plástica fácil de ser manuseada, medida e administrada, e que podem ser utilizadas por até 12 horas após a reconstituição.

Palavras-chave: Pediatria. Tuberculose. Rifampicina. Comprimido dispersível. Suspensão. Pó para reconstituição.

ABSTRACT

The availability of pediatric formulation for treating tuberculosis is a reality for the countries of Asia and Africa, but not in other countries that have considerable incidence of this disease. Considering the situation of the global need for medicines for pediatric use and specifically for this type of product for the treatment of tuberculosis, whose drugs association represents a major challenge, this study aimed to develop oral formulations containing rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in fixed-dose combination for pediatric use. It began with the physico-chemical characterization of active ingredients (identification by IR, UV and HPLC, determination of content by HPLC and UV, bulk density and angle of repose). It then carried the evaluation of thermal compatibility of active ingredients with different excipients (DSC and TG); the vehicle development for use as a carrier of oral drugs in children with minimal components, at low concentrations, selecting them from the inputs considered safe for children (evaluating viscosity, pH, palatability, physical and microbiological stability). It was developed and validated spectrophotometric analytical methodology for use in the assay and dissolution profile of three drugs in the developed products, in addition to pre-formulation studies by apparent density and angle of repose of the individual drugs and their mixtures with aerosil, granulation with different polymers and their effect on the release of rifampicin, rifampicin stability in function of pH, coating and microencapsulation of rifampicin with chitosan, and finally the development of solid oral formulations in the form of powder for reconstitution and dispersible tablet containing a fixed-dose combination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide. We evaluated the viscosity, pH, content of drug and stability of the reconstituted preparations, as well as average weight, hardness, disintegration time, dissolution profile and friability of the tablets. The Ozawa method was used for DSC studies kinetic to estimate the frequency factor, the activation energy and the order of reactions that lead to degradation of solid dosage forms. The two solid dosage forms when dispersed in water, resulting in pseudo-plastic suspension easy to be handled, measured and administered, and can be used for up to 12 hours after reconstitution.

Keywords: Paediatrics. Tuberculosis. Rifampicin. Dispersible tablets. Suspension. Powder for reconstitution.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Tuberculostáticos de primeira linha presentes na lista de medicamentos essenciais para crianças.	25
Quadro 2 - Tuberculostáticos presentes na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do Brasil.....	26
Quadro 3 - Comprimentos de onda de máximo e de mínimo no espectro UV da pirazinamida em diferentes solventes.....	33
Quadro 4 - Solubilidade da rifampicina em diferentes solventes.....	35
Quadro 5 - Comprimentos de onda de máximo no espectro UV da isoniazida em diferentes solventes	36
Quadro 6 - Resumo das condições para realização do ensaio de dissolução para cápsulas e comprimidos contendo rifampicina sozinha e associada a isoniazida, pirazinamida e etambutol em diferentes farmacopeias.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Estrutura química dos tuberculostáticos utilizados no desenvolvimento deste trabalho (MERCK, 2001)	32
Figura 2 - Escalas hedônicas mistas faciais-verbais específicas para gênero.....	51
Figura 3 - Espectros infravermelho da isoniazida SQR e dos insumos ativos utilizados provenientes do LAFEPE (PE) e NUPLAM (RN).....	65
Figura 4 - Espectros infravermelho da pirazinamida SQR e do insumo ativo utilizado proveniente do NUPLAM (RN).	65
Figura 5 - Espectros infravermelho da rifampicina SQR e dos insumos ativos utilizados provenientes do LAFEPE (PE) e NUPLAM (RN).....	66
Figura 6 - Espectros UV da isoniazida, pirazinamida e rifampicina em HCl 0,1M e em metanol.	66
Figura 7 – DSC da rifampicina, isoniazida e pirazinamida utilizados como insumos ativos...	67
Figura 8 - Representação gráfica das densidades aparente, de compactação e do índice de Carr da rifampicina, isoniazida e pirazinamida.	69
Figura 9 - Microfotografia com aumento de 100 X de rifampicina, isoniazida e pirazinamida.	70
Figura 10 – Comportamento reológico de diluições aquosas dos polímeros metilcelulose (MC) e hipromelose (HPMC). BV e AV significam, respectivamente, baixa viscosidade e alta viscosidade.	73
Figura 11 - Comportamento reológico das preparações líquidas obtidas com a combinação de carmelose sódica (C) com goma xantana (GX) no planejamento fatorial 2 ²	74
Figura 12 – Comportamento reológico das preparações líquidas obtidas com a combinação de carmelose sódica (C) com goma xantana (GX) no planejamento fatorial 2 ² com ponto central.	75
Figura 13 – Gráfico de superfície de resposta apresentando o efeito da carmelose e da goma xantana sobre a viscosidade do veículo medida a 4 rpm.	76
Figura 14– Efeito de eletrólitos e pH sobre a viscosidade do veículo contendo goma xantana.	78
Figura 15 - Efeito de acidulantes e alcalinizantes sobre o pH do veículo e sua evolução ao longo de 6 dias.	79
Figura 16 - Viscosidade do veículo líquido logo após (T zero) até 116 horas após a preparação.	80
Figura 17 - Viscosidade do veículo líquido em comparação com o veículo sólido armazenado em sachês, reconstituído após 7, 30 e 45 dias depois de realizada a mistura.	81
Figura 18 – Efeito do volume dos diferentes flavorizantes sobre a viscosidade do veículo Gute.	82
Figura 19 - Histograma de frequência do teste de aceitação do veículo com crianças saudáveis, segundo as regiões da escala hedônica.	85
Figura 20 - Análise de Componentes Principais representando a aceitação do veículo Gute nos sabores menta, morango e cereja, pelas crianças saudáveis.	86
Figura 21 - Espectros de absorção UV/VIS de pirazinamida, rifampicina e isoniazida, cada uma a 10 µg/mL, na faixa de 200 a 500 nm, obtidos em intervalo de 1 nm.	88
Figura 22 – Correlação entre valores de concentração esperados e calculados para cada um dos ativos empregando os modelos descritos na tabela 15 nas faixas de comprimento de onda de 240 a 390 nm e 245 a 395 nm.....	91
Figura 23 – Relação entre o número de variáveis empregados nos modelos de regressão multivariada com o coeficiente de correlação (r ²), o erro padrão e o teste F para o intervalo de 240 a 395 nm.	92

Figura 24 – Espectros obtidos com a mistura de rifampicina, isoniazida e pirazinamida nas mesmas concentrações, demonstrando a repetibilidade em todos os comprimentos de onda..	94
Figura 25 – Índice de Carr da rifampicina e misturas com aerosil em função do número de batidas, do tempo de mistura e da concentração do adjuvante.....	96
Figura 26 - Índice de Carr da isoniazida isolada e misturas com aerosil em função do número de batidas, do tempo de mistura e da concentração do adjuvante.....	97
Figura 27 - Índice de Carr da pirazinamida isolada e misturas com aerosil em função do número de batidas, do tempo de mistura e da concentração do adjuvante.....	98
Figura 28 – Ângulo de repouso da rifampicina com diferentes concentrações de aerosil e diferentes tempos de mistura.....	101
Figura 29 – Ângulo de repouso da isoniazida com diferentes concentrações de aerosil e diferentes tempos de mistura.....	102
Figura 30 – Ângulo de repouso da pirazinamida com diferentes concentrações de aerosil e diferentes tempos de mistura.....	103
Figura 31 - Concentração de rifampicina em relação ao tempo em soluções com isoniazida e pirazinamida, com ou sem ácido ascórbico, avaliados sob cinética de ordem zero e ordem um.....	105
Figura 32 - Velocidades de degradação em função do pH e da presença de ácido ascórbico avaliadas sob cinética de ordem zero e ordem um.....	106
Figura 33 - Curvas de calibração para isoniazida, pirazinamida e rifampicina obtidas por CLAE apresentada com todos os pontos e com a média das áreas.....	108
Figura 34 - Exemplos dos cromatogramas empregados na preparação das curvas de calibração de isoniazida, pirazinamida e rifampicina.....	109
Figura 35 - Evolução da isoniazida, pirazinamida e rifampicina sob condições de estresse ácido, oxidante, luz e em temperatura ambiente.....	109
Figura 36 - Curvas térmicas da rifampicina sozinha, com aerosil 200 e com ácido ascórbico.....	111
Figura 37 - Viscosidade e comportamento reológico das soluções dos polímeros empregados para a granulação da rifampicina.....	113
Figura 38 – Perfil de liberação das partículas de rifampicina com quitosana obtidas a partir da trituração das membranas preparadas por suspensão.....	115
Figura 39 – Difração de raios X de quitosana, da rifampicina e dos pós contendo a associação rifampicina:quitosana obtidos por nebulização.....	117
Figura 40 - Perfil de liberação de rifampicina a partir das micropartículas de quitosana obtidas por nebulização.....	117
Figura 41 – Microfotografias das partículas obtidas por nebulização a partir das emulsões e suspensões de rifampicina em quitosana nas relações droga:polímero (D:P) de 1:2, 1:1 e 2:1. (Aumento de 400 X, luz polarizada).....	119
Figura 42 – DSC das partículas obtidas por nebulização a partir das respectivas emulsões e suspensões de rifampicina em quitosana.....	120
Figura 43 - DSC das misturas empregadas para o preparo da suspensão extemporânea, antes e após a trituração da rifampicina, isoniazida e pirazinamida em moinho de bolas.....	121
Figura 44 – DSC dos insumos ativos após moagem em moinho de bolas.....	123
Figura 45 – DSC da mistura de ativos, dos excipientes e de toda a formulação do pó para suspensão.....	123
Figura 46 - Comportamento reológico da suspensão reconstituída em água.....	124
Figura 47 - Volume de sedimento das suspensões preparadas com aerosil e celulose.....	125
Figura 48 – Curvas de DSC não isotérmicas da mistura para suspensão obtidas sob diferentes rampas de aquecimento (\emptyset).....	128

Figura 49 – Relação de Ozawa relativa à decomposição a partir dos 320°C considerando os dados obtidos com rampas de 15 a 40 °C/min.....	129
Figura 50 – Dados de DSC apresentando a região de análise (215 a 286°C) pelo método de Ozawa.....	130
Figura 51 – Relação de Ozawa relativa à decomposição de 215 a 286°C considerando os dados obtidos com rampas de 5 a 30 °C/min.	130
Figura 52 – Evolução dos teores de pirazinamida, rifampicina na suspensão formulada com 2,35% de aerosil.	132
Figura 53 - Microfotografia da suspensão reconstituída demonstrando as formações cristalinas de pirazinamida formadas sob refrigeração.....	133
Figura 54 – Aspecto do comprimido dispersível 3 em 1 com crospovidona expostos à umidade em função do tempo.	137
Figura 55 – Relação entre peso e dureza para os comprimidos dispersíveis 3 em 1.....	138
Figura 56 – Perfil de dissolução dos comprimidos dispersíveis 3 em 1 contendo 15% de crospovidona.....	141
Figura 57 – Teores de fármacos após dispersão aquosa dos comprimidos em função do tempo	142
Figura 58- Curvas de DSC não isotérmicas da mistura empregada na preparação dos comprimidos obtidas sob diferentes rampas de aquecimento (\emptyset).	143
Figura 59 - Dados de DSC apresentando as regiões de análise pelo método de Ozawa e respectivo gráfico da relação de Ozawa.	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições analíticas empregadas para o doseamento dos insumos ativos	46
Tabela 2 - Limites de concentração de carmelose sódica MV e goma xantana empregados no planejamento fatorial 2 ² em cada um dos experimentos.....	49
Tabela 3 - Composição das soluções de calibração empregadas no desenvolvimento do método analítico espectrofotométrico de determinação do teor dos fármacos em dose fixa combinada.	53
Tabela 4 - Combinações dos fármacos empregadas na validação do método analítico espectrofotométrico para determinação do teor de pirazinamida, rifampicina e isoniazida em dose fixa combinada.	54
Tabela 5 - Concentrações de isoniazida, pirazinamida e rifampicina empregadas na obtenção das curvas de calibração por CLAE.	56
Tabela 6 - Sistema gradiente empregado na determinação dos teores de pirazinamida, rifampicina e isoniazida nos comprimidos dispersíveis.	57
Tabela 7 - Principais eventos térmicos observados na análise por DSC dos insumos ativos rifampicina, isoniazida e pirazinamida.	67
Tabela 8 - Densidades aparentes, de compactação e Índice de Carr para a rifampicina, isoniazida e pirazinamida.	69
Tabela 9 - Ângulo de repouso para os fármacos rifampicina, isoniazida e pirazinamida.	70
Tabela 10 - Tamanho médio e desvio padrão das partículas de rifampicina, isoniazida e pirazinamida.	71
Tabela 11 – Efeitos da carmelose (C) e da goma xantana (GX) sobre a viscosidade do veículo sob diferentes velocidades de cisalhamento	77
Tabela 12 – Quantidade de flavorizante para a flavorização de 100 mL de veículo.....	83
Tabela 13 - Composições das três formas de apresentação do veículo destinado ao transporte de fármacos para uso em pediatria.	84
Tabela 14 – Coeficientes linear e angulares para o doseamento de pirazinamida por espectrofotometria UV em diferentes quantidades de comprimentos de onda.	89
Tabela 15 – Comprimento de onda e coeficientes encontrados no modelo de regressão multivariada para a combinação de fármacos.....	90
Tabela 16 – Valores de coeficientes angular, linear e de correlação entre os valores esperados e valores calculados de concentração (µg/mL) para os insumos ativos empregando os modelos escolhidos pelo valor de p (menor número de variáveis) e pelo menor erro padrão (maior número de variáveis) considerando a faixa de 240 a 390 nm.....	93
Tabela 17 – Resultados do ensaio de repetibilidade e de exatidão para pirazinamida, rifampicina e isoniazida empregando o método espectrofotométrico para a determinação do teor.	93
Tabela 18 - Densidades aparentes e de compactação para a rifampicina lote M100202 e misturas com aerosil em função da concentração do adjuvante e do tempo de mistura.....	95
Tabela 19 - Índice de Carr para a rifampicina lote M100202 e misturas com aerosil em função da concentração do adjuvante e do tempo de mistura	95
Tabela 20 - Densidades aparente e de compactação para a isoniazida e misturas com aerosil em função da concentração do adjuvante e do tempo de mistura	96
Tabela 21 - Índice de Carr para a isoniazida e misturas com aerosil em função da concentração do adjuvante e do tempo de mistura	96
Tabela 22 - Densidades aparentes e de compactação para a pirazinamida e misturas com aerosil em função da concentração do adjuvante e do tempo de mistura	97
Tabela 23 - Índice de Carr da pirazinamida isolada e misturas com aerosil em função do número de batidas, do tempo de mistura e da concentração do adjuvante.	98

Tabela 24 – Ângulo de repouso (em graus) das misturas de rifampicina e aerosil em função da concentração de adjuvante e tempo de mistura	100
Tabela 25 - Ângulo de repouso (em graus) das misturas de isoniazida e aerosil em função da concentração de adjuvante e tempo de mistura	101
Tabela 26 - Ângulo de repouso (em graus) das misturas de pirazinamida e aerosil em função da concentração de adjuvante e tempo de mistura	102
Tabela 27 – Velocidades específicas de degradação para a rifampicina em solução aquosa em função de pH e sob ação de agente redutor.	104
Tabela 28 - Velocidades de degradação e coeficientes de determinação para a rifampicina associada a isoniazida e pirazinamida na presença e ausência de ácido ascórbico em função do pH.	106
Tabela 29 - Velocidade de degradação, ordem de reação e coeficiente de correlação para a isoniazida e rifampicina em meio ácido e oxidante.....	110
Tabela 30- Resumo das informações da análise térmica por DSC da rifampicina e sua associação com aerosil e/ou com ácido ascórbico.....	111
Tabela 31 - Teor de rifampicina nas micropartículas obtidas por nebulização a partir das suspensões e emulsões em quitosana.	116
Tabela 32 - Velocidade de liberação e respectivos coeficientes de correlação de rifampicina em pH 9 das micropartículas com quitosana obtidas por nebulização.....	118
Tabela 33 – Volume de sedimento em função do tempo, expresso de forma percentual em relação ao volume total da suspensão, observado após a reconstituição das suspensões com diferentes quantidades de aerosil (1A e 2A) e de celulose microcristalina 101 (1C e 2C)	125
Tabela 34 - Velocidades de reação para a degradação da rifampicina contida nas formulações de pó para reconstituição com diferentes proporções de aerosil e celulose, avaliadas sob cinéticas de reação de ordem zero, um e dois.....	126
Tabela 35 – Resultados da análise cinética de DSC do pó para suspensão extemporânea. ...	131
Tabela 36 - Velocidades de degradação para a rifampicina nas respectivas ordens de reação e prazo de validade da suspensão reconstituída.	132
Tabela 37 – Resultados de peso médio e seus limites, dureza, e friabilidade para os comprimidos contendo aerosil ou celulose microcristalina.....	135
Tabela 38 – Medidas de peso, dureza e friabilidade dos comprimidos 3 em 1 contendo 10, 15 e 20% de crospovidona.	136
Tabela 39 - Parâmetros físicos da qualidade dos comprimidos dispersíveis contendo dose fixa combinada de isoniazida, pirazinamida e rifampicina.....	138
Tabela 40 – Resultado da friabilidade dos comprimidos 3 em 1, dispersíveis, contendo 15% de crospovidona.....	139
Tabela 41 – Resultados da análise cinética de DSC da decomposição dos comprimidos.....	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BP 2013	- British Pharmacopoeia 2013 = Farmacopeia Britânica 2013
CLAE	- Cromatografia a líquido de alta eficiência = HPLC
d_b	- densidade aparente, bulk density
DSC	- Differential scanning calorimetry - Calorimetria exploratória diferencial
d_t	- densidade compactada, tapped density
DTA	- Differential thermo-analysis = Análise térmica diferencial
DTG	- Derivative thermo-gravimetry = Termogravimetria derivada
FB 5	- Farmacopeia Brasileira 5ª Ed.
FH	- Fator de Hausner
Gute	- Nome dado ao veículo desenvolvido para uso em pediatria
HIV	- Human Immunodeficiency Virus = Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography = CLAE
IC	- Índice de Carr, Índice de compressibilidade
INH	- Isoniazida
IV	- Infra-vermelho
JP 16	- Japanese Pharmacopoeia 16 th Ed. = Farmacopeia Japonesa 16ª Ed.
NUPLAM	- Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte
OMS	- Organização Mundial da Saúde = WHO
PZA	- Pirazinamida
RIF	- Rifampicina
SQR	- Substância química de referência
TB	- Tuberculose
TG	- Termogravimetria
USP 38	- United States Pharmacopoeia 38ª Ed.
UV/VIS	- Espectrofotometria na região ultra-violeta e/ou visível
WHO	- World Health Organization = OMS

LISTA DE SÍMBOLOS

- α - Alfa - indicativo de ângulo
- λ - Lambda - indicativo de comprimento de onda
- ϕ - Fi – indicativo da taxa de aquecimento em análise térmica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 TUBERCULOSE	22
2.2 TUBERCULOSTÁTICOS ESSENCIAIS PARA CRIANÇAS	24
2.3 CARÊNCIA DE FORMULAÇÕES PEDIÁTRICAS: O CASO DA TUBERCULOSE ..	26
2.4 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO COMBINADA DE RIFAMPICINA, ISONIAZIDA E PIRAZINAMIDA: DIFICULDADES PRÁTICAS.....	30
2.5 INFORMAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS SOBRE OS ATIVOS	32
2.6. SOBRE OS ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO	36
2.6.1 Ensaio de doseamento.....	37
2.6.2 Análises térmicas.....	38
2.6.3 Ensaio de dissolução	40
3. OBJETIVOS	43
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	44
4.1 MATERIAIS	44
4.2 MÉTODOS.....	46
4.2.1 Caracterização dos insumos ativos.....	46
4.2.1.1 Teor.....	46
4.2.1.2 Identificação espectrofotométrica por ultravioleta (UV) infravermelho (IV)	47
4.2.1.3 Análise térmica	47
4.2.1.4 Densidade aparente e de compactação	47
4.2.1.5 Fluidez	48
4.2.1.6 Microscopia para determinação do diâmetro de Ferret	48
4.2.2 Desenvolvimento do veículo	48
4.2.2.1 Escolha dos componentes das preparações	48
4.2.2.2 Efeito do pH e de eletrólito no comportamento reológico	50
4.2.2.3 Avaliação da estabilidade física e microbiológica	50
4.2.2.4 Edulcoração e flavorização.....	50
4.2.2.5 Ensaio sensorial de palatabilidade em crianças.....	50
4.2.2.6 Avaliações da qualidade	52
4.2.3 Desenvolvimento de metodologia analítica espectrofotométrica para avaliação do teor de isoniazida, rifampicina e pirazinamida nas formulações de dose fixa combinada	52
4.2.3.1 Elaboração dos espectros de calibração.....	52
4.2.3.2 Espectros de validação.....	53
4.2.3.3 Avaliação dos dados para construção dos modelos.....	53

4.2.3.4 Validação do modelo	54
4.2.4 Estudos de pré-formulação	55
4.2.4.1 Efeito do dióxido de silício coloidal (aerosil) e do tempo de mistura sobre a densidade aparente e fluidez dos insumos ativos	55
4.2.4.2 Efeito do pH e ácido ascórbico sobre a estabilidade dos insumos ativos.....	56
4.2.4.3 Estudo de degradação forçada sobre os insumos ativos combinados.....	56
4.2.4.4 Análise térmica das misturas de insumos ativos entre si e com excipientes	57
4.2.4.5 Escolha do polímero para granulação.....	57
4.2.5 Desenvolvimento do pó para suspensão extemporânea	59
4.2.5.1 Preparação	59
4.2.5.2 Avaliação física da qualidade	59
4.2.5.3 Determinação do teor dos ativos	60
4.2.5.4 Avaliação da estabilidade do pó	60
4.2.5.5 Avaliação da estabilidade da suspensão reconstituída	60
4.2.6 Desenvolvimento do comprimido dispersível	60
4.2.6.1 Preparação	60
4.2.6.1.1 Caracterização física da mistura	61
4.2.6.2 Avaliação da qualidade.....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS INSUMOS ATIVOS	64
5.1.1 Teor.....	64
5.1.2 Identificação por infravermelho (IV) e por ultravioleta (UV).....	64
5.1.3 Análise térmica	67
5.1.4 Densidade aparente e de compactação	68
5.1.5 Ângulo de repouso.....	70
5.1.6 Observação microscópica dos fármacos.....	70
5.2 DESENVOLVIMENTO DE VEÍCULO PARA USO ORAL EM PEDIATRIA	71
5.2.1 Escolha dos componentes das preparações	72
5.2.2 Efeito da associação de polímeros sobre o comportamento reológico.....	74
5.2.3. Efeito da mudança do pH e concentração de sal sobre a viscosidade do veículo	78
5.2.4 Avaliação da estabilidade física e microbiológica	78
5.2.5 Edulcoração e Flavorização.....	81
5.2.6 Composição do veículo	84
5.2.7 Ensaio sensorial de palatabilidade em crianças saudáveis	84
5.3 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS FORMULAÇÕES DE DOSE FIXA COMBINADA CONTENDO ISONIAZIDA, RIFAMPICINA E PIRAZINAMIDA ..	87

5.4 FORMAS FARMACÊUTICAS DE DOSE FIXA COMBINADA CONTENDO ISONIAZIDA, RIFAMPICINA E PIRAZINAMIDA	94
5.4.1 Densidade aparente e de compactação	94
5.4.2 Ângulo de repouso.....	99
5.4.3 Estabilidade química dependente do pH e da presença de ácido ascórbico	104
5.4.4 Estudo de degradação forçada sobre os insumos ativos combinados.....	107
5.4.5 Análise térmica	110
5.4.6 Escolha do polímero para granulação / micropartículas.....	112
5.4.7 Pó para suspensão oral.....	120
5.4.7.1 Ensaio de reconstituição	124
5.4.7.2 Determinação do teor dos ativos	126
5.4.7.3 Avaliação da estabilidade do pó	127
5.4.7.4 Determinação da estabilidade da suspensão.....	131
5.4.8 Comprimido dispersível	134
5.4.8.1 Escolha da quantidade do desagregante	135
5.4.8.2 Adição de deslizante e lubrificante.....	136
5.4.8.3 Mistura e compressão	136
5.4.8.4 Determinação do teor dos ativos	139
5.4.8.5 Perfil de dissolução.....	140
5.4.8.6 Determinação da estabilidade da dispersão obtida com os comprimidos	141
5.4.8.7 Avaliação da estabilidade dos comprimidos	142
6. CONCLUSÕES	146
7. REFERÊNCIAS	148

1. INTRODUÇÃO

A carência de medicamentos desenvolvidos para uso em pediatria levou a Europa e os Estados Unidos a elaborarem diretrizes legais para estimular os estudos que levassem à correção desta distorção. Por serem iniciativas recentes, muita coisa ainda há que ser feita para suprir tão grande demanda, mas diversas ações têm mostrado resultados práticos, como demonstra o relatório “General report on experience acquired as a result of the application of regulation (EC) nº 1901/2006 on medicinal products for paediatric use”, datado de 2013, onde estão quantificados os ensaios clínicos realizados com produtos para uso em pediatria.

Apesar de todos os esforços, ainda são muitas as necessidades, incluindo aquelas de cunho regional, abrangendo doenças negligenciadas que quase sempre não despertam interesse da indústria farmacêutica. Diante disso, observando que a tuberculose é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e que o Brasil, apesar dos avanços demonstrados nos últimos anos, ainda registra elevada incidência da doença, especialmente quando associada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), e que as crianças também são afetadas e o país não dispõe de medicamentos adequados às suas necessidades, resolveu-se iniciar os estudos visando o desenvolvimento de formulações pediátricas contendo a associação de rifampicina, isoniazida e pirazinamida.

Algumas das formulações de tuberculostáticos destinadas aos pacientes pediátricos são disponíveis na Índia e na África, mas ainda não existem no Brasil e em diversos outros países. Em nosso país, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de caracterizar os fármacos empregados na associação de dose fixa combinada para tratamento da tuberculose, destacando-se os esforços de instituições como Farmanguinhos e Núcleo de Produção de Alimentos e Medicamentos (NUPLAM), chegando até a formulação de comprimidos contendo os três fármacos supra-citados e etambutol para uso em adultos.

Neste trabalho foram realizados estudos de caracterização físico-química de cada um dos três fármacos empregados no tratamento da tuberculose, tais como a determinação do ângulo de repouso e da densidade aparente, distribuição granulométrica, determinação do teor, observação microscópica, identificação por infra-vermelho. Ficou constatado o aspecto cristalino de cada um dos fármacos, porém com grandes diferenças de tamanho e formato dos cristais, evidenciando assim a necessidade de se proceder a uma redução visando à uniformização do tamanho das partículas, o que foi realizado através da trituração de cada um deles, separadamente, em moinho de bolas. Dessa forma, as misturas avaliadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) apresentaram respostas muito mais repetíveis do que aquelas

obtidas com as misturas realizadas com os sólidos antes da trituração, além de se apresentarem visualmente mais homogêneas do que as anteriores ao processo de trituração.

Foi desenvolvida a composição de um veículo para o carreamento de fármacos destinados a administração por via oral, em forma farmacêutica líquida, para atender a necessidade de pacientes pediátricos ou outros que não tenham condições de deglutir comprimidos. O veículo líquido foi depois trabalhado para se apresentar como forma sólida para reconstituição apenas pela adição de água, facilitando ainda mais a realização do processo de transformação de formas sólidas em formas líquidas para uso em pediatria. Caracterizado por um comportamento reológico pseudo-plástico, baixa viscosidade, elevada compatibilidade, sabor doce e baixo custo, o veículo denominado de Gute foi submetido a processo de patenteamento no Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Parte da composição do veículo sólido foi empregada na composição das formas sólidas contendo a associação dos fármacos rifampicina, isoniazida e pirazinamida.

A avaliação da qualidade em termos de teor e perfil de dissolução das composições que foram desenvolvidas, segundo o que consta nas farmacopeias consultadas, deveria ser realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em que a eluição é realizada por gradiente, com tempo de corrida em torno de 15 minutos para cada amostra. Considerando a necessidade de que as análises sejam realizadas em triplicata, e que a dissolução emprega 6 cubas, pode-se estimar que o tempo necessário para a análise completa seria de 15 (minutos) x 3 (triplicata) x 6 (cubas) = 270 minutos, que deveria ser somado ao tempo de lavagem do sistema antes e após sua utilização. Ou seja, certamente seriam utilizados mais de 5 horas nesse ensaio. Considerando ainda que a rifampicina é um fármaco sensível ao pH, à luz e ao oxigênio, e que sua combinação com isoniazida em meio ácido resulta num produto insolúvel, cuja formação é percebida logo nos primeiros 17 minutos de contato entre eles, verificamos a necessidade de desenvolvermos um método analítico cujo processamento da amostra e tempo de resposta fossem mais rápidos do que por CLAE. Desenvolvemos e validamos uma metodologia analítica espectrofotométrica por ultra-violeta (UV) capaz de permitir a dosagem concomitante dos três fármacos, em pouco tempo e com volume reduzido de solvente orgânico.

Finalmente, foram propostas e desenvolvidas duas formulações sólidas para uso oral em pediatria: sachê contendo pó para reconstituição e comprimido dispersível, que empregam processamento simples para o preparo e uso, já que para a obtenção deste último a compressão foi realizada diretamente sobre a mistura dos sólidos.

Permanece a dificuldade de se minimizar a interação entre rifampicina e isoniazida na formulação e após a administração, permitindo desse modo obter uma forma farmacêutica em

dose fixa combinada para uma só administração, cuja estabilidade e aspecto biofarmacêutico não sejam comprometidos pela interação entre os fármacos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TUBERCULOSE

Em estudo realizado no Rio de Janeiro, ALVES, SANT'ANNA e LA CUNHA (2000), investigaram todos os casos de TB envolvendo a população de crianças menores de 15 anos notificados à secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro no período de 1989 a 1993, e encontraram um total de 1.886 casos, com coeficiente de incidência de 27 por 100.000 habitantes. Em 2001, o total de casos registrados pelo SUS foi de 103.029 casos, com incidência da doença de 60,68 por 100.000 habitantes. Dentre os pacientes com tuberculose, as taxas por faixa etária foram as seguintes: menores de 5 anos (11,26%); de 5 a 9 anos (5,77%); e de 10-19 anos (25,78%). Conforme SANT'ANA et al (2002), o Brasil é um dos quatro países com maior número absoluto de casos de tuberculose (TB) no mundo.

Em 2004, o Brasil apresentou incidência global de TB de 41 casos por 100.000 habitantes, com 74.540 casos novos notificados. Desses, 52,8% eram casos pulmonares com baciloscopia positiva, 24,1% estavam em tratamento supervisionado, 63,5% eram provenientes de capitais ou das regiões metropolitanas e 54,9% eram casos curados. Excluindo-se os registros sem preenchimento da variável de desfecho, a proporção de cura alcançou 72,4% para casos novos, 47% para casos novos HIV positivos, 64,9% para recidivas, 64,5% transferências e 40% para reingressos após abandono (BIERRENBACH et al., 2007).

Em 2007, foram registrados 72 mil novos casos de tuberculose no Brasil, com uma média nacional de 38,2 por 100 mil habitantes. Além disso, 4,5 mil pessoas morreram em decorrência da doença. Do total de casos, 70% estavam concentrados em 315 dos 5.565 municípios. As maiores incidências ocorreram nos estados do Rio de Janeiro (73,27 por 100 mil), Amazonas (67,60), Pernambuco (47,79), Pará (45,69) e Ceará (42,12). A região Centro-Oeste apresentou a menor taxa do país – em Goiás, com 9,57 por 100 mil habitantes e no Distrito Federal, 12,09. (Brasil, 2014).

Apesar dos avanços demonstrados no combate e controle da TB ao longo dos últimos anos, demonstrado através da diminuição do número de novos casos, a incidência ainda merece bastante atenção, como se verifica com os investimentos feitos pelo governo brasileiro, que totalizam cerca de 11 milhões de reais em 2014, segundo o Ministério da Saúde.

A incidência entre os homens (cerca de 50 por 100 mil) é o dobro das mulheres. O maior número de casos se concentra na faixa etária de 20 a 39 anos. Já as populações mais vulneráveis são as indígenas (incidência quatro vezes maior do que a média nacional); portadores de HIV (30 vezes maior); presidiários (40 vezes maior); e moradores de rua (60 vezes maior). No entanto, há ocorrências em todos os segmentos da sociedade, independente da renda ou da escolaridade. Dentre os profissionais de saúde os riscos são maiores para os profissionais de enfermagem (3 a 20 vezes), seguido pelos demais que participam do processo de diagnóstico ambulatorial e laboratorial, alcançando também os acadêmicos (BRASIL, 2015).

A fonte de transmissão da infecção para as crianças é geralmente um adulto infectado residindo no mesmo ambiente familiar. Em alguns casos, a doença se manifesta rapidamente após alguns meses. O risco do desenvolvimento da doença aumenta quando a infecção primária ocorre antes dos 10 anos de idade, particularmente entre 0 e 4 anos e em crianças imunocomprometidas (WHO, 2006). Recomendam-se alguns critérios para o diagnóstico da doença em crianças, tais como história clínica detalhada (incluindo história dos contatos e de seus sintomas), exame clínico (inclusive com avaliação do crescimento), prova tuberculínica, confirmação bacteriológica (quando possível), informações relevantes de suspeita de TB pulmonar e extra-pulmonar e teste anti-HIV (em regiões de alta prevalência desta morbidade) (WHO, 2006).

A dificuldade para o diagnóstico da TB pulmonar na criança ocorre tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos. O fator crucial é o isolamento do bacilo, o qual é necessário para o diagnóstico definitivo. A OMS propôs um guia (WHO, 2006) denominado de *Guidance for National Tuberculosis Programmes on the Management of Childhood Tuberculosis in Children*, focalizando a conduta frente ao diagnóstico e tratamento de tuberculose na infância, para ser complementado às ações de programas nacionais de controle da TB em cada país (SANT'ANNA & HIJJAR, 2007).

No sentido de facilitar o diagnóstico na prática e porque, em geral crianças são paucibacilíferas, emprega-se no Brasil o sistema de pontuação para diagnóstico de TB na infância que prescinde de exames bacteriológicos. O sistema foi validado e apresenta boa sensibilidade e especificidade, superiores a 85% (SANT'ANNA et al., 2006).

A apresentação clínica da tuberculose nas crianças ocorre de forma variada e pouco característica que, geralmente, cursa com poucos bacilos, lesões sem grande extensão, deixando poucas sequelas (SANT'ANNA & HIJJAR, 2007). Quanto aos adolescentes, eles são mais susceptíveis a desenvolver a doença, devido às alterações hormonais e do metabolismo do cálcio que ocorre durante essa fase. O intervalo entre o período da infecção e a manifestação da

doença é menor do que nas demais faixas etárias, sendo que a forma pulmonar assemelha-se à forma apresentada pelo adulto com infiltração pulmonar nos terços superiores, cavidades, disseminação brônquica e sintomatologia respiratória. A hemoptise e sudorese noturna também podem estar presentes (LOPES et al., 2007). Em adolescentes já é possível a realização de exames de escarro para o diagnóstico de TB, pois são capazes de expectorar e a maioria é bacilífera.

A principal causa da multirresistência às drogas decorre da falta da qualidade da assistência prestada ao paciente, além da falta de interesse político em melhorar a qualidade de vida da população (TORRES & SANTA CRUZ, 2004). O maior desafio é garantir a adesão do paciente ao tratamento da TB desde o seu início até o final. Dessa forma, especula-se que o problema não é só o paciente que é refratário ao tratamento, mas também o serviço ineficiente que não garante uma qualidade na prestação de assistência ao doente, não bastando a presença do médico, sendo também necessária a presença de uma equipe multidisciplinar devidamente qualificada (DALCOMO, ANDRADE, PICON, 2007).

Para aumentar ainda mais a dificuldade do tratamento da TB, estudos realizados por PINHEIRO et al (2006) e por BARROSO et al (2009) demonstram que ocorre redução da permeabilidade intestinal dos pacientes debilitados em decorrência da TB, HIV ou outras causas (desnutrição, alcoolismo), o que reduz a biodisponibilidade dos fármacos empregados no tratamento, levando ao surgimento de mais casos de multirresistência.

2.2 TUBERCULOSTÁTICOS ESSENCIAIS PARA CRIANÇAS

A TB é aceita como uma prioridade de saúde pública no mundo e, por isso, a OMS incluiu na lista de medicamentos essenciais para crianças (WHO Model List of Essential Medicines for Children, 2013) os tuberculostáticos etambutol, isoniazida, pirazinamida e rifampicina, que compõem o mesmo quadro básico do tratamento da TB em adultos. O Quadro 1 mostra as apresentações padronizadas pela OMS, ressaltando-se a presença de formulações líquidas. Além de monodrogas nota-se a inclusão de duas associações medicamentosas na forma sólida, rifampicina+isoniazida, em duas concentrações distintas e rifampicina+isoniazida+pirazinamida, em uma única concentração. A estreptomicina injetável foi incluída para o tratamento da TB meningítica e da reativação de TB. Outros antimicrobianos foram reservados como segunda linha, para o tratamento de TB multirresistente (MDR-TB).

As combinações em doses fixas foram incluídas, apesar de não haver evidências clínicas para o seu uso em crianças, tendo em vista a necessidade de facilitar a adesão ao tratamento.

Foram selecionadas para a Lista de Medicamentos Essenciais para Crianças as combinações em doses mais baixas encontradas em alguns países, porém outras poderão ser necessárias. Para se determinar qual seria a combinação mais apropriada e quais as concentrações mais adequadas dos seus componentes, seria necessário obter e analisar dados farmacocinéticos estratificados por peso e idade das crianças, o que não foi realizado ou publicado ainda.

Quadro 1- Tuberculostáticos de primeira linha presentes na lista de medicamentos essenciais para crianças.

Medicamentos	Apresentações
Etambutol	Líquido oral 25 mg/mL Comprimido 100 mg; 400 mg (cloridrato)
Isoniazida	Líquido oral 50 mg/5 mL Comprimido 100 mg; 300 mg Comprimido (sulcado) 50 mg
Pirazinamida	Líquido oral 30 mg/mL Comprimido 400 mg Comprimido (dispersível) 150 mg Comprimido (sulcado) 150 mg
Rifampicina	Cápsula ou comprimido de 150 mg; 300 mg Solução oral 20 mg/mL
Rifampicina + isoniazida	Comprimido de 60 mg + 30 mg Comprimido 60 mg + 60 mg
Rifampicina + isoniazida + pirazinamida	Comprimido 30 mg + 60 mg + 150 mg
Estreptomicina	Pó para injeção 1 g por frasco (como sulfato)

Ref: Lista de Medicamentos essenciais para crianças – OMS, 2013

No Brasil, a 7ª edição da Relação de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2010) incluía para uso em crianças, etambutol solução oral 25 mg/mL, pirazinamida solução oral 30 mg/mL e rifampicina suspensão 20 mg/mL. Porém, desde na 8ª edição e 9ª edição (2014) da mesma relação, a solução de etambutol foi suprimida. A combinação isoniazida+rifampicina existe em cápsulas em duas concentrações para uso em adultos (Quadro 2).

Quadro 2 - Tuberculostáticos presentes na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do Brasil.

Denominação genérica	Apresentação 2010	Apresentação 2014
Sulfato de estreptomicina	Pó para solução injetável 1g	Pó para solução injetável 1g
Cloridrato de etambutol	Comprimido 400 mg Solução oral 25 mg/mL	Comprimido 400 mg
Etionamida	Comprimido 250 mg	Comprimido 250 mg
Isoniazida	Comprimido 100 mg	Comprimido 100 mg
Isoniazida + Rifampicina	Cápsula 75 mg + 150 mg Cápsula 100 mg + 150 mg Cápsula 200 mg + 300 mg	Cápsula 75 mg + 150 mg Cápsula 100 mg + 150 mg Cápsula 200 mg + 300 mg
Pirazinamida	Comprimido 500 mg Solução oral 30 mg/mL	Comprimido 500 mg Solução oral 30 mg/mL
Rifampicina	Cápsula 300 mg Suspensão oral 20 mg/mL	Cápsula 300 mg Suspensão oral 20 mg/mL
Rifampicina + Isoniazida + Pirazinamida + Cloridrato de etambutol	Cápsula 150 mg + 75 mg + 400 mg + 275 mg	Comprimido 150 mg + 75 mg + 400 mg + 275 mg

Ref: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME – 2010 e 2014)

A mais recente revisão da OMS sobre o tratamento de crianças com tuberculose estabelece que seja realizado segundo o esquema:

Rifampicina – 15 (10 a 20) mg/kg/dia

Isoniazida – 10 (10 a 15) mg/kg/dia

Pirazinamida – 35 (30 a 40) mg/kg/dia

O Comitê de experts sobre a seleção de medicamentos de uso essencial propôs que o comprimido em dose fixa combinada contendo 250 mg de rifampicina, 150 mg de isoniazida, 400 mg de pirazinamida e 250 mg de etambutol é o produto ideal para o regime de tratamento da fase intensiva da tuberculose em crianças entre 5 e 30 kg de peso corporal. Outras combinações trazem apenas os dois primeiros fármacos ou a combinação dos três primeiros fármacos. (WHO, 2009).

2.3 CARÊNCIA DE FORMULAÇÕES PEDIÁTRICAS: O CASO DA TUBERCULOSE

As crianças têm peculiaridades fisiológicas que as diferem dos adultos e estão classificadas em sub-grupos etários caracterizados pelo grau de desenvolvimento dos órgãos e funções. Essas características incidem sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica, criando a necessidade da realização de estudos clínicos envolvendo as sub-populações alvo do tratamento, bem como a necessidade de desenvolvimento de formulações adequadas a cada faixa etária (STEPHENSON 2006, SANTOS et al 2008).

O grau de dificuldade para o desenvolvimento de estudos clínicos em crianças é bem maior do que em adultos, envolvendo aspectos práticos, éticos e mesmo epidemiológicos. Além disso, de modo geral, a fração do mercado representada por esse grupo etário, não é atrativa economicamente para a indústria farmacêutica, o que explica, ainda que não justifique, a reduzida disponibilidade de medicamentos com evidências suficientes de eficácia e segurança em crianças, bem como a carência de formulações pediátricas (MILNE & BRUSS 2008; COSTA, COELHO, REY 2009).

A carência de formulações apropriadas para uso pediátrico é um problema mundial que começou a ser enfrentado muito recentemente pelas autoridades sanitárias dos países desenvolvidos, mas ainda não tem uma resposta adequada da indústria farmacêutica (STEPHENSON 2006; COSTA, COELHO, REY 2009). A existência de formulações apropriadas facilita a administração e o cumprimento dos tratamentos e evita perdas desnecessárias, favorecendo os benefícios terapêuticos e reduzindo os custos em saúde. Uma formulação ideal teria facilidade de preparo pelo farmacêutico e administração pela enfermeira/cuidador, concentração e volume suficientes para obtenção da medida ou da dosagem necessárias, sabor agradável, e dados científicos que respaldassem o preparo e a determinação do prazo de validade. Preparações líquidas seriam as mais adequadas para uso em crianças, devido à facilidade de ajuste das doses e das características organolépticas, bem como a facilidade na deglutição e administração (PEZZANI 1993; T JONG et al 2003); no entanto, apresentam desafios e inconvenientes quanto à palatabilidade, estabilidade, transporte e armazenamento dos produtos (COSTA, COELHO, REY 2009). Quanto às formulações extemporâneas, mesmo quando preparadas adequadamente, é difícil assegurar a sua estabilidade, pela ausência de testes para comprovar sua qualidade, segurança e eficácia (LAVANDERIA, 2002).

O número de medicamentos e/ou de tomadas é um outro fator que interfere negativamente na adesão aos tratamentos, mesmo em adultos. Em crianças a dificuldade é ainda maior, principalmente em se tratando de formulações sólidas de difícil deglutição; no caso das formulações líquidas, a palatabilidade é o grande desafio para a aceitação das crianças sem comprometer as características do produto ou introduzir fatores de risco para alergias e outros eventos adversos (NUNN et al 2009).

Por outro lado, o desenvolvimento de formulações combinadas foi desencorajado durante muito tempo devido aos problemas de sub ou sobredoses relacionados à impossibilidade de ajustes, dificuldades relativas às reações adversas, alergias etc. No entanto,

a emergência da AIDS trouxe de volta a necessidade de desenvolvimento de combinações medicamentosas, o que vem se estendendo a outras doenças como malária e a própria TB. O tratamento empregando associações de substâncias para tratar TB visa impedir a seleção e multiplicação de microrganismos naturalmente resistentes a cada um dos agentes associados (BRASIL, 2011).

No Brasil, o tratamento da tuberculose é padronizado pelo Ministério da Saúde e os medicamentos são distribuídos pelo SUS através de seus postos municipais de atendimento. O esquema terapêutico de primeira linha, para crianças menores de 10 anos, é denominado RHZ e inclui três medicamentos: rifampicina (R), isoniazida (H) e pirazinamida (Z). Nos 2 primeiros meses utiliza-se o esquema RHZ, seguido nos 4 meses seguintes da administração de isoniazida e rifampicina. A cura usando o esquema preconizado por 6 meses, no sistema público de saúde, aproxima-se de 100% quando o medicamento é utilizado de forma regular, ou seja, todos os dias. Além disso, no caso de recém-nascidos provenientes de famílias onde exista caso de tuberculose, é necessário o uso da isoniazida na dose de 10 mg/kg durante 3 meses, avaliar e decidir se o tratamento profilático pode ser suspenso ou precisa ser continuado por mais 3 meses. Como a forma farmacêutica contendo isoniazida é apenas o comprimido de 100 mg, a sua utilização é mais do que inconveniente nesses casos comuns (BRASIL, 2011).

A partir de busca realizada no site de pesquisa *bulasmed.com.br*, *CD PDR Vademecum* e no *Formulário Terapêutico Nacional* (FTN 2008), verificou-se que a associação isoniazida e rifampicina só estava disponível no Brasil na apresentação de cápsula nas dosagens de rifampicina 300 mg + isoniazida 200 mg, bem como rifampicina 150 mg + isoniazida 100 mg (meia dose). Porém, com a interrupção da fabricação destes, passou a ser utilizado o comprimido com a associação rifampicina 150 mg + isoniazida 75 mg (RENAME 2014).

A isoniazida pode ser utilizada por crianças considerando o seu peso, já a sua associação com rifampicina é contra-indicada para crianças com menos de 20 kg ou idade inferior a 5 anos pela impossibilidade do ajuste de doses. No Brasil, a menor dose da isoniazida disponível é de 100 mg por comprimido, enquanto que no Reino Unido existem comprimidos de 50 mg e, para crianças menores, sugere-se seu uso extemporâneo. As associações medicamentosas disponíveis internacionalmente para o tratamento da tuberculose são: isoniazida 50 mg + rifampicina 120 mg + pirazinamida 300 mg; isoniazida 100 mg + rifampicina 150 mg; isoniazida 150 mg + rifampicina 300 mg. No Brasil, a forma associada isoniazida 100 mg + rifampicina 150 mg é preparada na forma de cápsulas e não é recomendada para crianças abaixo de 5 anos.

Em levantamento realizado sobre a necessidade de formulações pediátricas no Brasil comparativamente ao disponível em outros países, Costa e cols. 2009, identificaram a carência das seguintes formulações para o tratamento da TB: isoniazida comprimidos de 50 mg e rifampicina injetável 600 mg/mL (COSTA, COELHO, REY 2009).

No continente africano e na Ásia estão concentradas as indústrias que mais atuam no mercado de produção de medicamentos voltados ao tratamento da tuberculose, tais como: Cosmos Limited (Quênia), Sandoz (África do Sul), Svizera Labs (Índia), Lupin Ltd (Índia), Macleods Pharmaceuticals (Índia), Sanofi-Aventis Pharma (África do Sul), incluindo produtos destinados ao uso por pacientes pediátricos, como comprimidos dispersíveis. (Ministry of public health and sanitation and Ministry of medical services, Kenya, 2012).

É inquestionável que a via de administração mais cômoda para o paciente é a via oral, sendo a via naturalmente utilizada para a ingestão de alimentos. Para uso em pediatria a forma farmacêutica deveria ser líquida, apresentada como solução ou suspensão, propiciando assim condições para a flexibilização da dose de acordo com o peso, área de superfície corporal ou idade do paciente. No entanto, tanto do ponto de vista de via de administração quanto de forma farmacêutica, vão existir fatores que dificultam ou até inviabilizam sua utilização, tais como o sabor desagradável de diversos fármacos, a instabilidade quando na forma líquida e/ou frente ao suco gástrico, a baixa biodisponibilidade do fármaco quando administrada por via oral, disponibilidade e/ou aceitação do paciente quanto ao uso do medicamento, irritabilidade do fármaco sobre o trato gastro-intestinal etc.

Do ponto de vista de forma farmacêutica, a apresentada na forma líquida apresenta-se normalmente com menor estabilidade química, física e microbiológica que as formas sólidas, requerem maior quantidade e variedade de componentes, ocupam maior volume e estão mais sujeitas a desperdícios por quebra e/ou vazamento da embalagem. Além disso, o sabor do medicamento na forma líquida é imediatamente perceptível ao ser administrada, juntamente com outras características demonstradas como importantes, como a textura/consistência, a cor, e o sabor residual após a ingestão (CRAIG et al, 2009).

Em dezembro de 2000, o parlamento europeu se posicionou de forma favorável quanto à necessidade de uma resolução sobre melhores medicamentos para crianças na Europa. A Agência europeia de medicamentos (EMA) iniciou em 2005 o estudo sobre as formulações de escolha para a população pediátrica, que foi concluído em julho de 2006 e adotado a partir de setembro do mesmo ano (EMA/CHMP/PEG/194810/2005) (EC nº 1901/2006) como parte dos esforços iniciados pela comissão europeia em 2004 em regulamentar os medicamentos para uso em pediatria (Pediatric Investigation Plans). No documento fica demonstrada, em caráter

de orientação, que as formas farmacêuticas líquidas destinadas ao uso oral conseguem atender à demanda de toda a faixa etária da população pediátrica.

De forma semelhante à iniciativa europeia, a Food and Drug Administration (FDA-USA), também legislou a favor da necessidade da realização de ensaios clínicos para o desenvolvimento de formulações destinadas ao uso pediátrico (Pediatric Study Plans), incentivando as empresas farmacêuticas através da extensão do direito de patente sobre fármacos já comercializados. Dessa forma tem se observado o crescente número de ensaios clínicos realizados com a participação de crianças. Do mesmo modo, diversos grupos organizados têm sido criados com objetivos comuns relacionados à obtenção de melhores medicamentos para crianças, envolvendo diferentes formas farmacêuticas, uso de excipientes seguros e que apresente palatabilidade adequada ao uso em pediatria.

2.4 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO COMBINADA DE RIFAMPICINA, ISONIAZIDA E PIRAZINAMIDA: DIFICULDADES PRÁTICAS

O desenvolvimento de uma formulação farmacêutica comporta basicamente: estudos de pré-formulação, onde são avaliadas as incompatibilidades entre os componentes e são buscadas as condições para evitá-las ou corrigi-las, além da escolha dos excipientes segundo a forma de apresentação e de administração do produto. Em seguida, busca-se avaliar qual a influência que os componentes das combinações propostas exercem sobre os parâmetros de qualidade do produto, incluindo a cinética de liberação e dissolução dos ativos. Depois de quantificada a influência, busca-se otimizar a formulação de modo a se obter o produto com as características desejadas do ponto de vista terapêutico. Escolhidos os excipientes e o material de acondicionamento, passa-se a formular o produto em quantidade suficiente para sua submissão ao ensaio de degradação acelerada de forma a se prever o prazo de validade do mesmo (GIBSON, 2004).

No caso de formulação pediátrica, ainda, há necessidade de incluir uma etapa voltada à correção do sabor dos ativos para tornar palatável a preparação a fim de evitar o abandono do tratamento (NUNN *et al*, 2009). Como as faixas etárias dos pacientes que possuem TB é muito variável, deve-se considerar, também, o aspecto referente à dosagem do produto no momento da administração, devendo-se prever a necessidade de ajustes da quantidade dos ativos a ser disponibilizada para diferentes idades e pesos dos pacientes (WHO, 2006).

Quando se trata de um produto com patente expirada, na verdade, esse desenvolvimento é simplificado, pois já se conhece as características da substância frente a diversos insumos comumente empregados na formulação das formas tradicionalmente usadas, que, no caso de medicamentos contra tuberculose se apresentam como cápsulas e comprimidos. Porém, as dificuldades técnicas a serem vencidas, em termos de adaptações de dosagem para diferentes pacientes e a correção do sabor/palatabilidade, exigem que sejam usados excipientes e processos adequados às respectivas finalidades (NUNN e WILLIAMS, 2004; NUNN *et al*, 2009).

No caso presente, do ponto de vista biofarmacêutico, será necessário corrigir incompatibilidade já conhecida entre a rifampicina e a isoniazida em meio ácido estomacal, que pode ser realizada através da utilização de polímero que promova uma maior demora na liberação de um dos ativos em relação ao outro, permitindo que os dois sejam administrados concomitantemente, mas liberados em momentos distintos (SING *et al*, 2000; SING *et al*, 2001).

Sobre esse problema, SINGH *et al.*, 2001, discutindo as prováveis razões para a baixa e variável biodisponibilidade da rifampicina em preparações de dose fixa combinada, ressaltam o efeito produzido pela acidez e a presença concomitante da isoniazida, apontados como os principais causadores dos problemas de absorção. Os autores concluíram que é muito mais importante que o tamanho das partículas de rifampicina seja menor que 100 μm do que o arranjo cristalino do fármaco. No que se refere à variabilidade interindividual, o tempo de residência gástrica e a acidez são apontados como principais determinantes. Os autores também afirmam que a decomposição da rifampicina no estômago antes da absorção é um forte fator que contribui para falhas no tratamento e surgimento de resistência. Como estratégias no desenvolvimento de formulações combinadas sugerem: proteção da rifampicina contra a ação do suco gástrico, administração simultânea de alcalinizante solúvel com o uso de aditivos específicos na formulação, e liberação diferenciada de rifampicina e isoniazida.

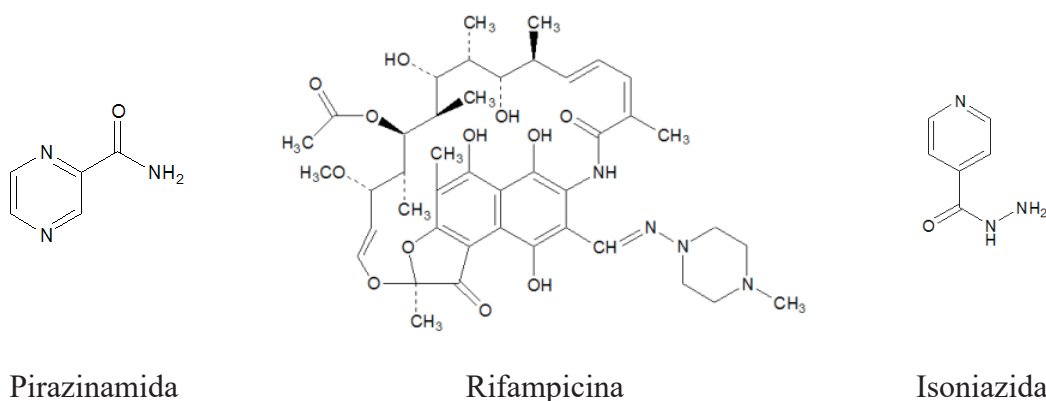
Outros autores, AGRAWAL *et al*, (2004a) consideram que o problema da biodisponibilidade irregular da rifampicina estaria mais relacionado a fatores extrínsecos, tais como a formulação ou a matéria-prima, e não à variabilidade intrínseca da absorção da mesma, o que seria agravado nas formulações em dose fixa combinada. Em trabalhos posteriores, os mesmos pesquisadores conseguiram provar a bioequivalência entre a formulação em dose fixa combinada quando comparada com a administração isolada dos mesmos componentes, demonstrando ser possível e mais fácil de transportar, dispensar e administrar um medicamento contendo todos os ativos necessários ao tratamento (AGRAWAL *et al*, 2004c).

No entanto, para uso em crianças uma fórmula líquida contendo os ativos combinados só apresentou estabilidade para a pirazinamida, exigindo ainda condições de conservação em baixa temperatura para que a rifampicina apresentasse alguma estabilidade, o que não foi conseguido para a isoniazida (SINGH et al, 2001), demonstrando a dificuldade de se chegar a uma formulação líquida. Assim sendo, os desafios que se apresentam para o desenvolvimento de formulação combinada de rifampicina, isoniazida e pirazinamida, ou destas com etambutol, para administração a crianças, consistem em encontrar condições que reduzam a possibilidade de interação entre os componentes durante a estocagem e durante o tempo de permanência no estômago, que deve ser abreviado para início rápido de ação, e permitir que a biodisponibilidade não seja significativamente afetada, além de ter que se apresentar palatável e com facilidade de ser dosificada e administrada.

2.5 INFORMAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS SOBRE OS ATIVOS

Os insumos farmacologicamente ativos empregados no tratamento da tuberculose e utilizados no presente trabalho foram pirazinamida, rifampicina e isoniazida, cujas estruturas químicas estão representadas a seguir, na Figura 1.

Figura 1 –Estrutura química dos tuberculostáticos utilizados no desenvolvimento deste trabalho (MERCK, 2001)



Fonte: The Merck Index, 13rd Ed.

Pirazinamida, Pirazinacarboxamida, possui CAS: 98-96-4, fórmula C₅H₅N₃O, peso molecular 123,11, apresenta-se como pó cristalino branco ou quase branco, inodoro ou praticamente inodoro, de sabor ligeiramente amargo (FELDER & PITRE, 1983).

O espectro UV da pirazinamida em diferentes solventes apresenta os seguintes comprimentos de onda de máxima e de mínima absorção, com os respectivos coeficientes de extinção molar (Quadro 3):

Quadro 3 - Comprimentos de onda de máximo e de mínimo no espectro UV da pirazinamida em diferentes solventes.

Solvente	λ max (nm)	ϵ (max)	λ min (nm)	ϵ (min)
Água	209	8765 ± 22	238,5	2000
	269	8036 ± 20	294	480
	310	611 ± 10		
Metanol	269	7900	235	1600
	320	530	296,5	280
Clorofórmio	322	530	269	7500
			298	250
NaOH 0,1M	268,5	7950	238,5	1500
	310	640	295	540
HCl 0,1M	209	8000	238,5	2000
	269	8200	295	510
	310,5	620		

Fonte: FELDER & PITRE, 1983

É importante observar que a pirazinamida apresenta máxima absorbância em 269 nm em água, em metanol, e em HCl 0,1M, e em 268,5 nm em NaOH 0,1M, ocorrendo deslocamento hipocrômico da água para NaOH 0,1M e para metanol, e deslocamento hiperocrômico para o HCl 0,1M. Isso já sugere a necessidade de se fixar as condições de ensaio quanto a natureza do solvente e o seu valor de pH de modo a não ocorrer interferência destes fatores externos na avaliação da qualidade dos produtos formulados com a pirazinamida.

A pirazinamida pode ocorrer em 4 (quatro) formas polimórficas, α -pirazinamida obtida a partir da cristalização em etanol ou de solução hidro-etanólica à temperatura ambiente; β -pirazinamida obtida a partir do etanol a 0°C; γ -pirazinamida, obtida por fusão; e δ -pirazinamida obtida a partir da mistura de uma solução do fármaco em nitrometano a 80-140°C vertida sobre tetraclorometano à temperatura ambiente, ou a partir de uma solução em hexano-acetato de etila. Os intervalos de fusão para as formas α , β , γ e δ são, 188-193°C, 187-189°C, 185-189°C e 188°C, respectivamente, o que está de acordo com o especificado no ensaio de qualidade descrito em farmacopeias (FELDER & PITRE, 1983).

Através do uso de outras condições, como acetonitrila, tetrahidrofurano, liofilização e sublimação, é possível a obtenção das diferentes formas polimórficas a partir da forma α , como está descrito por CASTRO et al, 2010. A forma comercialmente disponível é a forma α .

A pirazinamida é classificada como classe III no sistema de classificação biofarmacêutica, pois tem alta solubilidade e baixa permeabilidade ($c\text{LogP} = -0,68$; $\log\text{P} = -0,6$) (BCS DATABASE, 2013).

Rifampicina, Rifampin, é denominada preferencialmente como 3-[[[4-metil-1-piperazinil)imino]metil]rifamicina SV, com a denominação IUPAC de 2,7-(epoxipentadeca [1,11,13] trienimino) nafto [2,1-b] furan-1,11 (2H) -diona, 5,6,9,17,21 -hexahidroxi-23-metoxi-2,4,12,16,18,20,22-heptametil-8- [N- [4-metil-1-piperazinil) formimidoil]-21-acetato (GALLO & RADAELLI, 1976), e, mais recentemente, de acetato de (7S,11S,12R,13S,14R,15R,16R,17S,18S,19Z,21Z) -2,15,17,27,29 -pentahidroxi -11 -etoxi-3,7,12,14,16,18,22-heptametil-26- [(E)-N- (4-metilpiperazin-1-il)carboxi-midoil]-6,23-dioxo-8,30-dioxa-24-azatetraciclo [23.3.1.1.0] triaconta-1,3,5 (28), 9,19,21,25(29),26-octaen-13-il (FERREIRA et al, 2014).

Consiste de um núcleo cromofórico denominado naftohidroquinona, junto de uma cadeia alifática denominada ansa, ligada a uma cadeia lateral piperazínica. Possui CAS: 13292-46-1, fórmula $\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{12}$, peso molecular 822,95, apresenta-se como pó cristalino vermelho-alaranjado, inodoro. Mesmo possuindo 9 carbonos assimétricos e 3 duplas ligações na porção alifática, apenas um isômero é produzido pelo microrganismo *Streptomyces mediterranei* (GALLO & RADAELLI, 1976) (o nome da espécie foi modificado para *Nocardia mediterranei* (1969), *Amycolatopsis mediterranei* (1986) e, mais recentemente para *Amycolatopsis rifamycinica* (2004)) (BALA et al, 2004).

Rifampicina sofre decomposição ao fundir entre 183 e 188°C. O polimorfo I, como caracterizado por FERREIRA et al (2014) foi termicamente estável até cerca de 230°C, sofrendo decomposição em três etapas: a 250°C com perda de massa de 23,3%, depois a 287°C com perda de massa de 13,5% e depois a 488°C com perda de massa de 62,8%.

A solubilidade da rifampicina em diferentes solventes é apresentada no Quadro 4.

Quadro 4 - Solubilidade da rifampicina em diferentes solventes.

Solvente	Solubilidade (mg/mL)	Temperatura (°C)
Clorofórmio	349	25
Diclorometano	216	25
Acetato de etila	108	25
Dioxano	39	25
Metanol	16	25
Acetona	14	25
n-Hexano	0,43	25
Éter de petróleo	0,33	25
Água pH 7,3	2,5	25
Água pH 4,3	1,3	25
Água pH 7,5	2,8	Ambiente
Água pH 2,0	99,5	Ambiente
HCl 0,1M	200	37
Tampão fosfato pH 7,4	9,9	37

Fonte: GALLO & RADAELLI, 1976

Rifampicina é estável na forma de pó quando armazenada em frasco bem fechado, mesmo quando armazenada a 70 °C. Na forma de solução, em meio alcalino sofre desacetilação, sem perda substancial da atividade antimicrobiana. Em meio moderadamente alcalino e exposto ao oxigênio, transforma-se em rifampicina-quinona, que pode ser evitado pela presença de ascorbato de sódio. Degrada-se rapidamente em meio ácido e em meio alcalino, mas lentamente em meio neutro. O principal produto de decomposição em meio aquoso ácido é 3-formilrifampicina SV (GALLO & RADAELLI, 1976).

A rifampicina é classificada como classe II no sistema de classificação biofarmacêutica, pois tem baixa solubilidade e alta permeabilidade (cLogP = 2,49; logP= 2,7) (BCS DATABASE, 2013).

Isoniazida, hidrazida do ácido nicotínico, isonicotinoilhidrazina, hidrazida do ácido 4-piridinocarboxílico, possui CAS: 54-85-3, fórmula $C_6H_7N_3O$, peso molecular 137,14, apresenta-se como pó cristalino branco ou incolor, inodoro, com sabor inicialmente doce e depois amargo (BREWER, 1977). O quadro 5 apresenta os comprimidos de onda de máxima

absorbância e alguns ombros em diversos solventes, e as respectivas absorvidades específicas (A 1%, 1cm) para a isoniazida.

Quadro 5 - Comprimentos de onda de máximo no espectro UV da isoniazida em diferentes solventes

Solvente	λ (nm)	A 1%, 1cm
HCl 0,01M	213 (max)	437
	265 (max)	417
Água	261 (max)	306
	208 (ombro)	
NaOH 0,01M (imediatamente)	266 (ombro)	293
	272 (max)	298
	295 (max)	284
NaOH 0,01M (após 2 horas)	256 (max)	173
	262 (max)	170
	325 (max)	76

Fonte: BREWER, 1977

A faixa de fusão da isoniazida é entre 170 e 174 °C. A solubilidade da isoniazida em água é de 14 g em 100 mL de água a 25 °C, e chega a 26 g em 100 mL de água a 40 °C. Apresenta-se estável na forma sólida, mas em solução sofre decomposição em cinética de primeira ordem sob ação do pH distante da neutralidade, de agentes oxidantes, por interação com agentes redutores e, intensamente por complexação com cátions metálicos bivalentes (BREWER, 1977).

A isoniazida é classificada como classe III no sistema de classificação biofarmacêutica, pois tem alta solubilidade e baixa permeabilidade ($c\text{LogP} = -0,67$; $\log P = -0,7$) (BCS DATABASE, 2013).

2.6. SOBRE OS ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO

Antes da realização dos ensaios visando o desenvolvimento de um medicamento é imprescindível conhecer os insumos que estão sendo utilizados quanto às suas características físicas e químicas que possam implicar na qualidade do que será desenvolvido. Deste modo, caracterizar os fármacos do ponto de vista da sua identidade, do teor de cada um dos fármacos

e sua compatibilidade com excipientes constitui a etapa inicial do desenvolvimento. Além disso, é também necessário caracterizar a qualidade do que vier a ser desenvolvido. A seguir procurou-se chamar a atenção para alguns dos itens de caracterização que serão utilizados e que merecem questionamentos.

2.6.1 Ensaios de doseamento

Desde o advento dos insumos ativos rifampicina, isoniazida e pirazinamida, muitos ensaios de avaliação da qualidade em termos de teor vêm sendo utilizados, envolvendo técnicas desde volumétricas (titulação em meio não aquoso), espectrofotometria UV/VIS, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE = HPLC), aplicável às mais diversas formas de apresentação, quer seja em forma sólida ou em forma líquida (USP 38; BP 2013; FB 5; JP 16). A avaliação de teor dos insumos realizada de forma isolada não representa, portanto, dificuldade técnica para sua realização. Porém, quando se faz necessário determinar o teor dos insumos numa mistura a dificuldade aumenta e as técnicas empregadas devem ser capazes de individualizar e efetivamente demonstrar a quantidade de cada um deles presentes na amostra. Evidencia-se assim a necessidade de se empregar técnicas um pouco mais elaboradas, tais como a espectrofotometria UV/VIS diferencial e/ou derivada (BENETTON et al, 1998; MADAN, DWIVEDI, SINGH 2005, MEKURIA, MOHAMMED, HYMETE 2008), espectrofotometria IR próxima (NEVES et al, 2012), Quimioluminescência em fluxo contínuo (BAOXIN LI et al, 2005), HPTLC (ALI et al, 2007) e mais frequentemente, HPLC em gradiente (USP 38; BP 2013; FB 5; JP 16).

Mesmo com o acesso e uso cada vez maior de recursos de informática, com a automação de processos, de controle de equipamentos, além do registro e processamento dos dados, que torna mais fácil e confiável a utilização dos tais equipamentos, o doseamento envolve uma outra etapa muito importante: a preparação da amostra até o momento do uso do equipamento. Para uso do HPLC, inclui-se ainda o preparo das fases móveis para o sistema gradiente (mistura, degaseificação, filtração), equilíbrio prévio do equipamento, tempo de corrida de cada amostra empregada como referência, avaliação da amostra e o tempo destinado à limpeza do equipamento pós-corridas (KAZAKEVICH e LoBRUTTO, 2007).

O emprego da espectrofotometria no doseamento de múltiplos fármacos, especificamente para o caso dos ativos contra tuberculose, foi realizado por GOICOECHEA e OLIVIERI (1999) na dosagem de rifampicina, isoniazida e pirazinamida em comprimidos, conseguindo a resolução da mistura através da análise de regressão por PLS-1, que se mostrou melhor do que o uso da classical least square (CLS). Os autores encontraram ótimos resultados

de coeficiente de correlação para a rifampicina, pirazinamida e isoniazida, sendo respectivamente de 0,9990, 0,9996 e 0,9910, mas o erro relativo de previsão para a isoniazida ficou em 5,40%. Além disso, foi necessário o uso de softwares específicos (Sigmaplot – Systat Software) e um chegou a ser elaborado pelos autores empregando a linguagem de programação Quick Basic (Microsoft) para ser utilizado na avaliação, o que pode exigir treinamento adicional para quem vier a aplicar o método a esta ou a outras associações de fármacos.

Assim, o uso de técnica analítica que torne mais rápido o acesso à informação sobre a qualidade da mistura é de muita utilidade, sobretudo se considerarmos um processo produtivo que adote o PAT (Process Analytical Technology) inserido no conceito de QbD (Quality by Design), em que o monitoramento da qualidade é realizado in-line. (RANTANEN et al, 2005)

2.6.2 Análises térmicas

O emprego das técnicas termo-analíticas na caracterização de fármacos vem sendo realizado há bastante tempo e, especificamente no caso dos que são empregados no tratamento da tuberculose diversos trabalhos já foram realizados buscando evidenciar os polimorfos da isoniazida, da pirazinamida e, com mais ênfase, da rifampicina. As mais empregadas são a calorimetria de varredura diferencial (DSC) e a termogravimetria (TG) e sua derivada (DTG). A primeira mostra os eventos térmicos relacionados ao consumo ou produção de energia, respectivamente denominados eventos endotérmicos ou exotérmicos, tais como ponto de fusão, recristalização, transição vítrea, decomposição. A segunda mostra os eventos relacionados a variação da massa, tais como a perda de água ou de outro solvente presente na amostra, reação em que ocorra variação de massa (hidrólise, redução, oxidação), e decomposição.

Estas mesmas técnicas têm sido amplamente empregadas nos ensaios de pré-formulação em busca de evidenciar a compatibilidade entre fármacos e entre fármacos e excipientes, visando reduzir incompatibilidades que levem a curto prazo de validade ou que influenciem na qualidade biofarmacêutica do produto. Dentre estes trabalhos, destacamos alguns relacionados aos fármacos empregados no tratamento da tuberculose, como a dissertação de Ricardo Alves (USP-2007) orientado pelo Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos, Edilene Pereira Lavor (UFRN-2010) orientada pelo Prof. Dr. Tulio Flávio Accioly de Lima e Moura, além de diversos artigos científicos originados destas e de outras pesquisas. Como exemplos citamos AGRAWAL et al, 2004a; FREIRE et al, 2009; LAVOR et al, 2014.

A primeira dissertação trata do estudo de caracterização da rifampicina, diferenciando o polimorfo I e II, empregando DSC, TG/DTG, DTA, IV, DRX de pó, além de avaliar o efeito

da combinação dos dois polimorfos com diversos excipientes: amido, celulose, lactose, hipromelose, povidona, macrogol 6000 e eudragit L100. A segunda realizou um estudo térmico dos fármacos isolados (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol), em combinações dois a dois, em combinações três a três e em combinações contendo os quatro fármacos, incluindo ainda a presença de excipientes como a celulose microcristalina, lactose, estearato de magnésio e talco. Um outro trabalho contendo informações de análise térmica da rifampicina é o de AGRAWAL et al (2004a), que além de realizar a caracterização térmica de dois polimorfos e do amorfo, avaliou a qualidade térmica de diversas amostras comerciais do ativo.

Todos verificaram que a rifampicina na forma I é mais estável que na forma II, pois esta última sofre fusão (184-197 °C) seguida de imediata recristalização (197-222 °C) na forma I e, neste processo se inicia a decomposição, que prossegue mais intensamente a partir da temperatura de 236 °C na forma II e de 255 °C na forma I. Os últimos autores perceberam que o insumo disponível no mercado farmacêutico é normalmente constituído por mistura dos dois polimorfos em diferentes proporções, junto com o amorfo. A completa caracterização destes insumos só pode ser realizada com o uso simultâneo de técnicas termo-analíticas, infravermelho e difração de raios X de pó.

Dos ensaios realizados entre os componentes da formulação contra tuberculose, foi constatada a interação entre a isoniazida e a rifampicina, de forma que a fusão do primeiro fármaco ocorre em temperatura inferior àquela da substância isolada, havendo também a supressão do evento devido a fusão da rifampicina. Isso sugere que tenha havido a formação de um eutético entre os dois fármacos. De forma semelhante, a combinação entre rifampicina e pirazinamida avaliada em DSC e TG/DTG apontam para uma interação entre os fármacos, evidenciado pela ausência dos pontos de fusão característicos dos dois, redução das temperaturas em que ocorre a decomposição térmica dos fármacos e até a ausência da transição polimórfica da pirazinamida. O mesmo é observado para a combinação entre isoniazida e pirazinamida, em que as endotermas de fusão ocorrem em temperaturas inferiores às observadas para os fármacos separadamente, e que a decomposição térmica dos fármacos associados ocorre também em temperaturas inferiores quando comparadas com aquelas observadas com os fármacos isolados (LAVOR, 2010).

Tanto LAVOR (2010) quanto ALVES (2007) constataram que o uso da celulose microcristalina não traz nenhum problema de compatibilidade quando combinado com os fármacos da associação. No entanto, a lactose, por ser um açúcar redutor, interage de forma desfavorável com a rifampicina, com a isoniazida e com a pirazinamida, que possuem aminas nas suas estruturas químicas.

2.6.3 Ensaios de dissolução

Diversos problemas tiveram que ocorrer para que fosse feita a associação entre a dissolução de comprimidos e sua biodisponibilidade, sendo os piores casos o da digoxina (Reino Unido e Estados Unidos, em 1971) e da fenitoína (Austrália e Nova Zelândia, 1968), fazendo com que em 1970 a 18ª. Edição da Farmacopeia Americana apresentasse o ensaio de dissolução em 6 monografias de formas farmacêuticas de liberação imediata. Trinta anos depois, a edição do ano 2000 já apresentava um total de 592 monografias com ensaio de dissolução, sendo 552 para formas farmacêuticas de liberação imediata (DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006).

A evolução que vem ocorrendo com o ensaio de dissolução, iniciado apenas com dois dispositivos (pá e cesto), chegou ao ponto de se dispor de 7 dispositivos oficiais, segundo a Farmacopeia Americana 38ª. Ed. (2015), adequados a diferentes formas farmacêuticas, como comprimidos, cápsulas, supositórios, óvulos e sistemas transdérmicos, além de avanços como a automação do método.

Tanto do ponto de vista físico-químico quanto biofarmacêutico, outros fatores estão envolvidos no processo de dissolução, liberação e absorção de fármacos a partir das mais diversas formas farmacêuticas, e o ensaio de dissolução tem sido uma ferramenta de grande importância quando é capaz de distinguir aspectos que possam comprometer a eficácia do medicamento (SINKO, 2006).

Sobre a composição de dose fixa combinada para tuberculose, que associa fármacos solúveis como a pirazinamida e a isoniazida, com um outro de menor solubilidade em água como a rifampicina, apresentados em doses completamente diferentes entre si, respectivamente, 400 mg, 75 mg e 150 mg, a importância da realização do ensaio de dissolução é muito grande em busca de se estabelecer uma nítida e contínua correlação *in vitro-in vivo*. Na revisão de BECKER et al (2007) foi concluído que as formas farmacêuticas de liberação imediata contendo isoniazida podem ser isentadas do ensaio de biodisponibilidade e bioequivalência, desde que não contenham excipientes como a lactose e outros açúcares redutores. Para a pirazinamida, a revisão realizada por BECKER et al (2008) apresenta informações de que sua absorção por crianças é mais demorada e algumas vezes reduzida, mas pode ser isentada dos ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência, desde que a dissolução ocorra de forma imediata e os excipientes sejam os mesmos apresentados nos medicamentos disponíveis e para

os quais já se demonstrou a biodisponibilidade. Ambos os fármacos acima são classificados como Classe I no sistema de classificação biofarmacêutica (BCS).

A rifampicina, classificada como Classe II, não poderia nem ser cogitada da bioisenção até que foi considerado aceitável que a solubilidade em pH 6,8 seria critério aceitável para fármacos desta classe. Porém, como a rifampicina tem melhor solubilidade em meio ácido, e a dissolução em pH 6,8 ocorre de forma lenta e incompleta, além da existência de diversos outros fatores que afetam a biodisponibilidade, a forma farmacêutica sólida de liberação imediata contendo a rifampicina deve ser avaliada por ensaios de biodisponibilidade ou bioequivalência. Além disso, o ensaio de dissolução atualmente adotado pelas farmacopeias, não tem sido capaz de fazer distinção entre produtos que tem apresentado diferenças de biodisponibilidade (BECKER, 2009).

Num estudo conduzido por SINGH et al (2000) em busca de evidenciar a estabilidade dos fármacos isoladamente ou em combinação frente ao meio empregado no estudo de dissolução da FDC, que é o HCl 0,1 M a 37 °C, durante 50 minutos, ficou evidenciada a decomposição da isoniazida (3,2 a 4,7%) e da rifampicina (17,8 a 24,4%). Além de ocorrer a decomposição de dois fármacos, o emprego do HCl 0,1 M como meio de dissolução não é discriminador da qualidade da formulação, como foi demonstrado por AGRAWAL e PANCHAGNULA (2004b), que sugeriram o uso do HCl 0,01 M, volume de apenas 250 mL e aparato 2 (pá) em velocidade de apenas 50 rpm.

Num levantamento realizado em diferentes farmacopeias, foi observado que não existe consenso (harmonização) no procedimento de avaliação da dissolução aplicada a formas sólidas orais contendo rifampicina isoladamente ou combinada com isoniazida, pirazinamida e até etambutol, como se pode perceber pelos dados contidos no quadro 6.

A falta de harmonização se nota pela diferença entre o meio de dissolução empregado para uma mesma forma farmacêutica, em que a Farmacopeia Japonesa indica a água enquanto as demais farmacopeias indicam o uso do HCl 0,1 M. Outras diferenças estão na velocidade de agitação, no tempo limite da realização do ensaio e no aparato utilizado durante o ensaio.

Quadro 6 - Resumo das condições para realização do ensaio de dissolução para cápsulas e comprimidos contendo rifampicina sozinha e associada a isoniazida, pirazinamida e etambutol em diferentes farmacopeias.

Farmacopeia	Forma	Aparato	Meio	Veloc (rpm)	Tempo (min)	Ensaio
BP 2009 a BP 2014	R cápsulas	1	HCl 0,1M	100	45	Espectro 475nm
USP 30 a USP 38	R cápsulas	1	HCl 0,1M	100	45	Espectro 475nm
USP 30 a USP 38	R + I cápsulas	1	HCl 0,1M	100	45	Espectro 475nm I – CLAE
USP 30 a USP 38	R + I + P comprimidos	1	FGS sem pepsina	100	30	Espectro 475nm I e P - CLAE
USP 30 a USP 38	R + I + P + E comprimidos	2	pH 6,8	100	45	CLAE gradiente
JP 16	R cápsulas	2	H ₂ O	75	45	Espectro 334nm
F. HINDU 2007	R cápsulas	2	HCl 0,1M	100	45	Espectro 475nm
F. HINDU 2007	R comprimidos	2	HCl 0,1M	100	45	Espectro 475nm
F. HINDU 2007	R + I comprimidos	2	HCl 0,1M	100	45	Espectro 475nm I – CLAE
F. HINDU 2007	R + I + E comprimidos	2	HCl 0,1M	100	45	Espectro 475nm I e E - CLAE
F. HINDU 2007	R + I + P comprimidos	2	0,2% NaCl e 0,7% HCl	100	45	Espectro 475nm I e P- CLAE
F. HINDU 2007	R + I + P + E comprimidos	1	pH 6,8	100	45	CLAE
F. ARG.7	R cápsulas	1	HCl 0,1M	100	45	Espectro 475nm

R – Rifampicina; I – Isoniazida; P – Pirazinamida; E – Etambutol; Volume de 900 mL; Aparato 1 – cesto; Aparato 2 – pá; FGS – Fluido gástrico simulado

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver formulações orais de tuberculostáticos contendo combinação de rifampicina, isoniazida e pirazinamida para uso em pediatria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Elaborar veículo oral padronizado para uso na veiculação de fármacos adequado para administração a pacientes pediátricos;

Desenvolver metodologia analítica espectrofotométrica UV-VIS para avaliação da qualidade das formulações contendo a combinação de fármacos tuberculostáticos;

Desenvolver formulação de pó para reconstituição contendo rifampicina, isoniazida e pirazinamida em dose fixa combinada para uso no tratamento de tuberculose em crianças.

Desenvolver comprimido dispersível contendo rifampicina, isoniazida e pirazinamida em dose fixa combinada para uso no tratamento de tuberculose em crianças.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS

Insumos ativos

Isoniazida Lotes 15854 e NUPLAM M110608 (Amsal Quality)

Pirazinamida Lote NUPLAM M080710 (Calyx Chemicals Pharmaceuticals Ltd.)

Rifampicina Lotes 6CGL002 e NUPLAM M100202 (Luohe Nanjiecum Pharmaceutical)

Insumos inativos

Ácido ascórbico VIAFARMA 200905200 (Shandong Luwei Pharmaceutical)

Ácido cítrico anidro WB7F113B3 (Dinâmica)

Carmelose sódica 10120811 (Senzhen) e 025811 (Farmos)

Celulose microcristalina PH 101 VIAFARMA 035066 (Mingtai Chemical)

Croscarmelose sódica (Solutab) Lote 125008008 (Blanver)

Crospovidona (BASF)

Dióxido de silício coloidal (Aerosil 200) HENRIFARMA 3159091614

Edetato dissódico DINAMICA 45692

Estearato de magnésio HENRIFARMA 905054

Flavorizantes líquidos de Abacaxi (Lote 190766), Cereja (Lote J10J5EB), Chocolate (Lote J10IZGI), Framboesa (Lote J10J3SC), Laranja (Lote J10J5GZ), Limão (Lote 196433), Menta/Hortelã (Lote 199539), Morango (Lote 199541) (NovoAroma)

Flavorizantes sólidos de Abacaxi (Lote 194327), Baunilha (Lote J10IYZL), Chocolate (Lote 2.14), Framboesa (Lote 116409), Laranja (Lote 197016), Limão (Lotes 190682 e 201709) e Tangerina (Lote 196429) (NovoAroma)

Glicerol bidestilada GF85623 (Cotia Foods)

Goma Xantana VIAFARMA 035758 (Wenda)

Hipromelose (Methocel K100 Premium LV) Lote WP350605 (Colorcon)

Hipromelose (Methocel K100M Premium) Lote WP319088 (Colorcon)

Lauril sulfato de sódio PRIMACOM HN0H025557 (Cognis)

Metilcelulose (Methocel A15 Premium LV) Lote Wp235757 (Colorcon)

Metilparabeno JA1411 (Ueno Fine Chemicals)

Propilparabeno J1911 (Ueno Fine Chemicals)

Povidona K-30 VIAFARMA 035142 (Nanhang Industrial)

Quitosana POLYMAR 20091115

Sacarina sódica FARMOS 1355/09

Sucralose VIAFARMA 037719/3 (Changzhou Niutang Chemical)

Talco MAGNESITA N-100114-4

Reagentes

Acetonitrila UV-HPLC (Vetec)

Ácido cítrico anidro WB7F113B3 (Dinâmica)

Ácido fosfórico xaroposo 85% PA (Reagen)

Fosfato de sódio bibásico (Vetec)

Fosfato de sódio monobásico (Vetec)

Hidróxido de sódio (Vetec)

Metanol UV-HPLC (Vetec)

Equipamentos

Aagitador horizontal Certomat MO B.Braun Biotec International

Aagitador mecânico de bancada, com eixo de 30 cm, hélice naval, controle de velocidade Fisaton mod 913

Aparelho de Termo-gravimetria Shimadzu TG 60

Balanças analíticas modelos CELTAC FA2104N e PRECISA 205 A SCS

Calorímetro Térmico Diferencial Shimadzu DSC 60

Coluna cromatográfica CLAE RP-C18 250x4,6mm, 5 micras (HyperClone 120Å)

Coluna cromatográfica CLAE RP-C8 100x4,6mm, 3 micras (Nucleosil 120 Å)

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu composto de sistema de gerenciamento, uma bomba, um injetor manual com loop de 20 µL, um degaseificador, e um detector UV/vis ajustável para até 2 comprimentos de onda de detecção

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Varian, composto de sistema de gerenciamento, duas bombas, um injetor manual com loop de 20 µL, um detector PDA UV/vis, com monitoramento por até 2 comprimentos de onda

Cubetas de quartzo 10 mm de caminho óptico Ref. Q-244

Espectrofotômetro UV-VIS Beckman Coulter DU-640

Espectrofotômetro UV-VIS Spectronic Genesys 10S UV-Vis

Espectrômetro de Infra-Vermelho, com dispositivo ATR, modelo Jasco FT/IR 4100

Kit para filtração de fase móvel com membrana nylon 4,7 cm de diâmetro e poro de 0,45 micra, Quimis

Moinho Fritish Pulverisette 14 com malha trapezoidal de 0,5 mm

Moinho de bolas, corpo e bolas de porcelana, com sistema motriz Sachsenwerk Dresden KD 71

Viscosímetro rotacional Haake Visco Tester 6L

Máquina de comprimir rotativa Lemaq, 8 estações de trabalho, operando com jogo de punções planos, chanfrados e sulcados de 8 mm de diâmetro, controle de velocidade por inversor de frequência.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização dos insumos ativos

4.2.1.1 Teor

O teor de isoniazida, pirazinamida e rifampicina foi determinado segundo as respectivas monografias da Farmacopeia Brasileira 5ª. Ed. empregando cromatografia líquida de alta eficiência nas condições descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Condições analíticas empregadas para o doseamento dos insumos ativos

	Isoniazida	Pirazinamida	Rifampicina
Coluna	RP C-18 250x4,6mm 5 µm, 120 Å	RP C-18 250x4,6mm 5 µm, 120 Å (*)	RP C-8 100x4,6mm 3 µm, 120 Å
Detecção	254 nm	270 nm	254 nm
Fluxo	1,5 mL/min	1,5 mL/min (*)	1,5 mL/min
Fase móvel	KH ₂ PO ₄ Trolamina NaOH Metanol	KH ₂ PO ₄ NaOH Ácido fosfórico Acetonitrila	Água Acetonitrila KH ₂ PO ₄ Ácido fosfórico Ácido cítrico Perclorato de potássio
SQR	Isoniazid USP Lote IOG205	Pyrazinamide USP Lote HOG198	Rifampicin USP Lote KOG365

(*) A monografia da FB5 expressa 1 mL/min, mas utiliza coluna C18 de 150x3,6mm.

Para a preparação da fase móvel foram utilizadas as seguintes soluções:

Isoniazida

Tampão fosfato pH 6,9: preparar solução de fosfato de potássio monobásico a 0,1 M e ajustar o pH em 6,9 com solução concentrada de hidróxido de sódio SR. Adicionar cinco gotas de trolamina por litro de tampão preparado e homogeneizar.

Fase móvel: mistura de *Tampão fosfato pH 6,9* e metanol (95:5).

Pirazinamida

Fase móvel: transferir 0,6805 g de fosfato de potássio monobásico para balão volumétrico de 250 mL, dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Transferir a solução obtida para balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar 18 mL de hidróxido de sódio 0,2 M e completar o volume com água. Ajustar o pH para $3,0 \pm 0,2$ com ácido fosfórico. Misturar 10 mL de acetonitrila com 1000 mL dessa solução, filtrar e desgaseificar.

Rifampicina

Tampão fosfato: dissolver 136,1 g de fosfato de potássio monobásico em cerca de 500 mL de água, adicionar 6,3 mL de ácido fosfórico, diluir com água para 1000 mL e agitar. Ajustar o pH a $3,1 \pm 0,1$.

Fase móvel: mistura de água, acetonitrila, tampão fosfato, ácido cítrico M e perclorato de sódio 0,5 M (510:350:100:20:20). Desgaseificar e filtrar.

3.2.1.2 Identificação espectrofotométrica por ultravioleta (UV) infravermelho (IV)

Soluções dos insumos ativos em diferentes concentrações e diferentes solventes (metanol, água, tampão fosfato) foram submetidas a avaliação espectrofotométrica na região UV (200-400 nm) em varredura de 1 nm, em cubeta de quartzo de 1 cm de comprimento. Os espectros obtidos em HCl 0,1M e em metanol são apresentados na forma de gráfico que relaciona a absorvância com o comprimento de onda.

Para o ensaio espectrofotométrico por infravermelho as amostras foram colocadas sobre o dispositivo ATR, pressionadas pelo próprio dispositivo e avaliadas no intervalo de comprimento de onda de 4000 a 530 cm^{-1} e submetido a transformada de Fourier. Os espectros obtidos são apresentados na forma de gráfico que relaciona a transmitância com o comprimento de onda.

4.2.1.3 Análise térmica

Os ensaios foram realizados por calorimetria térmica diferencial (DSC) até 400 °C ou 600 °C e sobre 2 mg a 5 mg de cada uma das amostras, sob rampa de aquecimento de 10°C/min e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30 mL/min. Os dados são apresentados na forma de gráfico que relaciona o parâmetro analisado de forma diferencial (DSC) com a temperatura, e tabela com os principais eventos térmicos.

4.2.1.4 Densidade aparente e de compactação

A medida foi realizada segundo descrição da Farmacopeia Japonesa 16^a. Ed., (3.01 - Determination of Bulk (d_b) and Tapped Densities (d_t)), sub-itens 1 (bulk) e 2 (tapped). Em todas

as situações foi empregada uma proveta de vidro, graduada, de 100 mL. Após a colocação da amostra, medido o volume e massa, o conjunto foi submetido a 50, 125, 250 e 500 batidas (taps), expressando-se os resultados em termos de densidade para cada situação. Os dados obtidos foram tabulados e com os mesmos foi calculado o índice de compressibilidade ou índice de Carr (IC) segundo a equação 1 e fator de Hausner (FH) segundo a equação 2.

$$IC = 100.(d_t-d_b)/d_t \quad \text{Equação 1}$$

$$FH = d_t/d_b \quad \text{Equação 2}$$

4.2.1.5 Fluidez

Medida realizada segundo descrição da Farmacopeia Japonesa 16^a Ed. (G2 Solid-state Properties – Powder Flow), com a utilização de funil através do qual se fazia escoar a amostra sobre base plana de diâmetro fixo até que não mais fosse percebido aumento da altura do cone obtido. O ângulo de repouso foi calculado como sendo o ângulo cuja tangente é a razão entre a altura e o raio da base do cone formado. Os ensaios foram realizados em triplicata e os ângulos apresentados representam a média das 3 medidas, junto com o respectivo desvio padrão.

4.2.1.6 Microscopia para determinação do diâmetro de Ferret

Amostras dos pós de cada um dos fármacos foram distribuídos sobre lâminas de vidro com o auxílio de pincel, colocadas em microscópio óptico e fotografadas sob aumento de 40x a 1000x sob luz normal e sob filtro de luz polarizada. As fotografias foram escolhidas quanto a nitidez, número de partículas, e avaliadas com o uso do software livre ImageJ v.1.48 para a determinação das dimensões das partículas, expressando-se os resultados como o diâmetro de Ferret.

4.2.2 Desenvolvimento do veículo

4.2.2.1 Escolha dos componentes das preparações

Partindo-se de informações buscadas na literatura sobre excipientes de uso seguro em crianças que poderiam ser úteis na composição do veículo, foram formuladas preparações com distintos agentes suspensores, isolados e em combinação, em proporções variáveis, e avaliadas em termos de facilidade de preparação, sabor, compatibilidade com ativos e comportamento reológico. Foram preparadas 3 apresentações: uma líquida pronta para uso, uma líquida concentrada para ser diluída, e uma sólida concentrada para ser reconstituída.

Foram inicialmente avaliados alguns agentes suspensores, como carmelose sódica MV, metilcelulose BV, hipromelose BV e AV e goma xantana, através da preparação das respectivas

mucilagens em diferentes concentrações e submetendo-as a avaliação do comportamento reológico em viscosímetro rotacional.

Em seguida, com a seleção de dois potenciais agentes suspensores, estes foram combinados num planejamento fatorial 2^2 , segundo os limites apresentados na tabela 2, para verificar a intensidade do efeito de cada um sobre a viscosidade. Os resultados preliminares levaram à necessidade de se realizar um outro ensaio, agora com repetição do ponto central, com outras concentrações de goma xantana. Os resultados foram avaliados por regressão multivariada, tendo como resposta a viscosidade lida a uma determinada velocidade, e como variáveis independentes os níveis de carmelose e de goma xantana, determinando-se assim os efeitos que cada um dos polímeros exerce sobre a viscosidade do veículo.

Tabela 2 - Limites de concentração de carmelose sódica MV e goma xantana empregados no planejamento fatorial 2^2 em cada um dos experimentos.

Primeiro experimento	-1	+1	
Carmelose sódica MV (%)	0,20	0,40	
Goma Xantana (%)	0,20	0,40	

Segundo experimento	-1	0	+1
Carmelose sódica MV (%)	0,20	0,30	0,40
Goma Xantana (%)	0,10	0,15	0,20

Escolhidos o agente suspensor e os demais componentes necessários à qualidade do veículo, a formulação líquida foi preparada com a solubilização dos conservantes em água quente, onde também foi dissolvido o edetato dissódico e a sucralose, ao mesmo tempo em que se dispersava o agente suspensor no agente umectante empregando o agitador mecânico. Em seguida, a solução aquosa foi rapidamente vertida sobre a dispersão do suspensor, mantendo-se a agitação de forma vigorosa para homogeneizar.

A formulação concentrada foi preparada através da dissolução dos conservantes no agente umectante, seguida da dispersão de todos os demais componentes no mesmo solvente, sem o uso de água. O produto final foi diluído no momento do uso, na proporção de 50 mL da formulação concentrada para 950 mL de água, sob agitação mecânica.

Substituindo-se o agente umectante líquido por um diluente sólido solúvel em água, foi possível obter uma formulação sólida, de tal forma que 50 g desta, dissolvidos em 950 mL de água, resulta em veículo pronto para uso.

4.2.2.2 Efeito do pH e de eletrólito no comportamento reológico

Ao veículo líquido aquoso foram adicionados, separadamente, ácido cítrico, citrato de sódio, ácido ascórbico e este último combinado com ácido cítrico, de modo a verificar qual é o efeito que estes agentes exercem sobre o pH e qual a consequência para o comportamento reológico do veículo.

4.2.2.3 Avaliação da estabilidade física e microbiológica

O veículo líquido aquoso e o veículo sólido reconstituído foram avaliados quanto à estabilidade física (pH, densidade e comportamento reológico) e microbiológica (contagem de microrganismos viáveis) empregando os métodos descritos no item 4.2.2.6. O veículo líquido foi mantido em frasco de vidro âmbar, contendo 100 mL, fechado com tampa plástica rosqueável. O veículo sólido na quantidade de 5 g foi mantido em sachês de filme (plástico, alumínio, plástico), selados termicamente, sendo reconstituído com água até o volume de 100 mL antes da realização dos ensaios. Ambas as formulações foram armazenadas a 30 °C e 75% de umidade relativa durante 6 meses, sendo coletados periodicamente para avaliação.

4.2.2.4 Edulcoração e flavorização

O veículo líquido foi edulcorado com diferentes proporções de sucralose e depois foi flavorizado com diferentes sabores para determinar a quantidade mínima de cada flavorizante que resulte numa mistura com sabor perceptível e agradável. Os ensaios foram realizados com 06 voluntários adultos que receberam 5 mL do veículo contendo quantidades decrescentes de edulcorante e, posteriormente, de cada flavorizante, intercalado com água para a lavagem da boca entre os testes. Após a determinação da quantidade mínima de edulcorante e de cada flavorizante, os três mais agradáveis foram avaliados como descrito no item 3.2.2.6.

4.2.2.5 Ensaio sensorial de palatabilidade em crianças

A aceitabilidade do veículo sem ativos por crianças saudáveis foi investigada através de testes de aceitação com escala hedônica (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999), envolvendo 61 crianças saudáveis de quatro a 12 anos de idade, de ambos os gêneros, que frequentavam a instituição educacional Espaço de Desenvolvimento Integral Trampolim, em Fortaleza, Ceará, Brasil, com a autorização dos responsáveis através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, protocolo nº 41/12) (Anexo II).

As amostras consistiram de veículo líquido flavorizado nos sabores Menta, Morango e Cereja, apresentadas à temperatura ambiente, de forma codificada e em ordem balanceada, segundo delineamento proposto por MACFIE e colaboradores (1989). Após explicação do teste, a criança recebeu aproximadamente 5 mL de uma das amostras em uma colher descartável. Imediatamente após provar a primeira amostra, pediu-se que a criança apontasse a figura da escala que melhor representasse, segundo o seu julgamento, o quanto gostou do sabor (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). Em seguida, após um gole de água para limpar o paladar, pediu-se que a criança fizesse o mesmo com as amostras seguintes.

As respostas foram registradas pelo pesquisador. Foi utilizada uma escala hedônica mista facial-verbal específica para gênero (Figura 2), com sete graus de satisfação: detestei, não gostei de jeito nenhum, não gostei, nem gostei nem desgostei, gostei, gostei muito e adorei, sendo atribuídos valores numéricos para cada um, com 1 correspondente a “detestei” e 7 correspondente a “adorei” (PERYAM; PILGRIM, 1957.). O desenho das expressões faciais foi feito especialmente para esta pesquisa, buscando-se aperfeiçoar o modelo utilizado anteriormente por outros autores (GUINARD, 2001; POWERS; GOOCH III; ODDO, 2000).

Figura 2 - Escalas hedônicas mistas faciais-verbais específicas para gênero



Os resultados do teste de aceitação foram avaliados mediante ANOVA e teste de Tukey ao nível de 5% de significância para comparação das médias de aceitação, por meio do programa SAS® Statistical Analytical System (SAS, 2008). Os resultados foram apresentados na forma de histogramas de frequência e submetidos à Análise de Componentes Principais (ACP). As formulações foram consideradas aceitas se o Índice de Aceitabilidade (IA)

calculado para determinada amostra atingisse 70%, sendo IA (%) = médias dos valores hedônicos atribuídos à amostra x 100/valor máximo atribuído à amostra (DUTCOSKY, 2013). Os resultados também foram analisados segundo a faixa etária (4 a 6, 7 a 9 ou 10 a 12 anos), e o gênero dos participantes.

4.2.2.6 Avaliações da qualidade

4.2.2.6.1 Determinação do pH

A medida foi realizada segundo descrição da Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. Volume 1 (5.2.19) empregando o medidor Digimed DM-20 com eletrodo de vidro combinado, calibrado com soluções tampões pH 7 e pH 4.

4.2.2.6.2 Determinação do comportamento reológico

A medida foi realizada com o uso de viscosímetro rotacional Haake Visco Tester 6L, com fuso L1, nas velocidades compreendidas entre 0,3 e 200 rpm, e o comportamento reológico demonstrado graficamente na forma da relação entre a viscosidade e a velocidade e matematicamente através da relação entre as mesmas variáveis empregando a lei das potências de Ostwald-de-Waelle, cuja equação é:

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Equação 3}$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento (shear stress – dina/cm²), k é o índice de consistência ou de viscosidade, $\dot{\gamma}$ é a velocidade de rotação (shear rate – s⁻¹), e n é o índice de comportamento de fluxo. Se n for maior que zero e menor que um ($0 < n < 1$), o fluido é de comportamento pseudo-plástico.

4.2.2.6.3 Contagem de microrganismos viáveis

O ensaio foi realizado segundo descrição da Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. Volume 1 (5.5.3.1.2).

4.2.3 Desenvolvimento de metodologia analítica espectrofotométrica para avaliação do teor de isoniazida, rifampicina e pirazinamida nas formulações de dose fixa combinada

4.2.3.1 Elaboração dos espectros de calibração

Quantidades exatamente pesadas das SQR de cada um dos insumos ativos foram isoladamente dissolvidas em metanol e o volume ajustado com o mesmo solvente. Dessas soluções foram realizadas diluições com solução tampão pH 6,8 até a obtenção das concentrações descritas na tabela 3. Cada uma das soluções, preparada em triplicata, foi

submetida a leitura em espectrofotômetro por varredura de 200 a 500 nm, em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Os dados obtidos foram gravados em formato .csv (comma separated value) e reunidos em planilha eletrônica, associando cada espectro à respectiva concentração e composição da solução.

Tabela 3 - Composição das soluções de calibração empregadas no desenvolvimento do método analítico espectrofotométrico de determinação do teor dos fármacos em dose fixa combinada.

Mistura	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		
	Pirazinamida	Rifampicina	Isoniazida
1	5	0,85	0,8
2	5	0,85	1,2
3	5	2,50	0,8
4	5	2,50	1,2
5	10	1,70	0,8
6	10	1,70	1,2
7	10	3,40	0,8
8	10	3,40	1,2
9	20	1,25	0,8
10	20	1,25	1,6
11	20	2,90	0,8
12	20	2,90	1,6
13	20	1,70	0,8
14	20	1,70	1,6
15	20	3,40	0,8
16	20	3,40	1,6
17	15	2,50	1,2

4.2.3.2 Espectros de validação

Foram preparadas 15 soluções em triplicata contendo combinações dos fármacos com concentrações de 5 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de pirazinamida, 2 a 8 $\mu\text{g/mL}$ de rifampicina e 1 a 4 $\mu\text{g/mL}$ de isoniazida, todas diluídas com solução tampão pH 6,8 e imediatamente submetidas a leitura espectrofotométrica na faixa de 200 a 500 nm, em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, frente ao tampão como branco. As combinações utilizadas estão descritas na tabela 4.

4.2.3.3 Avaliação dos dados para construção dos modelos

Trabalhou-se de forma a que o intervalo entre a primeira diluição no balão volumétrico e a última leitura no espectrofotômetro não ultrapassasse os 10 minutos. Examinando os espectros, foram eliminados os comprimentos de onda do extremo inferior do espectro, passando a considerar apenas a partir de 240 nm, bem como valores do extremo superior do espectro, especialmente acima de 400, onde as absorvâncias apresentaram valores baixos. Cada

espectro foi separado em dois blocos de leituras de 10 em 10 nm, compreendendo o primeiro, a faixa de 240 a 390 nm, e o outro bloco a faixa de 245 a 395nm, contendo cada um o total de 16 comprimentos de onda. Cada bloco foi separadamente submetido a análise de regressão multivariada no Microsoft Excel® considerando como variável dependente (Y) a concentração conhecida de cada fármaco, e considerando como variáveis independentes (X) as absorvâncias nos seus respectivos comprimentos de onda. A cada ensaio de regressão os dados de valor de p associados a cada variável independente foram avaliados em busca de eliminar o comprimento de onda que estivesse contribuindo com a menor significância estatística (maior valor de p), repetindo-se o processo de eliminação até obter todos os efeitos com valor de p menor que 0,05.

Tabela 4 - Combinações dos fármacos empregadas na validação do método analítico espectrofotométrico para determinação do teor de pirazinamida, rifampicina e isoniazida em dose fixa combinada.

Mistura	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		
	Pirazinamida	Rifampicina	Isoniazida
1	5,15	2,04	1,02
2	5,15	2,04	3,06
3	5,15	6,14	1,02
4	5,15	6,12	3,06
5	10,30	4,08	2,04
6	10,30	4,08	4,08
7	10,30	8,16	2,04
8	15,45	2,04	1,02
9	15,45	2,04	3,06
10	15,45	6,12	1,02
11	15,45	6,12	3,06
12	20,60	4,08	2,04
13	20,60	4,08	4,08
14	20,60	6,12	3,06
15	20,60	8,16	2,04

4.2.3.4 Validação do modelo

O método analítico foi validado em termos de precisão através da análise de repetibilidade, em que uma mesma amostra foi avaliada em sextuplicata, e os resultados dos teores de fármacos são expressos em média e desvio padrão relativo; e em termos de linearidade através da determinação dos coeficientes angular e linear empregando a calibração multivariada, avaliando a validade dos modelos através do coeficiente de correlação de Pearson e a significância dos coeficientes expressa pelo valor de p. Os modelos encontrados foram aplicados ao conjunto de 15 soluções descritas no item 3.2.4.2 e os resultados de teor encontrados foram comparados com os respectivos teores esperados para cada concentração,

expressando os resultados na forma de gráfico. O modelo de regressão linear obtido deve apresentar coeficiente de correlação de Pearson o mais próximo de um, um coeficiente angular que deve ser o mais próximo de 1 (medida da exatidão) e um coeficiente linear que deve ser o mais próximo de zero (medida da interferência / erro).

4.2.4 Estudos de pré-formulação

4.2.4.1 Efeito do dióxido de silício coloidal (aerosil) e do tempo de mistura sobre a densidade aparente e fluidez dos insumos ativos

Os insumos ativos foram intimamente misturados em misturador em cubo utilizando diferentes concentrações de aerosil (0,5%; 1,0% e 1,5% para rifampicina e isoniazida; 0,75%, 1,5% e 2,25% para pirazinamida) e diferentes tempos de mistura (10, 20 e 30 minutos) e a qualidade das misturas obtidas foi avaliada em termos de densidade aparente e ângulo de repouso. Os dados são apresentados na forma de gráfico que relaciona o parâmetro avaliado com a concentração de aerosil.

4.2.4.1.1 Determinação da fluidez

A medida foi realizada segundo descrição da Farmacopeia Japonesa 16^a Ed. (G2 Solid-state Properties – Powder Flow), com a utilização de funil através do qual se fazia escoar a amostra sobre base plana de diâmetro fixo até que não mais fosse percebido aumento da altura do cone obtido. O ângulo de repouso foi calculado como sendo o ângulo cuja tangente é a razão entre a altura e o raio da base do cone formado. Os ensaios foram realizados em triplicata e os ângulos apresentados representam a média das 3 medidas, junto com o respectivo desvio padrão.

4.2.4.1.2 Determinação da densidade aparente e de compactação

Medida realizada segundo descrição da Farmacopeia Japonesa 16^a Ed., (3.01 - Determination of Bulk (d_b) and Tapped Densities (d_t)), sub-itens 1 (bulk) e 2 (tapped). Em todas as situações foi empregada uma proveta de vidro, graduada, de 100 mL. Após a colocação da amostra, medido o volume e massa, o conjunto foi submetido a 50, 125, 250 e 500 batidas (taps), expressando-se os resultados em termos de densidade para cada situação. Os dados obtidos foram tabulados e com os mesmos foi calculado o índice de compressibilidade ou índice de Carr (IC) segundo a equação 1 (pg. 48).

4.2.4.2 Efeito do pH e ácido ascórbico sobre a estabilidade dos insumos ativos

Soluções de rifampicina, isoladamente ou em combinação com isoniazida e pirazinamida, foram avaliadas quanto a estabilidade em função do pH, compreendido entre 5 e 9, e presença do ácido ascórbico, por cromatografia líquida de alta eficiência. Diferentes soluções tampões foram preparadas com a combinação entre fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio bibásico, de modo a obter os valores de pH compreendidos entre 5 e 9, mantendo a concentração final do tampão em 250 mM. Os cromatogramas foram obtidos em até 90 horas após a preparação das soluções. Os dados são apresentados como gráficos que apresentam a evolução do teor de rifampicina ao longo do tempo de avaliação da estabilidade das soluções, e na forma de equação que expressa a velocidade de degradação da rifampicina e sua respectiva ordem de reação, reunidos em tabela.

4.2.4.3 Estudo de degradação forçada sobre os insumos ativos combinados

Foram construídas curvas de calibração com as substâncias químicas de referência (SQR's) de rifampicina, pirazinamida e isoniazida, em que as soluções de diferentes concentrações foram associadas segundo a tabela 5, diluídas com a composição A da fase móvel empregada no doseamento por CLAE e injetadas em volume de 20 mL para corrida cromatográfica segundo os parâmetros descritos a seguir (tabela 6). As áreas dos picos correspondentes a cada um dos ativos foram correlacionadas com as respectivas concentrações e os resultados são apresentados na forma de gráfico com regressão linear.

Tabela 5 - Concentrações de isoniazida, pirazinamida e rifampicina empregadas na obtenção das curvas de calibração por CLAE.

	Isoniazida ($\mu\text{g/mL}$)	Pirazinamida ($\mu\text{g/mL}$)	Rifampicina ($\mu\text{g/mL}$)
1	60,35	320,1	119,9
2	60,35	960,3	119,9
3	181,05	320,1	119,9
4	60,35	320,1	359,7
5	60,35	960,3	359,7
6	181,05	320,1	359,7
7	181,05	960,3	359,7
8	120,7	640,2	239,8
9	181,05	960,3	119,9

Tabela 6 - Sistema gradiente empregado na determinação dos teores de pirazinamida, rifampicina e isoniazida nos comprimidos dispersíveis.

Tempo (minutos)	Fase A Tampão pH 6,8:Acetonitrila (97:3)	Fase B Acetonitrila:Tampão pH 6,8 (55:45)	Eluição
00:00 → 05:00	100	0	Isocrático
05:00 → 05:05	100 → 0	0 → 100	Gradiente linear
05:00 → 15:00	0	100	Isocrático
15:00 → 15:05	0 → 100	100 → 0	Gradiente linear

Associações dos fármacos em proporção semelhante ao que estará presente nas composições em dose fixa combinada 3 em 1, foram preparadas a partir das soluções de cada um dos mesmos em metanol, e diluídas em tampão fosfato pH 6,8 0,1M. A seguir, foram separadas em iguais porções de 10 mL, sendo uma mantida sob refrigeração, outra à temperatura ambiente e protegida da luz, outra à temperatura ambiente e exposta à luz fluorescente proveniente da iluminação do laboratório, outra recebeu 5 gotas de ácido clorídrico 1M e uma outra recebeu 5 gotas de peróxido de hidrogênio 30%. As amostras foram alternadamente injetadas em CLAE monitorando-se o teor dos fármacos ao longo do tempo durante 7 horas. Os resultados são mostrados em termos de velocidade de degradação com respectiva ordem de reação.

4.2.4.4 Análise térmica das misturas de insumos ativos entre si e com excipientes

Os ensaios foram realizados por calorimetria térmica diferencial (DSC) até 400 °C ou 600 °C e análise termo-gravimétrica (TGA) até 900 °C sobre 2 a 5 mg de cada uma das amostras, sob rampa de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30 mL/min ou 50 mL/min. Os dados são apresentados na forma de gráfico que relaciona o parâmetro analisado de forma direta (TG), diferencial (DSC) ou derivada (DTG) com a temperatura e como tabela que relaciona os dados térmicos das amostras avaliadas.

4.2.4.5 Escolha do polímero para granulação

Polímeros de diferentes naturezas e graus de polimerização foram utilizados na obtenção de grânulos de rifampicina. Cada um deles foi preparado em meio aquoso nas seguintes concentrações: Quitosana e Hipromelose AV - 1 e 2%, Povidona K-30, Hipromelose BV, Metilcelulose BV - 5 e 10%. A quitosana foi vigorosamente agitada em água, e a esta dispersão foi acrescentado ácido clorídrico 1M até a completa dissolução sendo o pH mantido em 5,0. A povidona foi diretamente dissolvida em água e, pela grande solubilidade e por não aumentar a

viscosidade de forma importante, bastou o uso de agitação. Os derivados de celulose foram dispersos sob agitação em água aquecida a 80 °C e, ao se perceber a ausência de grumos, foi acrescentada água gelada (cerca de 5 °C) até completar o volume. Os grânulos obtidos foram passados através de malha de 1 mm e submetidos a secagem em estufa com circulação de ar a 45 °C. Depois de recolhidos, foram triturados em moinho com malha de 0,5 mm a 18.000 rpm e submetidos a ensaio de teor e velocidade de dissolução em HCl 0,1M.

Após a escolha do polímero, foram realizados ensaios com diferentes formas de sua utilização para a obtenção de partículas pequenas revestidas o mais completamente pelo polímero: dispersões líquidas como suspensão e como emulsão foram (1) secas em estufa com formação de membranas e (2) secas em nebulizador, como descrito a seguir.

Membranas de quitosana contendo o fármaco disperso como suspensão foram preparadas com diferentes relações de quantidade entre droga e polímero, sendo deixadas a secar em estufa com circulação de ar a 50 °C, e trituradas para obtenção de pó.

Membranas de quitosana contendo o fármaco disperso como emulsão foram preparadas, iniciando com a dissolução da rifampicina em clorofórmio, que foi então emulsionada em quitosana com o uso de polisorbato 80. A emulsão foi mantida sob agitação para que ocorresse a evaporação do solvente orgânico e, depois deixada secar em placa de Petri em estufa com circulação de ar a 50 °C, e trituradas para obtenção de pó.

Preparações líquidas obtidas como suspensão e como emulsão foram submetidas a ação de nebulizador, com a bomba peristáltica operando a 7 a 10% da vazão máxima, com bico de 0,7 mm de diâmetro, temperatura inicial de 150 °C, temperatura de saída por volta de 110 a 115 °C, vazão de ar aspirado operando em 90%, fluxo de ar de 700 NI/hora, em aparelho Buchi Mini Spray Dryer B-191. As dispersões foram inicialmente submetidas a ação de ultra-turrax a 10.000 rpm durante 20 minutos atuando sobre 450 mL de cada preparação, em bequer de vidro com capacidade para 600 mL. As razões fármaco:polímero trabalhadas foram 2:1, 1:1 e 1:2. Durante todo o período de secagem as preparações eram mantidas sob agitação magnética.

Os pós obtidos com a nebulização foram caracterizados do ponto de vista de microscopia óptica com luz normal e luz polarizada, espectroscopia no IV, difração de Raios X de pó de 5 a 30 °, bem como determinação do teor de rifampicina por espectrofotometria UV e análise térmica por DSC.

4.2.4.7 Trituração em moinho de bolas

Este procedimento foi realizado em moinho de bolas constituído de um cilindro de material cerâmico com 30 cm de diâmetro, contendo bolas de diferentes dimensões, mantido

horizontalmente em rotação de 30 rpm durante 1 hora. Cada um dos insumos ativos foi submetido à trituração separadamente, e o pó resultante deste processo foi separado das bolas, passando-o através de tamis de 250 μm .

4.2.5 Desenvolvimento do pó para suspensão extemporânea

4.2.5.1 Preparação

Rifampicina foi inicialmente misturada por tamboreamento com o aerosil 200 (agente dessecante) durante 10 minutos, sob velocidade de 30 rpm. Em seguida foi tamisada e novamente submetida a 30 rpm durante 10 minutos. Depois foi acrescentado o fosfato de potássio dibásico anidro (modificador de pH) e a goma xantana (agente suspensor), agitando-os novamente durante 10 minutos a 30 rpm. Finalmente os demais componentes ativos (isoniazida e pirazinamida), o edulcorante (sucralose) e o antiespumante (dimeticona) previamente misturados entre si, foram acrescentados e misturados durante 20 minutos a 30 rpm. A mistura resultante foi distribuída em sachês de filme aluminizado, selados termicamente e armazenados à temperatura ambiente. Cada sachê continha 4 g de pirazinamida, 1,5 g de rifampicina e 0,75 g de isoniazida para a obtenção de 100 mL de suspensão.

4.2.5.2 Avaliação física da qualidade

O ensaio de reconstituição foi realizado através da mistura de quantidade de pó contida no sachê (8,5 g) com volume de água purificada para a obtenção de 100 mL, dentro de frasco de vidro âmbar com capacidade para 120 mL. Os frascos foram colocados em misturador horizontal e mantidos em 100 rpm. A cada intervalo de 5 minutos os frascos eram recolhidos e observados quanto à homogeneidade da suspensão, vertendo o conteúdo para um béquer em busca da presença de grumos no líquido ou aderidos às paredes do frasco.

O ensaio de viscosidade e comportamento reológico foi realizado imediatamente após a reconstituição, realizada por agitação manual, empregando viscosímetro rotacional Visco Tester 6L, como anteriormente descrito no item 4.2.2.7.2, pg 52.

Quatro diferentes formulações contendo diferentes quantidades (1,19 e 2,35%) de aerosil e de celulose foram preparadas, dispersas em água e transferidas para provetas com capacidade de 100 mL, monitorando-se o volume de sedimento formado ao longo do tempo até 71 horas depois da reconstituição. Os resultados são apresentados na forma de percentagem de volume sedimentado em relação ao volume total da suspensão.

A medida do pH da suspensão reconstituída foi realizada como anteriormente já descrito (item 4.2.2.7.1, pg. 52).

4.2.5.3 Determinação do teor dos ativos

Estando os fármacos combinados numa formulação em dose fixa, foi realizada a determinação do teor dos ativos empregando o método espectrofotométrico UV que foi desenvolvido.

Quantidade exatamente pesada da mistura, aproximadamente igual a 4,5 g, foi dispersa em metanol:água (1:2) até o volume de 50 mL em balão volumétrico. Para a completa dissolução dos ativos a mistura foi submetida a ultrassom durante 10 minutos. Realizada diluição 1:500 com água a partir do conteúdo inicial e foi submetido a leitura espectrofotométrica de 200 a 500 nm em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico empregando água como branco. A mistura dos excipientes foi avaliada da mesma forma.

4.2.5.4 Avaliação da estabilidade do pó

A avaliação da estabilidade do pó para reconstituição foi realizada através do ensaio de DSC cinético, empregando 2 a 5 mg de amostra em cada corrida, considerando o intervalo de temperatura entre ambiente e 400 °C, rampas de aquecimento de 2 °C/min até 30 °C/min, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30 mL/min. Em seguida, os dados foram tratados segundo o método de Ozawa, em busca de encontrar a energia de ativação, o fator de frequência e a ordem de reação (SHIMADZU, 2010).

4.2.5.5 Avaliação da estabilidade da suspensão reconstituída

O teor de fármacos da suspensão reconstituída foi avaliado imediatamente após a reconstituição (tempo zero) e a cada hora durante as primeiras 10 horas, e novas leituras 2 e 3 dias após a preparação, sendo as suspensões mantidas em frasco de vidro, protegidas da luz e à temperatura ambiente.

4.2.6 Desenvolvimento do comprimido dispersível

4.2.6.1 Preparação

A base do desenvolvimento do comprimido dispersível foram as misturas de pó empregadas para suspensão extemporânea, avaliando os excipientes aerosil e a celulose microcristalina 101 em duas concentrações (1,19% e 2,35%). Para reduzir as opções, foram adicionados deslizante (Talco 10%) e lubrificante (Estearato de magnésio 1%) a cada uma das misturas e realizada a compressão em máquina rotativa com punção plano, chanfrado, sulcado, com 8 mm de diâmetro, como descrito no item 4.2.1.6.2. Os comprimidos obtidos foram

avaliados quanto ao peso, dureza e friabilidade segundo os métodos descritos na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed.

Como agentes desagregantes foram avaliados croscarmelose e crospovidona, escolhendo aquele que propiciou a dispersão do comprimido em menor tempo depois de ser colocado em contato com 10 mL de água. O método farmacopeico de determinação do tempo de desintegração foi empregado na última etapa de desenvolvimento do comprimido.

4.2.6.1.1 Caracterização física da mistura

Análise térmica por DSC, realizada como descrito no item 3.2.1.3, sendo a temperatura até 400 °C, fluxo de nitrogênio de 30 mL/min, e rampa de aquecimento geralmente de 10 °C/min. Para a avaliação da estabilidade empregando o método de Osawa, as rampas de aquecimento foram de 2 até 40 °C/min, empregando painéis de alumínio contendo de 2 a 5 mg de amostra.

4.2.6.1.2 Compressão

Cerca de 500 g de massa de pó, obtido como descrito no item 4.2.6.1, foram colocados no alimentador da máquina de comprimir rotativa LEMAQ, ajustando-se peso para obter comprimido de 260 mg e dureza adequada, monitorando-se estes parâmetros durante a compressão. A máquina foi acionada para realizar a compressão em baixa velocidade (cerca de 20 rpm), para que a compressão fosse realizada de forma lenta a ponto de permitir a expulsão do ar contido entre as partículas do pó fino que constitui a mistura a ser compactada.

4.2.6.2 Avaliação da qualidade

Dimensões dos comprimidos

A medida das dimensões dos comprimidos foi realizada com o uso de paquímetro, envolvendo medidas da altura e do diâmetro, expressando os resultados em mm, na forma de média, desvio padrão e desvio padrão relativo (%).

Determinação do peso médio

A medida realizada segundo descrição da Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. Volume 1 (5.1.1) empregando balança analítica, expressando os resultados em g, na forma de média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Determinação da dureza

A medida realizada segundo descrição da Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. Volume 1 (5.1.3.1) empregando o aparelho digital de bancada fabricado pela Nova Ética, expressando os resultados em Newtons (N), na forma de média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Determinação da friabilidade

A medida realizada segundo descrição da Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. Volume 1 (5.1.3.2) empregando o aparelho com controle digital, de bancada, fabricado pela Nova Ética, expressando o resultado na forma percentual de perda de massa.

Determinação do tempo de desintegração

A medida realizada segundo descrição da Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. Volume 1 (5.1.4.1) empregando o aparelho Nova Ética, com água a 37 °C e a 25 °C, expressando o resultado em minutos.

Determinação do teor dos ativos

Comprimidos foram colocados individualmente em balões volumétricos de 100 mL, acrescidos de água e metanol, agitados, submetidos a sonicação durante 5 minutos, e o volume completo com água. O conteúdo dos balões de 100 mL foi injetado em HPLC com loop de 20 µL, coluna RP C18 5 µm, 150 x 4,6 mm, empregando fase móvel fluído a 1 mL/min composta por uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato pH 6,8, em sistema de gradiente, como descrito na USP 38, com ligeira alteração em virtude do tipo de coluna utilizado. O sistema gradiente e a composição das fases móveis foram descritos anteriormente.

Determinação do perfil de dissolução

O perfil de dissolução foi determinado como descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª. Ed. Volume 1 (5.1.5), empregando o método 2 (pá), na velocidade de 50 rpm, temperatura de 37 °C, 900 mL de HCl 0,1M como meio dissolutor, coleta de 5 mL sendo realizada a cada 15 minutos. Uma porção de 1 mL da amostra recolhida foi imediatamente diluída com tampão fosfato pH 6,8 1 M até o volume de 10 mL e submetida a leitura espectrofotométrica (mesmo método desenvolvido para determinação do teor) na faixa de 200 a 500 nm em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Determinação da estabilidade da dispersão obtida com os comprimidos

Comprimidos dispersíveis contendo dose fixa combinada de isoniazida, pirazinamida e rifampicina foram dispersos em metanol:água (1:1), sonicados e o volume completo com a mesma mistura de solventes. A solução resultante foi avaliada por CLAE segundo o método descrito no item anterior. As injeções foram repetidas sistematicamente até um período total de 500 minutos (cerca de 8 horas), e os cromatogramas foram avaliados em termos de teor de cada um dos ativos em relação ao tempo.

Avaliação da estabilidade dos comprimidos

A avaliação da estabilidade dos comprimidos foi realizada da mesma forma que a empregada para o pó para reconstituição, através do ensaio de DSC cinético, empregando 2 a 5 mg de amostra proveniente da trituração dos comprimidos. Cada corrida foi realizada no intervalo de temperatura entre ambiente e 400 °C, com rampas de aquecimento de 2 °C/min até 30 °C/min, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30 mL/min. Em seguida, os dados foram tratados segundo o método de Ozawa, em busca de encontrar a energia de ativação, o fator de frequência e a ordem de reação (SHIMADZU, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS INSUMOS ATIVOS

Os insumos ativos foram avaliados quanto às características físico-químicas importantes para a formulação de formas farmacêuticas sólidas, compreendendo os parâmetros teor, espectroscopia UV e IV, análise térmica por DSC e TG.

5.1.1 Teor

A avaliação química do teor de cada um dos fármacos empregando cromatografia líquida de alta eficiência como descrito na metodologia, resultou nos seguintes valores:

Rifampicina 98,54%

Isoniazida 99,53%

Pirazinamida 99,67%

Segundo consta na Farmacopeia Brasileira 5a. Ed, a rifampicina deve conter entre 97 e 102% de $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, mas a forma de dosagem indicada na monografia é por espectrofotometria a 475 nm, e a forma de dosagem empregada neste doseamento foi a cromatografia líquida de alta eficiência, na amostra não dessecada.

Ainda segundo a citada Farmacopeia, o limite para isoniazida é entre 98 e 102%, podendo o doseamento ser realizado por volumetria de neutralização, espectrofotometria a 265 nm ou cromatografia líquida de alta eficiência, e, para pirazinamida, o limite é entre 99 e 101%, com doseamento realizado por volumetria em meio não aquoso.

Percebe-se, pelos valores encontrados, que o todos os insumos atendem aos requisitos farmacopeicos para serem utilizados na preparação de medicamentos. Portanto, além de terem apresentado perfil cromatográfico e de infra-vermelho (vide item 4.1.2 a seguir) compatíveis com as substâncias químicas de referência, foram esses os insumos utilizados no decorrer do presente trabalho. Como forma de permitir melhor conservação durante todo o andamento da pesquisa, foram armazenados sob refrigeração (temperatura inferior a 5°C), fracionados em frascos de vidro com tampa, sendo aberto um frasco de cada vez após equilíbrio com a temperatura ambiente.

5.1.2 Identificação por infravermelho (IV) e por ultravioleta (UV)

O perfil espectrofotométrico IV de cada um dos insumos ativos e suas respectivas substâncias químicas de referência são apresentados nas Figuras 3, 4 e 5, onde se observa a

similaridade entre todas as bandas caracterizando a identidade de cada par avaliado. Segundo o critério de identificação, é necessário que haja coincidência entre os máximos e mínimos do espectro obtido com a amostra em relação ao espectro obtido com a substância química de referência (SQR) nos mesmos comprimentos de onda.

Figura 3 - Espectros infravermelho da isoniazida SQR e dos insumos ativos utilizados provenientes do LAFEPE (PE) e NUPLAM (RN).

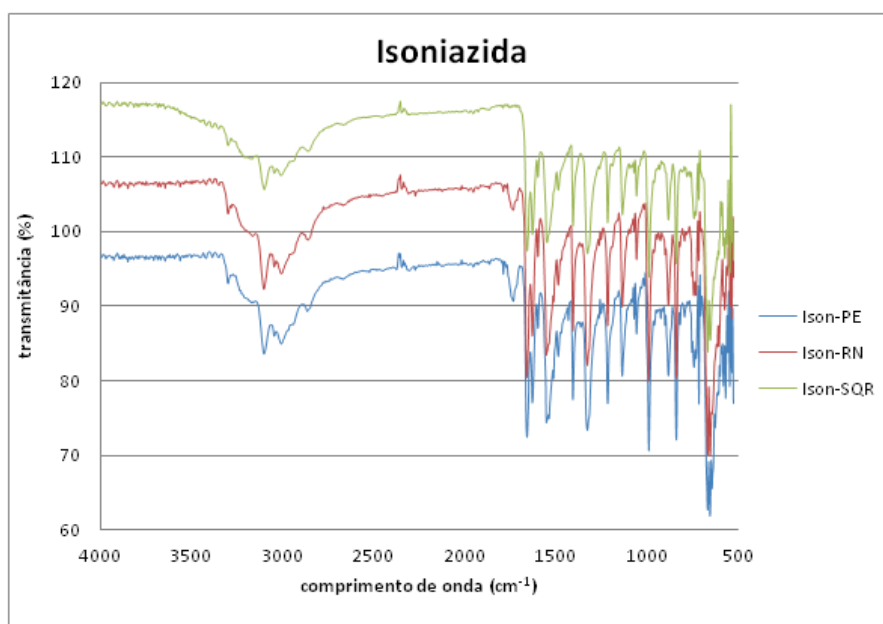


Figura 4 - Espectros infravermelho da pirazinamida SQR e do insumo ativo utilizado proveniente do NUPLAM (RN).

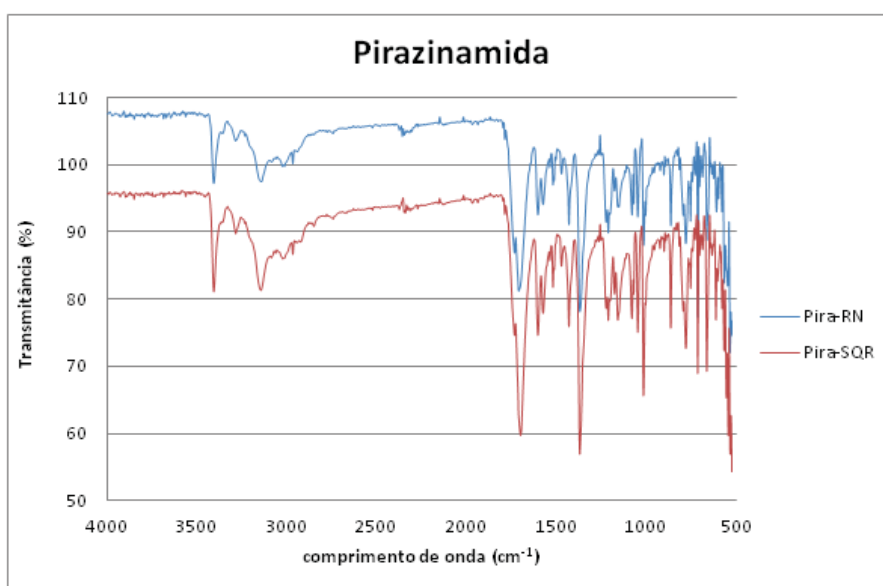
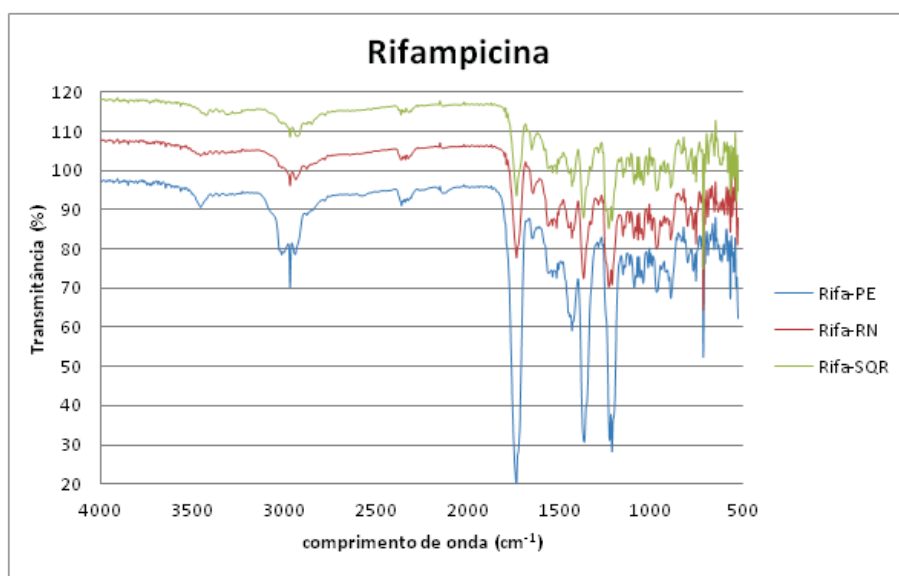
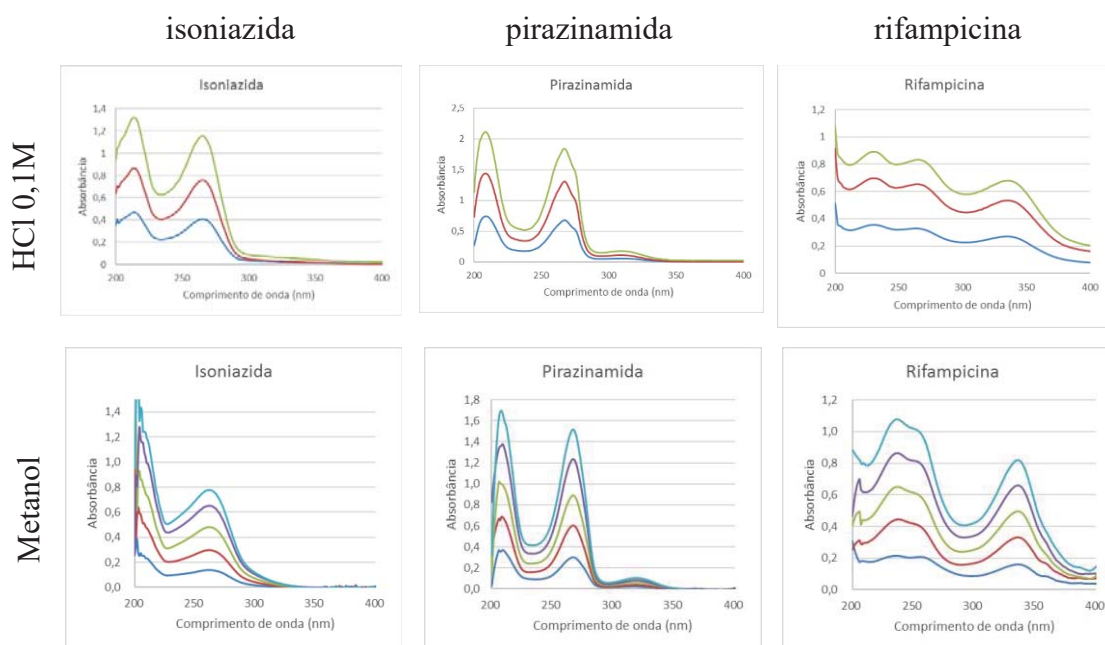


Figura 5 - Espectros infravermelho da rifampicina SQR e dos insumos ativos utilizados provenientes do LAFEPE (PE) e NUPLAM (RN).



Os espectros UV obtidos em HCl 0,1M e em metanol confirmam a similaridade entre as SQR's e respectivas substâncias farmacêuticas ativas, como pode ser observado na figura 6 a seguir. Também é possível observar os diferentes perfis espectrofotométricos das substâncias segundo a condição em que o fármaco é dissolvido, como era esperado, completando as informações fornecidas por FELDER & PITRE, 1983.

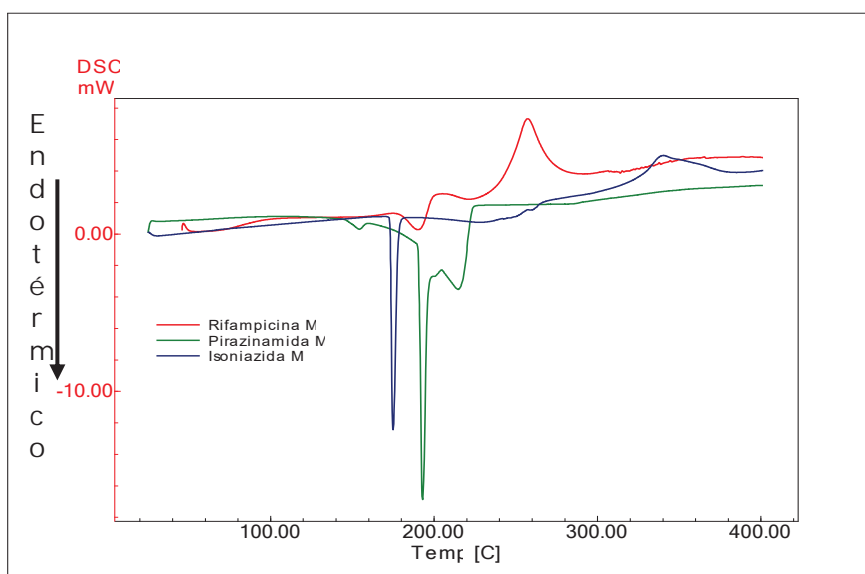
Figura 6 - Espectros UV da isoniazida, pirazinamida e rifampicina em HCl 0,1M e em metanol.



5.1.3 Análise térmica

Como critério de caracterização diferencial, e considerando ainda o que consta no artigo de AGRAWAL et al (2014b), a rifampicina aparenta ser constituída predominantemente por cristais do polimorfo II, notadamente pelo perfil térmico de DSC, com o evento endotérmico referente a fusão, imediatamente seguido pela transição polimórfica com decomposição, como pode ser visualizado na figura 7.

Figura 7 – DSC da rifampicina, isoniazida e pirazinamida utilizados como insumos ativos



Os eventos térmicos observados por DSC ao analisar isoladamente as amostras de rifampicina, isoniazida e pirazinamida estão apresentados na figura 7, e estão de acordo com dados apresentados em literatura, sendo relevante notar que a rifampicina se apresenta predominantemente como polimorfo II. Os eventos térmicos principais observados para os respectivos fármacos apresentados na tabela 7 correspondem à fusão de cada um, como é descrito em trabalhos anteriores (LAVOR, 2010).

Tabela 7 - Principais eventos térmicos observados na análise por DSC dos insumos ativos rifampicina, isoniazida e pirazinamida.

	rifampicina	isoniazida	pirazinamida
Onset (°C)	180,62	173,63	147,09
Pico (°C)	190,68	175,45	154,78
Endset (°C)	199,08	178,12	158,71
Calor (J/g)	-19,85	-132,37	-14,20

Como citado em trabalhos anteriores (GALLO & RADAELLI, 1976), o primeiro evento que ocorre com a rifampicina é em torno dos 193°C corresponde ao ponto de fusão, observado na forma de endoterma na curva de DSC. Imediatamente é seguido por uma exoterma próxima de 203°C correspondente à recristalização e, mais adiante (250°C), uma decomposição térmica, com expressiva perda de massa que compromete cerca de 20% da quantidade de rifampicina. FERREIRA e colaboradores (2014), analisando o polimorfo I da rifampicina, descrevem eventos térmicos de degradação da rifampicina ocorrendo em 250°C, 287°C e 488°C, com perda de massa de 23,3%, 13,5% e 62,8%, respectivamente. Ao mesmo tempo, a avaliação por DSC demonstra apenas 2 eventos térmicos relacionados à decomposição térmica da rifampicina, sendo o primeiro a 266°C e o segundo a 357°C. Por se tratar de forma anidra, nenhum evento térmico foi registrado em temperatura abaixo de 115°C.

AGRAWAL e colaboradores (2004b) já apresentam o polimorfo I como sofrendo decomposição entre 255°C e 266°C, enquanto o polimorfo II apresenta uma endoterma de fusão entre 180°C e 197°C, seguida imediatamente de uma exoterma de recristalização para a formação do polimorfo I (transição sólido-líquido-sólido), e, finalmente a decomposição entre 247°C e 266°C.

5.1.4 Densidade aparente e de compactação

Os ativos foram avaliados isoladamente e os valores de densidade aparente e de compactação (de acordo com o número de batidas da proveta) estão apresentados na tabela 8. A partir dos dados de densidade aparente e de compactação foram calculados os valores de índice de Carr (IC, índice de compressibilidade), cujos valores são apresentados nas mesmas tabelas supra citadas.

O fator de Hausner (FH) não foi apresentado pois está diretamente relacionado ao valor do índice de compressibilidade (IC), da seguinte forma:

$$IC = 100 \cdot (dt - db) / dt \quad \text{e} \quad FH = dt / db$$

$$IC = 100 (dt/dt - db/dt)$$

$$IC = 100 (1 - 1/FH)$$

$$IC = 100 (FH - 1) / FH$$

Ou seja, como os dois estão intimamente relacionados e expressam uma relação com a fluidez do pó, foram apresentados apenas os valores de IC, cuja interpretação é de que, quanto maior for o valor de IC, menor é a fluidez do pó, como expresso por AULTON (2005). Avaliando segundo este autor, a rifampicina se apresenta com fluxo escasso, a isoniazida como

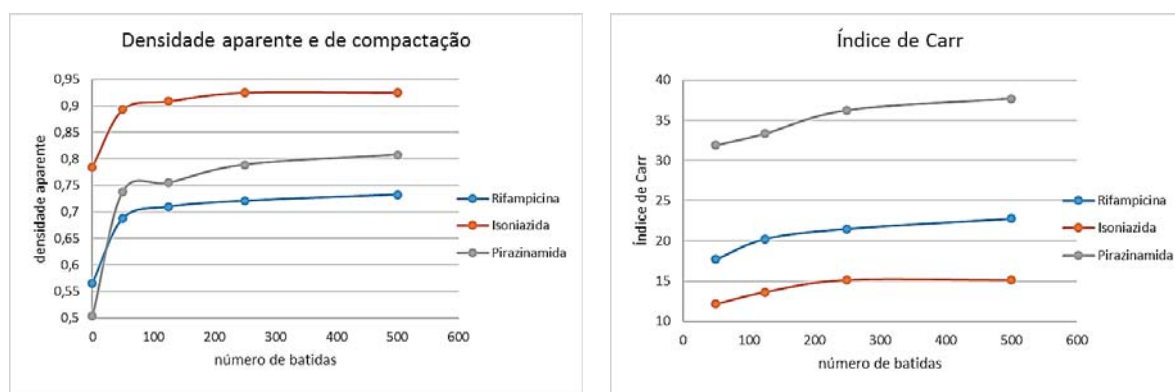
fluxo de bom a excelente, e a pirazinamida com fluxo pobre a muito pobre, típico de pós fluidos coesivos.

Tabela 8 - Densidades aparentes, de compactação e Índice de Carr para a rifampicina, isoniazida e pirazinamida.

Batidas	Rifampicina		Isoniazida		Pirazinamida	
	densidade	I.Carr	densidade	I.Carr	densidade	I.Carr
0	0,5659	---	0,7849	---	0,5033	---
50	0,6878	17,723	0,8932	12,125	0,7390	31,894
125	0,7097	20,262	0,9089	13,643	0,7550	33,338
250	0,7211	21,523	0,9251	15,155	0,7893	36,235
500	0,7329	22,786	0,9251	15,155	0,8077	37,687

Com os dados da tabela 8, foram construídos os gráficos apresentados na figura 8, onde é possível perceber que a expressão dos dados apenas como densidade aparente e de compactação não consegue representar a característica de compressibilidade e de fluidez da amostra. Observando o gráfico com os dados da densidade aparente e de compactação seria possível supor que o fármaco que apresenta maior densidade de compactação é o que apresenta melhor fluidez (isoniazida) e a rifampicina, seguindo o mesmo raciocínio, teria a pior fluidez. No entanto, observando os dados de IC, foi verificado que é a pirazinamida que possui a pior fluidez e também pior compressibilidade.

Figura 8 - Representação gráfica das densidades aparente, de compactação e do índice de Carr da rifampicina, isoniazida e pirazinamida.



5.1.5 Ângulo de repouso

Os resultados obtidos de ângulo de repouso através da medida da altura e do diâmetro da base do cone formado pelo escoamento da amostra estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Ângulo de repouso para os fármacos rifampicina, isoniazida e pirazinamida.

	Ângulo de repouso (graus)	Desvio padrão (n=3)
Rifampicina	38,5	1,02
Isoniazida	20,6	0,34
Pirazinamida	54,3	3,03

Percebe-se nitidamente que os valores estão alinhados com aqueles obtidos através da medida do índice de compressibilidade, em que a melhor fluidez é da isoniazida e o pior caso é o da pirazinamida.

5.1.6 Observação microscópica dos fármacos

Na figura 9 estão apresentadas as microfotografias obtidas dos fármacos sob aumento de 100 vezes em luz normal, onde é facilmente percebida a diferença de formato e de tamanho das partículas entre os mesmos.

Figura 9 - Microfotografia com aumento de 100 X de rifampicina, isoniazida e pirazinamida.



Avaliando cada fármaco separadamente percebe-se que a rifampicina apresenta formato de partícula mais regular, quase cúbico, com a predominância de partículas de muito pequeno tamanho, apesar da presença de aglomerados e de partículas de grande tamanho. Os resultados de tamanho médio e desvio padrão estão reunidos na tabela 10. A isoniazida se apresenta como grandes partículas em formato de paralelepípedo, apesar de coexistirem partículas pequenas e de formato próximo de cubo. A pirazinamida apresenta-se com formato mais fino do que a

isoniazida, adquirindo quase o formato acicular, com partículas predominantemente menores do que as apresentadas pela isoniazida, e maiores do que a rifampicina.

Tabela 10 - Tamanho médio e desvio padrão das partículas de rifampicina, isoniazida e pirazinamida.

	Tamanho médio (μm)	Desvio padrão (μm)
rifampicina	82,9	15,25
isoniazida	719,9	141,27
pirazinamida	302,0	49,36

Estas diferenças de formatos e de tamanhos médios podem explicar os valores de ângulo de repouso observados para os fármacos, em que a isoniazida com as maiores partículas e com formato de paralelepípedo tem melhor fluidez, a rifampicina, mesmo com as menores partículas, mas em formato cúbico tem fluidez intermediária, e a pirazinamida com formato quase acicular apresenta fluidez ruim. A relação entre a forma das partículas (tamanho, esfericidade), densidade aparente e fluidez está demonstrada em diversos trabalhos, tais como FU *et al* (2012), CLEARY (2008), LIU *et al* (2008) e PODCZECK e MIAH (1996).

Além de influir na fluidez, é de se esperar que possa ocorrer segregação entre as partículas quando os 3 fármacos forem colocados em processo de mistura por causa dos diferentes tamanhos e diferentes densidades aparentes.

5.2 DESENVOLVIMENTO DE VEÍCULO PARA USO ORAL EM PEDIATRIA

Um veículo destinado ao transporte de fármacos para uso oral em pediatria deve possuir algumas características de qualidade, tais como viscosidade para ser capaz de ser utilizado no preparo de soluções e de suspensões, ter facilidade de ser utilizado tanto durante o preparo do medicamento quanto da sua administração e deglutição; não ser hiperosmótico, calorígeno nem cariogênico (PERES *et al*, 2005; PASSOS *et al*, 2010); sabor agradável para que possa ser utilizado e aceito por crianças de diversas faixas etárias (ISHIZAKA *et al*, 2004; MENNELLA, PEPINO e BEAUCHAMP, 2003); resistir à presença de eletrólitos e de variações de pH, normalmente associados à estabilização dos fármacos carregados; e possuir estabilidade física e microbiológica (NUNN e WILLIAMS, 2004).

Foi observado que a dispersão imediata do agente suspensor na água resultava na formação de grumos (agregados de pó) difíceis de serem homogeneizados. Quando o mesmo era previamente disperso em solvente hidrofílico como o propilenoglicol ou glicerol, e depois

disperso em água, o intumescimento ocorria sem a formação dos grumos e por não haver necessidade de empregar agitação vigorosa, ocorria menor aprisionamento de bolhas de ar na preparação obtida. Como o propilenoglicol é um excipiente que está associado a reações adversas em crianças, mesmo que os casos mais importantes tenham ocorrido com o uso de medicação parenteral (LIM, POOLE, PAEGLER, 2014), optou-se por empregar o glicerol na dispersão do agente suspensor.

O produto final nas diferentes formas (líquida pronta para uso, líquida concentrada e pó para reconstituição) foram objeto de pedido de uma patente, tendo sido atribuída a denominação de Gute. O depósito feito no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual foi realizado em 11/04/2014, sob número BR 1020140087699, como consta no Anexo I.

5.2.1 Escolha dos componentes das preparações

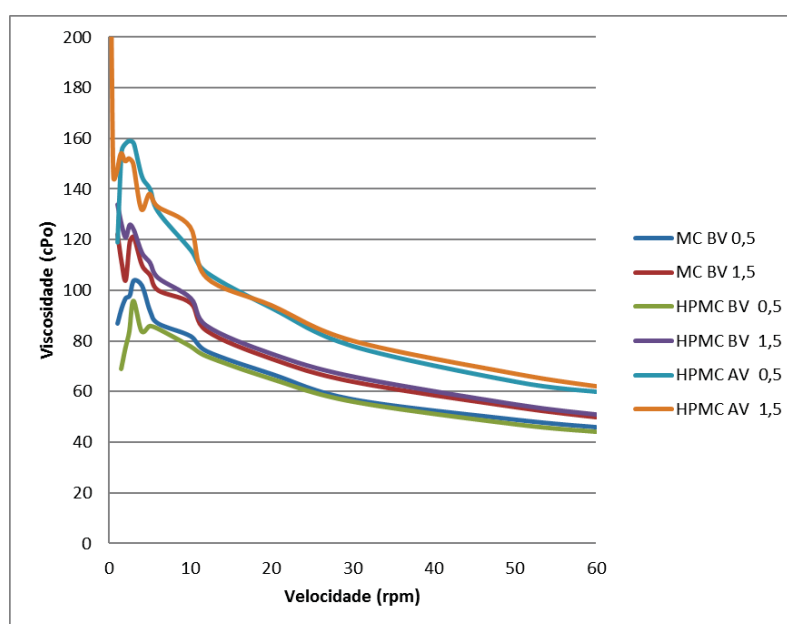
Uma busca realizada em revistas, livros e formulários sobre veículos líquidos disponíveis para uso em preparações orais resultou numa lista de excipientes comumente empregados para as mais diversas finalidades, desde a sacarose contida em elevada concentração (85% p/v) no xarope simples, o sorbitol empregado como solução a 70% p/v, como formas para conferir sabor doce e viscosidade ao veículo. No entanto, essas preparações são hipertônicas e causam irritação no trato gastrointestinal levando a diarreias (EDES, WALK, AUSTIN, 1990; JOHNSTON, GOVEL, ANDRITZ, 1994). São também calorigênicas e cariogênicas, sendo este último item a principal preocupação em relação a saúde bucal das crianças (PASSOS et al, 2010), por isso foi decidido pela utilização de nenhum desses agentes na composição do veículo.

Como formas alternativas à presença massiva de sacarose ou sorbitol, são empregados polímeros solúveis em água de forma a conferir viscosidade ao veículo, juntamente com edulcorantes para conferir sabor doce agradável. Para esses casos foram utilizados carmelose sódica, metilcelulose, hietelose, hipromelose e goma xantana como agentes doadores de viscosidade, e sararina sódica, acessulfame potássico, sucralose e esteviosídeo como edulcorantes. Diante da variedade de composições e concentrações empregadas, foi avaliado o efeito de alguns polímeros em diferentes concentrações sobre a viscosidade das respectivas soluções aquosas resultantes, obtendo-se os valores apresentados na forma de gráfico de comportamento reológico contidos na figura 10.

Observa-se pela figura 10 que o comportamento reológico é pseudo-plástico, notadamente a partir das leituras obtidas acima de 10 rpm. Antes disso, o comportamento errático não permite atribuir uma reologia adequada. Além disso, observa-se as diferenças de

viscosidade causadas pelas diferentes concentrações e diferentes graus de polimerização, designadas pelas siglas BV (baixa viscosidade) e AV (alta viscosidade). Metilcelulose BV e Hipromelose BV têm sua viscosidade claramente definidas em função da concentração do polímero, mas a Hipromelose AV, nas duas concentrações apresentadas na figura 10, apresentam viscosidades muito semelhantes na faixa de velocidade empregada na leitura.

Figura 10 – Comportamento reológico de diluições aquosas dos polímeros metilcelulose (MC) e hipromelose (HPMC). BV e AV significam, respectivamente, baixa viscosidade e alta viscosidade.



MC BV = Methocel A15 Premium LV; HPMC BV = Methocel K100 Premium LV; HPMC AV = Methocel K100M Premium.

Está documentado em literatura que a metilcelulose é sensível à temperatura, podendo até formar gel em temperatura de 50 °C (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009), além de ser incompatível com parabenos. Na preparação da dispersão aquosa é ainda necessário que seja realizado o resfriamento do sistema para o completo processo de intumescimento. Por esses motivos, pela baixa viscosidade apresentada pelas soluções contendo o excipiente, e pelas incompatibilidades com tensoativos, que às vezes são necessários como agente molhante no preparo de suspensão, foi decidido pela não utilização da metilcelulose.

De modo semelhante, apesar de não com as mesmas restrições, os dois polímeros denominados hipromelose também foram rejeitados para a composição do veículo oral. Estes também podem gelificar, apesar de que isso só venha a ocorrer em condição mais drástica do que para a metilcelulose (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). No entanto, a variação de

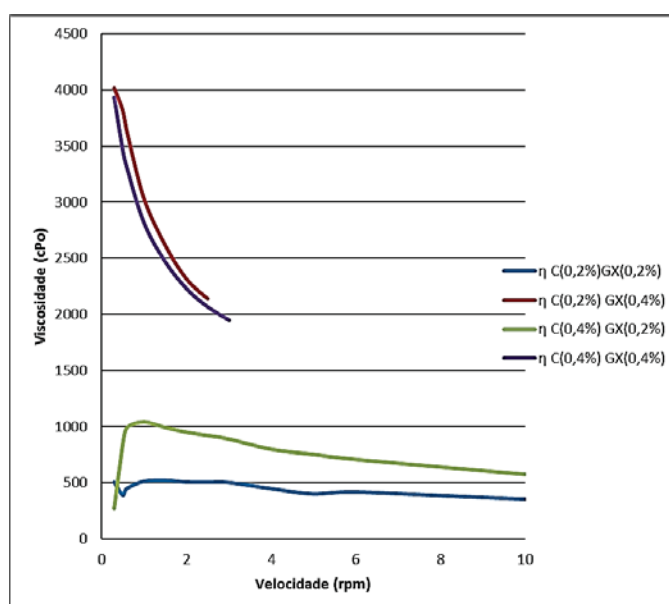
viscosidade observada com a variação da concentração destes polímeros, além do errático comportamento observado nas menores velocidades de leitura da viscosidade, também foram critérios utilizados para a sua não utilização na composição do veículo oral.

Após essas eliminações, restaram apenas a carmelose sódica MV (média viscosidade) e a goma xantana, com as quais foram realizados os ensaios, cujos resultados são apresentados a seguir.

5.2.2 Efeito da associação de polímeros sobre o comportamento reológico

Combinando goma xantana (GX) com carmelose sódica (CMC), numa triagem realizada na forma de um planejamento fatorial de dois níveis, verificou-se que a maior intensidade de efeito sobre a viscosidade e comportamento reológico foi da GX, como se pode perceber pela figura 11. Só se percebe mais nitidamente o efeito da carmelose quando a goma xantana está em baixa concentração. A partir deste resultado foi alterada a faixa de valores de concentração da goma xantana (0,1 a 0,2%) e elaborado um outro planejamento fatorial 2², agora com ponto central (0,15%), mantendo a faixa de concentração empregada para a carmelose sódica (0,2 a 0,4%).

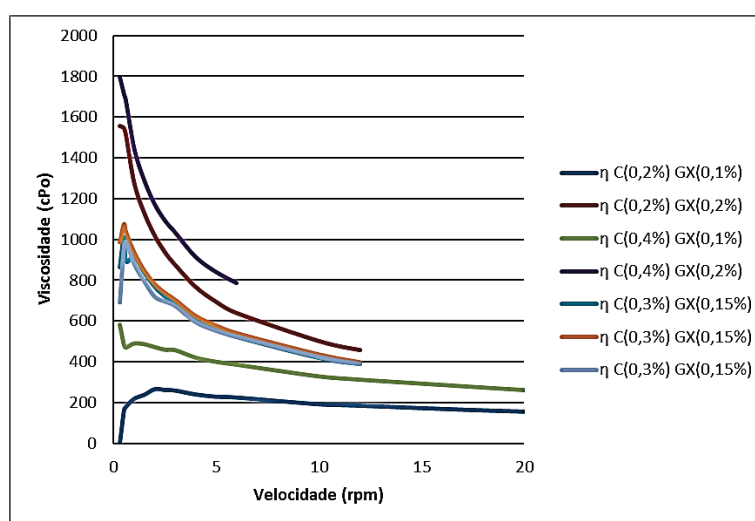
Figura 11 - Comportamento reológico das preparações líquidas obtidas com a combinação de carmelose sódica (C) com goma xantana (GX) no planejamento fatorial 2².



Realizando as novas combinações e avaliando o comportamento reológico de cada uma das soluções foram obtidos os resultados apresentados a seguir na figura 12. Alguns fatos ficam

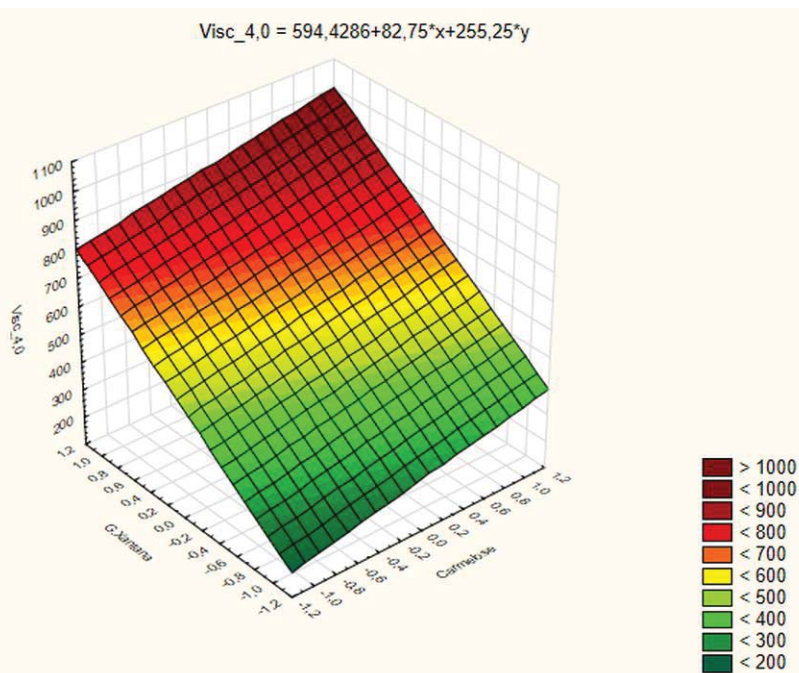
claros: (1) a repetibilidade dos resultados obtidos com a triplicata que representa a combinação de concentrações do ponto central, com a qual se permite inferir que qualquer variação observada na viscosidade das diferentes formulações poderá ser atribuída ao efeito da variação na concentração dos polímeros; (2) a goma xantana proporciona maior efeito sobre a viscosidade do que a carmelose sódica; (3) o comportamento pseudo-plástico está relacionado diretamente à goma xantana.

Figura 12 – Comportamento reológico das preparações líquidas obtidas com a combinação de carmelose sódica (C) com goma xantana (GX) no planejamento fatorial 2^2 com ponto central.



A figura 13 apresenta o gráfico de superfície de resposta da combinação de goma xantana e carmelose sódica sobre a viscosidade do veículo. Verificou-se que a viscosidade é máxima quando os dois polímeros encontram-se na maior concentração avaliada, no entanto o efeito da goma xantana sobre esse parâmetro é mais intenso.

Figura 13 – Gráfico de superfície de resposta apresentando o efeito da carmelose e da goma xantana sobre a viscosidade do veículo medida a 4 rpm.



x representa o nível de carmelose; y representa o nível de goma xantana.

Aplicando modelo de regressão multivariada aos dados de comportamento reológico obtidos para os veículos preparados com a combinação dos polímeros, foram encontrados os coeficientes apresentados na tabela 11, onde se confirma o pleno predomínio do efeito positivo da goma xantana sobre a viscosidade, sendo sempre muito maior do que o efeito causado pela carmelose em todas as velocidades avaliadas. Confirma-se também que a intensidade do efeito da carmelose é menor, demonstrando que o comportamento pseudo-plástico conferido pela goma xantana é muito maior do que o obtido com a carmelose sódica. O efeito da interação entre os dois polímeros mostrou-se absolutamente e estatisticamente insignificante sobre o valor da viscosidade da solução.

A importância do comportamento reológico do tipo pseudo-plástico tem sido salientada por ser esta a característica de fluidos que apresentam elevada viscosidade sob baixa velocidade de cisalhamento, e a viscosidade vai diminuindo progressivamente com o aumento da velocidade de cisalhamento (SINKO, 2008). Este tipo de comportamento é útil no carregamento de fármacos insolúveis em que a forma farmacêutica líquida resultante é uma suspensão, pois em repouso tem viscosidade elevada e, pela lei de Stokes, vai apresentar menor velocidade de sedimentação das partículas dispersas. Além disso, sob agitação tem sua viscosidade diminuída, permitindo a mais rápida e fácil redispersão e homogeneização (SINKO, 2008). Ainda sob o

simples ato de verter o produto líquido, a redução inicial da viscosidade, que se observa a partir do produto em repouso, já é suficiente para permitir a tomada da dose e sua administração.

Tabela 11 – Efeitos da carmelose (C) e da goma xantana (GX) sobre a viscosidade do veículo sob diferentes velocidades de cisalhamento

Rotação (rpm)	Efeito				
	Médio	Carmelose (C)	Goma Xantana (GX)	C e GX	R ²
0,5	994	123,25	654,25	-38,25	0,9949
0,6	965	115,25	635,25	-30,25	0,9937
1,0	880	110,75	503,25	-25,25	0,9939
1,5	802	102,75	422,75	-21,25	0,9942
2,0	742	91,00	363,50	-12,50	0,9944
2,5	700	89,25	327,25	-9,75	0,9945
3,0	669	90,25	298,25	-9,25	0,9946
4,0	594	82,75	255,25	-7,75	0,9953
5,0	549	80,25	226,25	-5,75	0,9948
6,0	517	78,00	203,50	-3,00	0,9950

Os dados da tabela 11 devem ser lidos da seguinte forma:

$$\text{Visc}_4 = 594 + 82,75.C + 255,25.GX - 7,75.C.GX$$

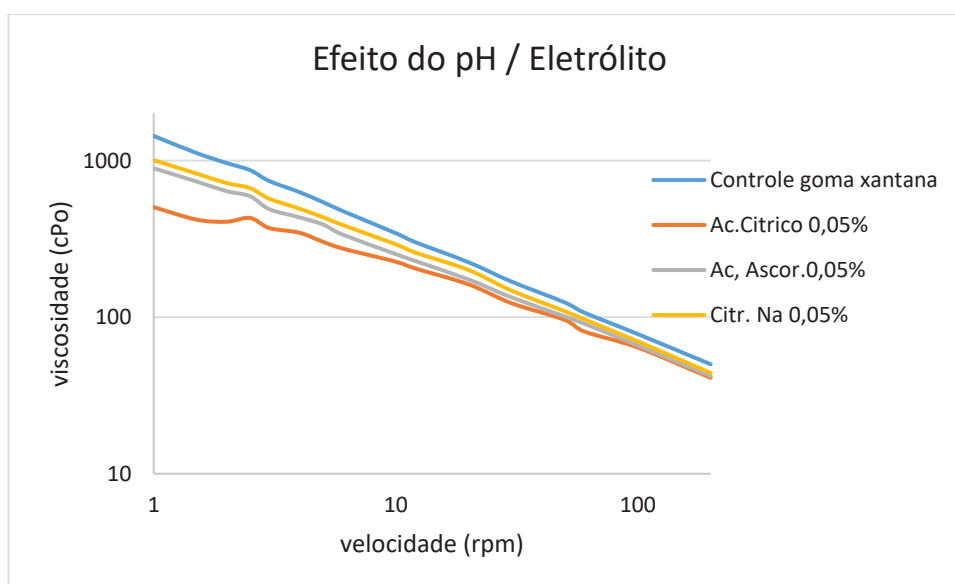
Ou seja, a viscosidade a 4 rpm possui um valor basal médio (594 cP) que é acrescido de 82,75 cP a cada aumento de um nível de carmelose (correspondente neste experimento a 0,1%), acrescido de 255,25 cP a cada aumento de um nível de goma xantana (correspondente neste experimento a 0,05%), e subtraído de 7,75 cP pela interação de efeito entre os dois fatores. Este último item foi sempre considerado não significativo no ensaio de regressão multivariada. O último valor da coluna (R²) representa o coeficiente de determinação, que estabelece a razão entre a variação explicada e a variação total do ensaio, demonstrando assim que os modelos encontrados por regressão multivariada estão ajustados em mais de 99% em relação aos dados obtidos nos experimentos.

Diante dos resultados obtidos, e considerando a variedade de insumos que deverão ser contemplados na sua veiculação, foi decidido pela exclusão da carmelose da composição, pois: (1) pouco contribui para a viscosidade do veículo quando comparada à goma xantana; (2) para conferir maior viscosidade seria necessário o seu uso em mais elevada concentração; (3) praticamente não influencia para a obtenção do comportamento reológico pseudo-plástico; (4) é de natureza aniônica e, assim, passível de sofrer interação com fármacos catiônicos. Doravante, então, será utilizada apenas a goma xantana na concentração de 0,15% p/v.

5.2.3. Efeito da mudança do pH e concentração de sal sobre a viscosidade do veículo

A adição de diferentes quantidades de ácido cítrico e de ácido ascórbico foi realizada e o produto obtido teve seu comportamento reológico avaliado, demonstrando que à medida que ocorre o abaixamento do pH, vai sendo também reduzida a viscosidade do veículo obtido. Observando o efeito da alcalinização com citrato de sódio, percebe-se que o veículo é sensível à presença de íons, e que não é apenas o abaixamento do pH que provoca redução na viscosidade (figura 14). Deve-se considerar que este veículo se destina ao preparo de formas extemporâneas que viabilizem a administração de medicamentos líquidos por via oral às crianças. Portanto, para o fim a que se destina o veículo, a alteração nos valores de viscosidade que se observa principalmente nas medidas realizadas em baixa velocidade, é de pequena relevância, pois entre as tomadas será sempre necessário fazer nova homogeneização através do ato de agitar o medicamento antes do uso. No entanto deve-se ter o cuidado para evitar que elevadas concentrações de eletrólitos estejam presentes na composição.

Figura 14– Efeito de eletrólitos e pH sobre a viscosidade do veículo contendo goma xantana.



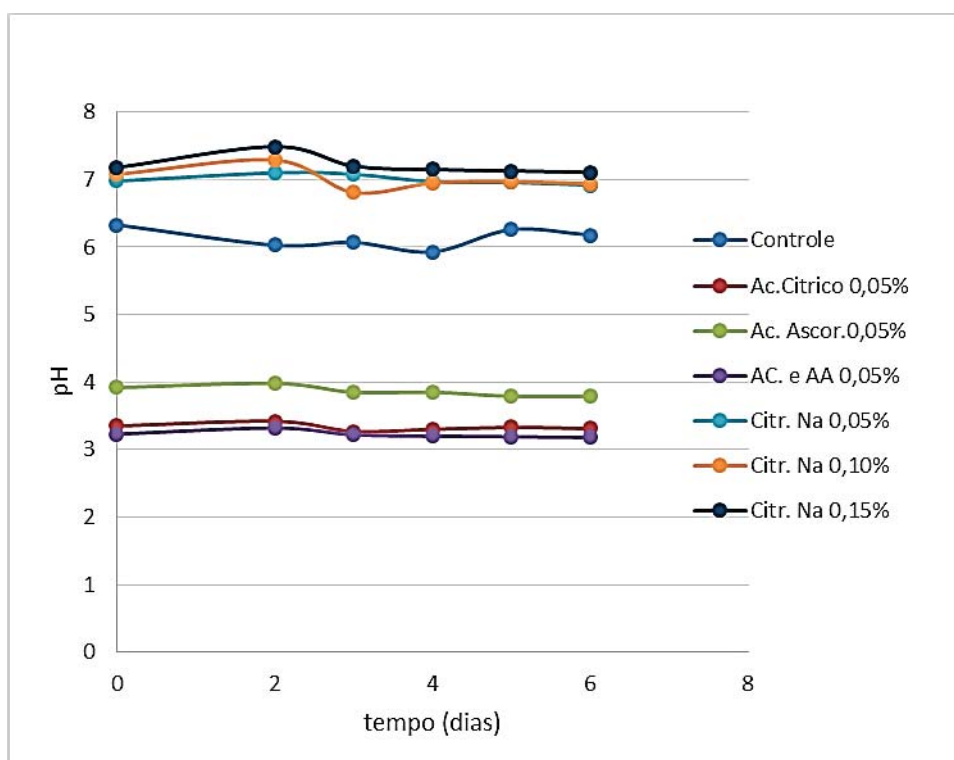
5.2.4 Avaliação da estabilidade física e microbiológica

A avaliação da estabilidade física ocorreu em diferentes momentos e sob diferentes verificações (pH, densidade e comportamento reológico). Inicialmente buscou-se estabelecer uma relação entre o uso de diferentes agentes acidulantes, isoladamente e em combinação, dentre aqueles comumente empregados como corretores de pH, antioxidantes e até para correção de sabor. Foi empregado o ácido cítrico na concentração de 0,05% e ácido ascórbico

0,05%, o que resultou no abaixamento do pH do valor de 6,33 para 3,35, 3,92 e 3,23, respectivamente, considerando a solução do veículo, veículo contendo ácido cítrico, veículo contendo ácido ascórbico e veículo contendo os dois agentes. Como era de se esperar, o efeito do ácido cítrico (pKa 3,128, 4,761 e 6,396) foi mais intenso do que o efeito do ácido ascórbico (pKa 4,03 a 4,30) (PRANKERD, 2007), e a associação dos dois ainda reduziu um pouco mais o pH da solução. Isto também demonstra que o veículo não possui capacidade tamponante e apresenta pH próximo da neutralidade, portanto pode facilmente ter seu pH ajustado para a melhor estabilização como for exigido para fármacos específicos.

Com o uso de agente alcalinizante, foi escolhido o citrato de sódio em 3 diferentes concentrações (0,05 a 0,15%) e os valores de pH obtidos inicialmente foram 6,98, 7,08 e 7,18, respectivamente. A evolução do pH de todas as soluções ao longo de 6 dias de avaliação está apresentada na figura 15, onde é possível perceber que não há uma nítida tendência de alteração nos valores de pH.

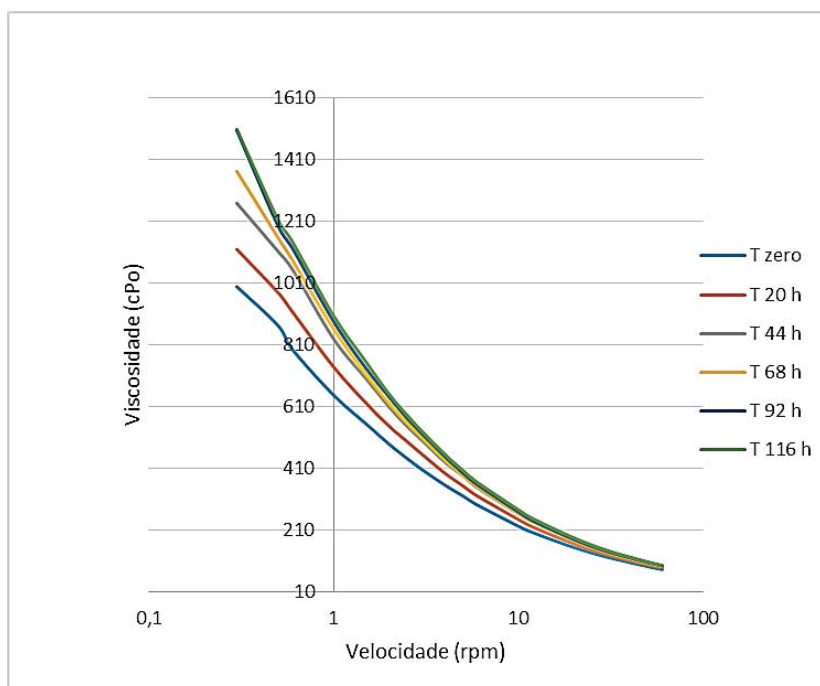
Figura 15 - Efeito de acidulantes e alcalinizantes sobre o pH do veículo e sua evolução ao longo de 6 dias.



Outra avaliação realizada foi sobre a estabilidade da viscosidade da forma líquida a partir do momento da preparação (denominado T zero), com sucessivas verificações até o tempo de 116 horas. Os resultados apresentados na figura 16 demonstram a manutenção do

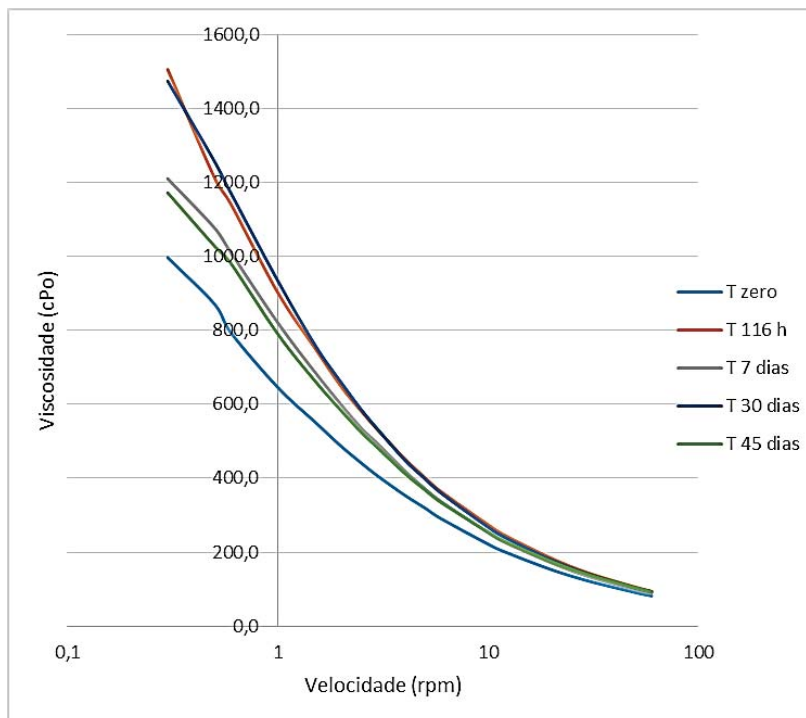
comportamento pseudo-plástico, ocorrendo aumento na viscosidade nas primeiras horas após a preparação, indicando que o polímero necessita de mais tempo para sua completa hidratação e expressão máxima da viscosidade. É importante esclarecer que essa hidratação ocorreu sempre com água purificada por destilação, realizada à temperatura ambiente.

Figura 16 - Viscosidade do veículo líquido logo após (T zero) até 116 horas após a preparação.



Outra avaliação realizada foi sobre a estabilidade da mistura sólida para reconstituição quanto à viscosidade do produto obtido. A mistura foi mantida em sachês de filme constituído de plástico-alumínio-plástico, selados termicamente, e armazenados à temperatura ambiente. Nos dias 7, 30 e 45, o conteúdo de 1 sachê foi disperso em 95 mL de água sob agitação mecânica. Após repouso e degaseificação por vácuo para a remoção das bolhas de ar incorporadas durante a agitação, cada amostra foi avaliada quanto a sua viscosidade sob diversas velocidades de cisalhamento. Os resultados mostrados na figura 17 em comparação com os resultados obtidos no tempo zero (T zero) e após 116 horas do experimento anterior, mostram que houve diferenças nos resultados da viscosidade entre as amostras, que só foram semelhantes entre si nos tempos 7 e 45 dias, sendo todas diferentes do T zero, e a do tempo 30 dias foi semelhante ao que foi obtido com 116 horas. O comportamento reológico foi mantido em todas as amostras, mas as diferenças de viscosidade são explicadas pelo fato de não se ter recolhido exatamente 5 g de cada sachê a cada vez que era realizada a reconstituição do pó para a obtenção do veículo líquido.

Figura 17 - Viscosidade do veículo líquido em comparação com o veículo sólido armazenado em sachês, reconstituído após 7, 30 e 45 dias depois de realizada a mistura.



Um lote do veículo foi produzido, sendo em seguida dividido em frações homogêneas, que foram submetidas a flavorização com cereja, menta/hortelã e morango, envasadas em frascos de vidro âmbar com tampa plástica, armazenadas à temperatura ambiente e avaliadas quanto à contagem de microrganismos viáveis. O resultado desse ensaio demonstrou que a condição de processamento bem como o sistema conservante empregado foram capazes de manter sob controle a carga microbiana nos diferentes produtos, deixando-os com qualidade microbiológica dentro dos níveis aceitáveis pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (inferior a 10^2 UFC/mL) para produtos não estéreis destinados ao uso por via oral. O mesmo ensaio microbiológico realizado 15 e 30 dias depois, demonstrou a estabilidade do sistema conservante em preservar microbiologicamente os produtos.

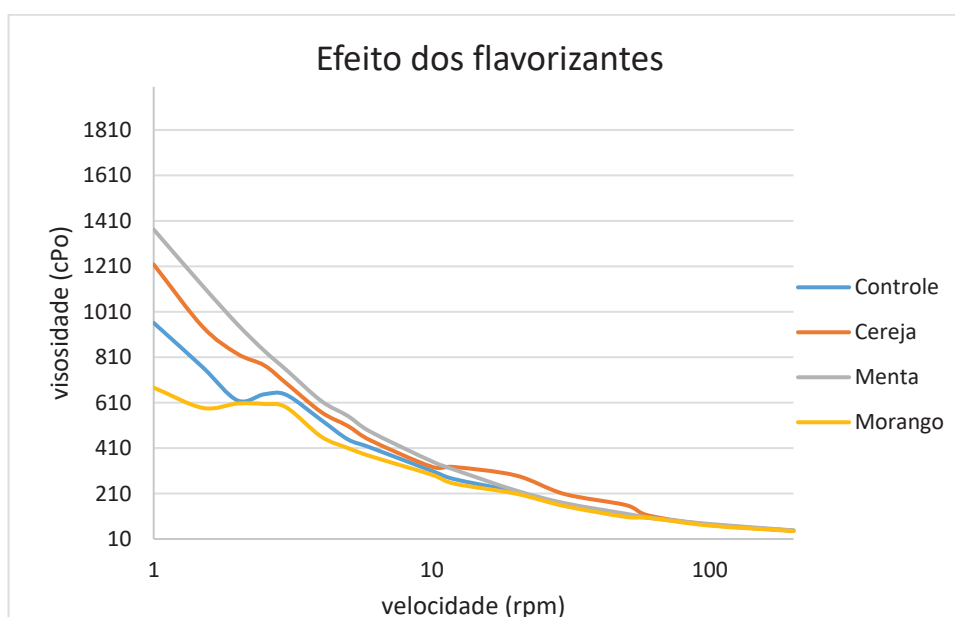
5.2.5 Edulcoração e Flavorização

A sucralose é um edulcorante com poder dulçor cerca de 300 a 600 vezes maior do que a sacarose (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009), sendo, portanto utilizada em baixa concentração. Foram ensaiadas concentrações de 0 até 0,15%, percebendo-se um sabor doce e suficientemente agradável quando se utilizava a concentração de apenas 0,05% deste

edulcorante. No entanto, dependendo do ativo a ser veiculado, quantidades diferenciadas podem ser necessárias para a edulcoração do produto. Em concentrações mais elevadas, o sabor doce se torna muito intenso e chega a ser enjoativo.

Diversos flavorizantes foram gradativamente e separadamente acrescentados ao veículo já edulcorado para se observar a quantidade necessária para a obtenção de sabor agradável, e os volumes encontrados como sendo necessários estão relacionados na tabela 12. As três melhores condições em termos de sabor tiveram sua qualidade observada em termos de viscosidade e pH. Verificou-se que ocorre pequena alteração na viscosidade (figura 18), quando observado sob velocidade acima de 5 rpm, e no pH com o uso de diferentes flavorizantes, e que a quantidade necessária de cada um para conferir sabor agradável é diferente entre os flavorizantes, mesmo levando em conta a diferença de sensibilidade e preferência dos avaliadores. A viscosidade observada em baixa velocidade pode ter recebido a influência do pH, pois é tanto menor quanto mais ácido estava o veículo. Como já foi discutido, tanto a presença de eletrólito quanto o pH podem influenciar na viscosidade do veículo. O valor do pH praticamente não foi alterado com o uso do flavorizante de menta (6,25) em relação ao veículo edulcorado e não flavorizado (6,27). Os outros dois flavorizantes, cereja e morango, provocaram redução no valor do pH, chegando a 5,45 e 4,74, respectivamente.

Figura 18 – Efeito do volume dos diferentes flavorizantes sobre a viscosidade do veículo Gute.



Os ensaios realizados resultaram na escolha de 3 flavorizantes considerados de melhor sabor imediato: cereja, menta/hortelã e morango. No ensaio de preferência realizado com 61

crianças, foi observado que a flavorização com as quantidades descritas na tabela 12 para cereja, menta/hortelã e morango foi recebida com plena aceitação em diferentes faixas etárias.

Tabela 12 – Quantidade de flavorizante para a flavorização de 100 mL de veículo.

Flavorizantes líquidos	Quantidade de Flavorizante (mL/100 mL de veículo)
Cereja	0,58
Chocolate	0,66
Menta/hortelã	0,16
Abacaxi	0,52
Laranja	0,46
Morango	0,46
Framboesa	0,50
Limão	0,50

O fabricante dos aromas recomenda que a utilização dos mesmos seja de até 0,5 mL para cada 100 mL da formulação, sob o risco de tornar mais amargo e desagradável o sabor obtido. No entanto, cereja, chocolate e abacaxi só apresentaram sabor perceptível com volumes acima daquele sugerido pelo fabricante. Por outro lado, laranja, morango e, de forma ainda mais destacada menta/hortelã, requerem um volume menor do flavorizante para conferir sabor agradável à formulação.

Preocupando-se com a segurança quanto ao uso desses agentes especialmente em formulações destinadas ao uso em pediatria, foi verificada a lista de componentes potencialmente sensibilizantes presentes nos aromas selecionados (cereja, menta/hortelã e morango), tendo sido constatado que apenas o aroma de cereja possui dois (cinamal e eugenol) dos 26 itens considerados como sensibilizantes e mesmo assim em concentração de 0,001% de cada um. Os outros dois aromas não possuem nenhum dos componentes sensibilizantes. Como veículo dos aromas, são empregados o etanol e/ou propilenoglicol que são indesejáveis em produtos para crianças, mas devido ao fato de se empregar volumes muito pequenos de cada um dos dois flavorizantes, a composição final do veículo oral para uso em pediatria terá concentração de etanol inferior ao limite máximo permitido pela legislação brasileira, que é de 0,5% nos medicamentos polivitamínicos (BRASIL, 2002).

5.2.6 Composição do veículo

As diferentes composições quali-quantitativas dos veículos destinados ao uso oral estão listadas a seguir na tabela 13. Com base no que foi avaliado das formulações durante o seu desenvolvimento é possível realizar correções do pH, acidulando ou alcalinizando o veículo conforme seja necessário para a solubilização e/ou estabilização do fármaco, sem prejuízo para a qualidade da formulação dentro de um curto prazo de utilização, coerente com o seu emprego no âmbito hospitalar ou em manipulação.

Para o emprego industrial é necessário a realização de mais ensaios que confirmem a estabilidade caso a caso para a forma líquida. Já a forma sólida que pode resultar em uma mistura para suspensão extemporânea se apresenta como um pó fino não higroscópico, capaz de veicular ativos previamente triturados, solúveis ou não em água, e após reconstituição com água resultar numa forma líquida destinada ao uso oral ou administrado por sonda naso-gástrica ou naso-entérica.

Tabela 13 - Composições das três formas de apresentação do veículo destinado ao transporte de fármacos para uso em pediatria.

Componente	Pronto para uso	Concentrado líquido	Concentrado sólido
Goma xantana	0,15 g	3,00 g	3,00 g
Sucralose	0,05 g	1,00 g	1,00 g
Metilparabeno	0,135 g	2,70 g	2,70 g
Propilparabeno	0,015 g	0,30 g	0,30 g
Glicerol	5,00 g	q.s.p. 100 g	-
Manitol	-	-	q.s.p. 100 g
Edetato de sódio	0,05 g	1,00 g	1,00 g
Flavorizante	q.s.	-	-
Água purificada	q.s.p. 100 mL	-	-

5.2.7 Ensaio sensorial de palatabilidade em crianças saudáveis

O teste de aceitação em crianças saudáveis envolveu 61 crianças de 4 a 12 anos, das quais 44,3% (27) eram meninos e 55,7% (34) meninas. A média e a mediana de idade foram respectivamente 7,9 e 8,0 anos, com desvio padrão de 2,3 e moda 9,0.

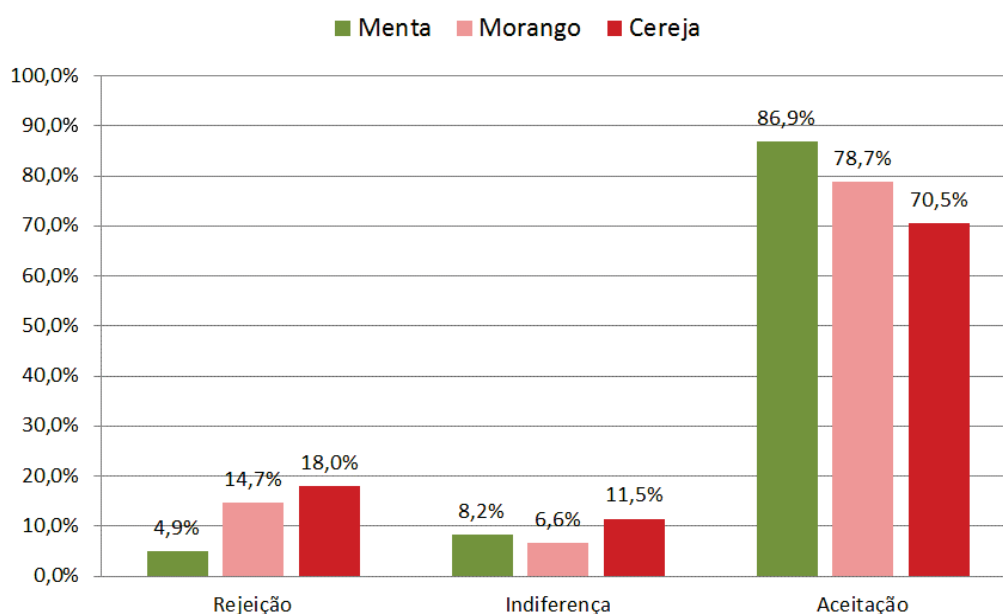
A ANOVA mostrou diferença significativa entre pelo menos duas amostras, com $p=0,0295$. O efeito dos provadores apresentou $p=0,1019$, mostrando que as respostas não variaram

significativamente entre as crianças. Não houve diferença significativa na aceitação entre os grupos de idade ($p = 0,8299$) e sexo ($p = 0,5326$).

Os três sabores testados foram aceitos pelas crianças, com médias dos escores hedônicos entre 5 e 6, correspondentes às categorias "Gostei" e "Gostei muito", respectivamente (Menta: 5,85, Morango: 5,42, Cereja: 5,11). Através do teste de médias de Tukey, obteve-se uma diferença crítica entre as amostras de 0,6524, sendo assim, apenas os sabores menta e cereja apresentaram diferença estatisticamente significativa na aceitabilidade.

Para melhor descrição dos resultados, os dados foram pormenorizados por meio de histogramas de frequência dos escores atribuídos às amostras, segundo as regiões da escala hedônica, ou seja, região de rejeição ("Detestei" a "não gostei"), indiferença ("Nem gostei, nem desgostei") e aceitação ("Gostei" a "Adorei") (figura 19). O sabor menta obteve 86,9% das respostas na região de aceitação e apenas 4,9% na região de rejeição, enquanto que morango obteve 78,7% e cereja 70,5% de seus escores na região de aceitação, e 14,7% e 18,0%, respectivamente, na região de rejeição. Com relação aos escores obtidos pelos sabores nas categorias individualmente, menta obteve 42,6% na categoria "Adorei" e apenas 1,6% das respostas na categoria "Detestei", enquanto que cereja obteve 6,6% das respostas na categoria "Detestei" e apenas 23,0% na categoria "Adorei", confirmando a superioridade da aceitação do sabor menta em relação ao sabor cereja.

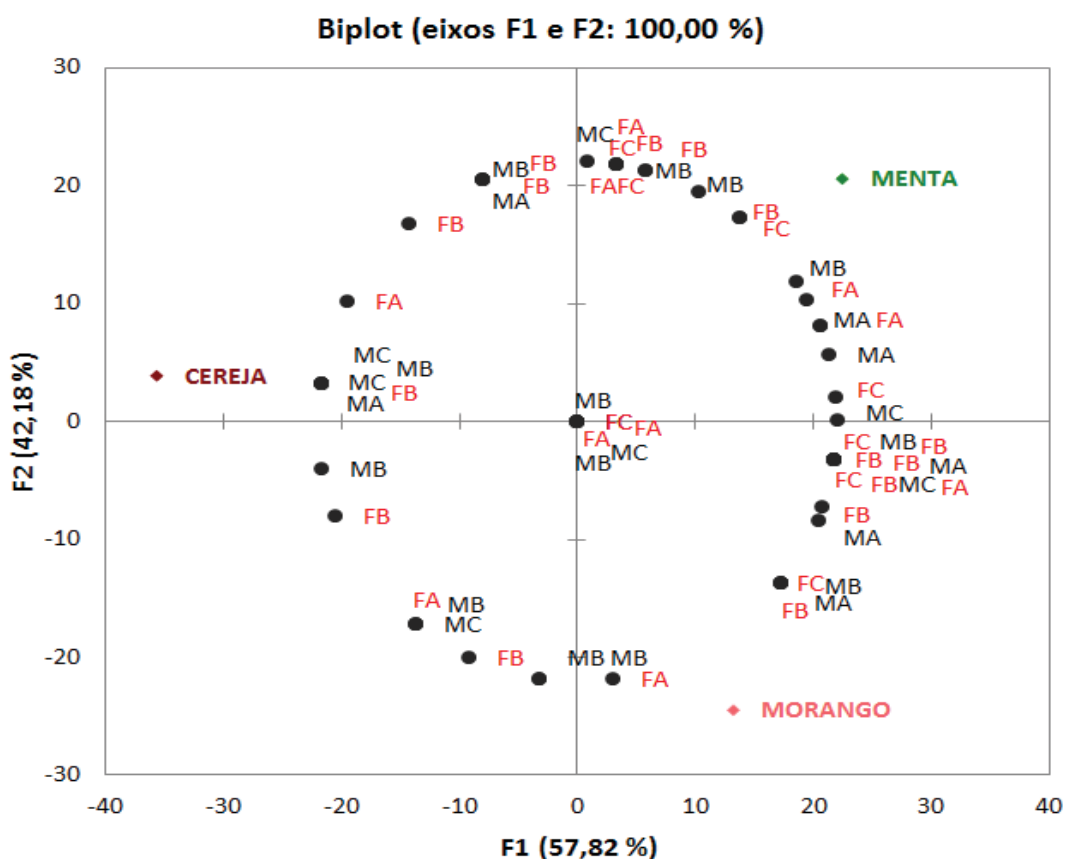
Figura 19 - Histograma de frequência do teste de aceitação do veículo com crianças saudáveis, segundo as regiões da escala hedônica.



O Índice de Aceitabilidade das amostras foi de 83,57% para menta, 77,43% para morango, e 73,00% para cereja. Assim, os três sabores foram bem aceitos pelas crianças, sendo menta o mais aceito, e cereja o menos aceito.

Os resultados do teste de aceitação foram submetidos à análise multivariada de Componentes Principais (figura 20) para visualizar as preferências individuais de cada provador. Nesse gráfico, cada ponto está associado a uma ou mais crianças, discriminadas por letras correspondendo a sexo e faixa etária; cada criança se localiza próximo às amostras a que deram maiores valores hedônicos. Quanto mais próximo um ponto se encontra de uma amostra (menta, morango ou cereja), maior foi a sua aceitação para essa amostra, em detrimento das amostras mais distantes daquele ponto.

Figura 20 - Análise de Componentes Principais representando a aceitação do veículo Gute nos sabores menta, morango e cereja, pelas crianças saudáveis.



F= Feminino; M =masculino; A = 4 a 6; B =7 a 9; C = 10 a 12.

Dessa forma, observa-se que as crianças localizadas no quadrante superior direito do gráfico aceitaram melhor o sabor menta, enquanto que as localizadas no quadrante inferior direito aceitaram melhor o sabor morango, e aquelas do quadrante superior esquerdo aceitaram

melhor o sabor cereja. As crianças do centro do gráfico não fizeram diferença entre as amostras, gostando muito ou pouco de todas. Observa-se ainda que crianças de todas as idades que fizeram parte da avaliação e de ambos os sexos ficaram bem distribuídas em cada quadrante do gráfico, confirmando os resultados da ANOVA de que não houve diferença significativa na aceitação entre os grupos de idade ou sexo.

Loratadina (Claritin RediTabs), Efavirenz (Sustiva), Amprenavir (Agenerase), Ritonavir e lopinavir, Amoxicilina, Ranitidina (Zantac), Fluoxetina (Prozac), são exemplos de medicamentos que utilizam menta como flavorizante, e são apresentados na forma líquida para uso oral ou em comprimido dispersível (STRICKLEY et al, 2008).

Alguns componentes empregados na composição do veículo sólido desenvolvido serão utilizados nas formulações do pó para reconstituição e do comprimido dispersível. O veículo sólido vem apresentando grande utilidade como forma de transformação de formas sólidas em formas líquidas para administração por via oral a pacientes que não são capazes de deglutir as formas sólidas, e para a adequação de dose, como tem sido frequentemente necessário na administração de medicamentos em pediatria.

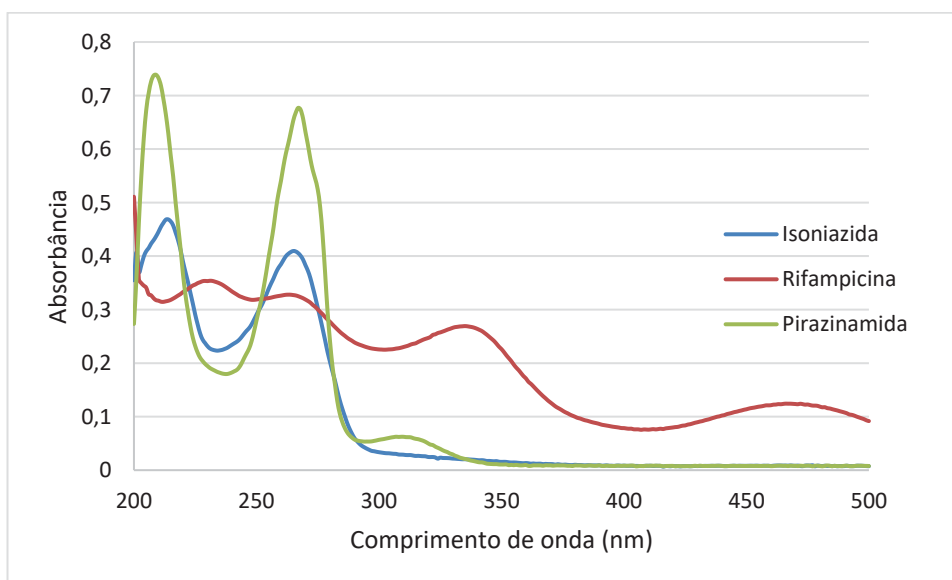
5.3 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS FORMULAÇÕES DE DOSE FIXA COMBINADA CONTENDO ISONIAZIDA, RIFAMPICINA E PIRAZINAMIDA

A indústria farmacêutica precisa ter condições de dar respostas rápidas, exatas e precisas sobre a qualidade dos seus insumos e produtos, quer durante a etapa de desenvolvimento, quer durante o período regular de produção e de avaliação da estabilidade. Se, além dessas características, ainda for possível que o método analítico seja econômico quanto à necessidade de investimento em equipamento, custo de manutenção, uso de solventes, será de grande utilidade. É o que se pretende com o desenvolvimento e validação da metodologia analítica voltada à determinação da qualidade de formulações contendo isoniazida, rifampicina e pirazinamida.

A figura 21 apresenta os espectros de absorção entre 200 e 500 nm para cada uma das soluções obtidas isoladamente com as respectivas diluições das SQR. Pode-se observar que a rifampicina sozinha poderia ser dosada através do uso do comprimento de onda de máxima absorvância de 475 nm, 338 nm, ou ainda 268 e 232 nm, onde nos dois primeiros praticamente apenas essa substância apresenta absorvância. Porém, mesmo na faixa de comprimento de onda mais elevado a absorvância da isoniazida e da pirazinamida não é zero e interfere com pequena intensidade na determinação do teor de rifampicina.

De modo diverso, o comprimento de onda de 268 nm é região de máxima absorbância para todas as três substâncias, assim como na região próxima dos 210 nm. Logo se percebe que não é possível utilizar um determinado comprimento de onda como sendo específico para a determinação quantitativa de cada uma das substâncias, pois mesmo para a rifampicina, o emprego da absorbância a 475 nm não é específico quando os fármacos estão associados, em virtude da formação de 3-formil-rifampicina que também absorve neste comprimento de onda (SHISHOO *et al*, 1999), e a absorvidade ainda é menos da metade da que é obtida a 338 nm.

Figura 21 - Espectros de absorção UV/VIS de pirazinamida, rifampicina e isoniazida, cada uma a 10 µg/mL, na faixa de 200 a 500 nm, obtidos em intervalo de 1 nm.



Para submeter os dados de absorbância x concentração obtidos para todas as combinações à regressão multivariada no excel foi necessário segregá-los em blocos de 16 comprimentos de onda cada, pois o software está limitado a essa capacidade de processamento. Cada resultado obtido foi analisado em busca de eliminar um a um os comprimentos de onda que não apresentam contribuição significativa para a quantificação de cada substância. O espectro foi reduzido à região UV, entre 240 e 390 nm, tornando assim o método analítico mais sensível, já que foram utilizados apenas comprimentos de onda em que a absorbância é mais intensa.

A tabela 14 apresenta como exemplo o conjunto de coeficientes determinados para a dosagem de pirazinamida empregando a regressão multivariada com diferentes números de comprimentos de onda, iniciando com todos os 16 e reduzindo até chegar ao número de 7. A

cada passo da análise é eliminado o comprimento de onda cujo efeito apresenta valor de p superior a 0,05.

Tabela 14 – Coeficientes linear e angulares para o doseamento de pirazinamida por espectrofotometria UV em diferentes quantidades de comprimentos de onda.

Bloco 1											
	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	p-value
Interseção	-0,140	-0,153	-0,192	-0,185	-0,140	-0,207	-0,212	-0,205	-0,218	-0,188	0,147129
240	4,437										
250	-26,376	-24,152	-25,478	-27,151	-29,572	-35,666	-41,596	-42,404	-43,152	-44,444	1,92.10 ⁻⁰⁷
260	20,216	20,439	20,174	24,140	24,792	26,799	30,322	31,430	32,875	34,374	4,82.10 ⁻⁰⁶
270	2,095	2,320	3,379								
280	6,845	6,629	7,248	8,254	6,623	4,965	4,839	4,499	5,575	5,428	0,244361
290	-41,346	-28,984	-27,773	-29,169	-23,665						
300	-50,786	-56,296	-47,309	-43,376	-36,372	-33,356					
310	102,531	96,356	74,268	70,649	77,867	79,781	64,172	71,586	55,067	46,229	0,087374
320	35,149	32,527	53,059	60,094	52,414	43,291	17,686				
330	25,219	30,194									
340	-78,599	-77,173	-58,182	-63,437	-48,143	-47,783	-31,494	-20,089	-16,634	-10,807	0,536658
350	22,417	19,262	28,841	27,553							
360	-54,345	-50,683	-56,285	-53,310	-52,969	-54,596	-48,832	-54,800	-34,718	-41,385	0,016526
370	-29,979	-32,998	-30,213	-35,013	-33,168	-39,422	-30,879	-22,291	-15,152		
380	15,871	17,145	23,604	26,444	14,984	20,709	24,471	20,941	26,238	21,326	0,2631
390	53,600	52,068	44,088	44,786	56,909	46,173	22,199	21,972			
r2	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	
Erro	0,0928	0,0885	0,0850	0,0825	0,0805	0,0786	0,0778	0,0761	0,0750	0,0742	
F	8075	9462	11001	12572	14293	16356	18368	21342	24711	28837	

Bloco 2											
	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	p-value
Interseção	-0,434	-0,431	-0,442	-0,448	-0,342	-0,331	-0,324	-0,366	-0,379	-0,335	0,0060
245	-47,851	-48,086	-48,605	-48,822	44,612	-47,471	-48,135	44,445	-35,020	-33,768	2,2E-06
255	18,629	18,276	17,763	18,001	18,152	17,677	17,094	11,622			
265	12,717	13,135	13,738	14,502	13,817	14,583	14,431	14,434	18,400	19,318	3,6E-07
275	1,328	1,204	1,054								
285	32,857	32,119	31,654	31,189	33,760	38,373	40,992	39,738	36,578	30,809	0,0192
295	49,397	55,119	62,545	65,631							
305	-143,06	-143,23	-144,42	-150,23	-87,22	-51,037	-45,832				
315	79,966	75,640	72,871	77,891	60,657						
325	83,260	82,301	77,240	76,158	69,278	104,752	104,676	79,223	91,353	79,804	0,0197
335	-12,492	-7,175									
345	-45,112	-48,826	-50,622	-51,175	53,574	-58,358	-62,757	65,208	-80,822	-87,676	0,0352
355	-85,692	-84,156	-87,160	-88,173	54,563	-64,305	-61,917	50,016	-45,989		
365	6,715										
375	-53,492	-50,129	-51,027	-51,384	56,674	-59,850	-55,321	55,050	-64,586	-64,897	0,0017
385	88,653	88,169	87,293	87,505	83,150	99,792	104,624	77,226	87,656	61,574	0,0143
395	33,65	34,09	36,38	38,40	34,41	15,39					
r2	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	
Erro padrão	0,0723	0,0689	0,0660	0,0635	0,0633	0,0631	0,0617	0,0649	0,0674	0,0725	
F	13321	15609	18232	21248	23103	25394	29249	29356	30626	30227	

Na tabela 14 estão assinalados os coeficientes que se apresentaram menos significativos na avaliação e que foram eliminados na avaliação posterior. Na mesma tabela estão

demonstrados os valores dos coeficientes de correlação (r^2), o erro padrão e o teste F obtidos em cada avaliação, sendo possível verificar uma redução no erro padrão e aumento no valor de F. Na última coluna estão os valores de p correspondentes aos coeficientes linear e angulares dos 7 comprimentos de onda, onde se vê no bloco 1 que o valor de p para o comprimento de onda de 340 nm é o mais elevado, e será eliminado, realizada nova avaliação de regressão multivariada até que todos apresentem-se inferiores a 0,05.

Após as avaliações, foram eliminados os comprimentos de onda marcados de amarelo na tabela 14 por apresentarem valor de $p > 0,05$ e selecionados os demais com os respectivos coeficientes apresentados na tabela 15 para a determinação quantitativa dos fármacos.

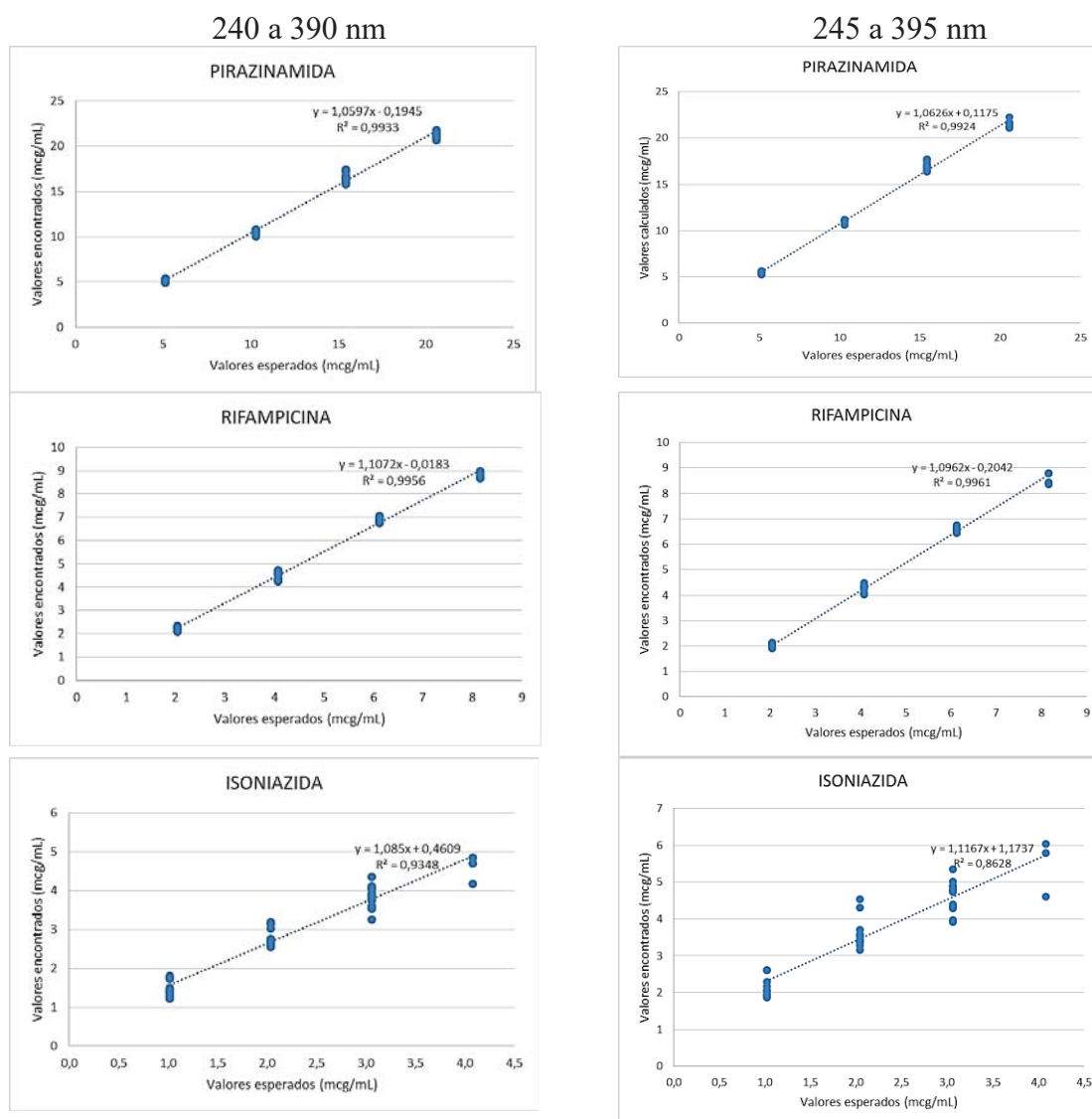
Tabela 15 – Comprimento de onda e coeficientes encontrados no modelo de regressão multivariada para a combinação de fármacos.

Bloco 1						
λ (nm)	PZA	p-value	RIF	p-value	INH	p-value
Interseção	-0,067	0,416	0,114	$2,92 \cdot 10^{-06}$	-0,261	0,003
240					65,490	$3,88 \cdot 10^{-14}$
250	-49,088	$5,27 \cdot 10^{-13}$				
260	40,293	$9,09 \cdot 10^{-19}$			-22,016	0,00035
270					9,150	0,026
300			-7,273	$1,84 \cdot 10^{-20}$	-113,455	$1,16 \cdot 10^{-05}$
310	32,968	0,000128				
340			43,041	$4,35 \cdot 10^{-34}$	-49,606	0,0001
350					90,849	0,0029
360	-44,191	0,005			-51,213	0,0318
380	32,199	0,009	-35,633	$1,68 \cdot 10^{-25}$	60,396	0,0009
r^2	0,9999		0,9990		0,9721	
F	40981		7860		78	
Bloco 2						
λ (nm)	PZA	p-value	RIF	p-value	INH	p-value
Interseção	-0,335	0,0060	0,140	0,000878	-0,19006	0,048266
245	-33,768	$2,2 \cdot 10^{-06}$			55,0849	$2,98 \cdot 10^{-06}$
255			7,866	0,000111	-24,6177	0,011647
265	19,318	$3,6 \cdot 10^{-07}$	-5,206	$6,66 \cdot 10^{-06}$	-17,373	0,033179
275					22,42424	0,017925
285	30,809	0,0192			40,37842	0,005095
295			-36,067	$1,66 \cdot 10^{-05}$		
305					-104,891	$1,06 \cdot 10^{-12}$
325	79,804	0,0197	53,472	$7,65 \cdot 10^{-16}$		
345	-87,676	0,0352				
375	-64,897	0,0017	-18,480	$2,56 \cdot 10^{-05}$		
385	61,574	0,0143			22,97954	0,004124
r^2	0,9999		0,9991		0,9534	
F	30227		4546		56	

De posse dos valores de absorvância de uma solução contendo os fármacos, a determinação da concentração ($\mu\text{g/mL}$) de cada um é realizada empregando o seguinte modelo matemático:

$$[\text{Fármaco}] = \text{Interseção} + \sum(\text{Coeficiente Angular} \times \text{Absorvância})$$

Figura 22 – Correlação entre valores de concentração esperados e calculados para cada um dos ativos empregando os modelos descritos na tabela 15 nas faixas de comprimento de onda de 240 a 390 nm e 245 a 395 nm.

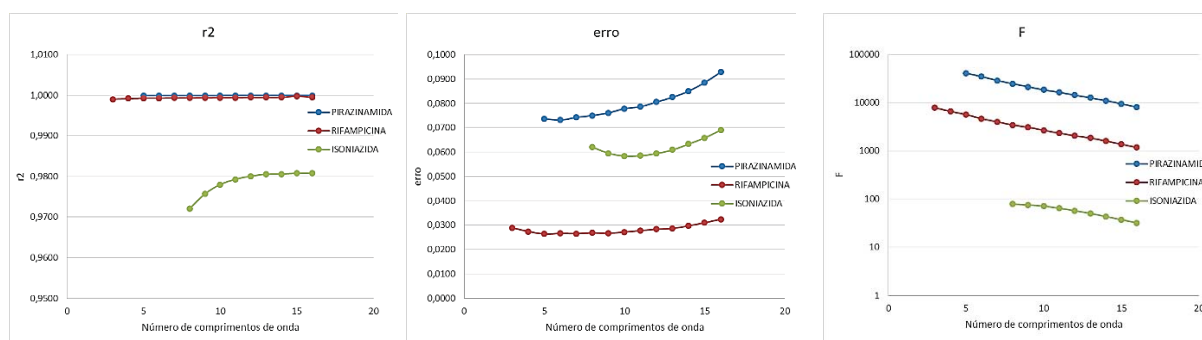


A aplicação dos modelos descritos na tabela 15 a um total de 40 soluções contendo fármacos isolados ou em associação, resultou em concentrações calculadas (encontradas) que foram comparadas com as concentrações teóricas (esperadas) em busca de estabelecer a relação de linearidade e o grau de correlação entre eles. Os gráficos da figura 22 demonstram uma

correlação ligeiramente maior para a rifampicina tanto na faixa de 240 a 390 (0,9956) como na faixa de 245 a 395 (0,9961), porém com maior tendência que os demais ativos a superestimar a concentração na solução amostra. A pior situação de estimação é para a isoniazida, especialmente se for utilizada a faixa entre 245 e 395 nm, onde a correlação é de apenas 0,8628.

O método empregado na escolha do número de comprimentos de onda resultou na escolha de 5 para a dosagem da pirazinamida, 3 para rifampicina e 8 para isoniazida, resultando num total de 10 comprimentos de onda, já que alguns deles são utilizadas para mais de um fármaco, como está mostrado na tabela 15, bloco 1. No entanto, ao relacionar o número de variáveis com o valor do coeficiente de correlação, com o erro padrão e o valor do teste F, percebe-se a possibilidade de se utilizar outros modelos aparentemente ainda mais precisos, como se pode observar na figura 23, associando o máximo valor de r^2 , menor erro padrão e maior valor de F.

Figura 23 – Relação entre o número de variáveis empregados nos modelos de regressão multivariada com o coeficiente de correlação (r^2), o erro padrão e o teste F para o intervalo de 240 a 395 nm.



Para pirazinamida e rifampicina, os valores de r^2 praticamente não variam com o número de variáveis consideradas na construção do modelo, mas para a isoniazida, além dos valores de r^2 serem sempre inferiores aos dos outros fármacos, fica gradativamente menor à medida que se reduz o número de comprimentos de onda empregados no modelo. No caso do erro padrão, para os três fármacos existe um valor mínimo encontrado com a variação do número de comprimentos de onda utilizados no modelo. Como este parâmetro não é relacionado ao coeficiente de correlação, foi empregado como critério de seleção do número de comprimentos de onda a serem utilizados no modelo, resultando nas informações apresentadas na tabela 16. Pode-se perceber que, aumentando o número de variáveis no modelo, houve ligeiro crescimento do coeficiente de correlação e ligeiro decréscimo no erro padrão, porém com pouca importância prática para a quantificação. Observa-se que esse aumento no número de variáveis não melhora

sempre o coeficiente linear e o coeficiente angular da relação entre concentração encontrada e a concentração esperada.

Tabela 16 – Valores de coeficientes angular, linear e de correlação entre os valores esperados e valores calculados de concentração ($\mu\text{g/mL}$) para os insumos ativos empregando os modelos escolhidos pelo valor de p (menor número de variáveis) e pelo menor erro padrão (maior número de variáveis) considerando a faixa de 240 a 390 nm.

	Pirazinamida		Rifampicina		Isoniazida	
	5 λ	6 λ	3 λ	5 λ	8 λ	10 λ
Coef. Angular	1,0597	1,072	1,1072	1,1018	1,085	1,0445
Coef. Linear	-0,1945	-0,0806	-0,0183	-0,0597	0,4609	0,3135
Coef. de correlação	0,9933	0,9939	0,9956	0,9957	0,9348	0,9450
Erro padrão	0,0737	0,0731	0,0289	0,0264	0,0620	0,0584

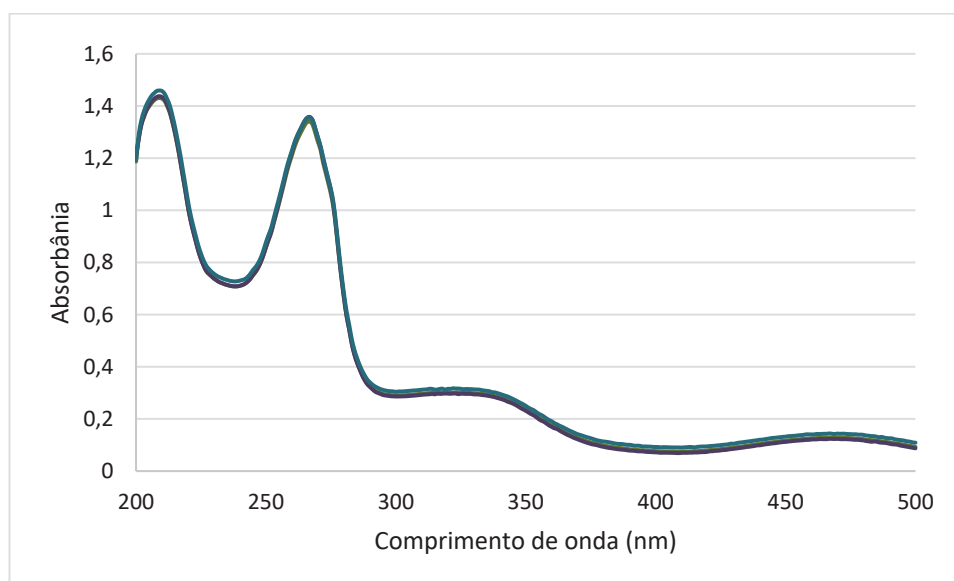
A precisão medida em termos de repetibilidade está expressa a seguir na forma de gráfico (figura 24), que mostra os espectros da mistura de rifampicina, isoniazida e pirazinamida nas mesmas concentrações repetidos 6 vezes, em que é possível perceber o grau de sobreposição. Os valores de concentração, desvio padrão e desvio padrão relativos calculados através da utilização do modelo de regressão multivariada apresentado na tabela 15, bloco 1, para a faixa de 240 a 390 nm, resultaram nas informações contidas na tabela 17.

Tabela 17 – Resultados do ensaio de repetibilidade e de exatidão para pirazinamida, rifampicina e isoniazida empregando o método espectrofotométrico para a determinação do teor.

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		Exatidão (%)	Desvio padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio padrão relativo (%)
	Esperada	Calculada(*)			
Pirazinamida	10,10	10,07	99,70	0,007	0,0072
Rifampicina	3,33	3,346	100,48	0,035	1,059
Isoniazida	1,21	1,232	101,82	0,036	2,940

(*) representa a média de 6 medidas independentes.

Figura 24 – Espectros obtidos com a mistura de rifampicina, isoniazida e pirazinamida nas mesmas concentrações, demonstrando a repetibilidade em todos os comprimentos de onda.



Com o uso deste método analítico espectrofotométrico é possível determinar o teor dos três fármacos contidos numa associação, bem como o seu emprego durante o ensaio de dissolução, em que o monitoramento do teor pode ser realizado de forma imediata, podendo inclusive ser automatizado. Dessa forma será possível retratar mais fielmente o que ocorreu em todas as cubas de dissolução, pois o tempo necessário para a análise ser efetuada é de poucos segundos após a diluição da amostra.

5.4 FORMAS FARMACÊUTICAS DE DOSE FIXA COMBINADA CONTENDO ISONIAZIDA, RIFAMPICINA E PIRAZINAMIDA

5.4.1 Densidade aparente e de compactação

Como anteriormente foram demonstrados os resultados obtidos de densidade aparente e de compactação para os fármacos rifampicina, isoniazida e pirazinamida (tabela 8) avaliados de forma isolada, a seguir estão apresentados os resultados de densidade aparente e de compactação (tabela 18), bem como os respectivos valores de índice de compressibilidade (tabela 19) encontrados com a associação da rifampicina com dióxido de silício coloidal (aerosil 200) quando misturados por diferentes intervalos de tempo (10, 20 e 30 minutos).

Tabela 18 - Densidades aparentes e de compactação para a rifampicina lote M100202 e misturas com aerosil em função da concentração do adjuvante e do tempo de mistura

Batidas	RIF pura	10 minutos de mistura			20 minutos de mistura			30 minutos de mistura		
		A _{0,5%}	A _{1,0%}	A _{1,5%}	A _{0,5%}	A _{1,0%}	A _{1,5%}	A _{0,5%}	A _{1,0%}	A _{1,5%}
0	0,5659	0,5867	0,5650	0,5482	0,5790	0,5652	0,5527	0,5692	0,5683	0,5662
50	0,6878	0,7107	0,6855	0,6621	0,6980	0,6783	0,6519	0,6940	0,6744	0,6533
125	0,7097	0,7208	0,7242	0,7081	0,7077	0,7267	0,7162	0,7237	0,7225	0,7077
250	0,7211	0,7313	0,7451	0,7389	0,7279	0,7373	0,7370	0,7342	0,7330	0,7177
500	0,7329	0,7420	0,7561	0,7498	0,7385	0,7373	0,7370	0,7450	0,7330	0,7279

A – representa a concentração de aerosil empregada nas misturas com a rifampicina

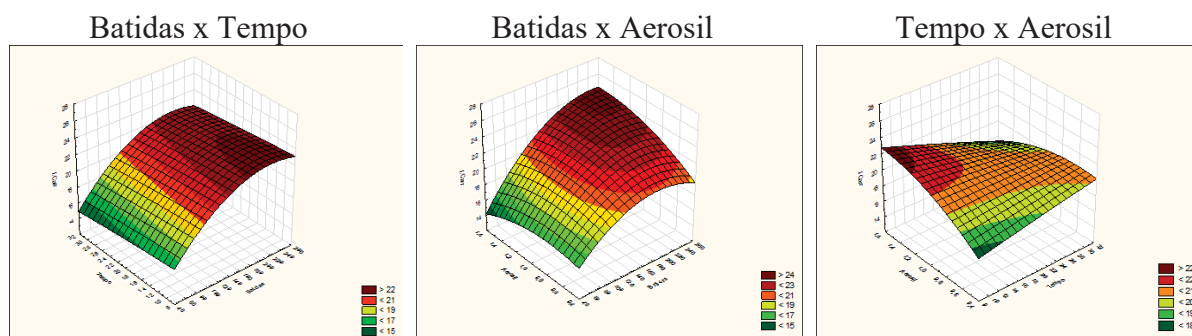
Tabela 19 - Índice de Carr para a rifampicina lote M100202 e misturas com aerosil em função da concentração do adjuvante e do tempo de mistura

Batidas	RIF pura	10 minutos de mistura			20 minutos de mistura			30 minutos de mistura		
		A _{0,5%}	A _{1,0%}	A _{1,5%}	A _{0,5%}	A _{1,0%}	A _{1,5%}	A _{0,5%}	A _{1,0%}	A _{1,5%}
50	17,72	17,45	17,58	17,20	17,05	16,67	15,22	17,98	15,73	13,33
125	20,26	18,60	21,98	22,58	18,19	22,22	22,83	21,35	21,34	19,99
250	21,52	19,77	24,17	25,81	20,46	23,34	25,01	22,47	22,47	21,11
500	22,79	20,93	25,27	26,89	21,60	23,34	25,01	23,60	22,47	22,22

A – representa a concentração de aerosil empregada nas misturas com a rifampicina

Reunindo as informações sobre o índice de compressibilidade e relacionando-as em função do número de batidas e o tempo de mistura, foi obtido o primeiro gráfico da figura 25, observando-se que o índice de compressibilidade não é praticamente afetado pelo tempo de mistura, mas é bastante afetado pelo número de batidas. O mesmo índice quando relacionado ao número de batidas e a concentração de aerosil já demonstra a influência de ambos os fatores, porém, como na relação anterior, não se dispõe de uma situação que seja considerada ótima. Avaliando a relação do índice de compressibilidade com o tempo de mistura e a concentração de aerosil, foi verificada a existência de uma grande área de cor laranja no terceiro gráfico da figura 25 em que é possível obter um índice de compressibilidade semelhante entre si, mesmo com amplas faixas de valores das duas variáveis citadas.

Figura 25 – Índice de Carr da rifampicina e misturas com aerosil em função do número de batidas, do tempo de mistura e da concentração do adjuvante.



De forma semelhante ao que foi mostrado acima para a rifampicina, a seguir, nas tabelas 20 e 21, e na figura 26 estão apresentados os valores de densidade aparente e de compactação para a isoniazida, os valores calculados de índice de compressibilidade, e os gráficos de superfície de resposta com a relação existente entre este índice e os parâmetros número de batidas, tempo de mistura e concentração de aerosil.

Tabela 20 - Densidades aparente e de compactação para a isoniazida e misturas com aerosil em função da concentração do adjuvante e do tempo de mistura

Batidas	INH pura	10 minutos de mistura			20 minutos de mistura			30 minutos de mistura		
		A0,5%	A1,0%	A1,5%	A0,5%	A1,0%	A1,5%	A0,5%	A1,0%	A1,5%
0	0,7849	0,7845	0,7419	0,7285	0,8104	0,7305	0,7627	0,7964	0,7745	0,7720
50	0,8932	0,8792	0,8532	0,8500	0,8803	0,8522	0,8377	0,8787	0,8664	0,8635
125	0,9089	0,8946	0,8677	0,8644	0,8957	0,8816	0,8517	0,8942	0,8813	0,8635
250	0,9251	0,8946	0,8677	0,8793	0,8957	0,8816	0,8517	0,8942	0,8813	0,8784
500	0,9251	0,8946	0,8677	0,8793	0,8957	0,8816	0,8517	0,8942	0,8813	0,8784

A – representa a concentração de aerosil empregada na mistura com a isoniazida

Tabela 21 - Índice de Carr para a isoniazida e misturas com aerosil em função da concentração do adjuvante e do tempo de mistura

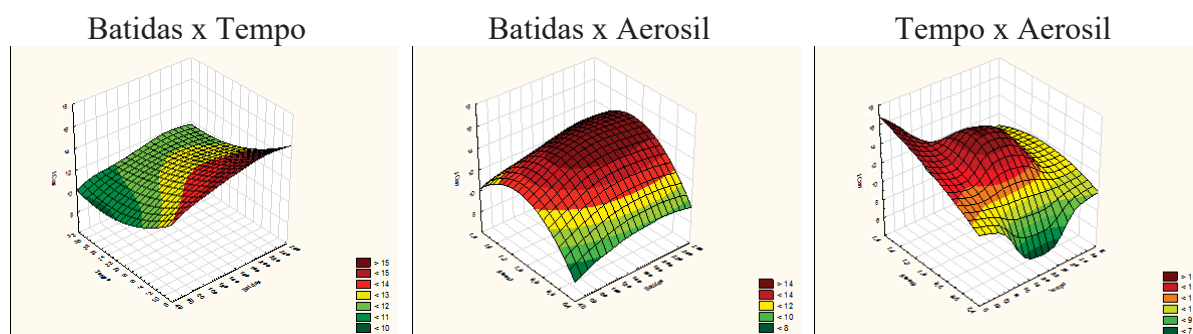
Batidas	INH	10 minutos de mistura			20 minutos de mistura			30 minutos de mistura		
		A0,5%	A1,0%	A1,5%	A0,5%	A1,0%	A1,5%	A0,5%	A1,0%	A1,5%
50	12,125	10,771	13,045	14,294	7,940	14,281	8,953	9,366	10,607	10,596
125	13,643	12,307	14,498	15,722	9,523	17,139	10,450	10,937	12,118	10,596
250	15,155	12,307	14,498	17,150	9,523	17,139	10,450	10,937	12,118	12,113
500	15,155	12,307	14,498	17,150	9,523	17,139	10,450	10,937	12,118	12,113

A – representa a concentração de aerosil empregada na mistura com a isoniazida

Constata-se que a melhor situação ocorre com o uso de 0,5% de aerosil num tempo de mistura de 20 minutos, pois assim se alcança o menor valor de índice de compressibilidade,

tornando-se constante a partir de 125 batidas. Trabalhar com maior concentração de aerossil ou outro tempo de mistura não promove melhora no índice obtido. Esta região de mínimo é claramente apresentada no terceiro gráfico da figura 26.

Figura 26 - Índice de Carr da isoniazida isolada e misturas com aerossil em função do número de batidas, do tempo de mistura e da concentração do adjuvante.



Aplicando a mesma metodologia à pirazinamida, foram obtidos os dados apresentados nas tabelas 22 e 23, bem como na figura 27. Neste caso foram empregadas concentrações mais elevadas de aerossil 200 do que as que foram utilizadas para rifampicina e isoniazida. O que se percebe com este fármaco é que a mistura realizada com 20 minutos resulta nos melhores valores de índice de compressibilidade, que também é influenciada pela concentração de aerossil, mostrando menores valores nas concentrações mais baixa e mais elevada deste adjuvante. O terceiro gráfico da figura 27 dá uma visão mais clara sobre as regiões em que ocorrem os menores valores de índice de compressibilidade.

Tabela 22 - Densidades aparentes e de compactação para a pirazinamida e misturas com aerossil em função da concentração do adjuvante e do tempo de mistura

Batidas	PZA	10 minutos de mistura			20 minutos de mistura			30 minutos de mistura		
		A _{0,75%}	A _{1,5%}	A _{2,25%}	A _{0,75%}	A _{1,5%}	A _{2,25%}	A _{0,75%}	A _{1,5%}	A _{2,25%}
0	0,5033	0,6305	0,5899	0,6241	0,6476	0,5990	0,6449	0,6456	0,6078	0,6348
50	0,7390	0,7771	0,7310	0,7489	0,7832	0,7292	0,7621	0,7807	0,7429	0,7646
125	0,7550	0,7956	0,7472	0,7660	0,7832	0,7624	0,7621	0,7807	0,7774	0,7824
250	0,7893	0,7956	0,7472	0,7838	0,8018	0,7624	0,7799	0,7993	0,7774	0,7824
500	0,8077	0,7956	0,7820	0,7838	0,8018	0,7624	0,7799	0,7993	0,7774	0,7824

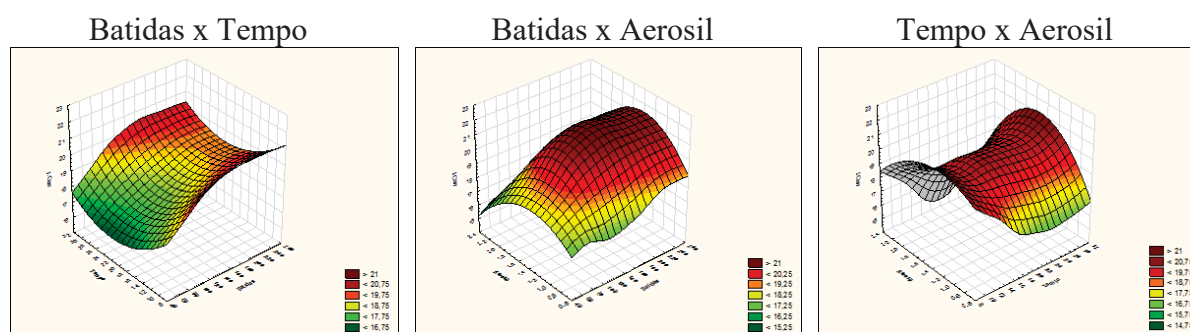
A – representa a concentração de aerossil empregada na mistura com a pirazinamida

Tabela 23 - Índice de Carr da pirazinamida isolada e misturas com aerosil em função do número de batidas, do tempo de mistura e da concentração do adjuvante.

Batidas	PZA	10 minutos de mistura			20 minutos de mistura			30 minutos de mistura		
		A _{0,75%}	A _{1,5%}	A _{2,25%}	A _{0,75%}	A _{1,5%}	A _{2,25%}	A _{0,75%}	A _{1,5%}	A _{2,25%}
50	31,894	18,865	19,302	16,664	17,314	17,855	15,379	17,305	18,185	16,976
125	33,338	20,752	21,052	18,525	17,314	21,432	15,379	17,305	21,816	18,865
250	36,235	20,752	21,052	20,375	19,232	21,432	17,310	19,229	21,816	18,865
500	37,687	20,752	24,565	20,375	19,232	21,432	17,310	19,229	21,816	18,865

A – representa a concentração de aerosil empregada na mistura com a pirazinamida

Figura 27 - Índice de Carr da pirazinamida isolada e misturas com aerosil em função do número de batidas, do tempo de mistura e da concentração do adjuvante.



Relacionando o tamanho e formato das partículas de cada fármaco com os resultados obtidos de densidade aparente e sua relação com o tempo de mistura e concentração de aerosil percebeu-se que:

- o tempo de mistura considerado melhor para isoniazida e pirazinamida foi de 20 minutos;
- a concentração de aerosil é de muita importância dependendo do formato do cristal de cada fármaco, tendo-se mostrado bastante útil a 0,5% para a isoniazida, a 1,5% para a rifampicina e a 0,75% para a pirazinamida.

É esperado que o aerosil exerça efeitos diferentes nos diferentes ativos notadamente pela diferença de formato, tamanho e tipo de superfície apresentado por cada um destes. Como se pode ver pelas micrografias obtidas com os fármacos, a isoniazida se apresenta com maior tamanho, formato de cristais com grandes superfícies planas, por isso já teve a densidade aparente e índice de compressibilidade bastante melhorada com apenas 0,5% de aerosil. De forma intermediária, tanto no formato, tamanho e tipo de superfície, está a pirazinamida situada entre a isoniazida e a rifampicina, por isso a quantidade de aerosil necessária para promover uma melhora na densidade aparente foi também intermediária. O informativo técnico da EVONIK, fabricante do aerosil traz informações que confirmam os resultados obtidos.

Para a combinação dos fármacos, considerando as quantidades diferenciadas dos mesmos, poderia-se utilizar os dados acima obtidos na forma de uma média ponderada e estimar a quantidade de aerosil a ser utilizada, que seria 0,9%, que é apenas teórico e não levaria em conta as diversas possíveis outras interações físicas entre os fármacos. Por exemplo, sendo a rifampicina muito menor que a isoniazida, as partículas da primeira têm ampla possibilidade de se intercalar nos espaços vazios existentes entre as partículas da segunda, tornando o pó com empacotamento mais compacto e mais coesivo. Ainda devido a diferença nos tamanhos das partículas, pode haver segregação por percolação durante o processo de mistura e nos demais processos de preparação de forma farmacêutica sólida, que leva à necessidade de se proceder à uniformização do tamanho das partículas quer aumentando-as por granulação, ou diminuindo-as por trituração (AULTON, 2005).

5.4.2 Ângulo de repouso

O ângulo de repouso tem sido utilizado como uma medida da fluidez de pós e de grânulos (AULTON, 2005; JAPANESE, 2011) e, através dos experimentos realizados a seguir, demonstrar o efeito que o tempo de mistura e a concentração de aerosil, empregado como deslizante, podem ter sobre esse parâmetro de qualidade. Para essa determinação foram empregadas diferentes concentrações de aerosil adicionadas aos fármacos e as misturas foram mantidas em misturador em cubo durante os tempos de 10, 20 e 30 minutos a 30 rpm. Após cada intervalo de tempo foi realizada a medida do ângulo de repouso das misturas obtidas, cujos resultados são apresentados a seguir na forma de tabelas (24, 25 e 26), de figuras (28, 29 e 30) e respectivos modelos matemáticos obtidos por regressão multivariada, demonstrando a intensidade dos efeitos do aerosil e do tempo de mistura sobre a fluidez expressa como ângulo de repouso.

Tabela 24 – Ângulo de repouso (em graus) das misturas de rifampicina e aerosil em função da concentração de adjuvante e tempo de mistura

Aerosil (%)	Tempo de mistura (minutos)		
	10	20	30
0,0	38,5 ± 1,02		
0,5	40,8±1,1	39,8±1,2	39,8±1,2
1,0	41,9±1,0	41,5±0,9	41,3±1,0
1,5	44,1±1,2	42,1±1,0	44,4±1,1

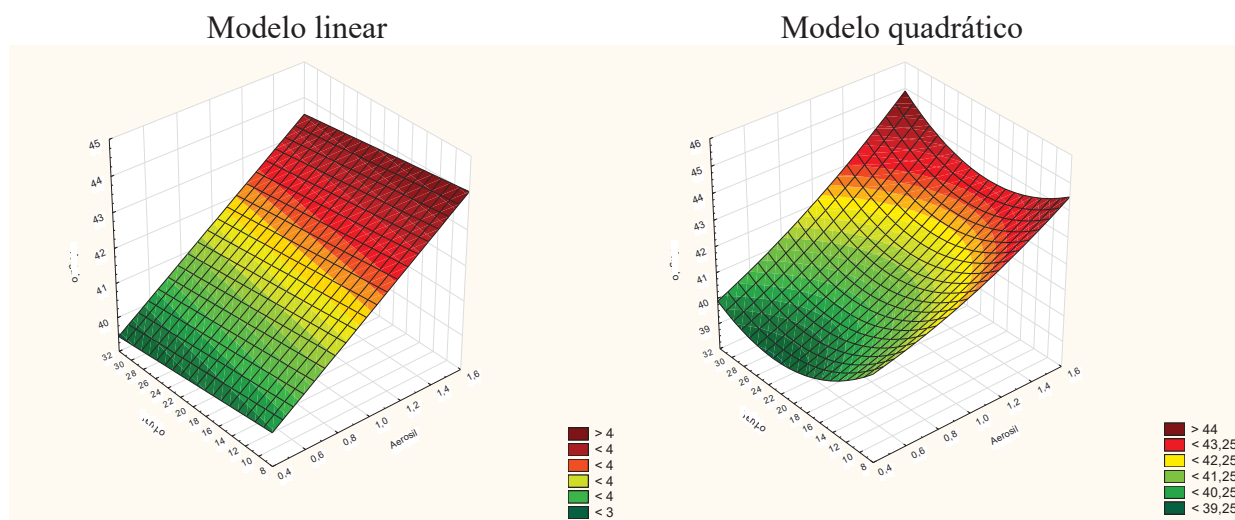
Os resultados obtidos demonstram que o tempo de mistura não influencia de forma significativa sobre o ângulo de repouso da rifampicina com aerosil ($p=0,5558$), mas a fluidez é significativamente influenciada pela concentração de aerosil ($p=0,0017$), e que o efeito deste excipiente é observado no sentido de reduzir a fluidez da mistura, já que o coeficiente é positivo no sentido de aumentar o ângulo de repouso à medida que se aumenta a concentração do aerosil. O modelo encontrado através do uso da regressão multivariada que relaciona as variáveis independentes tempo de mistura e concentração de aerosil com a variável dependente ângulo de repouso é, com coeficiente de correlação (r^2) de apenas 0,8210:

$$\hat{\text{Ângulo de repouso}} = 38,693 - 0,0198.\text{Tempo} + 3,427.\text{Aerosil}$$

Quando os dados são avaliados segundo um modelo quadrático, considerando ainda a interação entre o aerosil (A) e o tempo de mistura (T), os coeficientes encontrados são outros, sem significância estatística, porém com coeficiente de correlação ($r^2 = 0,9257$) maior que o obtido com o modelo linear.

$$\hat{\text{Ângulo de repouso}} = 44,022 - 0,453.T + 0,009.T^2 - 0,033.A + 1,067.A^2 + 0,065.A.T$$

Figura 28 – Ângulo de repouso da rifampicina com diferentes concentrações de aerosil e diferentes tempos de mistura.



Através do modelo quadrático é possível perceber que dentro do campo experimental empregado, o tempo de mistura ótimo para que se obtenha a melhor fluidez é 20 minutos, mas o efeito do aerosil é sempre no sentido de aumentar o ângulo de repouso. Estes resultados confirmam o que foi anteriormente exposto quando foi analisado o índice de compressibilidade, em que a melhor condição foi obtida com o uso de 0,5% de aerosil e mistura sendo realizada durante 20 minutos.

Tabela 25 - Ângulo de repouso (em graus) das misturas de isoniazida e aerosil em função da concentração de adjuvante e tempo de mistura

Aerosil (%)	Tempo de mistura (minutos)		
	10	20	30
0,0	20,6 ± 0,34		
0,5	28,5±1,7	29,6±1,6	27,2±1,8
1,0	32,0±2,4	30,4±2,0	29,3±2,1
1,5	36,7±2,5	33,1±2,5	30,3±2,3

Percebe-se que a isoniazida possui fluidez maior que a rifampicina, explicada inicialmente pela maior densidade do que a apresentada pela rifampicina, bem como pelo tamanho e formato dos cristais do primeiro fármaco, que são maiores do que os do segundo fármaco (ZENG, MARTIN, MARRIOTT, 2001). Percebe-se ainda que além do efeito da quantidade de aerosil ($p=0,0027$) existe o efeito do tempo de mistura ($p=0,014$) influenciando

no ângulo de repouso obtido, como se pode observar pelo modelo matemático de regressão linear múltipla. No entanto, o coeficiente de correlação (r^2) foi de apenas 0,8536.

$$\hat{\text{Ângulo de repouso}} = 29,289 - 0,1725 \cdot \text{Tempo} + 4,937 \cdot \text{Aerosil}$$

Avaliando como um modelo quadrático e incluindo a possível interação entre o aerosil e o tempo de mistura, percebe-se que o coeficiente de correlação (r^2) se eleva para 0,9630, mas os coeficientes que expressam a intensidade do efeito linear ou quadrático do aerosil e do tempo de mistura não foram estatisticamente significativos.

$$\hat{\text{Ângulo de repouso}} = 24,111 + 0,228 \cdot T - 0,004 \cdot T^2 + 7,367 \cdot A + 1,333 \cdot A^2 - 0,255 \cdot A \cdot T$$

Figura 29 – Ângulo de repouso da isoniazida com diferentes concentrações de aerosil e diferentes tempos de mistura.

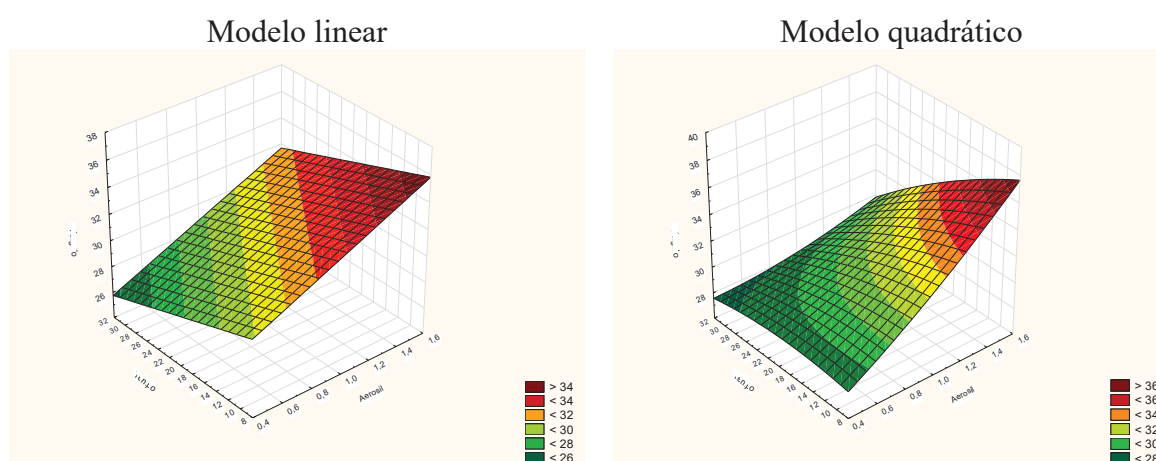


Tabela 26 - Ângulo de repouso (em graus) das misturas de pirazinamida e aerosil em função da concentração de adjuvante e tempo de mistura

Aerosil (%)	Tempo de mistura (minutos)		
	10	20	30
0,00	54,3 ± 3,03		
0,75	34,3±2,1	34,2±2,0	33,7±2,2
1,50	37,4±1,8	36,5±2,1	35,8±1,9
2,25	40,5±2,5	40,4±2,2	39,4±2,3

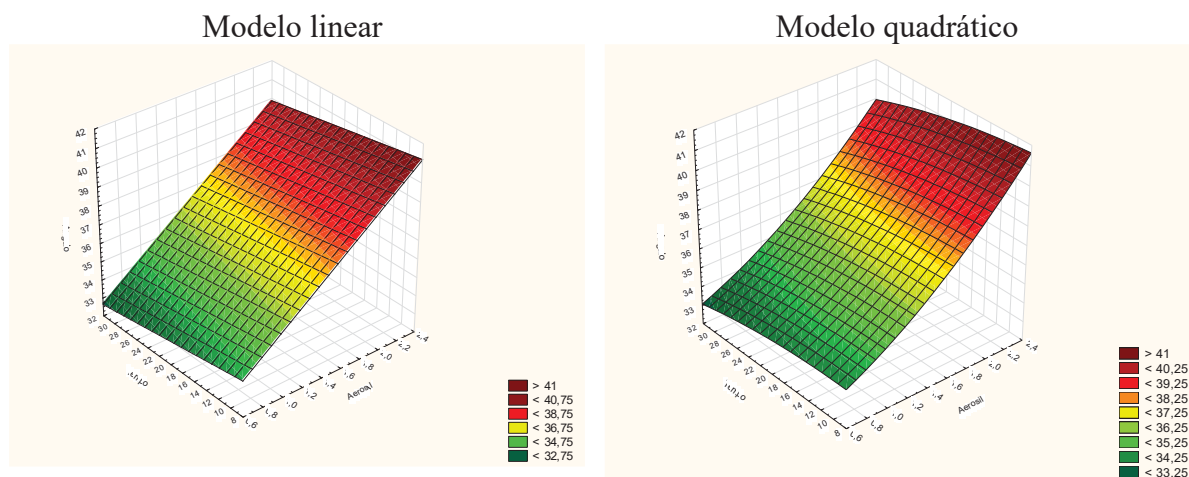
De modo semelhante ao que ocorreu com a isoniazida, a pirazinamida se comportou em termos de ângulo de repouso dependente do tempo de mistura e da concentração de aerosil utilizada na mistura, conforme modelo matemático descrito a seguir.

$$\hat{\text{Ângulo de repouso}} = 31,924 - 0,0526 \cdot \text{Tempo} + 4,0267 \cdot \text{Aerosil} \quad R^2 = 0,9834$$

$$\text{valor de p} \quad <0,001 \quad 0,0170 \quad <0,001$$

$$\hat{\text{Ângulo de repouso}} = 32,589 + 0,043 \cdot T - 0,002 \cdot T^2 + 1,600 \cdot A + 0,043 \cdot A^2 - 0,017 \cdot A \cdot T \quad R^2 = 0,9950$$

Figura 30 – Ângulo de repouso da pirazinamida com diferentes concentrações de aerosil e diferentes tempos de mistura.



Comparando os três ativos, foi observado que a rifampicina apresenta a menor sensibilidade à presença do aerosil no que se refere à fluidez, como se percebe pelos respectivos coeficientes relacionados ao aerosil, tanto no modelo linear quanto no quadrático. Isto se deve, provavelmente, ao menor tamanho das partículas de rifampicina que resulta em maior área superficial por massa de ativo, além do fato de apresentar menor densidade, dando a entender que possui maior volume de espaço vazio entre as partículas, permitindo assim que maior quantidade de aerosil seja necessário para promover uma maior fluidez da mistura do que o observado com os demais ativos (AULTON, 2005). Isto pode não se constituir num problema se os outros dois fármacos, especialmente a pirazinamida que é utilizada em maior quantidade possuir a capacidade de agir como carreador, deixando-se agregar com as partículas menores da rifampicina durante o processo de mistura (ZENG, MARTIN, MARRIOTT, 2001).

5.4.3 Estabilidade química dependente do pH e da presença de ácido ascórbico

Pode-se constatar pela avaliação dos dados obtidos nas corridas cromatográficas das soluções de rifampicina em diferentes valores de pH e com ou sem ácido ascórbico que (tabela 28):

- a velocidade de degradação é reduzida quando se eleva o valor do pH da solução, sendo 25 vezes maior em pH 5 do que em pH 9 na presença de ácido ascórbico e 6 vezes em pH 5, na ausência do antioxidante;
- a presença de ácido ascórbico sempre contribuiu para uma redução na velocidade de degradação, sendo esse efeito muito maior em pH alcalino do que em pH ácido, demonstrando que o efeito de proteção anti-oxidante deste excipiente é maior quando se encontra ionizado.

Tabela 27 – Velocidades específicas de degradação para a rifampicina em solução aquosa em função de pH e sob ação de agente redutor.

pH	Velocidade específica de degradação de ordem um			Coef. correlação (R^2)	
	k_{aa}	k	k/k_{aa}	c/aa	s/aa
5	0,3485	0,3635	1,0430	0,997	0,992
6	0,1858	0,1995	1,0737	0,997	0,984
7	0,0539	0,1048	1,9443	0,996	0,959
8	0,0219	0,0688	3,1416	0,943	0,871
9	0,0138	0,0566	4,1014	0,939	0,939

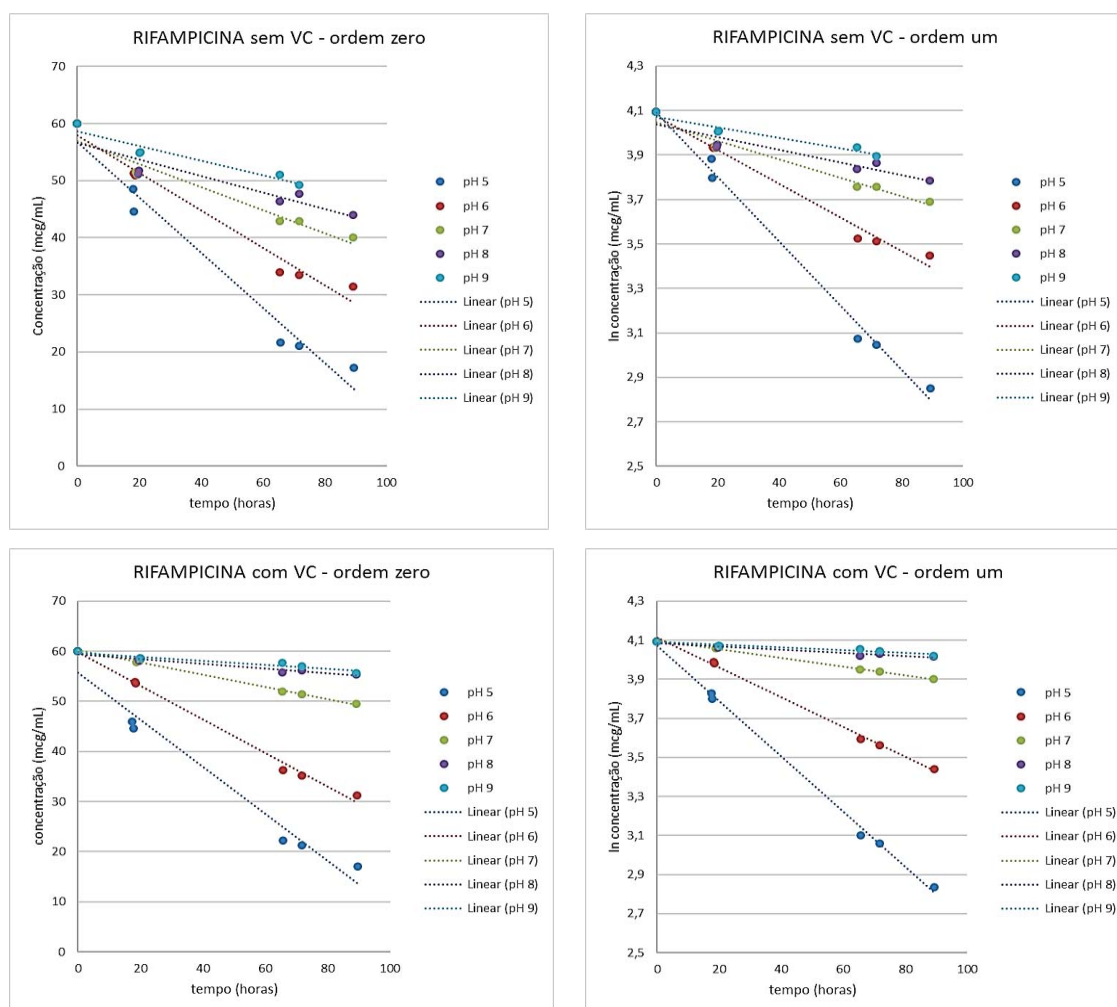
k_{aa} = velocidade de degradação com ácido ascórbico; k = velocidade de degradação sem ácido ascórbico; c/aa = com ácido ascórbico; s/aa = sem ácido ascórbico.

Modelos de degradação foram avaliados sob as cinéticas de ordem zero e ordem dois, mas os coeficientes de correlação encontrados em ambos os casos foram sempre menores do que aqueles obtidos com cinética de ordem um para cada par pH e anti-oxidante. Em decorrência disso, estão sendo apresentados apenas os dados de cinética de degradação diretamente dependente da concentração de uma substância.

Em seguida, para avaliar essa mesma condição, mas estando a rifampicina combinada com isoniazida e com pirazinamida, um outro conjunto de soluções foi preparado em diferentes valores de pH e na presença (cVC) ou ausência (sVC) de ácido ascórbico. Os gráficos que relacionam a concentração de rifampicina (em $\mu\text{g/mL}$) com o tempo de duração do ensaio (em horas), com ou sem vitamina C, avaliados sob cinética de ordem zero e cinética de ordem um estão apresentados na figura 31 Os resultados obtidos com essa nova série de experimentos demonstram que:

- a velocidade de degradação é dependente do pH, sendo tanto maior quanto menor for o valor do pH, com tendência ao mínimo por volta do pH 8 em diante;
- em pH igual ou inferior a 6, a degradação da rifampicina ocorre de forma praticamente independente da presença do ácido ascórbico. Porém, acima de 6 se percebe nitidamente a mudança na velocidade de degradação.

Figura 31 - Concentração de rifampicina em relação ao tempo em soluções com isoniazida e pirazinamida, com ou sem ácido ascórbico, avaliados sob cinética de ordem zero e ordem um.



Os dados de regressão obtidos com a análise dos dados acima estão reunidos na tabela 28, onde constam os valores de velocidade de degradação em ordem zero e ordem um para todos os valores de pH, na presença ou ausência de ácido ascórbico. Para cada valor de velocidade está associado o respectivo valor do coeficiente de determinação (r^2).

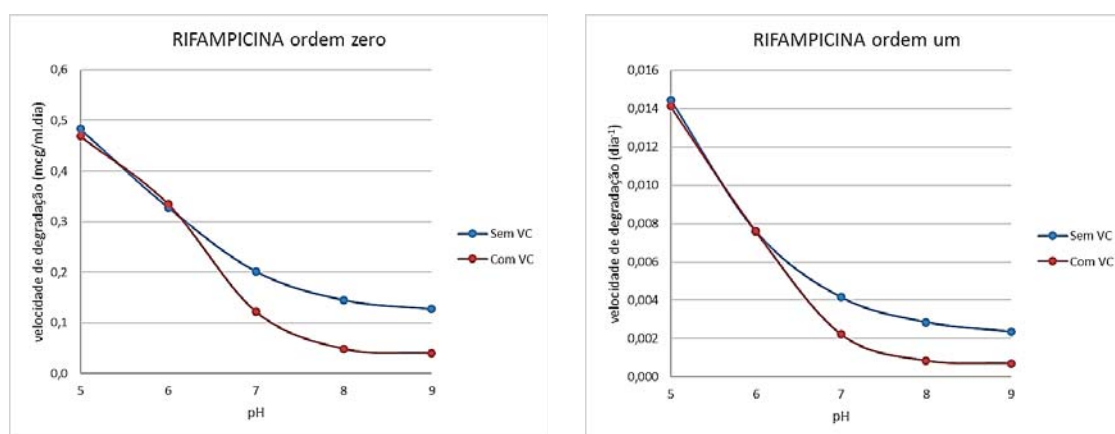
Tabela 28 - Velocidades de degradação e coeficientes de determinação para a rifampicina associada a isoniazida e pirazinamida na presença e ausência de ácido ascórbico em função do pH.

pH	Sem ácido ascórbico				Com ácido ascórbico			
	Ordem zero		Ordem um		Ordem zero		Ordem um	
	k	r ²	k	r ²	k	r ²	k	r ²
5	0,483	0,9693	0,0145	0,9922	0,469	0,9690	0,0141	0,9974
6	0,328	0,9719	0,0076	0,9840	0,335	0,9939	0,0076	0,9970
7	0,202	0,9349	0,0042	0,9594	0,122	0,9969	0,0022	0,9968
8	0,145	0,8452	0,0028	0,8710	0,048	0,9399	0,0008	0,9433
9	0,128	0,9283	0,0024	0,9394	0,040	0,9131	0,0007	0,9112

Os valores em negrito representam os coeficientes de determinação mais elevados quando se compara a ordem zero com a ordem um.

Expressando os valores acima na forma de gráfico, relacionando a velocidade de degradação da rifampicina com o pH da solução pode-se perceber que tanto o pH mais elevado quanto a presença de ácido ascórbico são fatores que contribuem para a estabilização da rifampicina, como se observa na figura 32.

Figura 32 - Velocidades de degradação em função do pH e da presença de ácido ascórbico avaliadas sob cinética de ordem zero e ordem um.



Autores que avaliaram a estabilidade da rifampicina (PRANKERD, WALTERS, PARNES, 1992) registraram que a degradação que ocorre em meio ácido se dá por meio de hidrólise com a formação de 3-formil-rifampicina e 1-amino-4-metil-piperazina e em meio alcalino se dá a formação de 25-desacetilrifampicina e rifampicina-quinona. Porém, os autores acima citados trabalharam na faixa de pH de 1 a 5, a solução continha ácido ascórbico para

evitar que ocorresse oxidação, os tampões empregados possuíam composições diferentes entre si, e o ensaio de degradação ocorreu em temperatura de 37 °C. Neste trabalho, a degradação foi avaliada à temperatura ambiente (25°C), os tampões tinham a mesma molaridade (250 mM), diferindo entre si na proporção do fosfato de sódio dibásico para o monobásico. Apesar dessas diferenças, a cinética encontrada pelos citados autores para a rifampicina em pH 5 foi de pseudo-primeira ordem notadamente para as primeiras 10 horas de experimento, com velocidade de $1,21 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, que equivale a uma velocidade de $4,36 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, que é um valor muito próximo daquele encontrado neste trabalho, de $1,45 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, sendo que a diferença pode estar associada às temperaturas e ao tipo de tampão utilizado nos diferentes trabalhos.

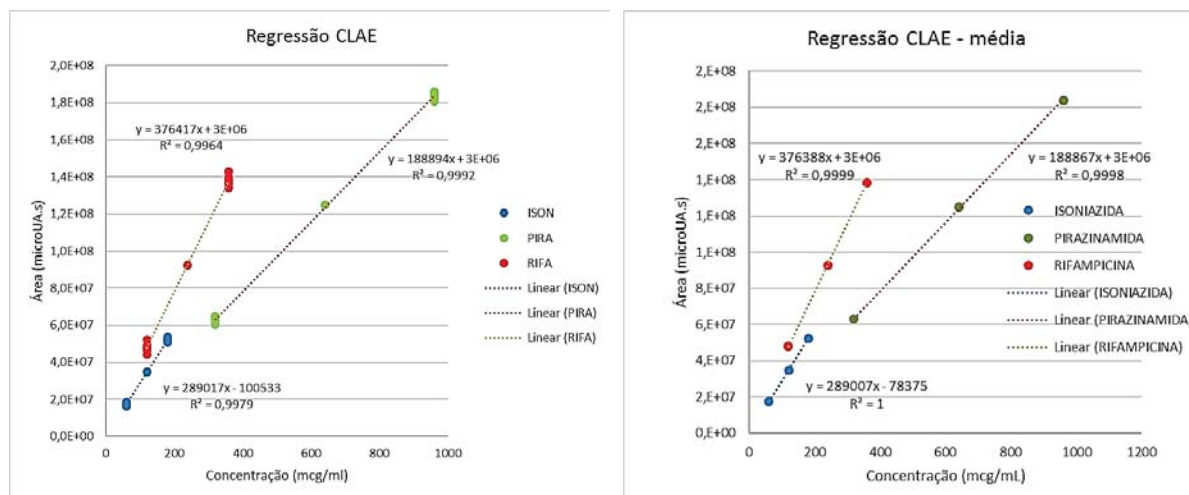
Num outro estudo sobre a estabilidade da rifampicina em combinação com isoniazida e pirazinamida, realizado a 37°C em ácido clorídrico 0,1M durante 50 minutos, SINGH et al (2000) demonstraram que a rifampicina degrada ainda mais rapidamente em meio ácido quando na presença da isoniazida. SANKAR, SHARDA e SINGH (2003) avaliaram a decomposição da rifampicina na presença da isoniazida no intervalo de pH 1 a 3, a 37° C durante 50 minutos, e verificaram que a degradação é mais rápida em pH 2, e que nessa condição ao final dos 50 minutos, o teor de rifampicina decresce entre 13 e 35% e a isoniazida decresce entre 4 e 11%.

5.4.4 Estudo de degradação forçada sobre os insumos ativos combinados

A conferência internacional para harmonização de requisitos técnicos para o registro de medicamentos para uso humano (ICH), através do seu guia sobre teste de estabilidade de novos fármacos e medicamentos (ICH Q1a4), estabelece a necessidade de se conhecer a estabilidade frente a estresses térmicos, pela luz, por agente oxidante e por hidrólise em diferentes faixas de pH. Os fármacos empregados neste trabalho não são novos, mas as condições em que se pretende realizar e apresentar as formulações o são, pois será administrado na forma líquida. Assim sendo, e já conhecendo de antemão por trabalhos já relatados acima que a degradação da rifampicina pode ocorrer em meio ácido, já foi apresentada a combinação deste com os dois outros fármacos em meio de pH próximo da neutralidade (6,8) e uma das amostras foi acidulada com ácido clorídrico 1M. Outra via de degradação conhecida é por oxidação, notadamente em meio alcalino, então foi acrescentado peróxido de hidrogênio à associação em meio líquido. Uma outra sensibilidade descrita para o fármaco é à luz, por isso, para comparação com as amostras de igual qualidade e mantida no escuro, uma amostra em balão volumétrico incolor, transparente, de 10 mL, foi exposta à luz.

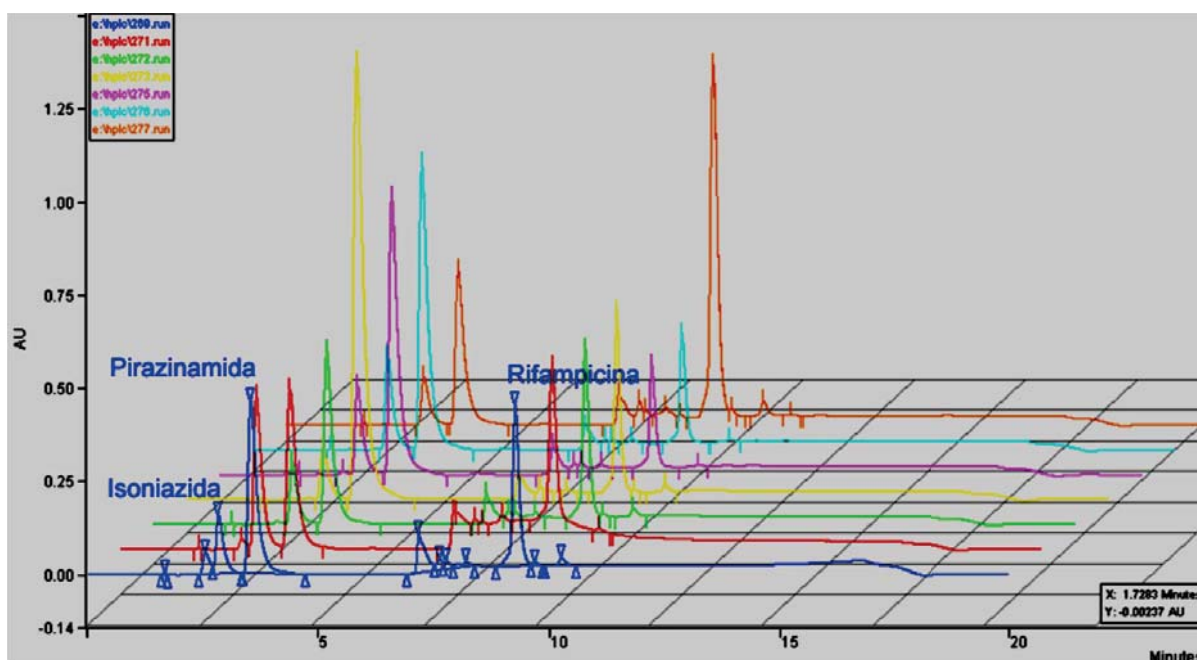
As curvas de calibração obtidas com o uso das combinações empregadas estão representadas na figura 33.

Figura 33 - Curvas de calibração para isoniazida, pirazinamida e rifampicina obtidas por CLAE apresentada com todos os pontos e com a média das áreas.



O que se percebe com as curvas de calibração obtidas é a ótima linearidade para todos os fármacos, quer a avaliação seja realizada com todos os dados ou, ainda melhor, apenas com as médias. Como as curvas foram obtidas ao mesmo tempo, demonstra que as corridas propiciaram suficiente resolução entre os picos para que cada um pudesse ser quantificado de forma separada sem interferir um com o outro. A figura 34 a seguir mostra um exemplo dos cromatogramas obtidos no ensaio, demonstrando haver resolução entre os picos correspondentes aos 3 fármacos presentes nas formulações. As diferenças nas intensidades (altura e áreas) dos picos estão diretamente relacionadas às diversas combinações de concentrações empregadas na realização do ensaio.

Figura 34 - Exemplos dos cromatogramas empregados na preparação das curvas de calibração de isoniazida, pirazinamida e rifampicina.



O que foi constatado com a realização deste ensaio é que a rifampicina e a isoniazida apresentam as maiores sensibilidades e se degradam com facilidade. Em ambos os casos o meio ácido se apresenta como o maior promotor de degradação, e, para a rifampicina ainda existe o papel da oxidação como via de degradação. A pirazinamida praticamente não sofre alteração nas condições avaliadas. A figura 35 apresenta as evoluções de teor de isoniazida, pirazinamida e rifampicina sob as condições avaliadas, e a tabela 29 tem os valores de velocidade de degradação determinadas nas respectivas ordens de reação e com o coeficiente de correlação.

Figura 35 - Evolução da isoniazida, pirazinamida e rifampicina sob condições de estresse ácido, oxidante, luz e em temperatura ambiente.

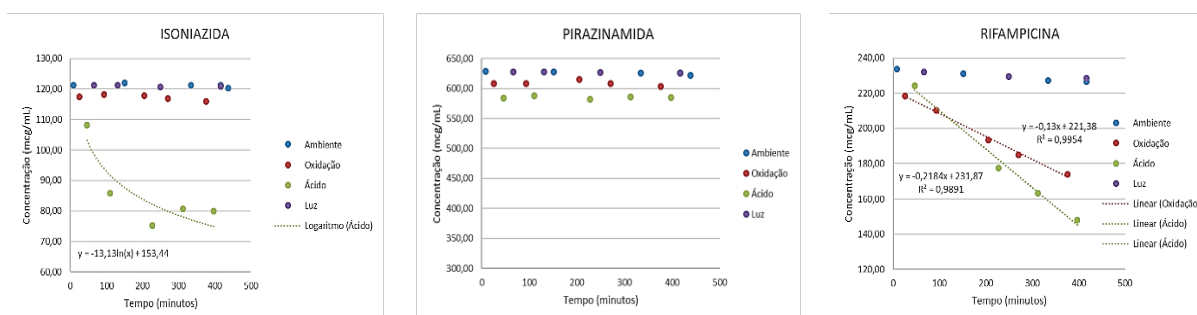


Tabela 29 - Velocidade de degradação, ordem de reação e coeficiente de correlação para a isoniazida e rifampicina em meio ácido e oxidante.

Meio reacional	ISONIAZIDA		RIFAMPICINA	
	Velocidade	Ordem de reação e r^2	Velocidade	Ordem de reação e r^2
Ácido	0,000307 min ⁻¹	1 e 0,6855	0,2184 µg/mL.min ⁻¹	0 e 0,9891
Oxidante	---	---	0,1300 µg/mL.min ⁻¹	0 e 0,9954

Estes resultados, além de confirmar o que anteriormente já havia sido discutido em relação a dados apresentados por outros autores, leva à necessidade de utilizar meios para manter o pH do produto em suspensão em condição próxima da neutralidade para evitar a degradação rápida que ocorre com a isoniazida e a rifampicina. No entanto, quanto à condição de oxidação, foi verificada a possibilidade de se utilizar o ascorbato de sódio como antioxidante, mas existem relatos de que a ação redutora deste excipiente interage com a amina primária da isoniazida, provocando sua degradação. Assim sendo, foi decidido pela não utilização desse excipiente e de nenhum outro antioxidante.

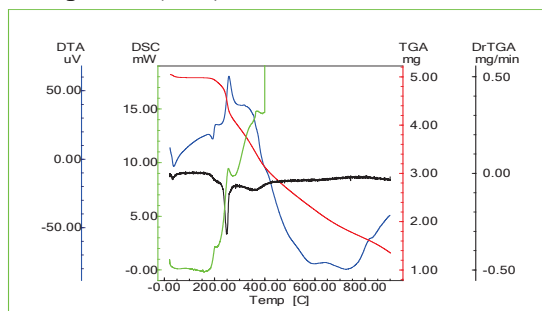
5.4.5 Análise térmica

Buscando verificar o efeito que o dióxido de silício coloidal (aerosil 200) e o ácido ascórbico teriam sobre a rifampicina, as misturas físicas do ativo com os excipientes foram obtidas e, após mantidas em ampolas de vidro fechadas e armazenadas a 70 °C durante 15 dias, foram avaliadas em DSC, TG e DTA. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 36 e resumidos na tabela 30.

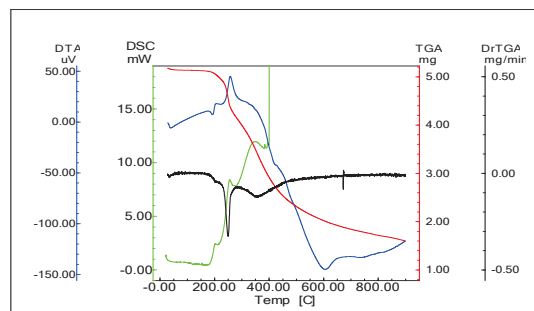
No presente trabalho, a presença dos excipientes aerosil e ácido ascórbico provocaram algumas mudanças no perfil térmico, mesmo quando misturados em pequena proporção com a rifampicina. Porém, as mudanças são mínimas e podem estar relacionadas apenas ao comportamento de impurezas, apesar de que o aerosil ter causado elevação nas temperaturas dos eventos, quer sozinho ou associado ao ácido ascórbico. De forma geral não houve alteração no perfil térmico da rifampicina.

Figura 36 - Curvas térmicas da rifampicina sozinha, com aerosil 200 e com ácido ascórbico.

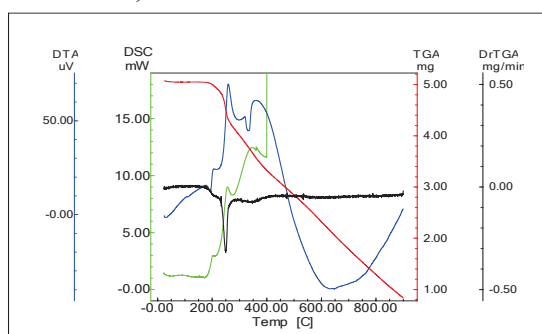
rifampicina (RIF)



RIF com 0,5% de aerosil 200



RIF com 1,0% de aerosil 200



RIF com 1,0% de ácido ascórbico

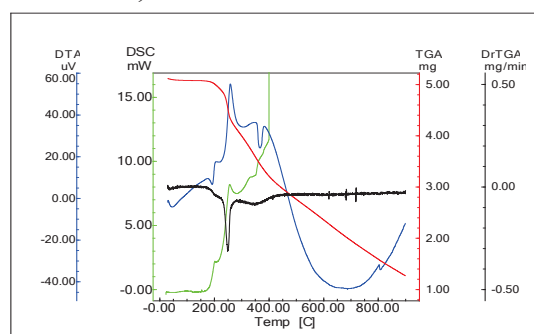


Tabela 30- Resumo das informações da análise térmica por DSC da rifampicina e sua associação com aerosil e/ou com ácido ascórbico.

Evento	Discriminação	Rifa	Rifa +A _{0,5%}	Rifa +A _{1,0%}	Rifa +C _{1,0%}	Rifa +A _{1,0%} +C _{1,0%}
1	Fusão	193,10	194,40	193,40	192,30	193,25
2	Recristalização	204,54	203,09	203,53	200,98	203,38
3	Decomposição	251,30	252,32	249,84	250,15	249,70
4	Decomposição	257,59	258,11	258,52	258,82	259,83
5	Decomposição	279,71	278,38	275,89		
6	Decomposição	366,12	346,44	345,35	349,93	362,59

A – aerosil; C – ácido ascórbico

Dióxido de silício coloidal (Aerosil 200) é amplamente utilizado por suas propriedades dessecante, deslizante, agente suspensor, espessante e até como carreador de fármaco líquido, como o ácido valpróico (KHETARPAL et al, 2012). Diferente de outras sílicas que são alcalinas, a forma de preparação deste insumo o deixa ligeiramente ácido (ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009) favorecendo a estabilização da rifampicina contra a oxidação e, pelo seu efeito dessecante, protege da hidrólise. Como foi experimentado como deslizante junto a cada um dos

insumos ativos por atuar também como dessecante e exercer a atividade em baixa concentração, é essencial que seja compatível. O reduzido tamanho das partículas do aerossol tem a capacidade de preencher espaços entre as demais partículas maiores de uma mistura, reduzindo o contato, a interação por forças de Van-der-Waals e, conseqüentemente, o atrito entre elas. Assim, reduzir também as interações entre as diferentes substâncias em estado sólido, o que explica a melhoria da fluidez e a proteção contra outros agentes como a umidade e solventes residuais, mas não necessariamente corrige a incompatibilidade.

A presença do ácido ascórbico, como antioxidante seguro para uso em pediatria, se justifica pela necessidade de proteção da rifampicina contra a oxidação, já tendo sido provada sua eficácia na formulação (GOHEL, SARVAIYA, NAGORI, 2010), durante o controle de qualidade (RAJARAM, VEMURI, NATHAM, 2014) bem como o efeito hepatoprotetor de forma a reduzir a incidência de hepatite em pacientes sob tratamento de tuberculose (PUROHIT et al, 1986; TASSADUQ, BUTT, HAMID, 2011). Mais recentemente tem sido demonstrado que o uso do ácido ascórbico favorece o efeito dos fármacos utilizados contra a tuberculose, mas se o ácido ascórbico estiver presente na formulação líquida, ocorre a interação deste com a isoniazida e com a pirazinamida, provocando a rápida degradação destes fármacos (SEIFART, PARKIN, DONALD, 1991). Assim sendo, é preferível que o ácido ascórbico seja utilizado como outro medicamento administrado em momento diverso daquele do uso dos medicamentos contra a tuberculose.

5.4.6 Escolha do polímero para granulação / micropartículas

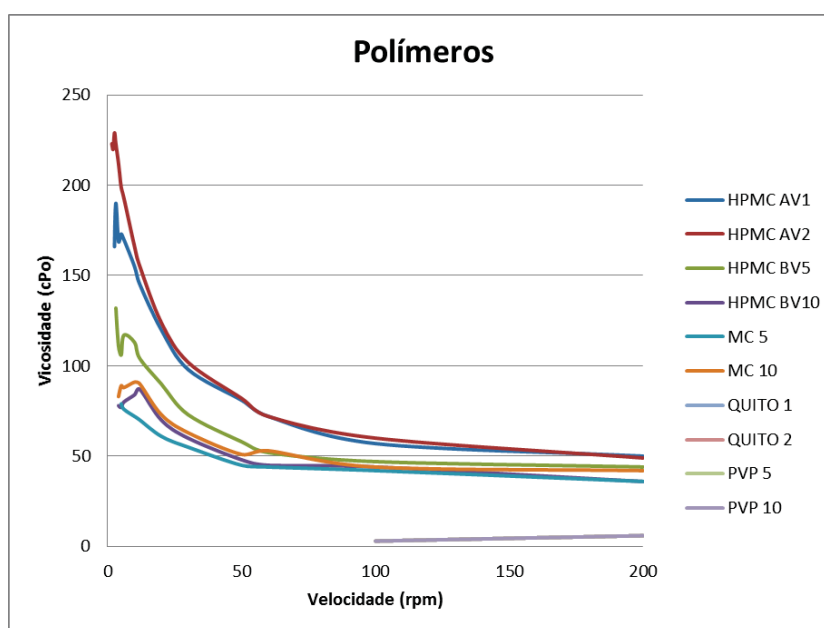
Quando foi iniciada a elaboração de forma farmacêutica contendo a combinação em dose fixa dos fármacos rifampicina, isoniazida e pirazinamida, foi considerada a necessidade de se obter uma formulação apresentada como líquido para uso oral, mas devido à incompatibilidade existente entre os fármacos e à própria instabilidade da rifampicina em meio aquoso, foi trabalhado o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica sólida destinada a obtenção extemporânea de forma líquida, apresentada como um pó para reconstituição e como comprimido dispersível.

A primeira etapa trabalhada foi na escolha das condições para a associação dos fármacos supra citados em uma formulação para a obtenção de um produto estável, com fluidez adequada ao processamento industrial, bem como com aspecto biofarmacêutico modificado para permitir a rápida dissolução da isoniazida e pirazinamida (fármacos com grande solubilidade) e retardo no início da dissolução da rifampicina sem impedir que venha a se dissolver completamente

ainda no estômago, onde apresenta melhor solubilidade. Assim sendo, buscou-se dentre os polímeros disponíveis qual o que proporcionaria as diferentes performances tidas como objetivos a serem atingidos.

Durante os ensaios para o desenvolvimento do veículo para uso em pediatria, os polímeros metilcelulose e hipromelose já haviam sido descartados por causa da viscosidade elevada obtida com os polímeros de maior peso molecular, pelo comportamento reológico apresentado por eles e pelas demais restrições apontadas anteriormente. Mas, ainda assim foram avaliados quanto à ação aglutinante na obtenção dos grânulos. A primeira dificuldade encontrada foi quanto a elevada viscosidade das dispersões aquosas desses polímeros como se pode avaliar através da figura 37 que apresenta as viscosidades e comportamentos reológicos de todas as soluções dos aglutinantes utilizados, e respectivas concentrações.

Figura 37 - Viscosidade e comportamento reológico das soluções dos polímeros empregados para a granulação da rifampicina.



HPMC – Hipromelose; MC – metilcelulose; Quito – Quitosana; PVP – Povidona; AV – Alta viscosidade; BV – Baixa viscosidade.

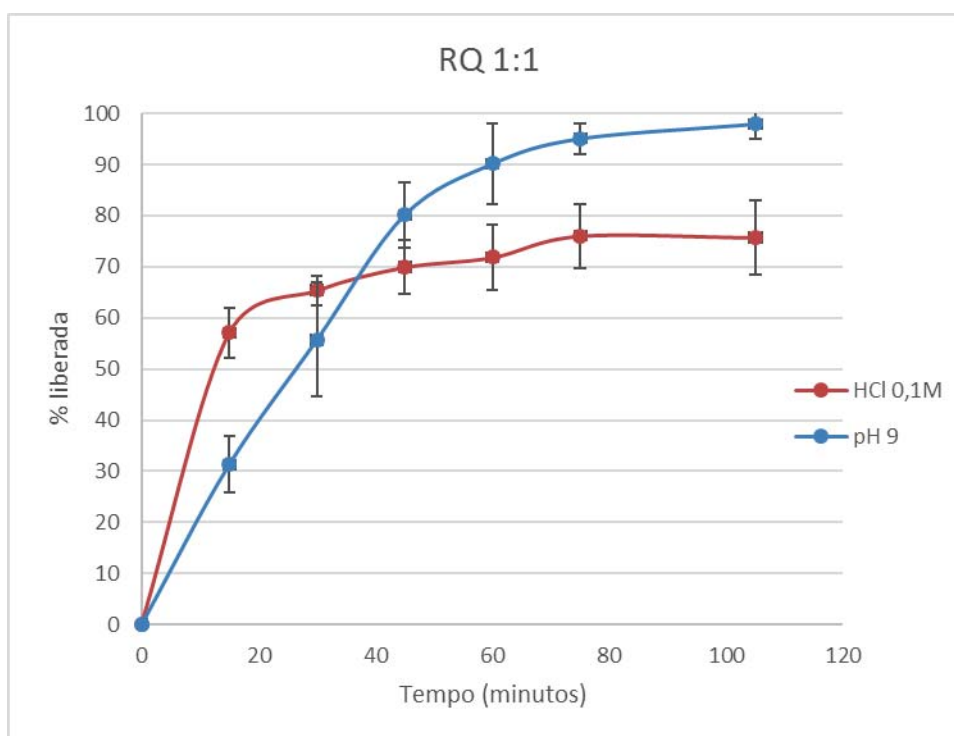
A viscosidade elevada, assim considerada em comparação com a solução de povidona e de quitosana, causou dificuldade durante o processo de malaxagem, pois, em contato com o sólido, resultou em massa com ainda maior resistência à movimentação. Quitosana a 1 e 2% e Povidona a 5 e 10% apresentaram as mesmas viscosidades, por isso os dados da figura 37 estão sobrepostos.

Empregando os grânulos secos e triturados em moinho com malha de 0,5 mm a 18.000 rpm, foram preparadas suspensões apenas com a rifampicina em água, resultando em produtos de elevada viscosidade e demora na hidratação, como no caso da hipromelose e metilcelulose, o que retarda bastante a dissolução do fármaco. Todos os grânulos foram avaliados quanto ao perfil de liberação e os resultados foram:

- com o uso da povidona K-30, a quantidade dissolvida inicialmente é mantida quase constante ao longo do tempo e, somente na concentração de 5% ocorreu aumento na dissolução aos 70 minutos, o que é muito demorado;
- com o uso dos derivados da celulose, como acima mencionados, houve aumento da viscosidade, e a quantidade de rifampicina liberada permaneceu baixa durante todo o tempo do ensaio;
- com o uso da quitosana, a quantidade dissolvida inicialmente é entre 35 e 40%, cresce rapidamente na concentração mais baixa do polímero, já atingindo a máxima concentração por volta dos 20 minutos, mas com maior concentração de quitosana, o valor inicial permanece quase constante, e chegando a máxima concentração por volta dos 30 minutos, e isso tudo com pequeno aumento de viscosidade da dispersão líquida.

Foi selecionada, portanto, a quitosana como polímero a ser empregado nas demais experimentações visando a uma ação mucoadesiva, proteger a rifampicina da interação com a isoniazida na formulação e retardar a dissolução no estômago. Porém, como o processo de granulação apenas agrega as partículas de fármaco umas às outras (PARIKH, 2005) sem realizar o efetivo e necessário revestimento das partículas com o polímero, a dissolução pode até ser reduzida em função da menor área superficial exposta ao solvente, mas não é controlada para ocorrer na condição escolhida. Foi avaliada a preparação de membranas em que a rifampicina era dispersa na solução de quitosana como suspensão, mantida sob agitação mecânica para a completa distribuição das partículas no meio do líquido, que então era vertido em placas de Petri e deixados em repouso para secar a 50°C em estufa com circulação de ar. As membranas obtidas eram trituradas em moinho a 18.000 rpm com malha trapezoidal de 0,5 mm e o pó resultante foi avaliado em termos de perfil de liberação em meio de pH 9 e em HCl 0,1M, a 37°C, empregando aparato 2 (pá) e 50 rpm. A figura 38 apresenta um dos resultados obtidos, demonstrando a discrepância entre o desejado e o obtido.

Figura 38 – Perfil de liberação das partículas de rifampicina com quitosana obtidas a partir da trituração das membranas preparadas por suspensão.



Esperava-se que a quitosana permanecesse insolúvel em meio alcalino e assim evitasse a liberação da rifampicina, da mesma forma que se esperava que em meio de ácido clorídrico ocorresse a completa dissolução do polímero e do fármaco. Nem uma coisa e nem outra ocorreram de forma efetiva. O que se percebia durante o ensaio de liberação é que em pH 9 as partículas de quitosana até permaneciam insolúveis, mas a rifampicina contida nelas era facilmente liberada e dissolvida, deixando a impressão que o revestimento não ocorria de forma a cobrir toda a superfície das partículas do fármaco. A área superficial exposta ao solvente ao se dissolver, deixava canalículos por meio dos quais o solvente conseguia penetrar para dissolver mais porções do fármaco, rapidamente esgotando este da matriz polimérica.

O uso do pH alcalino para a verificação da liberação é justificado como meio para manter a quitosana insolubilizada e assim estabilizar a rifampicina imobilizada no seu interior, permitindo que uma suspensão estável pudesse ser formulada mesmo com a presença de isoniazida. No entanto, pelo que foi obtido como resultado, a técnica de preparo e trituração de membrana não surtiu o efeito desejado.

Em meio ácido ocorreu uma rápida dissolução da rifampicina, chegando quase ao dobro do observado em meio alcalino nos primeiros 15 minutos. No entanto, com a continuação do

ensaio, o que se observou foi o declínio na quantidade de fármaco dissolvido, que pode estar associado à degradação da rifampicina em meio ácido.

Ainda acreditando que a quitosana pudesse realizar o controle da liberação, foi realizada a nebulização das dispersões como suspensão e como emulsão. Os teores de rifampicina encontrados nas micropartículas obtidas por nebulização estão apresentadas na tabela 31. O rendimento expressa de forma percentual o teor de rifampicina encontrado em relação ao teor de rifampicina esperado em cada preparação microparticulada.

Tabela 31 - Teor de rifampicina nas micropartículas obtidas por nebulização a partir das suspensões e emulsões em quitosana.

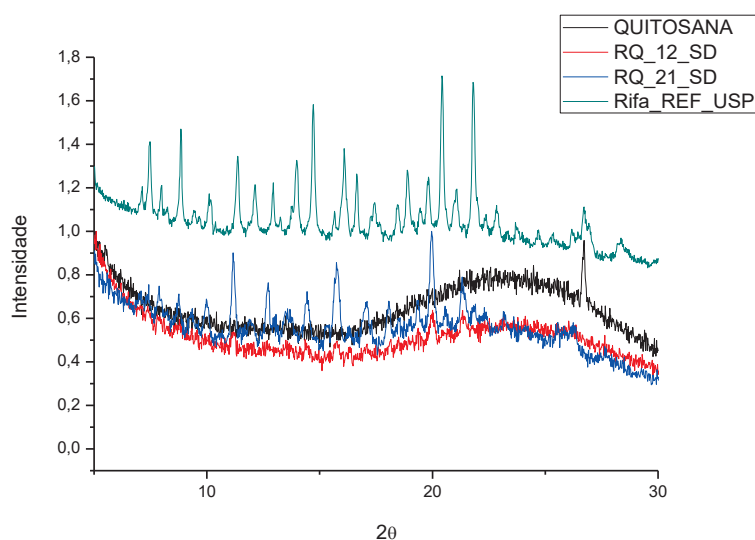
Amostra	RQ12SD	RQ11SD	RQ21SD	RQEm12SD	RQEm11SD	RQEm21SD
Teor (%m/m)	18,46	27,97	36,58	31,50	46,20	60,87
Teor esperado	33,33	50,00	66,67	33,33	50,00	66,67
Rendimento (%)	55,38	55,93	54,86	94,50	92,40	91,31

RQ – Rifampicina:Quitosana; 12, 11 e 21 – relação droga:polímero; Em - Emulsão

Percebe-se que os maiores teores foram obtidos com as partículas que foram processadas por emulsificação. Observa-se ainda que a eficiência na encapsulação (rendimento) é tanto maior quanto menor for a relação droga:polímero, demonstrando que no caso das preparações por emulsão o polímero efetivamente conseguiu manter o fármaco junto dele durante todo o processo de nebulização. No processamento por suspensão, os rendimentos foram bastante similares, próximos de 55%.

Ficou claramente demonstrado que o processo levou à amorfização da rifampicina, como se pode observar pelo resultado da difração de raios X apresentado na figura 39. A quitosana é um polímero praticamente amorfo e apresenta apenas um pico por volta de $\theta=27^\circ$. Após a nebulização, as partículas que continham menor proporção de rifampicina (RQ_12_SD) apresentaram-se mais amorfas do que as que continham maior proporção do fármaco (RQ_21_SD). A amorfização ocorre devido à rapidez com que o líquido contido na solução do fármaco é evaporado, sendo essa velocidade maior do que a velocidade de organização das moléculas para a sua cristalização (PETIT, COQUEREL, 2006; TAYLOR, SHAMBLIN, 2009).

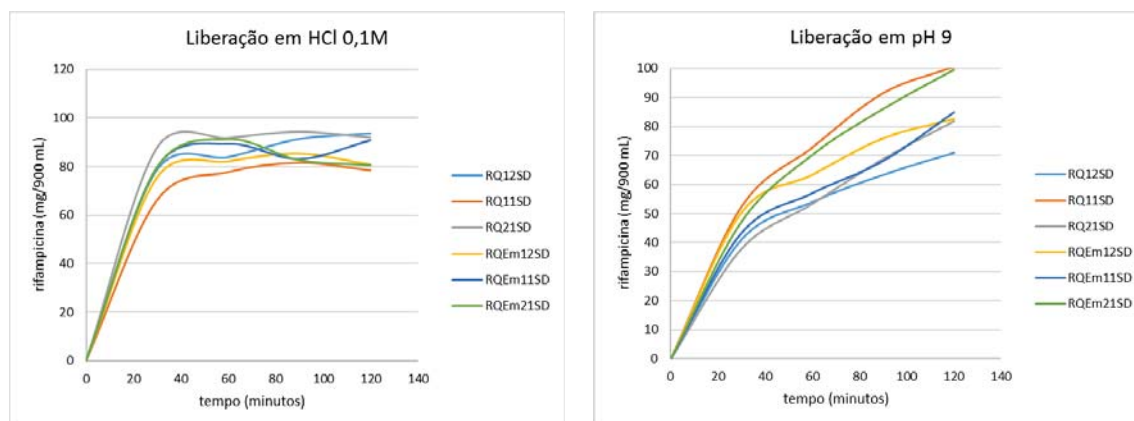
Figura 39 – Difração de raios X de quitosana, da rifampicina e dos pós contendo a associação rifampicina:quitosana obtidos por nebulização



RQ_12_SD – Rifampicina:Quitosana 1:2; RQ_21_SD – Rifampicina:Quitosana 2:1

Uma consequência direta da amorfização devido ao processamento por nebulização, associada com o reduzido tamanho das partículas, é o aumento na velocidade de liberação do fármaco amorfo contido nas micropartículas. A figura 40 a seguir apresenta os resultados do ensaio de liberação realizado com as amostras obtidas por nebulização tanto através da suspensão quanto da emulsão da rifampicina em quitosana. Por serem partículas muito finas e com grande tendência a formar aglomerados, o meio empregado para o ensaio de liberação foi acrescido de polissorbato 80 na concentração de 0,1%.

Figura 40 - Perfil de liberação de rifampicina a partir das micropartículas de quitosana obtidas por nebulização.



RQ – Rifampicina:Quitosana; 12, 11 e 21 representam a proporção droga:polímero; Em – emulsão.

Como se pode perceber, mais de 70% da rifampicina já está liberada e dissolvida em ácido clorídrico 0,1M nos primeiros 30 minutos de ensaio e aumenta o teor ao longo das próximas coletas, ocorrendo um decréscimo nos tempos superiores em decorrência da própria degradação do fármaco no meio ácido. Em pH 9 a liberação é menor no início, mas apresenta cinética praticamente linear ao longo do tempo, e que fica melhor linearizada quando plotada em relação à raiz quadrada do tempo, num modelo de liberação de Higuchi mediado pela difusão e liberação a partir de uma matriz insolúvel (COSTA, LOBO, 2001). Os resultados que representam a velocidade de liberação (%.min^{1/2}) e respectivo coeficiente de correlação para as amostras em pH 9 estão contidos na tabela 32.

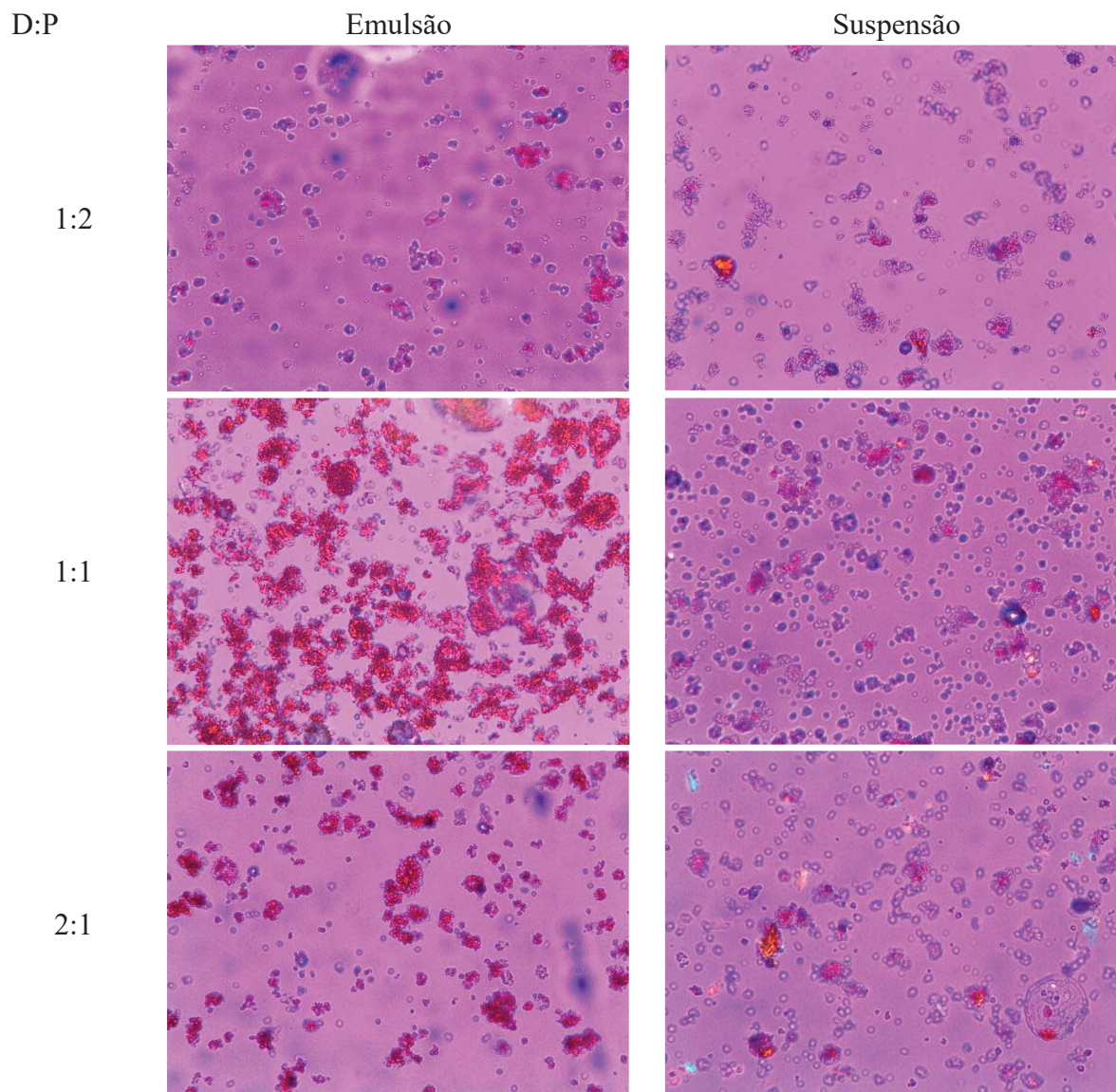
Tabela 32 - Velocidade de liberação e respectivos coeficientes de correlação de rifampicina em pH 9 das micropartículas com quitosana obtidas por nebulização.

Amostra	Velocidade de liberação (%.min ^{1/2})	r ²
RQ12SD	5,454	0,9995
RQ11SD	9,007	0,9931
RQ21SD	8,042	0,9954
RQ12EmSD	6,023	0,9950
RQ11EmSD	7,350	0,9760
RQ21EmSD	9,541	0,9993

Especialmente nas partículas que foram dispersas por emulsão fica muito evidente a dependência entre a relação droga:polímero com a velocidade de liberação, de forma que esta aumenta à medida que a primeira também aumenta.

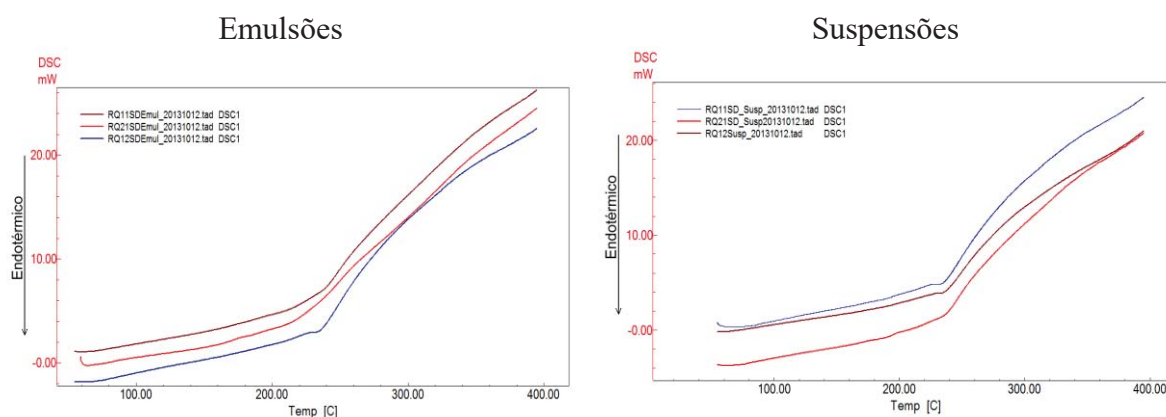
Os registros fotográficos das partículas obtidas durante a nebulização estão reunidos na figura 41. Estas microfotografias foram obtidas com aumento de 400 x, diferente das que foram obtidas diretamente da rifampicina antes do processamento que está apresentada na figura 9 com aumento de 100 x. É possível notar que houve redução no tamanho das partículas e que, sob luz polarizada, são apresentadas algumas formações cristalinas caracterizadas pela birrefringência da rifampicina. Mas essas formações cristalinas só são notadas nas preparações que foram obtidas a partir das suspensões e cuja ocorrência é maior quanto mais elevada for a relação droga:polímero.

Figura 41 – Microfotografias das partículas obtidas por nebulização a partir das emulsões e suspensões de rifampicina em quitosana nas relações droga:polímero (D:P) de 1:2, 1:1 e 2:1. (Aumento de 400 X, luz polarizada)



Através da análise térmica realizada por DSC no intervalo de 50 a 400 °C foi observado (figura 42) que o perfil é devido à quitosana, tendo ocorrido a supressão do perfil da rifampicina mesmo quando a preparação foi obtida a partir das suspensões e com maior proporção de droga do que de polímero. Este fato, mais uma vez, confirma a amorfização da rifampicina, cuja ocorrência foi de tal intensidade que fez desaparecer todos os eventos térmicos associados à rifampicina.

Figura 42 – DSC das partículas obtidas por nebulização a partir das respectivas emulsões e suspensões de rifampicina em quitosana



A soma de todos esses fatos que resultaram na amorfização da rifampicina com o uso da nebulização, o incompleto revestimento da rifampicina que ocorre na granulação e com a trituração das membranas, que levam ao não controle da liberação nos diferentes meios avaliados (pH 9 e em HCl 0,1M), associado com a necessidade de fossem preparadas formas farmacêuticas sólidas como pó para reconstituição e comprimido dispersível, somaram fatores que tornaram impossível continuar com a busca pelas condições que permitisse o almejado controle da liberação.

5.4.7 Pó para suspensão oral

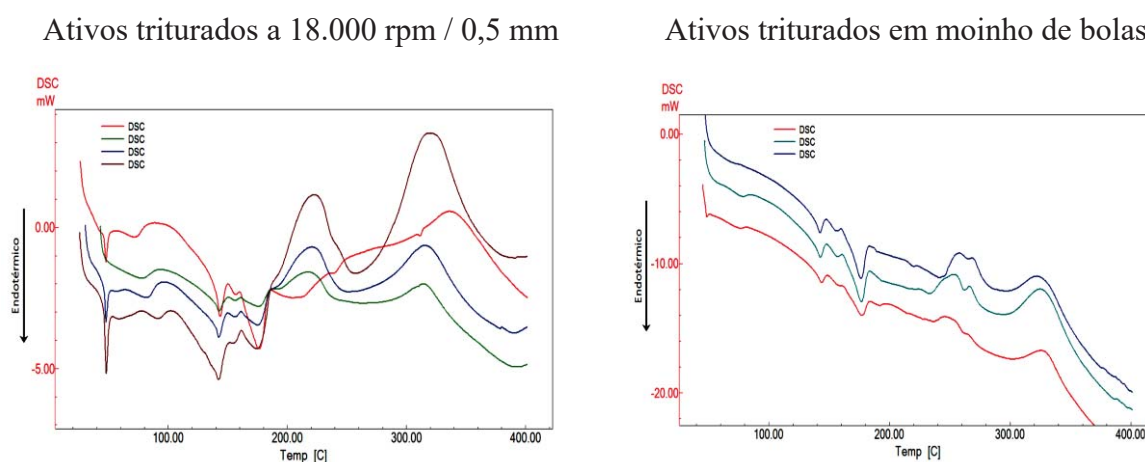
Como estabelecido desde o início deste trabalho, o objetivo foi a preparação de duas formas farmacêuticas sólidas para uso oral: pó para ser reconstituído como suspensão e comprimido dispersível. A partir das informações obtidas anteriormente sobre a composição de um veículo para o carregamento de fármacos destinados ao uso oral em pediatria, sobre o pH de estabilidade para a preparação líquida com a associação dos fármacos para uso no tratamento de tuberculose, foi proposta de composição e foram realizados ensaios no sentido de avaliar a sua viabilidade e a necessidade de ajustes.

Na composição proposta, além dos ativos rifampicina, isoniazida e pirazinamida, deveriam estar presentes: goma xantana, escolhida como agente suspensor desde o desenvolvimento do veículo oral para uso em pediatria; sucralose, escolhida como edulcorante no mesmo desenvolvimento anteriormente citado; aerosil 200, como agente dessecante e deslizante, cuja concentração foi alterada para a formulação do pó; silicone como agente anti-espumígeno; e fosfato de potássio dibásico anidro como agente modificador do pH, de modo que a suspensão reconstituída adquira o pH próximo da neutralidade. Neste parâmetro, mesmo

tendo sido demonstrado que o pH de maior estabilidade é 9, dentro dos limites ensaiados anteriormente, o valor é muito elevado e se tornaria desagradável, irritante e não seguro seu uso por crianças de todas as faixas etárias (DAVIDOVICH et al, 2010).

A mistura de pós realizada com os insumos triturados em moinho com malha de 0,5 mm a 18.000 rpm não se mostrou homogênea em ensaios realizados por DSC, em que a quantidade de amostra é muito pequena e, portanto, passível de detectar diferenças entre as quantidades dos componentes presentes na mistura. Verificou-se assim a necessidade de reduzir ainda mais e de forma homogênea o tamanho das partículas empregadas na composição das misturas para suspensão, o que foi efetivamente alcançado ao triturar cada um dos ativos, separadamente, em moinho de bolas. As diferenças são mostradas na figura 43, em que a repetibilidade só foi alcançada após a trituração dos ativos em moinho de bolas.

Figura 43 - DSC das misturas empregadas para o preparo da suspensão extemporânea, antes e após a trituração da rifampicina, isoniazida e pirazinamida em moinho de bolas.



O procedimento utilizado na mistura para a composição da suspensão oral foi iniciado pela rifampicina com dióxido de silício coloidal e, depois com o modificador de pH e agente suspensor. Com esse procedimento esperava-se que o agente dessecante exercesse seu efeito mais diretamente sobre a rifampicina com a qual foi intimamente misturada desde o início do processo, além de formar uma camada frouxa de pequenas partículas de pó sobre a superfície do fármaco, reduzindo assim sua interação com os outros fármacos da composição enquanto estiver na forma sólida.

A quantidade empregada do modificador de pH é necessária para que a suspensão reconstituída apresente pH 7,8 e proporciona ainda ótima homogeneidade à mistura, pois (1) sua quantidade é igual à soma das quantidades de rifampicina com aerosil, atendendo a um dos

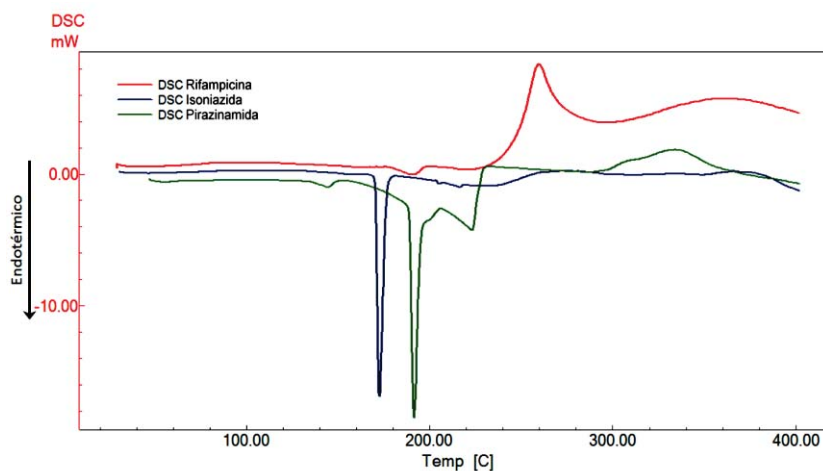
critérios para se alcançar a homogeneidade, e (2) seu aspecto de pó fino cristalino se assemelha ao tamanho do pó da rifampicina, atendendo a um outro critério para boa homogeneidade.

À mistura inicial foram acrescentados todos os demais constituintes que foram previamente misturados entre si: isoniazida, pirazinamida, sucralose e dimeticona. Todas as etapas de mistura foram realizadas em misturador cúbico. A mistura de pós para a suspensão tem a seguinte composição:

Pirazinamida	400 mg
Rifampicina	150 mg
Isoniazida	75 mg
Fosfato de potássio dibásico anidro	170 mg
Goma xantana	15 mg
Aerosil 200	20 mg
Dimeticona DC 100/20	10 µL
Sucralose	10 mg

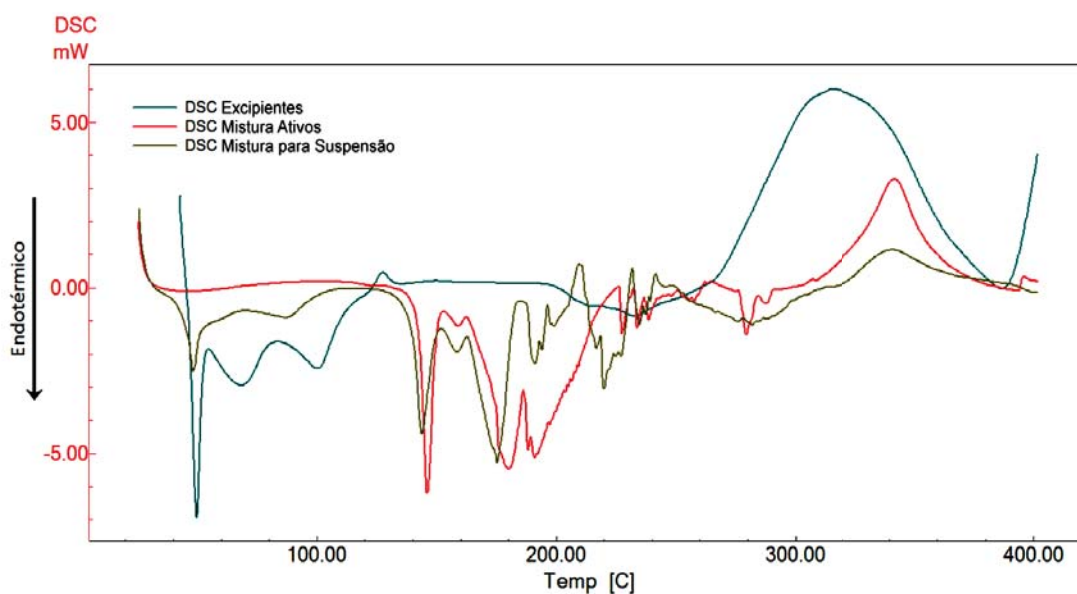
As misturas empregadas na composição do pó para suspensão foram avaliadas em DSC até 400°C, a 10°C/min, sob fluxo de nitrogênio de 30 mL/min. De início os resultados apresentavam nítida variação em decorrência da falta de homogeneidade causada pelo grande tamanho das partículas. Após a trituração em moinho de bolas, os insumos ativos (rifampicina, isoniazida e pirazinamida) apresentaram o mesmo comportamento em DSC (figura 44) obtido antes da trituração (figura 7), e a homogeneidade da mistura tornou a amostragem mais representativa, resultando em maior precisão em termos de repetibilidade no ensaio de DSC, como já mostrado na figura 43 acima.

Figura 44 – DSC dos insumos ativos após moagem em moinho de bolas.



A figura 45 apresenta os resultados dos ensaios realizados em DSC com a mistura física contendo apenas os 3 fármacos, a mistura física dos excipientes, e da composição final do pó para suspensão. Observa-se que os eventos principais que ocorrem até os 200°C, como a fusão da isoniazida e da pirazinamida, praticamente não são afetados pela presença dos excipientes. Nesta mesma região os eventos térmicos característicos da rifampicina são de pequena intensidade e já são afetados pelos dois outros fármacos.

Figura 45 – DSC da mistura de ativos, dos excipientes e de toda a formulação do pó para suspensão.

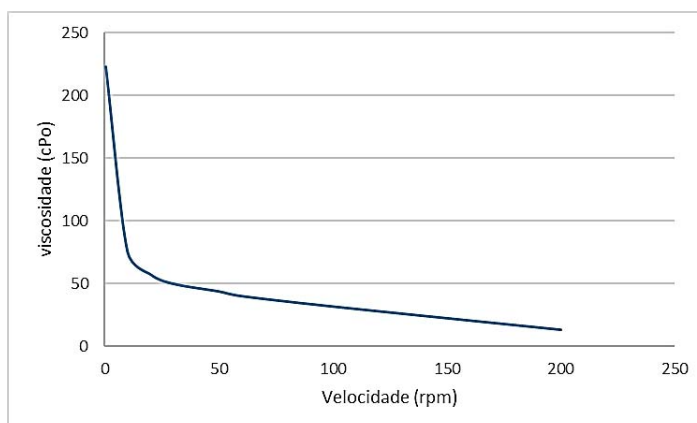


5.4.7.1 Ensaio de reconstituição

A agitação realizada em agitador horizontal é bastante branda para permitir seu uso em cultura de células, leva à menor incorporação de bolhas de ar e por isso foi utilizada como forma de avaliar a reconstituição do pó contendo a mistura para suspensão. Já a agitação manual é mais enérgica, menos reprodutível, leva à incorporação de bolhas de ar, mas é o método correntemente utilizado para realizar a reconstituição de suspensões.

A reconstituição por ambos os métodos é imediata, com pouca formação de grumos, sendo mais notável essa formação no agitador horizontal e com maior presença de celulose, e a maior formação de bolhas se deu com a agitação manual. A percepção destas características se deu apenas de forma visual, sem o registro formal dos resultados. A suspensão reconstituída tem comportamento pseudo-plástico, como é demonstrado na figura 46, mas a viscosidade máxima não é atingida de forma imediata, pois, tal como ocorre com o veículo desenvolvido para uso oral em pediatria, a goma xantana é hidratada de forma lenta.

Figura 46 - Comportamento reológico da suspensão reconstituída em água.

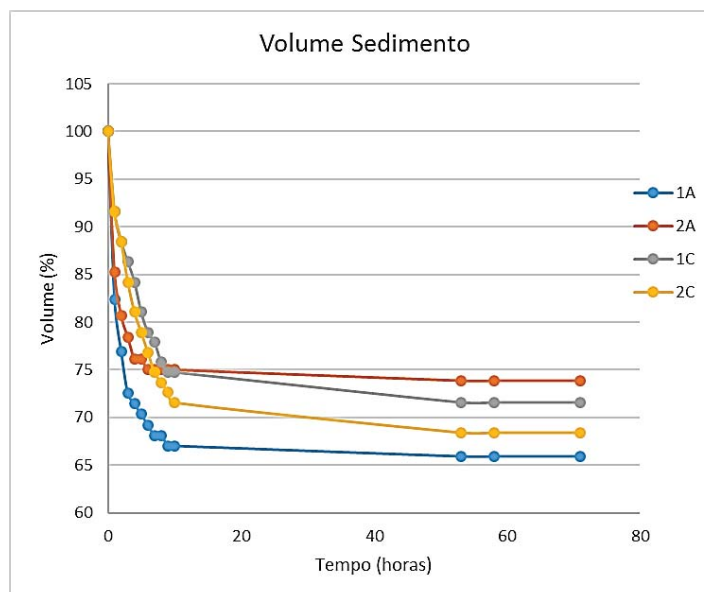


Durante as etapas iniciais de desenvolvimento da mistura para suspensão, foram avaliados de forma comparativa o efeito da presença de aerosil e de celulose microcristalina sobre a estabilidade física da suspensão reconstituída. A tabela 33 e a figura 47 mostram a evolução do volume de sedimento avaliado ao longo do tempo de observação para 4 suspensões, sendo duas com aerosil (1A e 2A), e duas com celulose microcristalina 101 (1C e 2C). As denominações 1A e 2A correspondem, respectivamente, ao uso de 10 e 20 mg de aerosil na composição acima descrita, e as denominações 1C e 2C correspondem, respectivamente, ao uso de 10 e 20 mg de celulose microcristalina. Esses valores, expressos de forma percentual, correspondem a 1,19 e 2,35%, respectivamente.

Tabela 33 – Volume de sedimento em função do tempo, expresso de forma percentual em relação ao volume total da suspensão, observado após a reconstituição das suspensões com diferentes quantidades de aerosil (1A e 2A) e de celulose microcristalina 101 (1C e 2C)

Tempo (horas)	Aerosil		Celulose	
	1,19%	2,35%	1,19%	2,35%
1	82,4	85,2	91,6	91,6
2	76,9	80,7	88,4	88,4
3	72,5	78,4	86,3	84,2
4	71,4	76,1	84,2	81,1
5	70,3	76,1	81,1	78,9
6	69,2	75,0	78,9	76,8
7	68,1	75,0	77,9	74,7
8	68,1	75,0	75,8	73,7
9	67,0	75,0	74,7	72,6
10	67,0	75,0	74,7	71,6
53	65,9	73,9	71,6	68,4
58	65,9	73,9	71,6	68,4
71	65,9	73,9	71,6	68,4

Figura 47 - Volume de sedimento das suspensões preparadas com aerosil e celulose.



Considerando que o produto é uma suspensão extemporânea que deve ser preparada e, portanto, utilizada logo após o seu preparo, o volume de sedimento que se observa durante o repouso é suficientemente fraco e não representa por si só um problema para a estabilidade do produto. É até desejável que o tipo de sedimento seja esse que caracteriza uma suspensão floculada (AULTON, 2005). No entanto, se a suspensão não for agitada antes do uso, corre-se o risco de estar sendo realizada uma administração inadequada dos seus componentes ativos. O

que se observa na figura 47 é que com o aumento da quantidade de celulose ocorre redução no volume de sedimento, significando que o mesmo tem a tendência a ficar progressivamente mais compactado, ao passo que com o aerosil ocorre o inverso, ou seja, aumentando a proporção deste excipiente, o volume de sedimento aumenta, caracterizando um sedimento frouxo e mais fácil de ser redisperso mesmo com pouca agitação manual. Por esse motivo a quantidade de aerosil empregada na composição do pó para suspensão ficou definido como está na formulação já apresentada.

O pH da suspensão obtida a partir da mistura de pós contendo 2,35% de aerosil 200 reconstituída com água potável apresentou valores entre 7,84 e 7,87, que corresponde ao pH de ótima estabilidade para a associação dos fármacos, permanecendo inalterado durante todo o período de avaliação de 71 horas.

5.4.7.2 Determinação do teor dos ativos

Ainda como parte do desenvolvimento da formulação em pó, e para subsidiar a escolha dos excipientes que vêm sendo trabalhados (aerosil x celulose), bem como para definir a metodologia a ser empregada no preparo da amostra, foi realizado o doseamento dos fármacos contidos nas formulações de pó para reconstituição durante um período de 71 horas após a reconstituição mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz.

Os resultados obtidos para a rifampicina através de 7 dosagens efetuadas, que foi o fármaco que apresentou maior degradação e está sendo utilizada como o fármaco limitante da estabilidade da formulação, estão sumarizados na tabela 34, foram avaliados como cinética de ordem zero e cinética de ordem um.

Tabela 34 - Velocidades de reação para a degradação da rifampicina contida nas formulações de pó para reconstituição com diferentes proporções de aerosil e celulose, avaliadas sob cinéticas de reação de ordem zero, um e dois

	Ordem zero		Ordem um		Ordem dois	
	k_0 (mg/mL.h ⁻¹)	r^2_0	k_1 (h ⁻¹)	r^2_1	k_2 (h.mL/mg)	r^2_2
A 1,19%	0,0250	0,7874	0,0026	0,8046	0,0014	0,8204
A 2,35%	0,0219	0,7325	0,0021	0,7497	0,0011	0,7648
C 1,19%	0,0264	0,8684	0,0029	0,9008	0,0017	0,9275
C 2,35%	0,0140	0,526	0,0015	0,5143	0,0008	0,5004

A – Aerosil; C – Celulose.

Dada a complexidade das reações que ocorrem entre os fármacos que constam na formulação citada (PRANKERD, WALTERS, PARNES, 1992; SINGH et al, 2000) que envolvem reações reversíveis e com mais de um componente, pode-se crer que a reação global da degradação da rifampicina ora monitorada possua ordem superior a dois, podendo até ser de ordem não inteira como será apresentado a seguir através do estudo cinético por DSC.

5.4.7.3 Avaliação da estabilidade do pó

O método de Ozawa tem sido amplamente empregado na avaliação da energia de ativação através de ensaios não isotérmicos de cinética de degradação de fármacos e outras substâncias químicas, tendo sido aplicado inicialmente aos dados obtidos da análise termogravimétrica (TG) (AGHERGHINEI, 1998; HATAKEYAMA, LIU, 1998; BROWN, 1998). Posteriormente evoluiu para aplicação aos dados obtidos por DSC tanto em modo isotérmico como não isotérmico, resultando na publicação de diversos trabalhos (SANTOS et al, 2004; FARJAS, BUTCHOSA, ROURA, 2010).

Utilizando essa abordagem é possível em pouco tempo a obtenção de informações como energia de ativação, fator de frequência e a ordem de reação, que podem ser utilizadas para calcular o prazo de validade da amostra. O tratamento matemático se baseia nas seguintes equações (SHIMADZU, 2010), elaboradas a partir da equação de Arrhenius.

$$\frac{dx}{dt} = A \cdot \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT}\right) (1-x)^n \quad (\text{equação 4})$$

Onde: $\frac{dx}{dt}$: velocidade da reação

A : fator de frequência

ΔE : energia cinética

1-x : percentagem da reação incompleta

R : constante dos gases

n : ordem da reação

T : temperatura

Quando a temperatura varia numa determinada velocidade $\phi = \frac{dT}{dt}$ a equação (4) pode ser aproximada para:

$$\log_{10} \phi = -0,4567 \cdot \frac{\Delta E}{R} \cdot \frac{1}{T} + cte \quad (\text{equação 5})$$

Onde: T : temperatura do pico.

Se as medidas das temperaturas dos picos forem realizadas com diferentes velocidades de aquecimento, e os dados de logaritmo da velocidade de aquecimento (eixo y) forem plotados em relação ao inverso da temperatura do pico (eixo x), será gerada uma reta, cuja inclinação é utilizada para calcular a energia cinética de ativação (ΔE), empregando a equação 6.

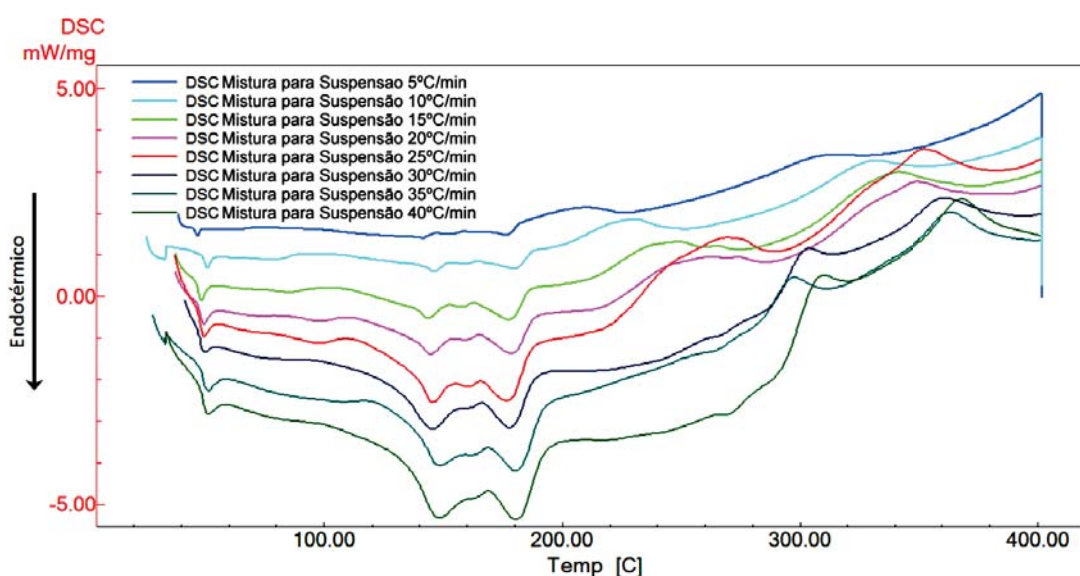
$$\text{Inclinação} = 0,4567 \cdot \frac{\Delta E}{R} \quad (\text{equação 6})$$

Conhecendo a energia cinética de ativação (ΔE), o fator de frequência da reação pode ser determinado com a equação 7.

$$\frac{\partial \Delta E}{RT^2} - A \cdot \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT}\right) \cong 0 \quad (\text{equação 7})$$

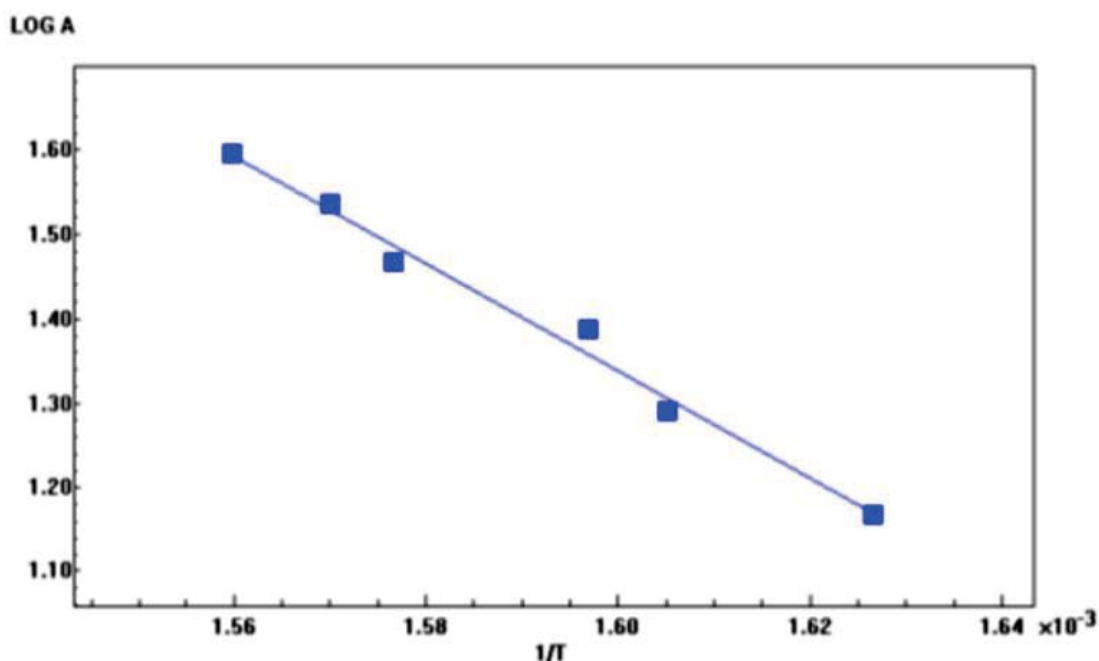
Através do ensaio de DSC cinético aplicado às amostras de pó para suspensão foram obtidas as curvas apresentadas na figura 48.

Figura 48 – Curvas de DSC não isotérmicas da mistura para suspensão obtidas sob diferentes rampas de aquecimento (\emptyset)



A plotagem do logaritmo do fator de frequência (A) em relação ao inverso da temperatura é mostrado na figura 49, demonstrando ótimo ajuste ($r^2=0,9879$) entre os dados encontrados com a linha contínua. Para a elaboração dos dados da figura 49 foram suprimidos os dados cinéticos obtidos com as rampas de 5 °C/min e de 10 °C/min, pois nos dois casos não foi percebido o evento térmico que está sendo avaliado.

Figura 49 – Relação de Ozawa relativa à decomposição a partir dos 320°C considerando os dados obtidos com rampas de 15 a 40 °C/min.



A avaliação dos dados de DSC segundo o método de Ozawa, considerando a degradação que ocorre a partir dos 320°C, resultou numa ordem de reação 1,4, fator de frequência de $4,62 \times 10^9 \text{ min}^{-1}$, Energia cinética de $116,98 \text{ kJ/mol} = 22,94 \text{ kcal/mol}$. A escolha da temperatura de 320°C para a avaliação da cinética se deu porque no perfil de DSC aplicado apenas à mistura dos ativos (figura 48 acima) é nessa região que se encontra o evento exotérmico característico de uma decomposição.

A análise realizada considerando a decomposição que ocorre após a temperatura de 215°C, até a temperatura de 286°C (figura 50), resulta em uma ordem de reação 2,1, fator de frequência de $2,60 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$, Energia cinética de $67,60 \text{ kJ/mol} = 16,15 \text{ kcal/mol}$. A plotagem do logaritmo do fator de frequência (A) em relação ao inverso da temperatura é mostrado na figura 51, demonstrando bom ajuste ($r^2 = 0,9247$) entre os dados encontrados com a linha contínua.

O resumo dos dados obtidos após a análise cinética de DSC aplicada ao pó contendo a composição empregada para a obtenção da suspensão extemporânea está apresentado na tabela 35.

Tabela 35 – Resultados da análise cinética de DSC do pó para suspensão extemporânea.

Parâmetros	RESULTADOS	
	Faixa de temperatura (°C)	215-286
Energia de ativação (kJ/mol)	67,60	116,98
Energia de ativação (kcal/mol)	16,15	22,94
Ordem da reação	2,1	1,4
Fator de frequência	$2,60 \times 10^6$	$4,62 \times 10^9$
r^2	0,9247	0,9879

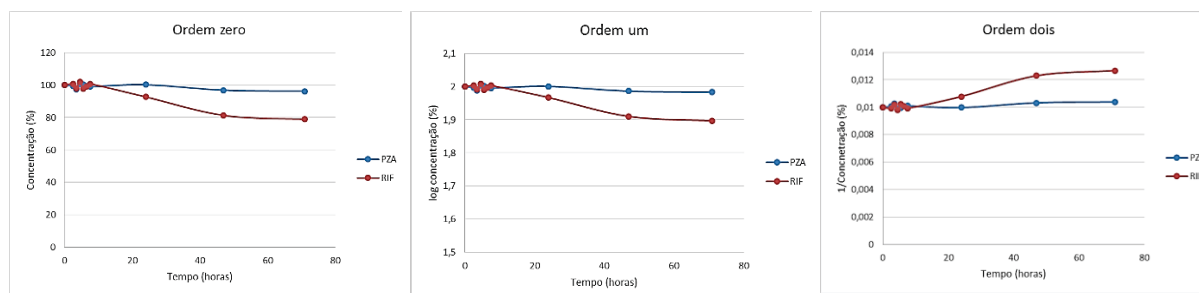
Analisando os resultados apresentados na tabela 35 foi constatado que a primeira etapa de degradação ocorre com maior velocidade que as demais, pois, apesar de possuir menor fator de frequência, requer menor energia de ativação. Quando os parâmetros são aplicados na equação de Arrhenius ($\ln k = \ln A - \Delta H/RT$) e considerando a temperatura ambiente (298 K), as velocidades de degradação (k) seriam: $3,87 \times 10^{-6}$ e $7,32 \times 10^{-8} \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Como se pode ver, a primeira é uma degradação de maior velocidade e de maior ordem e, possivelmente de maior molecularidade, representando a participação de maior número de reagentes no processo de degradação.

5.4.7.4 Determinação da estabilidade da suspensão

A estabilidade da suspensão reconstituída, cuja formulação do pó foi selecionada, foi avaliada em termos físicos (pH e volume de sedimento) e químico, através do teor dos fármacos. O pH da suspensão se manteve praticamente inalterado durante o período de 71 horas, oscilando entre 7,84 a 7,87, como já foi anteriormente mencionado.

A estabilidade química da suspensão reconstituída, avaliada através do doseamento dos seus fármacos realizada por espectrofotometria demonstrou que a rifampicina é o fármaco mais afetado pelo tempo de armazenamento, aliado à já conhecida incompatibilidade que existe entre este e a isoniazida. A figura 52 mostra graficamente a evolução dos teores de pirazinamida e de rifampicina na suspensão logo após a reconstituição (tempo zero) e até 71 horas. A pirazinamida é mostrada como referência de maior estabilidade e a rifampicina como sendo o pior caso de estabilidade.

Figura 52 – Evolução dos teores de pirazinamida, rifampicina na suspensão formulada com 2,35% de aerosil.



As informações apresentadas acima na forma de gráfico, quando trabalhadas de forma a quantificar a velocidade de degradação e coeficiente de correlação resulta nos dados apresentados na tabela 36.

Tabela 36 - Velocidades de degradação para a rifampicina nas respectivas ordens de reação e prazo de validade da suspensão reconstituída.

	Ordem zero	Ordem um	Ordem dois
Velocidade de degradação	0,3422 %·h ⁻¹	0,00166 h ⁻¹	4,3·10 ⁻⁵ h·% ⁻¹
r ²	0,9429	0,9494	0,9541
Prazo de validade (horas)	29	28	26

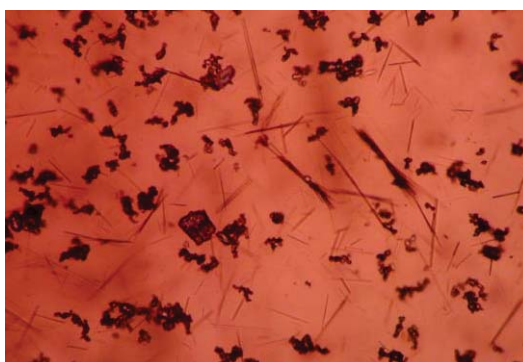
Analisando os dados de teor em relação ao tempo para cada um dos fármacos, visando encontrar um modelo cinético para melhor expressar a degradação do produto, foi verificado que o melhor ajuste ocorre quando os dados são tratados como uma cinética de ordem dois, ou seja, quando os dados de inverso da concentração são plotados em relação ao tempo. Dessa forma foi verificado que a rifampicina tem velocidade de degradação de $4,3 \cdot 10^{-5} \text{ h} \cdot \%^{-1}$ ($r^2=0,9541$) e, avaliadas como cinética de ordem dois, o que daria um prazo de validade de 26 horas ao se considerar tolerável uma degradação de até 10% do fármaco. Ou seja, a suspensão deve ser utilizada por no máximo um dia após a reconstituição, o que permite que a posologia pode ser feita com a previsão de fracionamento da dose a ser administrada ao longo do dia após a preparação.

A suspensão poderia ter seu prazo de validade aumentado após a reconstituição adotando algumas estratégias, tal como a elevação da viscosidade, o que reduz o fator de frequência (A) da equação de Arrhenius, reduzindo assim a velocidade de degradação (CARSTENSEN, RHODES, 2000). Porém, aumentar a viscosidade representa diretamente

uma redução na biodisponibilidade e aumento do tempo de ação, pois vai aumentar o tempo de residência no estômago (SHARGEL, WU-PONG, YU, 2005). Com isso estaria sendo aumentada a possibilidade de maior interação entre a rifampicina e a isoniazida, formando o derivado insolúvel e inativo.

Além disso, não haveria necessidade de elevar o prazo de validade, considerando que a suspensão preparada deverá ser totalmente utilizada em dose única diária. Outra estratégia possível seria a conservação da suspensão sob refrigeração. O que foi constatado é que a pirazinamida, que se encontra em elevada concentração, passa a ter facilidade em cristalizar quando a preparação é deixada sob armazenamento em temperatura próxima de 5°C. Esse crescimento cristalino, além de representar uma instabilidade física que leva ao aumento de material insolúvel para sedimentar, representa um outro fator que poderá comprometer o aspecto biofarmacêutico da suspensão (AÏACHE, DEVISSAGUET, GUIOT-HERMANN, 1983). A figura 53 mostra os cristais de pirazinamida que foram formados durante o período de 24 horas de armazenamento da suspensão sob refrigeração. A identificação de que os cristais eram de pirazinamida se deu por comparação com preparações líquidas obtidas com o mesmo veículo em que cada ativo foi veiculado separadamente. Assim sendo, foi preferível deixar a suspensão como uma formulação extemporânea destinada a dose única diária, fácil de ser preparada e administrada.

Figura 53 - Microfotografia da suspensão reconstituída demonstrando as formações cristalinas de pirazinamida formadas sob refrigeração.



SAMAD e colaboradores (2008) prepararam um pó para suspensão contendo isoniazida e rifampicina processadas como micropartículas, sendo o primeiro fármaco com alginato de sódio e quitosana, e o segundo fármaco com gelatina. Com isso, buscaram modificar o local de liberação dos fármacos, evitando a interação que existe entre os dois quando liberados e dissolvidos no suco gástrico, ao mesmo tempo que reduz a interação entre os fármacos na

formulação. No entanto, apesar das vantagens apresentadas, os processos de microencapsulação empregados não possuem aplicação prática para uma produção industrial do medicamento.

A preparação de um pó para reconstituição em que o único processamento de maior criticidade é a trituração dos insumos ativos, e o restante do processo constitui-se apenas nos procedimentos de pesagem e mistura, seguido da dosagem para a embalagem, torna a preparação bastante viável, técnica e economicamente, de ser efetivamente produzida e disponibilizada para a população que dela necessite.

5.4.8 Comprimido dispersível

Na tabela 37 estão os resultados em termos de peso médio, desvio padrão, desvio padrão relativo, peso mínimo e máximo, bem como os limites de peso inferior e superior estabelecidos com base no valor do peso médio, admitindo tolerância de $\pm 7,5\%$. Não foi constatada diferença significativa dos pesos quando comparadas as 4 formulações empregando análise de variância ($p=0,6324$), mas foi verificado que o menor desvio padrão relativo foi observado com a formulação contendo a menor quantidade de aerosil 200. Este fato pode ser explicado pela melhora da fluidez conferida aos pós pela presença do aerosil, cujo efeito se torna menos intenso em concentrações superiores a 1%, mas, se a mistura sólida contiver umidade pode ser necessário empregar até 5% deste excipiente (ROWE, 2009; EVONIK TI 1351). Na mesma tabela 37 estão os dados relativos à medida da dureza e de friabilidade obtidos com as mesmas 4 formulações.

Considerando que o objetivo é o desenvolvimento de comprimido dispersível, a friabilidade não constitui um ponto crítico a ser considerado no critério de escolha da formulação, a dureza realmente precisa ser pequena apenas para manter a forma do comprimido, e o que mais importa é a homogeneidade do peso entre os comprimidos. Diante disso e considerando ainda o que foi encontrado para o pó destinado à reconstituição no que diz respeito ao volume de sedimento menos frouxo observado para as preparações com celulose, foi escolhida a preparação 1A (com 1,19% de aerosil) para dar prosseguimento aos ensaios.

Tabela 37 – Resultados de peso médio e seus limites, dureza, e friabilidade para os comprimidos contendo aerosil ou celulose microcristalina.

Parâmetro	Aerosil		Celulose	
	1,19%	2,35%	1,19%	2,35%
Peso médio (g)	0,2337	0,2367	0,2365	0,2326
DP (g)	0,0107	0,0127	0,0152	0,0154
DPR (%)	4,60	5,36	6,45	6,61
Peso mínimo (g)	0,2181	0,2112	0,2080	0,2086
Limite inferior (g)	0,2162	0,2189	0,2188	0,2152
Peso máximo (g)	0,2534	0,2559	0,2541	0,2526
Limite superior (g)	0,2512	0,2544	0,2543	0,2501
Dureza (N)	72,0	73,7	85,9	74,1
DP (N)	13,5	20,6	14,9	14,1
DPR (%)	18,7	27,9	17,4	19,0
Friabilidade (%)	1,23	1,12	1,07	1,09

5.4.8.1 Escolha da quantidade do desagregante

Escolhendo a preparação 1A, foram acrescentadas diferentes concentrações de crospovidona (10, 15 e 20%) à mistura seca e, em seguida, misturou-se o talco e o estearato de magnésio em busca de estabelecer qual a concentração a ser utilizada do desagregante. Os comprimidos obtidos foram avaliados quanto a peso, dureza e friabilidade, cujos resultados são demonstrados na tabela 38.

À medida que se aumenta a concentração de crospovidona, mantendo as condições empregadas na compressão, obtém-se comprimidos com peso médio proporcionalmente menor, demonstrando que a participação da crospovidona na composição dos comprimidos reduz a densidade do pó que preenche a matriz, resultando em comprimidos com menor peso. O modelo de regressão que melhor se ajustou à essa relação foi o logarítmico, com $r^2=0,9993$, em que o peso médio (PM) expresso como função da concentração de crospovidona (CC), ficou:

$$PM = -0,00598 \cdot \ln(CC) + 0,2451 \quad (\text{Equação 8})$$

Comparando os valores de dureza e de friabilidade dos comprimidos sem crospovidona (tabela 37) e com crospovidona (tabela 38), percebemos que esses últimos apresentam-se mais frágeis que os primeiros. Comprimidos convencionais, tanto os destinados a liberação imediata quanto os de liberação modificada, não revestidos, devem exibir no máximo 1,5% de friabilidade (BRASIL, 2010). No entanto, trata-se aqui de comprimidos destinados a uma rápida desintegração, e o agente responsável por essa performance na composição dos comprimidos é a crospovidona, os resultados encontrados de menor dureza e maior friabilidade podem ser

explicados quanto ao efeito do excipiente em reduzir a deformação plástica causada pela compressão e por manter o ar nos espaços interparticulares após a compressão (MOHAMED et al, 2012).

Tabela 38 – Medidas de peso, dureza e friabilidade dos comprimidos 3 em 1 contendo 10, 15 e 20% de crospovidona.

Parâmetro	Crospovidona		
	10%	15%	20%
Peso médio (g)	0,2314	0,2367	0,2365
DP (g)	0,0069	0,0083	0,0064
DPR (%)	3,00	3,63	2,83
Peso mínimo (g)	0,2140	0,2189	0,2188
Limite inferior (g)	0,2123	0,2149	0,2142
Peso máximo (g)	0,2488	0,2544	0,2542
Limite superior (g)	0,2452	0,2493	0,2386
Dureza (N)	20,6	11,9	12,5
DP (N)	4,8	2,4	2,5
DPR (%)	23,3	19,8	20,0
Friabilidade (%)	3,08	2,51	10,30

5.4.8.2 Adição de deslizante e lubrificante

À mistura de pós empregada na composição da suspensão, foram acrescentados desagregante, deslizante e lubrificante, para que fossem obtidos comprimidos diretamente compressíveis e com característica de desintegração em pequeno volume de água, resultando numa suspensão fluida. Como o deslizante visa à redução do atrito entre as partículas sólidas para o aumento da fluidez do pó e assim resultar em comprimido com menor desvio padrão em torno do peso médio, foram realizados ensaios para a medida do ângulo de repouso e densidade aparente com diferentes quantidades de talco escolhido como deslizante. O talco foi escolhido por apresentar maior densidade do que o dióxido de silício coloidal e formato de partículas (laminares) mais adequado à melhora do deslizamento sobre partículas de pequeno tamanho, como as que estão sendo utilizadas no preparo das composições de suspensão e de comprimido.

5.4.8.3 Mistura e compressão

O procedimento empregado na mistura dos componentes foi o mesmo já descrito para a preparação do pó para reconstituição, apenas ao final foram acrescentados os agentes desagregante (crospovidona), deslizante (talco) e lubrificante (estearato de magnésio). Com a adição destes componentes, a mistura foi realizada durante apenas 5 minutos e o pó obtido foi

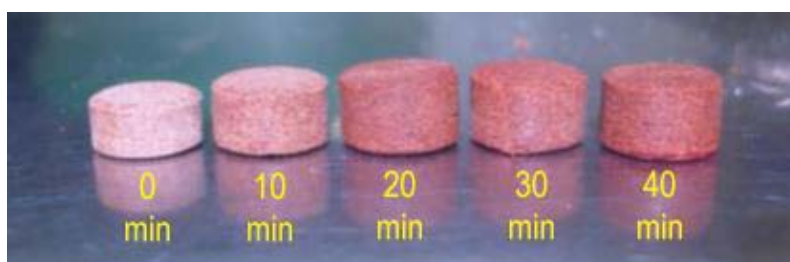
submetido a compressão em máquina rotativa LEMAQ, operando em baixa velocidade, tendo sido ajustada a amplitude de movimento do punção inferior para regular o peso e a dureza dos comprimidos. Desta forma foram obtidos os comprimidos, cujo aspecto corresponde ao comprimido referente ao tempo zero na Figura 54 (primeiro à esquerda na figura).

A composição dos comprimidos dispersíveis 3 em 1 contendo dose fixa combinada de isoniazida, rifampicina e pirazinamida é a seguinte:

	Cada 4 comprimidos contêm	Cada comprimido contém
Pirazinamida	400,00 mg	100,00 mg
Rifampicina	150,00 mg	37,50 mg
Isoniazida	75,00 mg	18,75 mg
Aerosil 200	20,00 mg	5,00 mg
Sucralose	10,00 mg	2,50 mg
Crospovidona	150,00 mg	37,50 mg
Fosfato de potássio dibásico anidro	170,00 mg	42,50 mg
Talco	70,00 mg	17,50 mg
Estearato de magnésio	7,00 mg	1,75 mg
PESO TOTAL	1.052,0 mg	263,00 mg

Os comprimidos dispersíveis são muito sensíveis à umidade e foi possível verificar esse fato ao expor os comprimidos às gotículas de água provenientes de um vaporizador ultrassônico quando foi observado o aumento de volume, a mudança de cor e a formação de fissuras nos comprimidos, como são mostrados na figura 54. A umidade relativa condensável chegou a 87% em temperatura de 22 °C. Isso exige maior cuidado na escolha das condições de embalagem e armazenamento dos comprimidos, além da necessidade de proteção à luz já requerido pela rifampicina.

Figura 54 – Aspecto do comprimido dispersível 3 em 1 com crospovidona expostos à umidade em função do tempo.



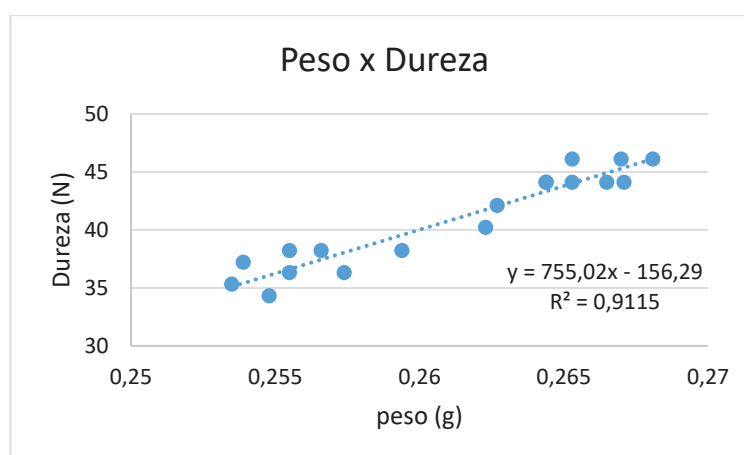
Avaliando os comprimidos, estes apresentaram os parâmetros físicos de qualidade em termos de dimensão, peso e dureza elencados na tabela 39.

Tabela 39 - Parâmetros físicos da qualidade dos comprimidos dispersíveis contendo dose fixa combinada de isoniazida, pirazinamida e rifampicina.

	Altura (mm)	Diâmetro (mm)	Peso (g)	Dureza (N)
Média	4,04	8,11	0,2580	40,84
Desvio padrão	0,07	0,02	0,0058	4,11
Desvio padrão relativo	1,84	0,21	2,2392	10,06
Menor valor	3,92	8,08	0,2465	34,3
Maior valor	4,14	8,14	0,2666	46,1

Durante a realização do ensaio de dureza, foi medido o peso de cada comprimido submetido ao ensaio, e assim foi possível estabelecer uma correlação entre os dois parâmetros. Porém, como a dispersão entre as medidas de dureza é maior que a dispersão entre as medidas de peso, mesmo havendo correlação entre as duas medidas o coeficiente de correlação de Pearson encontrado foi de apenas 0,9115. A figura 55 demonstra como ficou a relação entre essas variáveis para o comprimido dispersível.

Figura 55 – Relação entre peso e dureza para os comprimidos dispersíveis 3 em 1.



O valor médio da dureza ficou em 40,84 N, com desvio padrão relativo de 10,06%, sendo que os comprimidos empregados neste mesmo ensaio apresentaram peso médio de 0,2611 g, com desvio padrão relativo de 1,99%, diferente da amostragem empregada para a determinação do peso médio dos comprimidos. O ensaio de friabilidade foi realizado em triplicata, e em cada ensaio foram utilizados 10 comprimidos. A tabela 40 apresenta os

resultados de peso inicial, final e a friabilidade expressa de forma percentual. Percebe-se que à medida que o peso dos comprimidos é maior, a friabilidade é reduzida, assim como a dureza é aumentada, como é de se esperar. À medida que se tem mais massa dentro da matriz e essa massa é submetida à mesma condição de compressão (mesma distância entre os punções), vai ser realizada maior pressão sobre a massa maior, gerando um comprimido com maior dureza e menor friabilidade.

Tabela 40 – Resultado da friabilidade dos comprimidos 3 em 1, dispersíveis, contendo 15% de crospovidona

	1	2	3
Início	2,5584	2,5999	2,6218
Final	2,4270	2,5038	2,5839
Diferença	0,1314	0,0961	0,0379
Friabilidade (%)	5,1360	3,6963	1,4456

Os comprimidos dispersíveis foram submetidos ao ensaio de desintegração em água a 37°C, e, como é de se esperar, depois de 2 minutos não havia mais nenhuma porção perceptível de comprimido no equipamento. Quando o ensaio foi realizado com água em temperatura de 25°C, o tempo necessário para a completa desintegração foi de 4 minutos. O ensaio farmacopeico preconiza a realização do ensaio durante 30 minutos para comprimidos não revestidos e ao final deste tempo todos os comprimidos devem ter desintegrado. Para comprimidos dispersíveis e comprimidos solúveis, a temperatura a ser utilizada é entre 15 e 25°C e o tempo limite do ensaio é de 3 minutos (BRASIL, 2010).

5.4.8.4 Determinação do teor dos ativos

Os comprimidos dispersíveis 3 em 1 em dose fixa combinada para uso em pediatria possuem maior quantidade de excipientes do que o pó para reconstituição, especificamente crospovidona, talco e estearato de magnésio, o que confere maior turbidez à amostra obtida através da dispersão dos comprimidos em meio para a realização da análise. Isso impõe a necessidade de realizar a filtração para a remoção de material particulado, tendo o risco de haver ativos adsorvidos pelo material da membrana filtrante, e a limpidez da solução é condição imprescindível para a avaliação espectrofotométrica. Em CLAE, com o uso de uma coluna de guarda, é possível injetar amostras contendo partículas suspensas, apesar de não ser recomendado que isso seja feito. Em virtude dessa imposição, a determinação do teor dos ativos

contidos nos comprimidos, bem como o estudo de estabilidade do líquido reconstituído a partir da sua dispersão, foi realizada por CLAE.

Verificou-se que o tamanho da coluna, a composição da fase móvel e a condição do gradiente são ligeiramente diferentes do que consta na USP 38. Com a redução do comprimento da coluna utilizada (250 → 150 mm), houve a necessidade de modificar o fluxo da fase móvel, que passou de 1,5 para 1 mL/min. Mesmo com a redução do fluxo, quando foi utilizada a fase A com 4 partes de acetonitrila, os picos da isoniazida e pirazinamida ficaram parcialmente sobrepostos, denotando a falta de resolução adequada entre os dois fármacos. Com a redução da quantidade de acetonitrila, houve completa separação entre os picos de isoniazida e de pirazinamida. Outra mudança importante foi no intervalo para o gradiente linear. A USP 38 estabelece que a transição ocorra no intervalo de 1 minuto. Ao se realizar esse processo, o pico correspondente à rifampicina apresentou maior largura do que aquele que foi obtido após a modificação do tempo para ocorrência da transição da fase móvel.

Os teores de ativos encontrados durante o doseamento estão em plena concordância com os valores esperados para uma formulação recém obtida, sendo $98,5\% \pm 1,5\%$ do teor esperado para pirazinamida, $95,7\% \pm 0,8\%$ do teor esperado para rifampicina e $102,3\% \pm 2,0\%$ do teor esperado de isoniazida.

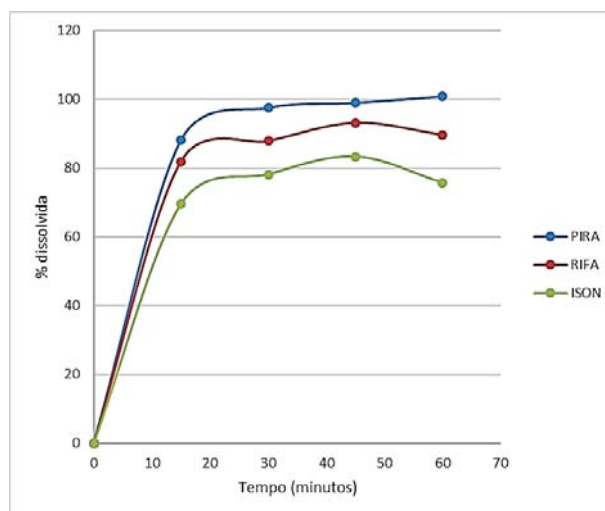
5.4.8.5 Perfil de dissolução

O resultado do ensaio de perfil de dissolução, realizado com a metodologia analítica espectrofotométrica desenvolvida e validada nesta tese, apresentado na figura 56 demonstra a elevada solubilidade da pirazinamida, que, mesmo em grande quantidade na formulação, teve sua dissolução praticamente completa nos primeiros 30 minutos de ensaio. A isoniazida e, mais intensamente, a rifampicina, tiveram suas concentrações em contínuo aumento até o tempo de 45 minutos, quando se atingiu a máxima concentração dissolvida para os dois fármacos.

Considerando os dados de literatura (JINDAL, 1994; SHISOO, 1999), desde os primeiros minutos de contato entre os dois fármacos em meio ácido já ocorre a interação com formação do derivado insolúvel 3-formil-rifampicina. Isso explica que nenhum desses fármacos atinge a concentração máxima esperada durante o ensaio de dissolução, e que após os 45 minutos percebe-se a redução na concentração destes. Até os primeiros 45 minutos ocorre a rápida dissolução junto com a interação, e quando não se tem mais fármaco a ser dissolvido, passa a predominar o efeito da interação entre os mesmos. Percebe-se, contudo, que a dissolução ocorre rapidamente e não é fator impeditivo para a absorção dos insumos,

permanecendo a rifampicina e a pirazinamida com mais de 85% dissolvidos desde os primeiros 15 minutos de ensaio. A redução do tamanho das partículas realizada com o uso de moinho de bolas, bem como a elevada concentração de crospovidona, são importantes fatores que contribuem para esse resultado.

Figura 56 – Perfil de dissolução dos comprimidos dispersíveis 3 em 1 contendo 15% de crospovidona.



5.4.8.6 Determinação da estabilidade da dispersão obtida com os comprimidos

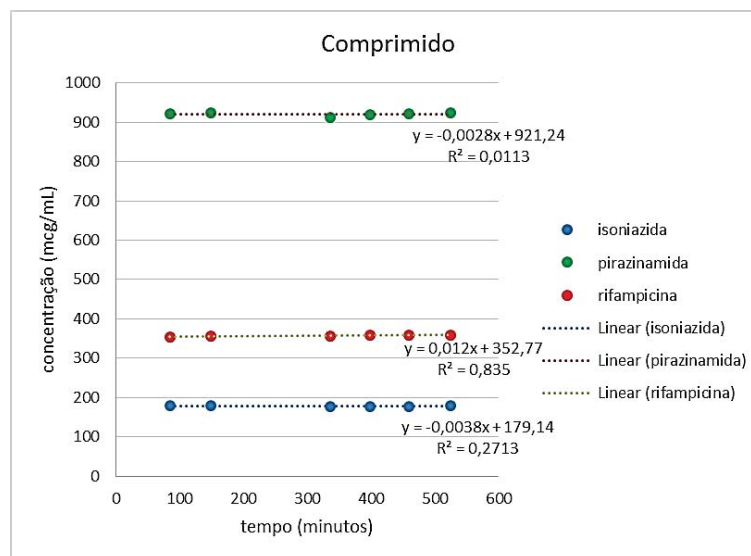
Os comprimidos deveriam ser dispersos em água para serem rapidamente administrados como forma líquida para as crianças. Porém, se essa mesma forma de dispersar for utilizada para fins analíticos, não seria obtida a totalidade dos fármacos dissolvidos devido ao pequeno volume e tipo de solvente empregado na dispersão. Então foi empregado um meio que associou a água usada para dispersão, com o metanol que promove a mais rápida dissolução dos fármacos, notadamente da rifampicina.

As dispersões obtidas, mantidas em balões volumétricos, foram regularmente amostradas e o líquido injetado em CLAE operando em sistema gradiente como anteriormente descrito e utilizado, e com os dados coletados foram obtidos os resultados na figura 57.

Os fármacos que apresentam uma discreta redução no seu teor ao longo do tempo são pirazinamida e isoniazida, porém com velocidades extremamente baixas e com nenhum significado estatístico de correlação entre concentração e tempo, pois os respectivos coeficientes de correlação são 0,0113 e 0,2713. Portanto, não há que considerar que esteja havendo alguma decomposição dentro das condições em que foi realizado esse ensaio, durante 8 horas, à temperatura ambiente e com as amostras protegidas da ação da luz.

A preparação líquida aquosa obtida com a dispersão dos comprimidos em dose fixa combinada permaneceu estável mesmo após 8 horas, o que está muito além do que é absolutamente necessário para este tipo de apresentação, pois logo após ser concluída a dispersão, a dose deve ser administrada ao paciente.

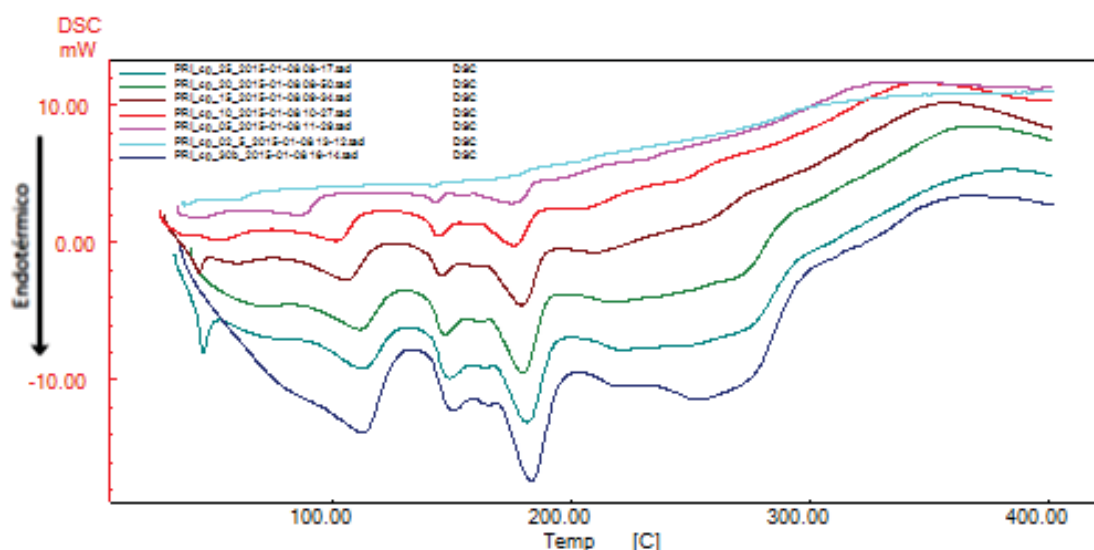
Figura 57 – Teores de fármacos após dispersão aquosa dos comprimidos em função do tempo



5.4.8.7 Avaliação da estabilidade dos comprimidos

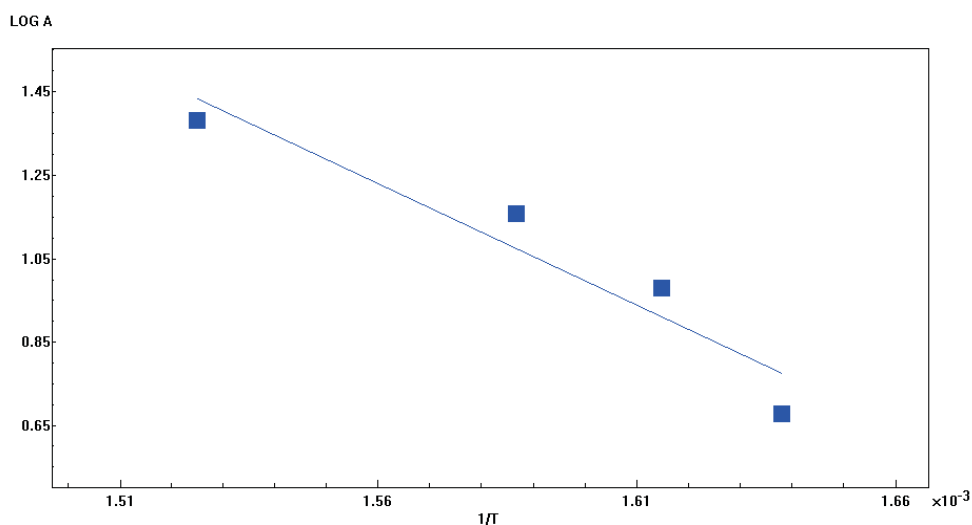
Amostras da mistura de pó empregada na preparação dos comprimidos foram avaliadas por DSC cinético e tratando os dados segundo o método de Ozawa, em busca de encontrar a energia de ativação, o fator de frequência e a ordem de reação, considerando o intervalo de temperatura entre ambiente e 400 °C, com rampas de aquecimento variando desde 2 °C/min até 30 °C/min, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30 mL/min, resultou nas curvas apresentadas na figura 58. Percebe-se nitidamente as diferenças entre os resultados da figura 58 com os da figura 48 (pg. 128), provavelmente pela presença de mais excipientes como o talco e a croscarmelose, notadamente na porção final (a partir dos 300 °C) da análise em que a decomposição ocorre como um só e longo evento, quando antes ocorria em dois distintos eventos. A diferença ficará melhor evidenciada a seguir ao empregar o método de Ozawa na avaliação dos eventos térmicos.

Figura 58- Curvas de DSC não isotérmicas da mistura empregada na preparação dos comprimidos obtidas sob diferentes rampas de aquecimento (ϕ).



Considerando as curvas obtidas com as diferentes rampas e no intervalo de temperatura de 300 a 400°C, foram obtidos os dados apresentados na figura 59, cujos resultados de regressão pelo método de Ozawa estão resumidos na tabela 41. Para a construção da relação de Ozawa foram empregados os dados de apenas 4 das corridas térmicas, pois as duas primeiras (2 e 5 °C/min) e a última (40 °C/min) apresentaram perfil térmico ligeiramente diferente das demais na região de temperatura avaliada, como se pode observar na figura 59.

Figura 59 - Dados de DSC apresentando as regiões de análise pelo método de Ozawa e respectivo gráfico da relação de Ozawa.



O resumo dos dados de análise cinética de DSC aplicada ao pó contendo a composição empregada na preparação dos comprimidos está apresentado na tabela 41.

Tabela 41 – Resultados da análise cinética de DSC da decomposição dos comprimidos.

Parâmetros	RESULTADOS
Faixa de temperatura (°C)	300-400
Energia de ativação (kJ/mol)	105,92
Energia de ativação (kcal/mol)	25,30
Ordem da reação	1,4
Fator de frequência	$2,25 \times 10^8$
r^2	0,9715

Analisando os resultados apresentados na tabela 41, constata-se que a degradação ocorre com menor velocidade do que a encontrada para o pó para suspensão. Quando os parâmetros são aplicados na equação de Arrhenius ($\ln k = \ln A - \Delta H/RT$) e considerando a temperatura ambiente (298 K), a velocidade de degradação (k) seria $6,67 \times 10^{-11} \text{ min}^{-1}$. Essa redução na velocidade de degradação, mantendo a mesma ordem de reação, pode estar relacionada à adição dos três excipientes à formulação (crospovidona, talco e estearato de magnésio). O simples efeito de diluição causado pelo aumento da quantidade de componentes na formulação, já pode favorecer o aumento da estabilidade do produto.

O pó para ser reconstituído como suspensão e o comprimido dispersível foram efetivamente desenvolvidos com qualidade adequada para o uso, permitindo que crianças das mais diferentes faixas etárias possam se beneficiar com o uso de uma medicação adequada às suas realidades e necessidades. Como ocorre em qualquer outra área tecnológica, o progresso deve continuar e diversos aspectos podem e merecem ser melhorados nas formulações aqui apresentadas, alguns itens que merecem especial atenção sendo enumerados a seguir:

- Do ponto de vista do uso em pediatria:

Não foi verificada a palatabilidade dos produtos desenvolvidos, mesmo tendo sido degustado por adulto e a percepção sensorial foi apenas aceitável, não chegando a ser algo tido como de sabor atraente, mas no final da degustação fica o sensorial amargo devido à isoniazida e pirazinamida.

Não foi avaliado como o cuidador ou o próprio paciente poderia usar as formas desenvolvidas nem a preferência por alguma delas, pois é um fator essencial para o sucesso de um tratamento. Depende inteiramente da forma correta de preparação e utilização de uma forma

farmacêutica, especialmente quando contém antimicrobiano, a resolução do respectivo problema para o qual o medicamento foi indicado.

- Do ponto de vista tecnológico:

Permanece o problema da incompatibilidade que se tem documentado entre a rifampicina e a isoniazida, e no presente caso, existe a possibilidade de ser maior pois foi necessário triturar os insumos ativos para que os produtos desenvolvidos apresentassem ótima homogeneidade na mistura, bem como existe a possibilidade de ser menor pois o processo de mistura foi realizado com o envolvimento das partículas de rifampicina com o aerosil. CARSTENSEN e RHODES descrevem maneiras de reduzir a interação entre os sólidos, e envolve, dentre outras soluções tecnológicas a preparação de grânulos, o que pode ser conseguido pela via seca, vindo a facilitar até a capacidade de deslizamento e de compressibilidade da mistura, além de melhorar a estabilidade química das preparações.

Permanece também o problema da biodisponibilidade que em parte é solucionada pela redução no tamanho das partículas, incluindo as da rifampicina, mas pelo fato dos dois ativos incompatíveis se encontrarem disponíveis e dissolvidos ao mesmo tempo no estômago vai permitir que ocorra a formação do derivado insolúvel, o que reduz a intensidade do efeito devido à rifampicina e isoniazida. A busca por uma solução através do revestimento com quitosana não foi alcançada pois não se conseguiu o efetivo recobrimento da rifampicina através das técnicas utilizadas e a preparação de micropartículas por nebulização levou à amorfização do ativo, o que o deixou com maior velocidade de dissolução.

Neste trabalho, a técnica de cinética de DSC foi utilizada para fazer uma avaliação da estabilidade térmica por meio não isotérmico, empregando o método de Ozawa para estimar os parâmetros de fator de frequência, energia de ativação e ordem de reação. Formalmente a ANVISA, através da RE nº 1 de 2005, exige que sejam realizados os estudos de estabilidade acelerado e de longa duração para a efetiva determinação do prazo de validade das formulações. Não foi possível realizar esses ensaios, afinal, seria necessário ter definido também as embalagens primárias a serem utilizadas com os dois produtos.

Enfim, foram obtidas as duas formas farmacêuticas sólidas para uso em pediatria no tratamento de tuberculose, mas o trabalho deve ter prosseguimento visando a melhoria do processo e da qualidade, visando ainda aspectos econômicos, tornando-a capaz de ser acolhida pela indústria farmacêutica e utilizada pelos pacientes.

6. CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho conseguimos desenvolver duas formulações sólidas orais destinadas ao uso em pediatria, contendo rifampicina, isoniazida e pirazinamida, sendo uma na forma de pó para ser reconstituído com água para a forma de suspensão e a outra, comprimido dispersível. Ambas, quando dispersas em água, resultam em suspensões de cor vermelha intensa, comportamento reológico pseudo-plástico, fácil de ser medida e administrada, e com estabilidade de até 12 horas.

Foram realizados estudos de caracterização físico-química de cada um dos fármacos, tais como a determinação do ângulo de repouso e da densidade aparente, distribuição granulométrica, determinação do teor, observação microscópica, identificação por infravermelho. Ficou constatado o aspecto cristalino de cada um dos fármacos, porém com grandes diferenças de tamanho e formato dos cristais, evidenciando assim a necessidade de se proceder a uma redução visando à uniformização do tamanho das partículas, o que foi realizado através da trituração de cada um deles, separadamente, em moinho de bolas. Dessa forma, as misturas avaliadas por DSC apresentaram respostas muito mais repetíveis do que aquelas obtidas com as misturas realizadas com os sólidos antes da trituração, além de se apresentarem visualmente mais homogêneas do que as anteriores ao processo de trituração.

Foi desenvolvida a composição de um veículo para o transporte de fármacos destinados a administração por via oral, em forma farmacêutica líquida, para atender à necessidade de pacientes pediátricos ou outros que não tenham condições de deglutir comprimidos. O veículo líquido depois foi trabalhado para se apresentar como forma sólida para reconstituição apenas pela adição de água, facilitando ainda mais a realização do processo de transformação de formas sólidas em formas líquidas para uso em pediatria. Caracterizado por um comportamento reológico pseudo-plástico, baixa viscosidade, elevada compatibilidade, sabor doce e baixo custo, o veículo denominado de Gute foi submetido a processo de patenteamento no Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Parte da composição do veículo sólido foi empregado na composição das formas sólidas contendo a associação dos fármacos rifampicina, isoniazida e pirazinamida.

A avaliação da qualidade em termos de teor e perfil de dissolução das composições que foram desenvolvidas, segundo o que consta nas farmacopeias consultadas, deveria ser realizada através de CLAE em que a eluição é por gradiente, com tempo de corrida em torno de 15 minutos para cada amostra. Considerando o grande número de análises realizadas nos estudos de dissolução, consumindo um tempo excessivamente longo e que a rifampicina é um fármaco

sensível ao pH, à luz e ao oxigênio, além de interagir com a isoniazida presente na formulação em meio ácido, foi necessário desenvolver um método analítico cujo processamento da amostra e tempo de resposta fossem mais rápidos do que por CLAE. Assim, foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica espectrofotométrica na região do UV para doseamento concomitante de rifampicina, isoniazida e pirazinamida, que emprega uma abordagem em que se associa conceitos da espectrofotometria derivada com regressão multivariada, passando pela seleção da faixa de comprimentos de onda a ser empregada no doseamento. A metodologia mostrou-se útil para a dosagem dos fármacos nas diferentes formas farmacêuticas e no estudo de dissolução das formas farmacêuticas sólidas orais.

7. REFERÊNCIAS

AGHERGHINEI, I. Thermogravimetry. Fast methods for evaluation of kinetic parameters. *Journal of Thermal Analysis*. 1998. 34:909-916.

AGRAWAL, S; KAUR, K J; SINGH, I; BHADE, S R; KAUL, C L; PANCHANGULA, R. Assessment of bioequivalence of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels. *International Journal of Pharmaceutics*, 233: 169-177, 2002.

AGRAWAL, S.; ASHOKRAJ, Y.; BHARATAMB, P.V.; PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 22, p. 127-144, 2004a.

AGRAWAL, S.; PANCHAGNULA, R. Dissolution test as a surrogate for quality evaluation of rifampicin containing fixed dose combination formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004b, 587:97-112.

AGRAWAL, S.; SINGH, I.; KAUR, K.J.; BHADE, S.R.; KAUL, C.L.; PANCHAGNULA, R. Comparative bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide from a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 276, p. 41-49, 2004c.

AÏACHE, J. M., DEVISSAGUET J. Ph., GUYOT-HERMANN, A. M. Biofarmacia, 2ª Edição, Editorial El Manual Moderno, 1983.

ALI, J., ALI, N., SULTANA, Y., BABOOTA, S., FAIYAZ, S. Development and validation of a stability-indicating HPTLC method for analysis of antitubercular drugs. *Acta Chromatographica*, 18, 168-179, 2007.

ALVES, R. Estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco-excipientes de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Matos, Jivaldo do Rosário. São Paulo, 2007. 90p.

ALVES, R.; SANT'ANNA, C. C. & LA CUNHA, A. J., Epidemiologia da tuberculose infantil na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Revista de Saúde Pública*, 34:409-410, 2000.

AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas, 2ª Ed., tradução George G. Ortega, Ed. Artmed, Porto Alegre, 2005.

BALA, S., KHANNA, R., DADHWAL, M., PRABAGARAN, S.R., SHIVAJI, S., CULLUM, J., LAL, R. Reclassification of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 46095 as *Amycolatopsis rifamycinica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1145-1149, 2004.

BAOXIN LI, YUEZHEN HE, JIAGEN LV, ZHUJUN ZHANG. Simultaneous determination of rifampicin and isoniazid by continuous-flow chemiluminescence with artificial neural network calibration. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 383, p. 817-824, 2005.

BARROSO, E.C., PINHEIRO, V.G.F., FAÇANHA, N.C., CARVALHO, M.R.D., MOURA, M.E., CAMPELO, C.L., PELOQUIN, C.A., GUERRANT, R.L., LIMA, A.A.M. Serum Concentrations of Rifampicin, Isoniazid, and Intestinal Absorption, Permeability in Patients with Multidrug Resistant Tuberculosis. *Am. J. Trop. Hyg.*, 81(2): p. 322-329, 2009.

BCS DATABASE. Drug Delivery Foundation. www.ddfint.org/bcs-database. Acesso em 20/06/2013.

BECKER, C., DRESSMAN, J.B., AMIDON, G.L., JUNGINGER, H.E., KOPP, S., MIDHA, K.K., SHAH, V.P., STAVCHANSKY, S., BARENDTS, D.M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Isoniazid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 96(3):522-531.

BECKER, C., DRESSMAN, J.B., AMIDON, G.L., JUNGINGER, H.E., KOPP, S., MIDHA, K.K., SHAH, V.P., STAVCHANSKY, S., BARENDTS, D.M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Pyrazinamide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 98(7):2252-2267.

BECKER, C., DRESSMAN, J.B., AMIDON, G.L., JUNGINGER, H.E., KOPP, S., MIDHA, K.K., SHAH, V.P., STAVCHANSKY, S., BARENDTS, D.M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Rifampicin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 97(9):3709-3720.

BENETTON, S.A., KEDOR-HACKMANN, E.R.M., SANTORO, M.I.R.M., BORGES, V.M. Visible spectrophotometric and first-derivative UV spectrophotometric determination of rifampicin and isoniazid in pharmaceutical preparations. *Talanta*, 47, p. 639-643, 1998.

BIERRENBACH, A. L. et al. Incidência da tuberculose e taxa de cura, Brasil, 2000 a 2004. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 24-33, 2007.

BRASIL, Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 548p.

BRASIL, Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 904p.

BRASIL, Ministério da Saúde. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/noticias-vigilancia/172-noticias-antiores-vigilancia/8210-tuberculose-brasil-reduz-casos-em-3-54-no-ultimo-ano> (Acesso em julho de 2014).

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico V. 46, nº 9: Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose. 19 p. disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/27/2015-007---BE-Tuberculose---para-substitui----o-no-site.pdf>. (Acesso em julho de 2015).

BRASIL, Resolução RE no 01, de 25 de janeiro de 2002. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária limita a presença de álcool em polivitamínicos de uso pediátrico. *Diário Oficial da União*, Brasília, 28 de janeiro de 2002.

BRASIL, Resolução RE nº 01, de 29 de Julho de 2005. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, 01 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Tuberculose: a situação da doença no Brasil. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31115>

Acesso em Julho 2010.

BREWER Jr., G.A. Isoniazid. *In* FLOREY, K. Ed., Analytical profiles of drug substances, v. 6, p. 183-258, Academic Press, 1977.

BROWN, M.E. Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry, vol 1: principles and practice. Elsevier Science, 1998.

CARSTENSEN, J. T., RHODES, C. T. Drug Stability: principles and practices, 3rd Ed., Marcel Dekker, 2000.

CASTRO, R.A.E., MARIA, T.M.R., ÉVORA, A.O.L., FEITEIRA, J.C., SILVA, M.R., BEJA, A.M., CANOTILHO, J., EUSÉBIO, M.E.S. A new insight into pyrazinamide polymorphic forms and their thermodynamic relationships. *Crystal Growth & Design*, 10, 274-282, 2010.

CLEARY, P.W., The effect of particle shape on simple shear flows. *Powder Technology*. 2008, 179: 144-163.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001, 13:123-133.

COSTA, P. Q.; COELHO, H.L.L.; REY, L. C. Lack of drug preparations for use in children in Brazil. *Jornal de Pediatria* - Vol. 85, Nº 3, 2009.

CRAIG, S.R., ADAMS, L.V., SIPELBERG, S.P., CAMPBELL, B. Pediatric therapeutics and medicine administration in resource-poor settings: a review of barriers and an agenda for interdisciplinary approaches to improving outcomes. *Social Science & Medicine*, 2009, 69:1681-1690.

DALCOLMO, M.P., ANDRADE, M.K., PICON, P.D. Tuberculose Multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. *Revista de Saúde Pública* 2007; 41 (supl 1): 34-42.

DAVIDOVICH, E., AFRAMIAN, D.J., SHAPIRA, J., PERETZ, B. A comparison of sialochemistry, oral pH, and oral health status of down syndrome children to healthy children. *International journal of paediatric dentistry*, 2010, 20:235-241.

DOKOUMETZIDIS, A., MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 321:1-11.

DUTCOSKY, S.D. Análise sensorial de alimentos. 4 ed. Curitiba: Pucpress, 2013.

EDES, T. E., WALK, B. E., AUSTIN, J. L. Diarrhea in tube-feed patients: feeding formula not necessarily the cause. *The American journal of medicine*, 1990, 88:91-93.

EVONIK INDUSTRIES. Technical Information TI 1351 – SIPERNAT® speciality silica and AEROSIL® fumed silica as flow aid and anticaking agent.

FARJAS, J., BUTCHOSA, N., ROURA, P. A simple kinetic method for determination of the reaction model from non-isothermal experiments. *J. Therm. Anal. Calorim.* 102:615-625, 2010.

FELDER, E.; PITRE, D. Pyrazinamide. In FLOREY, K. Ed., Analytical profiles of drug substances, V. 12, p 433-462, Academic Press, 1983.

FERREIRA, F.F., IBIAPINO, A.L., SEICEIRA, R.C., PITALUGA Jr., A.P. Structural characterization of form I of anhydrous rifampicin. *Cryst Eng Comm.* 2014, 16, 8555-8562.

FREIRE, F.D., ARAGÃO, C.F.S., MOURA, T.F.A.L., RAFFIN, F.N. Thermal studies of isoniazid and mixtures with rifampicin. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2009. 97:333-336.

FU, X., HUCK, D., MAKEIN, L., WILLEN, U., FREEMAN, T. Effect of particle shape and size on flow properties of lactose powders. *Particuology.* 2012. 10: 203-208.

GALLO, G. G.; RADAELLI, P. Rifampin. in FLOREY, K. Ed., Analytical profiles of drug substances, v. 5, p. 467-513, Academic Press, 1976.

GIBSON, M. Ed., *Pharmaceutical preformulation and formulation: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*. IHS Health Group, 610pp, 2004.

GOHEL, M.C., SARVAIYA, K.G., NAGORI, S.A. Design and evaluation of novel dosage form of rifampicin and isoniazid with improved functionality. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 2010, 44(1):22-27.

GOICOECHEA, H.C; OLIVIERI, A.C. Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in tablet preparation by multivariate spectrophotometric calibration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 1999, 20:681-686.

GUINARD, J.X. Sensory and consumer testing with children. *Trends Food Sci. Tech.* 2001, 11: 273–283.

HATAKEYAMA, T., LIU, Z. *Handbook of Thermal Analysis*. John Wiley & Sons, 1998.

ISHIZAKA, T., MIYANAGA, Y., ASAKA, K., NAKAI, Y., TSUJI, E., UCHIDA, T. Bitterness evaluation of medicines for pediatric use by a taste sensor. *Chem. Pharm. Bull.* 2004, 52(8): 943-948.

JAPANESE MINISTER OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE. *Japanese Pharmacopeia* 16th. Ed. 2011. 2326p.

JINDAL, K.C., CHAUDHARY, R.S., SINGLA, A.K., GANGWAL, S.S., KHANNA, S. Dissolution test method for rifampicin-isoniazid fixed dose formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1994, V 12, n° 4, 493-497.

JOHNSTON, K.R., GOVEL, L. A., ANDRITZ, M. H. Gastrointestinal effects of sorbitol as an additive in liquid medications. *The American journal of medicine*, 1994, 97:185-191.

KAZAKEVICH, Y., LoBRUTTO, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, New Jersey, 2007, p. 127.

KHETARPAL, N. A., SAV, A. R., RAO, L., AMIN, P. D. Formulation development of a stable solid oral dosage form of Valproic acid using colloidal sílica. *International Journal of Drug Delivery*, (2012), 4:266-274

LAVANDERIA, A. Orphan drugs: legal aspects, current situation. *Haemophilia*, v.8, n.3, p.194-198, 2002.

LAVOR, E. P. Estudo de pré-formulação para dose fixa combinada dos tuberculostáticos – rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (4 em 1). Dissertação (mestrado) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – orientador: Prof. Dr. Tulio Flávio Accioly de Lima e Moura. Rio Grande do Norte, 2010, 122 p.

LAVOR, E.P., NAVARRO, M.V.M., FREIRE, F.D., ARAGÃO, C.F.S., RAFFIN, F.N., BARBOSA, E.G., MOURA, T.F.A.L. Application of thermal analysis to the study of antituberculosis drug-excipient compatibility. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2014. 115:2303-2309.

LIM, T.Y., POOLE, R.L., PAEGLER, N.M. Propylene glycol toxicity in children. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 2014, 19(4)277-282.

LIU, L.X., MARZIANO, I., BENTHAM, A.C., LISTER, J.D., WHITE, E.T., HOWES, T. Effect of particle properties on the flowability of ibuprofen powders. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008; 362:109-117.

LOPES, A.J., CONCEIÇÃO, G.M.S., ROCHA, J.L., JANSEN, J.M., NOGUEIRA, K.T., SANTOS, R.A.C. Características da tuberculose em adolescentes: uma contribuição para o programa de controle. *Rev Bras Pneumol Sanit* 2007; 15 (1): 7 -14.

MACFIE, H.J., BRATCHELL, N., GREENHOFF, K., VALLIS, L.V. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*. 1989, 4:129-148.

MADAN, J., DWIVEDI, A.K., SINGH, S. Estimation of antitubercular drugs combination in pharmaceutical formulations using multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, 538, p. 345-353, 2005.

MEILGAARD, M., CIVILLE, G.V., CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. 3 ed. Florida: CRC Press. 1999

MENNELLA, J.A., PEPINO, M.Y., BEAUCHAMP, G.K., Modification of bitter taste in children. *Dev. Psychobiol.* 2003, 43(2): 120-127.

MERCK & Co, Inc. The Merck Index, 13th Ed., Whitehouse Station, New Jersey, USA, 2001.

MEKURIA, Y., MOHAMMED, A.M.I, HYMETE, A. Chemometrically-Assisted Spectrophotometric Determination of Certain Anti-Tubercular Combinations. Dissertação de Mestrado Universidade Addis Ababa, 2008.

MILNE, C-P., BRUSS, J.B. The Economics of Pediatric Formulation Development for Off-Patent Drugs. *Clinical Therapeutics*, Volume 30, Number 11, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Eletrônico Epidemiológico. Tuberculose: Informe Eletrônico da Tuberculose. Ano 9, nº 2, julho, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_tb_julho09.pdf

MOHAMED, M. B., TALARI, M. K., TRIPATHY, M., MAJEED, A. B. A. Pharmaceutical applications of crosprovidone: a review. *International journal of drug formulation and research.* 2012, 3(1):13-28.

NEVES, A.C.O., SOARES, G.M., MORAIS, S.C., COSTA, F.S.L., PORTO, D.L., LIMA, K.M.G. Dissolution testing of isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol tablets using near-infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate calibration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 57, 115-119, 2012.

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

NUNN, T., WILLIAMS, J. Formulation of medicines for children. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2004, 59(6): 674-676.

PARICKH, D.M. Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology, 2nd Ed. Taylor & Francis, 2005.

PASSOS, I. A., SAMPAIO, F. C., MARTÍNEZ, C.R., FREITAS, C. H. S. M. Sucrose concentration and pH in liquid oral pediatric medicines of long-term use for children. *Rev. Panam Salud Publica*. 2010; 27(2):132-137.

PERES, K.G., OLIVEIRA, C.T., PERES, M.A., RAYMUNDO, M.S. FETT, R. Sugar content in liquid oral medicines for children. *Rev. Saúde Pública*. 2005, 39(3): 486-489.

PERYAM, D.R., PILGRIM, F.J. Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technology* 1957, 11(9): 9-14.

PETIT, S., COQUEREL, G., The Amorphous State. In: HILFIKER, R. Ed. Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry, Wiley-VCH Verlag, 2006.

PEZZANI VALENZUELA, M. Manejo de medicamentos en lactentes y niños. In: GONZÁLEZ ZANINI, R. (Ed.). *Fundamentos de farmacia clínica*. Santiago: Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas de la Universidad de Chile, 1993. p. 253-263.

PINHEIRO, V.G.F., RAMOS, L.M.A., MONTEIRO, H.S.A., BARROSO, E.C., BUSHEN. O.Y., FAÇANHA, M.C., PELOQUIN, C.A., GUERRANT, R.L., LIMA, A.A.M. Intestinal Permeability and Malabsorption of Rifampin and Isoniazid in Active Pulmonary Tuberculosis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 10(6): p. 374-379, 2006.

PODCZECK, F., MIAH, Y. The influence of particle size and shape on the angle of internal friction and the flow factor of unlubricated and lubricated powders. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996, 144: 187-194.

POWERS, J.L., GOOCH III, W.M., ODDO, L.P. Comparison of the palatability of the oral suspension of cefdinir vs. amoxicillin/clavulanate potassium, cefprozil and azithromycin in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J*, 2000, 19(12):S174–80.

PRANKERD, R.J., WALTERS, J.M., PARNES, J.H. Kinetics for degradation of rifampicin, an azomethine-containing drug which exhibits reversible hydrolysis in acidic solutions. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992, 78:59-67.

PRANKERD, R.J. Profiles of Drug Substances, Excipients, and related methodology. Vol. 33. Academic Press. 2007.

PUROHIT, S.D., GUPTA, M.I., JAIN, D., GUPTA, P.R., SHARMA, T.N., METHA, Y.R. Rifampicin and ascorbic acid: role in anti-tuberculosis chemotherapy. *Lung India*, 1986, 4(2):63-65.

RAJARAM, S., VEMURI, V.D., NATHAM, R. Ascorbic acid improves stability and pharmacokinetics of rifampicin in the presence of isoniazid. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014, 100:103-108.

RANTANEN, J., WILKSTRÖM, H., TURNER, R., TAYLOR, L.S. Use of In-line Near-Infrared Spectroscopy in Combination with Chemometrics for Improved Understanding of Pharmaceutical Processes. *Analytical Chemistry*, 2005; 77(2):556-563.

ROWE, R.C., SHESKEY, P.J., QUINN, M.E. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th Ed., Pharmaceutical Press, 2009.

SAMAD, A.; SULTANA, Y.; KHAR, R.K.; AQIL, M.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A.K. Reconstituted powder for suspension of antitubercular drugs formulated as microspheres for pediatric use. *Drug Discov Ther*, 2008; 2(2):108-114.

SANKAR, R., SHARDA, N., SINGH, S. Behavior of decomposition of rifampicin in the presence of isoniazid in the pH range 1-3. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2003; 29(7):733-738.

SANT'ANNA, C.C., MOURGUES, L.V., FERRERO, F., BALANZAT, A.M. Diagnóstico e terapêutica da tuberculose infantil – uma visão atualizada de um antigo problema. *Jornal de Pediatria*. 2002. 78(Supl. 2):S205-S214.

SANT'ANNA, C.C., ORFALIAIS, C.T.S., MARCH, M.F.P.B., CONDE, M.B. Evaluation of a proposed diagnostic score system for pulmonary tuberculosis in Brazilian children. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10(4):463-5.

SANT'ANNA, C. C.; HIJJAR, M. A. Recente contribuição da Organização Mundial de Saúde para o controle da tuberculose na infância. *Rev Saúde Pública* 2007;41(Supl. 1):117-120

SANTOS, D. B.; COELHO, H. L. L.; CLAVENNA, A.; BONATI, M. Off-label and unlicensed drug utilization in hospitalized children in Fortaleza, Brazil. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v.64, n.11, p.1111-1118, 2008.

SANTOS, J.G., CONCEIÇÃO, M.M., TRINDADE, M.F.S., ARAÚJO, A.S., FERNANDES Jr., V.J., SOUZA, A.G. Kinetic study of dipivaloylmethane by Ozawa method. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 75:591-597, 2004.

SEIFART, H.L., PARKIN, D.P., DONALD, P.R. Stability of isoniazid, rifampicin and pyrazinamide in suspensions used for the treatment of tuberculosis in children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 1991, 10(11):827-831.

SHARGEL, L., WU-PONG, S., YU, A, B. C. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, 5th Ed., McGraw Hill, 2005.

SHIMADZU. Thermal Analysis System TA-60WS. DSC Kinetic Analysis Program (Ozawa Method) Instruction Manual. 75pp. 2010.

SHISHOO, C.J., SHAH, S.A., RATHOD, I.S., SAVALE, S.S., KOTTECHA, J.S., SHAH, P.B. Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 190:109-123.

SINGH, S; MARIAPPAN, T T; SHARDA, N; SINGH, B. Degradation of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide from prepared mixtures and marketed single and combination products under acid conditions. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 2000; 6: 491-494.

SINGH, S; MARIAPPAN, T T; SANKAR, N; SHARDA, N; SINGH, B. A critical review of the probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from antitubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 228, p. 5-17. 2001.

SINKO, P. J. Martin: Físico-farmácia e ciências farmacêuticas, 5ª. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

STEPHENSON, T. The medicines for children agenda in the UK. *British J. Clin. Pharmacol.*, 2006, 61(6): 716-719.

STRICKLEY, R.G., IWATA, Q., WU, S., DAHL, T.C. Pediatric drugs – a review of commercially available oral formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008. 97(5):1731-1774.

T JONG, G. W.; ELAND, I. A.; STURKENBOOM, M. C. J. M.; VAN DEN ANKER, J. N.; STRICKER, B. H. C. Determinants for drug prescribing to children below the minimum licensed age. *Eur. Clin. Pharmacol.*, v.58, n.10, p.701-705, 2003.

TASSADUQ, I., BUTT, S.A., HAMID, S. Protective effect of ascorbic acid on rifampicin induced hepatotoxicity in mice. *Journal of Rawalpindi Medical College*, 2011, 15(2):102-103.

TAYLOR, L.S., SHAMBLIN, S.L. Amorphous solids. In: BRITAIN, H.G. Polymorphism in Pharmaceutical Solids, 2nd Ed. Informa Healthcare, 2009.

TORRES, B. S., SANTA CRUZ, R. C. Revista Brasileira de Medicina (Rio de Janeiro), 2004, 61: 306-311.

The British Pharmacopoeia Commission Secretariat. British Pharmacopoeia 2013 CD-ROM. 2013.

U.S. Pharmacopeial Convention, USP 38 – NF 33, 2014.

WHO Model List of Essential Medicines for Children. October 2007. Disponível em [http://www.who.int/childmedicines/publications/EMLc%20\(2\).pdf](http://www.who.int/childmedicines/publications/EMLc%20(2).pdf) [acesso em 2009]

WHO – Dosing instructions for the use of currently available fixed-dose combination TB medicines for children. September 2009. Disponível em http://www.who.int/tb/challenges/interim_paediatric_fdc_dosing_instructions_sept09.pdf?ua=1 [acesso em junho de 2012].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidance for national tuberculosis programs on the management of tuberculosis in children.** 2006. 41p.

ZENG, X. M., MARTIN, G. P., MARRIOTT, C. Particulate interaction in dry powder formulation for inhalation. Taylor & Francis Group, 255pp. 2001.



LPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	2/3
	Título do Documento:			Código:	Versão:
Depósito de Pedido de Patente			FQ001	2	
			Procedimento:		DIRPA-PQ006

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: SAID GONÇALVES DA CRUZ FONSECA

6.2 Qualificação: DOUTOR EM FARMACIA

6.3 CPF: 230234903-25

6.4 Endereço Completo: RUA GENERAL BERNARDO FIGUEIREDO 2962

6.5 CEP: 60455-475

6.6 Telefone: 85-97999565

6.7 FAX:

6.8 E-mail: said@ufc.br

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas);

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).


	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	01
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	11
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	01
<input type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	01
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de seqüências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de seqüências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de seqüências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) CONTINUAÇÃO DO INVENTORES	02

12. Total de folhas anexadas: 16 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

FORTALEZA, 20 de Março de 2014

Local e Data


Assinatura e Carimbo
Prof. Jesualdo Pereira Fariñas
Reitor da UFC

Anexo II – Protocolo de aprovação da análise sensorial de veículos para preparações extemporâneas de uso em pacientes pediátricos expedido pelo comitê de ética em pesquisa.



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 73/12

Fortaleza, 16 de Março de 2012.

Protocolo COMEPE nº: 41/12

Pesquisador responsável: Patrícia Maria Pontes Thé.

Título do Projeto: “Análise sensorial de veículos para preparações extemporâneas de uso em pacientes pediátricos”

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 15 de Março de 2012.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC