

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

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE DERIVAÇÃO FARMACÊUTICA HOSPITALAR
DE TIZANIDINA

CAREN GOBETTI

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2017

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

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE DERIVAÇÃO FARMACÊUTICA HOSPITALAR
DE TIZANIDINA

Dissertação apresentada por Caren Gobetti
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Cássia Virginia Garcia

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 21.03.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dr. Patrícia Gomes
Centro Universitário Franciscano (UNIFRA)

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

CIP - Catalogação na Publicação

Gobetti, Caren
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE DERIVAÇÃO
FARMACÊUTICA HOSPITALAR DE TIZANIDINA / Caren
Gobetti. -- 2017.
134 f.

Orientadora: Cássia Virginia Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. cloridrato de tizanidina. 2. derivação farmacêutica. 3. estabilidade físico-química e microbiológica. 4. cromatografia líquida de alta eficiência. I. Garcia, Cássia Virginia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Cássia Virginia Garcia pela orientação, ensinamentos, exemplo de profissionalismo e por estar sempre acompanhando meu desenvolvimento profissional.

Aos professores, Elfrides Schapoval, Martin Steppe, Andreas Mendez, Nadia Volpato e Tércio Oppe pelo auxílio e colaboração.

À professora Ana Lucia Freitas pela contribuição na parte microbiológica.

Aos amigos do laboratório pelo convívio, amizade e conhecimentos transmitidos. Em especial à Andressa pela colaboração na parte prática deste trabalho.

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional. À minha irmã pelo carinho e incentivo.

Ao Amauri, pela cooperação e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade de aprimoramento científico.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e aos farmacêuticos Márcio e Sílvia por oportunizarem os resultados deste estudo.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos.

A todos, que de uma maneira ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O cloridrato de tizanidina é um relaxante muscular esquelético de ação central, utilizado no tratamento de espasticidade. Esse fármaco é comercializado apenas sob a forma de comprimidos, o que evidencia a necessidade do desenvolvimento de formulações líquidas orais. No ambiente hospitalar, este aspecto é contornado com a preparação de suspensões derivadas, de modo a permitir a administração em crianças e em adultos com deglutição prejudicada, mas não há dados sobre sua estabilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade físico-química e microbiológica de formas farmacêuticas líquidas preparadas em ambiente hospitalar a partir da derivação de comprimidos de cloridrato de tizanidina, empregando como metodologia a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e análise microbiológica. Um método simples e indicativo de estabilidade foi desenvolvido e validado por CLAE quanto a especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. As formulações líquidas foram preparadas em triplicata e acondicionadas em frasco de polietileno tereftalato (PET) âmbar e de vidro âmbar, que foram armazenados sob três diferentes condições: em temperatura ambiente, sob refrigeração e à 40 °C. Foram coletadas amostras a cada 7 dias por um período de 56 dias para a estabilidade físico-química. As formulações líquidas foram analisadas e demonstraram ser quimicamente estáveis durante 56 dias, permitindo um período de utilização prolongado. Entretanto, a determinação da estabilidade microbiológica mostrou que estas formulações estão propensas à contaminação microbiana, o que reduziu drasticamente a sua estabilidade para 7 dias, em ambos os frascos e em todas as temperaturas avaliadas. A qualidade microbiológica foi uma questão crítica, uma vez que as formulações foram produzidas apenas em água para injetáveis e não havia conservantes presentes na formulação. Os resultados deste estudo podem servir de referência para preparar derivações de cloridrato de tizanidina em uso hospitalar, uma vez que se demonstrou a confiabilidade do intervalo de tempo de armazenamento e as condições adequadas para o uso. De acordo com os resultados deste estudo de estabilidade, este fármaco pode ser incorporado na rotina de preparo das derivações dos hospitais, atendendo a uma demanda já há tempos sinalizada.

Palavras-chave: cloridrato de tizanidina, derivação, estabilidade físico-química e microbiológica, cromatografia líquida de alta eficiência.

ABSTRACT

Tizanidine hydrochloride is a centrally acting skeletal muscle relaxant, used in the management of spasticity. This drug is sold only as tablets, which highlights the need to develop oral liquid formulations. In the hospital environment, this aspect is circumvented by the preparation of derived suspensions, to allow administration to children and adults with impaired swallowing, but there is no data regarding their stability. The objective of this work was to evaluate the physicochemical and microbiological stability of liquid dosage forms prepared in hospital environment from tizanidine hydrochloride tablets, applying high performance liquid chromatography (HPLC) and microbiological analysis. A simple and stability-indicating HPLC method was developed and validated for specificity, linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy and robustness. The liquid formulations were prepared in triplicate and placed in amber PET and glass bottles, which were stored under three different conditions: at room temperature, under refrigeration and at 40 °C. Samples were collected every 7 days along 56 days for physicochemical stability. The liquid formulations were analyzed and demonstrated chemical stability for 56 days, allowing the use for long period. However, the determination of microbiological stability showed that these formulations are prone to microbial contamination, which has dramatically reduced its stability to 7 days, in both bottles and all evaluated temperatures. Microbiological quality was a critical issue, since formulations were produced only in water for injectables and there was no preservatives present in the formulation. Results of this study could be applied as a reference for tizanidine hydrochloride derived preparation in hospital, once it was demonstrated the reliability of storage time interval and proper conditions for use. According to the results of this stability study, this drug could be incorporated into the routine of hospital derivations preparation, meeting a demand already indicated.

Keywords: tizanidine hydrochloride, derivation, physicochemical and microbiological stability, high-performance liquid chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de cloridrato de tizanidina.....	35
Figura 2 - Espectro de absorção no ultravioleta da solução amostra de cloridrato de tizanidina em água, na concentração de 30,0 µg/mL.....	60
Figura 3 - Cromatograma da solução amostra de cloridrato de tizanidina na concentração de 30,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna Phenyl Zorbax Eclipse XBD Agilent® (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); fase móvel: metanol:água:trietilamina 50:50:0,5 (v/v/v) pH 3,5; vazão: 0,6 mL/min; detecção 227 nm e temperatura de 25 °C.....	62
Figura 4 - Pureza apresentada para a solução amostra de cloridrato de tizanidina, indicando a pureza total do pico do fármaco de 1,000000.....	63
Figura 5 - Cromatogramas obtidos da solução amostra de cloridrato de tizanidina na concentração 30,0 µg/mL (1) e da solução placebo (2).....	64
Figura 6 - Cromatogramas das degradações forçadas da amostra de cloridrato de tizanidina (1) após ser submetida à hidrólise ácida em HCl 0,1 M (A), à hidrólise alcalina em NaOH 0,1 M (B), após exposição à luz UV-A (352 nm) (C), após exposição à luz UV-C (254 nm) (D), à oxidação com peróxido de hidrogênio 3% (E) e à temperatura de 60 °C (F), todas por 72 horas.....	65
Figura 7 - Representação gráfica da curva padrão de cloridrato de tizanidina através do método por CLAE.....	66
Figura 8 - Gráfico dos resíduos da linearidade de cloridrato de tizanidina por CLAE.....	68
Figura 9 - Representação gráfica do teor de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frasco de PET âmbar e de vidro âmbar, em temperatura ambiente (15 a 30 °C) <i>versus</i> tempo.....	80
Figura 10 - Representação gráfica do teor de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frasco de PET âmbar e de vidro âmbar, em refrigeração (2 a 8 °C) <i>versus</i> tempo.....	81
Figura 11 - Representação gráfica do teor de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frasco de PET âmbar e de vidro âmbar, em estufa (40 °C) <i>versus</i> tempo.....	82

Figura 12 - Representação gráfica do pH de cloridrato de tizanidina armazenado em frasco de PET âmbar e de vidro âmbar em temperatura ambiente (15 a 30 °C) <i>versus</i> tempo.....	85
Figura 13 - Representação gráfica do pH de cloridrato de tizanidina armazenado em frasco de PET âmbar e de vidro âmbar em refrigeração (2 a 8 °C) <i>versus</i> tempo.....	85
Figura 14 - Representação gráfica do pH de cloridrato de tizanidina armazenado em frasco de PET âmbar e de vidro âmbar em estufa (40 °C) <i>versus</i> tempo.....	86
Figura 15 - Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> na ausência (A) e na presença (B) da amostra; crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na ausência (C) e na presença (D) da amostra; crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> na ausência (E) e na presença (F) da amostra; crescimento de <i>Cândida albicans</i> na ausência (G) e na presença (H) da amostra e crescimento de <i>Aspergillus niger</i> na ausência (I) e na presença (J) da amostra.....	97
Figura 16 - Cromatogramas obtidos da amostra de cloridrato de tizanidina no tempo zero (1) e após 7 dias (2) de exposição à luz UV-C em escala ampliada.....	110
Figura 17 - Gráfico de concentração <i>versus</i> tempo (1), log de concentração <i>versus</i> tempo (2) e 1/concentração <i>versus</i> tempo na determinação da ordem de reação de cloridrato de tizanidina.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos utilizados para a determinação quantitativa de cloridrato de tizanidina por CLAE.....	43
Tabela 2 - Condições cromatográficas para execução do método por CLAE....	54
Tabela 3 - Preparo das soluções para o estudo de exatidão de cloridrato de tizanidina por CLAE.....	59
Tabela 4 - Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos durante o desenvolvimento do método analítico por CLAE.....	63
Tabela 5 - Resultados da curva padrão para o método por CLAE.....	66
Tabela 6 - Análise de variância das áreas determinadas para obtenção da curva padrão de cloridrato de tizanidina por CLAE.....	67
Tabela 7 - Valores referentes à determinação de cloridrato de tizanidina por CLAE, para a avaliação da precisão intra e interdia.....	69
Tabela 8 - Valores do estudo de exatidão de cloridrato de tizanidina realizado por CLAE.....	69
Tabela 9 - Valores obtidos no estudo da robustez do método de cloridrato de tizanidina por CLAE.....	70
Tabela 10 - Resultado dos teores de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frascos de PET âmbar e de vidro âmbar, em temperatura ambiente (15 a 30 °C).....	80
Tabela 11 - Resultado dos teores de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frascos de PET âmbar e de vidro âmbar, em refrigeração (2 a 8 °C).....	81
Tabela 12 - Resultado dos teores de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frascos de PET âmbar e de vidro âmbar, em estufa (40 °C)	82
Tabela 13 - Valores de pH das derivações de cloridrato de tizanidina durante a avaliação de estabilidade.....	84
Tabela 14 - Condições do ensaio para adequação do método farmacopeico.....	95

Tabela 15 - Condições de incubação das derivações de cloridrato de tizanidina para determinação de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	96
Tabela 16 - Determinação de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e pesquisa de <i>Escherichia coli</i> nas derivações armazenadas em temperatura ambiente (15 a 30 °C).....	98
Tabela 17 - Determinação de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e pesquisa de <i>Escherichia coli</i> nas derivações armazenadas em refrigeração (2 a 8 °C).....	99
Tabela 18 - Determinação de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e pesquisa de <i>Escherichia coli</i> nas derivações armazenadas em estufa (40 °C)	99
Tabela 19 - Valores de concentração residual de cloridrato de tizanidina após exposição das amostras frente à luz UV-C, obtidos por CLAE.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA - Análise de Variância
- ANVISA - Agencia Nacional Vigilância Sanitária
- ATCC - *American type culture collection*
- CAD - *Charged Aerosol Detection*
- CAS - *Chemical Abstracts Service*
- CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
- DAD - Detector de arranjo de fotodiodos
- DPR - Desvio padrão relativo
- FB - Farmacopeia Brasileira
- FDA - *Food and Drug Administration*
- ICH - *International Conference on Harmonization*
- JP – *The Pharmacopoeia of Japan*
- k - Constante de velocidade de reação
- LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
- LD - Limite de detecção
- LQ - Limite de quantificação
- PET - Polietileno tereftalato
- r - Coeficiente de correlação
- r² - Coeficiente de determinação
- RE 899/03 - Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003
- SQR - Substância química de referência
- t_{90%} - Tempo com concentração 90%
- USP - *United States Pharmacopeia*
- UV/VIS - Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 ASPECTOS GERAIS.....	33
3.2 CLORIDRATO DE TIZANIDINA.....	34
3.2.1 MECANISMO DE AÇÃO.....	36
3.2.2 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS.....	36
3.3 NECESSIDADE DE MEDICAMENTOS PARA PEDIATRIA.....	37
3.4 NECESSIDADE DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS PARA PEDIATRIA.....	39
3.5 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA.....	41
3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	44
3.6.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	45
3.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	46
4. CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	49
4.1 INTRODUÇÃO.....	51
4.2 MATERIAIS.....	52
4.2.1 PRODUTO FARMACÊUTICO E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA.....	52
4.2.2 SOLVENTES E REAGENTES.....	52
4.2.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	53
4.3 MÉTODO.....	53
4.3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	53
4.3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	54
4.3.2.1 ESPECIFICIDADE.....	54
4.3.2.2 LINEARIDADE.....	57
4.3.2.3 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	57
4.3.2.4 PRECISÃO.....	58

4.3.2.5 EXATIDÃO.....	58
4.3.2.6 ROBUSTEZ.....	59
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5. CAPÍTULO II: ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS DERIVAÇÕES DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA.....	73
5.1 INTRODUÇÃO.....	75
5.2 MATERIAIS.....	76
5.2.1 DERIVAÇÕES.....	76
5.2.2 SOLVENTES E REAGENTES.....	76
5.2.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	76
5.3 MÉTODO.....	77
5.3.1 PREPARAÇÃO DAS DERIVAÇÕES DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA.....	77
5.3.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA DOSEAMENTO DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA	77
5.3.3 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA.....	78
5.3.4 PROTOCOLO DE ESTABILIDADE.....	78
5.3.5 CÁLCULO PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA NAS DERIVAÇÕES	78
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
6. CAPÍTULO III: ESTUDO DE ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DAS DERIVAÇÕES DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA.....	89
6.1 INTRODUÇÃO.....	91
6.2 MATERIAIS.....	92
6.2.1 DERIVAÇÕES.....	92
6.2.2 MICRORGANISMOS.....	92
6.2.3 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA.....	93
6.3 MÉTODOS.....	93
6.3.1 PREPARO DAS DERIVAÇÕES DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA.....	93
6.3.2 ADEQUAÇÃO DO MÉTODO FARMACOPEICO.....	93
6.3.3 PROTOCOLO DE ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA.....	95
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96

7. CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE.....	103
7.1 INTRODUÇÃO.....	105
7.1.1 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO.....	105
7.2 MATERIAIS.....	106
7.2.1 PRODUTO FARMACÊUTICO.....	106
7.2.2 SOLVENTES E REAGENTES.....	106
7.2.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	107
7.3 MÉTODO.....	107
7.3.1 DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO.....	107
7.3.2 CÁLCULO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO.....	108
7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
8. DISCUSSÃO.....	113
9. CONCLUSÕES.....	119
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

A farmácia hospitalar possui diversas funções, entre elas a seleção, aquisição, conservação, distribuição e manipulação de medicamentos. Para cumprir seus objetivos deve contar com um sistema eficiente de informações e com profissionais farmacêuticos com qualificação e experiência na área (GOMES e REIS, 2011). A qualidade e segurança dos medicamentos são uma preocupação constante para o farmacêutico, pois qualquer falha no processo produtivo pode traduzir-se em risco ao paciente, podendo evoluir desde a ineficácia à toxicidade.

A maioria dos medicamentos disponíveis no mercado não tem apresentação com dosagem de uso pediátrico, pois grande parte deles está sob as formas farmacêuticas de comprimidos e cápsulas (ROSA *et al.*, 2014). A carência de formas farmacêuticas adequadas à pediatria obriga os médicos a recorrerem ao uso de comprimidos triturados dissolvidos. Dessa forma, essas preparações são administradas sem qualquer informação sobre a sua biodisponibilidade, eficácia e toxicidade. Também faltam informações sobre sua compatibilidade e estabilidade, além de trazer riscos de inexistência de dose, contaminação e interações (CALDERÓN-GUZMÁN *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2014).

Conforme as Boas Práticas de Manipulação em Farmácias, esta transformação ou derivação se define como “manipulação de especialidade farmacêutica visando ao preparo de uma forma farmacêutica a partir de outra” (BRASIL, 2007).

Neste contexto, o cloridrato de tizanidina é um dos fármacos que apresenta apenas a forma farmacêutica comprimido, sendo necessária a derivação para adequar a dose e facilitar a administração aos pacientes pediátricos. É um relaxante muscular esquelético de ação central, agonista α 2-adrenérgico, utilizado no tratamento da espasticidade (SWEETMAN, 2011). No mercado está disponível com o nome comercial de Sirdalud® na forma de comprimidos contendo 2 mg.

O cloridrato de tizanidina apesar de ser utilizado em pacientes pediátricos não se encontra comercializado em forma adequada para crianças. Por isso a derivação dos comprimidos desempenha um importante papel na terapêutica, principalmente na clínica pediátrica, já que nesta faixa etária algumas crianças são incapazes de ingerir comprimidos e necessitam de flexibilidade na dosagem. Além disso, a falta de formulações líquidas orais não é um problema apenas para crianças, mas para adultos com dificuldade de deglutição e uso de sondas de alimentação enteral (SANTOS e HEINECK, 2011).

As suspensões ou soluções orais são usadas preferencialmente, pois apresentam as vantagens de facilidade de preparação, administração e versatilidade na obtenção de doses múltiplas. Porém, estas formas exigem estudos prévios, de seleção dos excipientes e, sobretudo, de estabilidade. Estes são aspectos cruciais para a otimização da terapêutica, uma vez que, sempre que se fazem modificações ou reformulações do produto original são colocadas questões de estabilidade (ALBUQUERQUE, 2007).

Na rotina do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, são preparadas derivações a partir de formas farmacêuticas sólidas com o critério de possuir estudo de estabilidade na literatura. Essas informações são úteis para verificar as condições de preparo, embalagem, armazenamento e intervalo de tempo de utilização. Desta forma, a farmácia hospitalar tem aporte e dados para preparar essas medicações, reduzindo os riscos de diluição e de contaminação microbiológica, dado que na ausência do estudo de estabilidade é a enfermagem que prepara o medicamento no momento de administrá-lo ao paciente.

Até o momento, há falta de dados na literatura relacionados ao comportamento de cloridrato de tizanidina após a derivação. Por essa razão, buscou-se desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação de cloridrato de tizanidina, cujos resultados estão apresentados no Capítulo I. A avaliação das estabilidades físico-química e microbiológica das derivações estão descritas no Capítulo II e III, respectivamente. Visou-se também o estudo preliminar de estabilidade, através da determinação da cinética de fotodegradação, descrito no Capítulo IV.

Com base nesses estudos, este trabalho pretende colaborar na prática de hospitais, dando resposta à necessidade do estudo de estabilidade em formas líquidas deste fármaco. Por essas razões, entende-se que a contribuição será significativa, estabelecendo-se bases para resolver um problema real existente na prática farmacêutica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade de formas farmacêuticas líquidas preparadas em ambiente hospitalar a partir da derivação de comprimidos de cloridrato de tizanidina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação quantitativa de formas farmacêuticas líquidas derivadas de comprimidos de cloridrato de tizanidina;
- Determinar a cinética de degradação de cloridrato de tizanidina na condição de estresse mais suscetível;
- Determinar o intervalo de tempo confiável para a utilização, o tipo de embalagem e as condições de armazenamento mais adequadas a partir do estudo de estabilidade físico-química e microbiológica das preparações líquidas derivadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS

Diversas doenças do cérebro e da medula espinhal produzem aumento dos tônus muscular, que pode ser doloroso e incapacitante. A espasticidade resultante de traumatismo ou doença vascular cerebral e a paralisia gerada por lesões da medula espinhal são exemplos. Quando as doenças progredem por alguns anos, podem causar rigidez muscular e espasmos, bem como outros sintomas como dor, fadiga, dificuldade em urinar e tremores (RANG *et al.*, 2007).

O espasmo é uma contração involuntária do músculo que pode causar o movimento involuntário, interferir com a função e causar distorção, podendo ocorrer em qualquer tipo de músculo e em doenças como esclerose múltipla e danos na medula espinhal. Relaxantes musculares de ação central e benzodiazepínicos são utilizados para tratar espasmos musculares como *splitting*, que ocorrem em resposta a trauma local ou distúrbios musculoesqueléticos e articulares. *Splitting* é um espasmo muscular reflexo que produz rigidez muscular e atua como um mecanismo de proteção para evitar o movimento e mais danos da parte afetada (SWEETMAN, 2011; BRANDALISE, 2012).

Câimbras são espasmos musculares de início abrupto que ocorrem em repouso e geralmente duram por alguns segundos ou minutos. Muitas vezes, são ocasionadas pela desidratação e hiponatremia produzidos por exercícios vigorosos, transpiração excessiva, diarreia e vômito, ou podem ser associadas à terapia medicamentosa (SWEETMAN, 2011).

A espasticidade caracteriza-se por resistência inicial à mobilização passiva de um membro ou de uma articulação, seguida de relaxamento subido. O termo espasticidade tem sido amplamente aplicado a várias desordens do controle motor resultantes de doença do sistema nervoso central e caracterizado por sintomas como aumento do tônus muscular, reflexos de estiramento exagerados, movimento voluntário prejudicado, fraqueza e postura anormal. A espasticidade é uma característica de condições neurológicas, tais como esclerose múltipla, paralisia cerebral, traumatismo craniano, acidente vascular cerebral e especialmente se existirem lesões da coluna vertebral. Torna-se difícil de tratar quando está na forma grave, mas quando moderada ou leve pode ser tratada de forma eficaz pelo tratamento tradicional. Baclofeno, dantrolene, diazepam e tizanidina estão entre os fármacos mais utilizados para o tratamento, além de fisioterapia (BRUNTON, 2012;

SWEETMAN, 2011). Em pacientes que apresentam espasticidade decorrente de esclerose múltipla e são intolerantes ao baclofeno ou tizanidina, diazepam, clonazepam ou dantrolene podem ser considerados como alternativas, mas geralmente são menos eficazes (DIPIRO *et al.*, 2014).

Embora existam muitas causas possíveis de espasticidade, a maioria das crianças que apresentam espasticidade têm diagnóstico de paralisia cerebral, dado que aproximadamente dois terços de todos os pacientes com paralisia cerebral sofrem de espasticidade (AWAAD e RIZK, 2012).

3.2 CLORIDRATO DE TIZANIDINA

O cloridrato de tizanidina (Figura 1) é um relaxante muscular esquelético de ação central, agonista α_2 -adrenérgico, estruturalmente relacionado com a clonidina (SWEETMAN, 2011) e aprovado, em 1996, pelo *Food and Drugs Administration* (FDA).

Os agonistas α_2 -adrenérgicos constituem uma classe de fármacos com propriedades potencialmente úteis em anestesia e terapia intensiva, que incluem efeito anti-hipertensivo, analgesia, sedação, diminuição da concentração alveolar mínima dos anestésicos inalatórios e redução de tremores pós-operatórios (NOCITI, 2001). Como protótipo dos agonistas α_2 , tem-se a clonidina, onde o principal uso terapêutico reside no tratamento da hipertensão (BRUNTON, 2012).

O cloridrato de tizanidina é um fármaco utilizado para o alívio sintomático da espasticidade associada a distúrbios neurológicos, tais como esclerose múltipla, mielopatia crônica, doenças degenerativas da medula espinhal, acidentes cerebrovasculares, paralisia cerebral e outras lesões ou doenças da medula espinhal. Também é utilizado no tratamento sintomático do espasmo muscular doloroso associado a condições musculoesqueléticas e distúrbios estáticos e funcionais da coluna (síndromes cervical e lombar) (SWEETMAN, 2011; NOVARTIS, 2016). Os ensaios clínicos com tizanidina administrada isoladamente mostraram que é segura e eficaz para controlar a espasticidade (QI, WANG e WANG, 2002).

No Brasil, o fármaco é comercializado pelo laboratório Novartis na forma de comprimidos orais, na dose de 2 mg, sob o nome comercial de Sirdalud® e versão genérica comercializada pelo laboratório Ranbaxy. Na formulação do Sirdalud®, além

do fármaco, encontram-se os seguintes excipientes: lactose, ácido esteárico, dióxido de silício e celulose microcristalina (NOVARTIS, 2016).

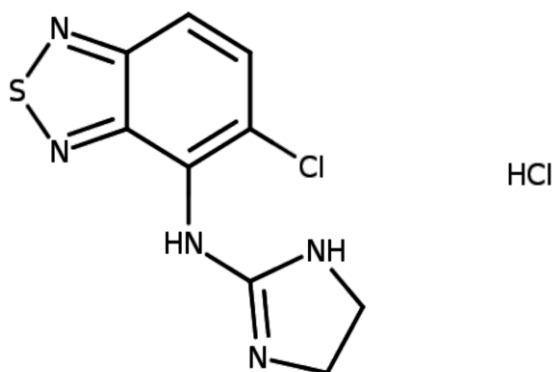


Figura 1 - Estrutura de cloridrato de tizanidina (DRUGBANK, 2016).

O cloridrato de tizanidina apresenta as seguintes características: (DRUGBANK, 2016; PUBCHEM, 2016; USP 38, 2015)

- Nome químico: 5-cloro-N-(4,5-diidro-1H-imidazol-2-il)-2,1,3-benzotiadiazol-4-amina; cloridrato
- Registro no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 64461-82-1
- Fórmula molecular: $C_9H_8ClN_5S$ HCl
- Massa molecular: 290,17
- pKa: 7,47
- Solubilidade: ligeiramente solúvel em água e em metanol

Como a experiência com cloridrato de tizanidina em pacientes abaixo de 18 anos de idade é limitada, não se recomenda o uso nessa faixa etária da população (NOVARTIS, 2016). Porém, mesmo que alguns medicamentos não sejam aprovados em pediatria, o acesso a melhor terapia medicamentosa não pode ser negado a esses pacientes, visto que existe o dever ético de providenciar a terapia mais apropriada disponível e seria negligência não fornecer o medicamento. A falta de aprovação para pediatria não significa necessariamente que os medicamentos sejam ineficazes, inseguros ou contraindicados para crianças. Muitos desses medicamentos são

prescritos justificadamente para o uso em doentes pediátricos, podendo muitas vezes ter como fundamento a medicina baseada em evidência (ALBUQUERQUE, 2007).

NIKKHAH e colaboradores (2011) demonstraram que a tizanidina é um medicamento eficaz e seguro para diminuir a espasticidade associada com paralisia cerebral espástica em crianças, concluindo com base no estudo experimental que poderia ser considerado um fármaco útil para o tratamento. Apesar de haver poucos e limitados estudos sobre o efeito da tizanidina em crianças, muitos neurologistas recomendam o uso no tratamento de espasticidade durante a infância.

PALAZON e colaboradores (2008) relataram o efeito de tizanidina em 45 crianças com paralisia cerebral espástica. Seus estudos mostraram que a tolerância de cloridrato de tizanidina foi excelente em 79,3% das crianças e verificou-se boa avaliação por 92,9% dos pais.

3.2.1 MECANISMO DE AÇÃO

A tizanidina é um agonista dos receptores α_2 -adrenérgicos do sistema nervoso central. Este fármaco atenua a espasticidade aumentando a inibição pré-sináptica dos neurônios motores (BRUNTON, 2012). O seu principal local de ação é a medula espinhal, onde evidências sugerem que, pela estimulação de receptores α_2 pré-sinápticos, ocorre inibição da liberação de aminoácidos excitatórios que estimulam os receptores N-metil-D-aspartato. A transmissão do sinal polissináptico aos interneurônios espinhais, os quais são responsáveis pelo tônus muscular excessivo, é então inibida e o tônus muscular é reduzido. Adicionalmente às propriedades miorrelaxantes, também exerce um efeito analgésico central moderado (NOVARTIS, 2016).

3.2.2 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

O cloridrato de tizanidina é administrado por via oral, geralmente em doses fracionadas, sendo as doses expressas em valores da base. O cloridrato de tizanidina 1,14 mg é equivalente a cerca de 1 mg de tizanidina. A dose diária inicial habitual no Reino Unido no tratamento da espasticidade equivale a 2 mg da base administrada como dose única. A dose pode ser aumentada em 2 mg de acordo com as necessidades individuais do paciente em intervalos de pelo menos 3 a 4 dias,

normalmente até 24 mg diários, administrados em 3 a 4 doses. Um esquema semelhante, com uma dose diária inicial de 4 mg, aumentada de 2 a 4 mg, é utilizado nos Estados Unidos. A dose máxima recomendada é de 36 mg por dia (SWEETMAN, 2011).

No tratamento do espasmo muscular doloroso, o cloridrato de tizanidina é administrado em doses usuais de 2 a 4 mg, três vezes ao dia. Em casos graves, uma dose adicional de 2 a 4 mg pode ser tomada, preferencialmente à noite para minimizar a sedação (NOVARTIS, 2016).

O cloridrato de tizanidina é absorvido de forma rápida e quase completa após sua administração oral, atingindo picos de concentração entre 1 e 2 horas após a administração da dose. A biodisponibilidade média é cerca de 34%, pois sofre um extenso metabolismo de primeira passagem no fígado, principalmente através da isoenzima CYP1A2 do citocromo P450. É excretado principalmente na urina na forma de metabolitos inativos e eliminado da circulação sistêmica com uma meia-vida média de 2 a 4 horas (SWEETMAN, 2011; NOVARTIS, 2016). Sedação, tontura e boca seca são os efeitos adversos mais comumente relatados, mas também pode ocorrer hipotensão, bem como hepatotoxicidade rara porém grave (DIPIRO *et al.*, 2014).

Estudos comparando a eficácia de cloridrato de tizanidina com a de outros fármacos atuais, como baclofeno e diazepam, demonstram que a tizanidina é tão eficaz quanto os outros agentes em reduzir a espasticidade. A tizanidina é um agente antiespasmódico com a mesma eficácia que o baclofeno e com perfil de tolerabilidade mais favorável. Enquanto a sonolência é um efeito adverso frequentemente relatado em ambos os fármacos, a fraqueza muscular parece ser um problema menor com a tizanidina do que com baclofeno. Portanto, a tizanidina parece ser uma alternativa terapêutica atraente para pacientes com espasticidade associada à lesão cerebral ou espinhal (USP DI, 2006; WAGSTAFF e BRYSON, 1997). Efeitos adicionais ao baclofeno podem ser produzidos, permitindo melhores resultados e redução na dosagem de ambos os fármacos, porém o uso com benzodiazepínicos não é recomendado devido ao potencial de interações (SWEETMAN, 2011; DIPIRO *et al.*, 2014).

3.3 NECESSIDADE DE MEDICAMENTOS PARA PEDIATRIA

A terapia medicamentosa pediátrica apresenta características distintas em relação ao uso de medicamentos durante a vida adulta. Elas podem se resumir em: 1) adaptação fisiológica desde o nascimento até a adolescência e, em seguida, a idade adulta, o que determina a resposta farmacológica (farmacodinâmica e farmacocinética); 2) falta de medicamentos específicos; 3) falta de um método universal para calcular doses pediátricas para cada uma das faixas etárias e de desenvolvimento; 4) falta de ensaios clínicos específicos; 5) doenças específicas das crianças, e 6) presença regular de cuidadores na administração dos medicamentos (CARRANZA e TORREJÓN, 2007).

A população pediátrica apresenta diferenças fisiológicas e psicológicas relativas aos adultos e caracteriza-se por rápido crescimento, desenvolvimento e grande variabilidade na maturação dos diversos órgãos, ao longo da idade. Assim sendo, é imprescindível o trabalho de cooperação entre profissionais para melhorar as necessidades farmacológicas da pediatria (ALBUQUERQUE, 2007).

Mais de 35 anos atrás, o termo “órfãos terapêuticos” foi criado a fim de destacar o fato de as crianças não serem frequentemente incluídas em ensaios clínicos para o desenvolvimento de novos fármacos. Exemplos como malformações congênitas associadas à talidomida, na década de 1960, desenvolvimento de kernicterus (lesão cerebral grave relacionada à hiperbilirrubinemia neonatal) com uso de sulfonamidas em neonatos, “síndrome do bebê cinzento” associado ao uso de cloranfenicol no período neonatal e, mais recentemente, arritmia cardíaca com o uso de cisaprida no tratamento do refluxo gastroesofágico, veem chamando a atenção para a necessidade de regular os estudos e o comércio de medicamentos para crianças, garantindo segurança, eficácia e qualidade. Na Europa, estima-se que apenas 35% de todos os medicamentos comercialmente disponíveis estão licenciados para uso em crianças. Da mesma forma, nos Estados Unidos, até 2003, apenas 20 a 30% dos medicamentos foram aprovados para uso em crianças (SANTOS e HEINECK, 2012).

Assim, por necessidade, os médicos têm rotineiramente administrado medicamentos para crianças *off-label*, o que significa que o fármaco não foi avaliado em crianças nos ensaios clínicos (MEADOWS, 2003). Neste caso, muitas crianças ficam expostas ao risco de receberem doses subterapêuticas ou tóxicas.

Nos hospitais e consultórios médicos, os pediatras escrevem prescrições *off-label* todos os dias com as melhores intenções. Eles fazem uma suposição sobre qual fármaco prescrever e qual seria a dose adequada para uma criança de um

determinado peso e idade, esperando que esteja correto. Porém esta prática com crianças pode apresentar efeitos colaterais inesperados (ANRIG, 2008).

Especialistas dizem que a ausência de estudos para medicamentos pediátricos é devido a uma combinação de razões. A principal razão é que as empresas farmacêuticas geralmente veem as crianças como um mercado que traria apenas pequenos benefícios financeiros, com exceção de fármacos que foram adequadamente estudados em crianças, como vacinas, alguns antibióticos e alguns medicamentos contra a tosse e o resfriado, que tiveram um grande mercado. Além disso é mais difícil realizar estudos em crianças e as questões éticas também são mais rígidas. Por exemplo, enquanto adultos podem dar consentimento para participar de um ensaio clínico, as crianças não podem porque "consentimento" implica compreensão total dos riscos potenciais e outras considerações (MEADOWS, 2003).

Em 1968, Harry Shirkey descreveu como as melhorias nos processos de licenciamento de fármacos, estimuladas por catástrofes como o desastre da talidomida, levaram a melhorias na segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos para pacientes adultos. Para isso criaram a condição onde nenhum medicamento era recomendado para uso em crianças devido à insuficiência de evidências clínicas. Porém esta prática não melhorou a situação devido à utilização indiscriminada dos medicamentos. Isso não reflete a prescrição inadequada, mas a falta de disponibilidade de medicamentos licenciados com evidência para crianças (COROY, 2003).

Embora hoje a maioria dos medicamentos sejam fabricados devido a demandas comerciais, a necessidade de medicamentos especializados e individualizados permanece. Quando um medicamento é removido do mercado por razões financeiras, pode deixar lacunas nas necessidades clínicas dos pacientes. Para suprir essa carência, são necessários materiais de referência para auxiliar no processo de manipulação (TRISSEL, 2009).

3.4 NECESSIDADE DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS PARA PEDIATRIA

Além da escassez de medicamentos, muitas especialidades farmacêuticas comercializadas apresentam forma farmacêutica imprópria para crianças. O uso de medicamentos por via oral em forma líquida justifica-se com base na facilidade de

administração a pacientes que apresentam dificuldade de deglutir, entre eles os pediátricos.

A maioria dos fármacos é formulada para utilização em adultos e frequentemente apresentada nas formas de dosagem sólidas. Para utilização em crianças, faz-se necessário a alteração da forma farmacêutica. A preparação extemporânea não estéril, oral ou tópica que resulta desta reformulação está fora de especificação para aprovação e, portanto, é classificada como um produto não licenciado. A falta de formulações e estudos adequados sobre a segurança na utilização de preparações extemporâneas favorece resultados de tratamento imprevisíveis. A utilização de comprimidos ou cápsulas na preparação de formulações líquidas orais só deve ocorrer quando existirem informações sobre a biodisponibilidade e estabilidade físico-química e microbiológica do produto resultante (SANTOS e HEINECK, 2011). As formulações líquidas apresentam facilidade de melhor ajuste das doses, administração e ingestão mais fácil. Por outro lado, faltam informações sobre estabilidade, já que são menos estáveis que as sólidas e facilmente contamináveis (CARRANZA e TORREJÓN, 2007).

Um estudo desenvolvido em hospital pediátrico da Inglaterra verificou diversos problemas relacionados à falta de medicamentos licenciados para crianças e à manipulação de derivações. Dificuldades como exatidão nas doses, desconhecimento da biodisponibilidade das preparações, uso de excipientes potencialmente tóxicos e carência de acesso a preparações de liberação modificada. Portanto, constatou-se a necessidade de padronizar e licenciar a produção de derivações e formulações especiais para suprir as necessidades (STANDING e TULEU, 2005).

SANTOS e HEINECK (2011) identificaram os medicamentos reformulados pela farmácia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, bem como a disponibilidade de formulações líquidas orais em pediatria. A derivação, alteração da forma de dosagem sólida (comprimidos, pílulas) em forma líquida não estéril (solução oral, xarope ou suspensão oral) correspondeu a 3,8% dos itens avaliados nas prescrições, estando o baclofeno (18,9%) e a furosemida (10,1%) entre os mais solicitados. Estudo realizado em hospital de Fortaleza, apresentou uma listagem de medicamentos adaptados da forma sólida para a líquida, sendo o captopril (41,67%) e a furosemida (29,17%) os mais referidos pelos médicos. A inexistência de formulações líquidas para uso oral foi o problema mais citado pelos médicos (COSTA, LIMA e COELHO, 2009).

Uma revisão sistemática foi realizada em várias bases de dados, no período de 1966 a 2007, analisando o uso de preparações extemporâneas, incluindo as derivações a partir de formas farmacêuticas sólidas. Os dados demonstraram que a falta de medicamentos licenciados disponíveis e formas farmacêuticas adequadas para pacientes pediátricos é um problema generalizado e a prescrição de produtos extemporâneos para atender a essa necessidade é aceita na prática pediátrica. Apesar dos esforços das agências reguladoras de medicamentos, nem todos os medicamentos estarão disponíveis numa dose e forma farmacêutica adequadas, e os farmacêuticos continuarão a preparar esses produtos. Os farmacêuticos precisam ter acesso a informações de estabilidade, compatibilidade e formulação, bem como treinamento apropriado para garantir que os pacientes sejam tratados com preparações de alta qualidade (GIAM e MCLACHLAN, 2008).

A RDC 67/2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a legislação que especifica as condições necessárias para cada grupo de medicamentos, onde o anexo VI normatiza sobre a manipulação das derivações na farmácia magistral. Além disso, preconiza que as derivações são consideradas preparações extemporâneas e devem ser preparadas apenas para 48 horas, se comprovada a estabilidade química.

Dado a situação atual da falta de medicamentos para crianças, é essencial a colaboração entre pediatras, farmacêuticos, indústrias farmacêuticas, universidades e autoridades reguladoras para o seu desenvolvimento e avaliação (ALBUQUERQUE, 2007). A necessidade de derivações irá continuar enquanto os medicamentos não forem aprovados em formas líquidas, sendo uma experiência diária e um desafio para os farmacêuticos e prestadores de cuidados à saúde.

3.5 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Na Farmacopeia Americana (USP) há um método que utiliza a CLAE para a separação de compostos relacionados à tizanidina A, B e C, presentes na matéria-prima e produto acabado. Esse método utiliza detecção em 230 nm, coluna C₁₈ e fase móvel constituída de tampão pentasulfonato de sódio (pH 3,0) e acetonitrila (USP 38, 2015). Na Farmacopeia Japonesa (JP) encontra-se descrito o método para doseamento de cloridrato de tizanidina na matéria-prima por titulação potenciométrica,

utilizando ácido perclórico 0,1 M como titulante. Também apresenta método para determinação de impureza por CLAE, utilizando coluna C₁₈, fase móvel composta por mistura de acetonitrila, água e ácido fórmico, com detecção em 230 nm e 318 nm (THE PHARMACOPOEIA OF JAPAN, 2011). A Farmacopeia Brasileira (FB), na última edição, ainda não contém metodologia recomendada para análise quantitativa de cloridrato de tizanidina.

Há na literatura diversos trabalhos descritos com desenvolvimento e validação de métodos por CLAE para quantificar o cloridrato de tizanidina, além de outros métodos com quantificação simultânea com outros fármacos (Tabela 1).

Tabela 1 - Métodos utilizados para a determinação quantitativa de cloridrato de tizanidina por CLAE.

Coluna	Fase móvel	Deteção	Autores
Hypersil CN	Solução de pareamento iônico:metanol:acetonitrila (50:57:18 v/v)	227 nm	QI, WANG e WANG, 2002
Waters Spherisorb® ODS	1% de trietilamina (pH 2,5): acetonitrila (55:45 v/v)	303 nm	GANDHIMATHI, RAVI e VARGUESE, 2005
Phenomenex® C ₁₈	Metanol:água (53:47 v/v)	228 nm	NALLURI <i>et al.</i> , 2012
Thermo® BDS hypersil C ₁₈	Acetonitrila:tampão fosfato (25 mM, pH 3,5) (60:40 v/v)	293 nm	DUDHE <i>et al.</i> , 2013
Hypersil ODS C ₁₈	Metanol:acetonitrila:tampão fosfato (pH 5,0) (30:60:10 v/v/v)	241 nm	SIVASUBRAMANIAN e DEVARAJAN, 2009
Intersil C ₁₈	Acetonitrila:tampão fosfato (0,02 M, pH 3,5) (60:40 v/v)	240 nm	PURANIK <i>et al.</i> , 2006
Hypersil C ₁₈	Tampão fosfato (pH 7,0): acetonitrila (40:60 v/v)	230 nm	VAIDKA <i>et al.</i> , 2010
Ineretsil C ₁₈	Tampão fosfato (20 mM, pH 3,5): acetonitrila:metanol (30:40:30 v/v/v)	230 nm	KUMAR <i>et al.</i> , 2010
ODS C ₁₈	Metanol:acetonitrila:fosfato de potássio dihidrogenado (pH 3,0) (10:30:60 v/v/v)	274 nm	DHANARAJU <i>et al.</i> , 2010
Phenomenex® Luna C ₁₈	Metanol:água (90:10 v/v)	256 nm	NARAJJI <i>et al.</i> , 2011
ODS C ₁₈	Metanol:água (pH 4,15) (65:35 v/v)	307 nm	NIMJE <i>et al.</i> , 2007
Hypersil C ₁₈	Tampão acetato de amônio (0,1 M, pH 6,0):metanol: acetonitrila (50:30:20 v/v)	232 nm	RAMAA <i>et al.</i> , 2006
Kromasil® C ₁₈	Tampão fosfato (pH 5,5): metanol (45:55 v/v)	235 nm	KAUL <i>et al.</i> , 2005

Outras técnicas cromatográficas foram desenvolvidas para determinação de cloridrato de tizanidina. MAHADIK e colaboradores (2003) desenvolveram um método indicativo de estabilidade por cromatografia em camada delgada de alta performance, com surgimento de produto de degradação oxidativo. KAUL e colaboradores (2005) desenvolveram simultaneamente método por cromatografia em camada delgada de alta performance e CLAE para análise de tizanidina e rofecoxib. VIJAYAKUMAR e

colaboradores (2010) isolaram e caracterizaram impureza de cloridrato de tizanidina através da técnica por CLAE preparativa. Também há método de determinação de tizanidina em plasma humano por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (NIROGI *et al.*, 2006).

ASHRAF, KHALID e MOHAMED (2016) propuseram um estudo comparativo de diferentes abordagens para a determinação da tizanidina na presença de seu produto de degradação oxidativo.

Métodos de espectrofotometria na região do UV/VIS para a quantificação de cloridrato de tizanidina em matéria-prima e produto acabado também foram descritos (SUJATHA *et al.*, 2003; SIVASUBRAMANIAN e DEVARAJAN, 2009; PALADUGU *et al.*, 2013).

3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação é o processo onde comprova-se que o método analítico é aceitável para a finalidade pretendida. Por isso, cabe ao analista referir-se a documentos e guias regulatórios, tornando-se primordial ter definições claras dos diferentes critérios de validação utilizados (ROZET *et al.*, 2007).

No contexto geral, a validação do método é um processo que consiste em pelo menos cinco etapas distintas: qualificação do sistema, amostragem, preparação da amostra, análise e avaliação dos dados (ARAUJO, 2009).

Os parâmetros a serem avaliados estão relacionados com o tipo e uso pretendido da metodologia analítica. Os métodos são classificados nas seguintes categorias: testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (categoria I), testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas (categoria II), testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo) (categoria III) e testes de identificação (categoria IV) (BRASIL, 2003; USP 38, 2015).

Os métodos analíticos são determinantes para assegurar a qualidade e segurança de produtos farmacêuticos, estando as técnicas cromatográficas entre as mais empregadas para a avaliação.

3.6.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A técnica cromatográfica foi desenvolvida originalmente pelo botânico russo Michael Tswett, em 1903, sendo atualmente a CLAE a técnica analítica de escolha na indústria farmacêutica para a realização do controle de qualidade de seus produtos e a mais preconizada pelos Códigos Oficiais (GUPTA *et al.*, 2012; WATSON, 2012).

A CLAE foi derivada da cromatografia em coluna clássica e é uma das ferramentas mais importantes da química analítica no momento atual. É uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; GUPTA *et al.*, 2012).

Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, os quais dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e vazão da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A técnica adquiriu relevância em estudos de estabilidade, devido à sua capacidade de alta resolução, sensibilidade e especificidade. Além disso, compostos não voláteis e termicamente instáveis também podem ser analisados por CLAE (BAKSHI e SINGH, 2002).

Nas últimas três décadas, ocorreu o desenvolvimento de vários detectores espectrofotométricos que operam em comprimento de onda variável e houve um aumento de utilização de detectores eletroquímicos, por fluorescência, bem como o acoplamento com espectrômetro de massas. Com eles, tornou-se possível a detecção de uma faixa mais ampla de compostos e a análise de compostos em baixas concentrações presentes em amostras complexas (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). O detector de arranjo de fotodiodos (DAD) com a absorvância medida em função do tempo de retenção e do comprimento de onda, fornece maior margem para analisar a pureza do pico em comparação com a detecção de um único comprimento de onda (WIBERG *et al.*, 2004).

Além disso, a técnica continua em avanço devido às inovações em materiais de empacotamento de colunas, *softwares* e inclusão de técnicas analíticas hifenizadas.

3.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE

A estabilidade pode ser definida como a capacidade de uma formulação, em determinado material de acondicionamento, manter suas características químicas, físicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas por um período definido (O'DONNELL e BOKSER, 2013).

Alguns fármacos são suscetíveis à degradação química sob várias condições devido à fragilidade da sua estrutura molecular. Outros sofrem alterações de degradação física, levando a mudanças no seu estado físico. A degradação de medicamentos pode alterar os seus efeitos farmacológicos, resultando em alteração da eficácia terapêutica, bem como em consequências toxicológicas. Uma vez que os produtos farmacêuticos são utilizados com base na sua eficácia e segurança, eles devem ser estáveis e manter a sua qualidade até o momento da utilização ou até a sua data de validade (YOSHIOKA e STELLA, 2000).

A forma mais facilmente compreendida e mais estudada de instabilidade de fármacos é através de reação química que resulta na redução da potência. A perda da potência é reconhecida como má qualidade do produto e é apenas uma das muitas razões para investigar o fármaco. A identificação de produtos formados proporciona uma melhor compreensão dos mecanismos destas reações químicas, bem como outras informações valiosas (YOSHIOKA e STELLA, 2000).

As degradações podem ocorrer por diversos motivos, entre eles pH, catalisadores, concentração de reagentes e temperatura. A velocidade e a ordem dessas reações são definidas e para classificá-las são necessários estudos de cinética química, que podem ser classificados como ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2010).

Alguns estudos sobre a estabilidade de cloridrato de tizanidina estão relatados na literatura. MAHADIK e colaboradores (2003) desenvolveram um método indicativo de estabilidade por cromatografia em camada delgada de alta performance para cloridrato de tizanidina. As amostras foram expostas à degradação ácida, básica, oxidativa e frente à luz solar. Os resultados demonstraram sensibilidade do fármaco frente a oxidação (H_2O_2 30%, refluxo e banho-maria em ebulição por 6 horas), com surgimento de produto de degradação oxidativo e efetiva separação em relação ao fármaco. QI e colaboradores (2002) desenvolveram e validaram método por CLAE indicativo de estabilidade para tizanidina. As amostras foram expostas a condições de

degradação e deixadas em repouso à temperatura ambiente ou aquecidas a 90° C durante 30 minutos ou mais. As amostras foram degradadas até níveis em que o teor de tizanidina fosse reduzido para 90%, para demonstrar a capacidade do método em separar o fármaco dos produtos de degradação.

Um outro trabalho descreve a estabilidade de cloridrato de tizandina através de desenvolvimento e validação de método por CLAE com detector *Charged Aerosol Detection* (CAD), onde foi obtido um produto de degradação na condição de degradação de estresse oxidativo (H₂O₂ 13% por 72 horas) (BRANSALISE, 2012). A degradação oxidativa (H₂O₂ 3% e refluxo a 100 °C por 4 horas) do cloridrato de tizanidina também foi avaliada através de método espectrofotométrico por ASHRAF, KHALID e MOHAMED, 2016.

A degradação de um produto pode gerar inúmeras alterações e por isso torna-se importante avaliar a estabilidade do mesmo, garantindo que o produto atenda suas especificações durante todo o período de armazenamento. Considerando essas informações e com o propósito de expandir o conhecimento de estabilidade, decidiu-se determinar a estabilidade das derivações de cloridrato de tizanidina e a cinética de degradação do fármaco.

**4. CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA**

4.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos apropriados é essencial para que o controle de qualidade possa garantir a segurança, eficácia e qualidade dos produtos farmacêuticos. Conseqüentemente, antes de um método ser implementado na rotina, ele deve primeiramente ser validado para demonstrar que é adequado para a finalidade pretendida (ROZET *et al.*, 2007).

Para assegurar que o método gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser avaliado através da validação, por meio de um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento (RIBANI *et al.*, 2004). A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Portanto, deve ser considerada como parte de um conceito integrado para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos (ERMER, 2001).

A Farmacopeia Americana (USP 38, 2015), o *Internacional Conference on Harmonization* (ICH, 2005) e a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (RE 899) relatam os parâmetros analíticos que devem ser avaliados para a validação de um método, pertencendo ao analista selecionar os parâmetros relevantes para cada método. Deve-se levar em conta as propriedades físico-químicas do fármaco, a forma farmacêutica e a finalidade da metodologia analítica.

Inúmeras metodologias para fins quantitativos de fármacos, tanto matérias-primas como produtos farmacêuticos, encontram-se estabelecidas em compêndios oficiais, bem como o limite de variação aceitável. O método escolhido para efetuar o doseamento de cloridrato de tizanidina foi a CLAE com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta e baseou-se em trabalhos anteriormente descritos na literatura.

Nos últimos 40 anos, a CLAE tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios de indústrias químicas e farmacêuticas, em áreas médicas e em muitos outros campos da ciência (MALDANER e JARDIM, 2009). Combinada com detectores de UV/VIS, é o método mais comumente utilizado na análise farmacêutica e fornece um método preciso, exato e robusto para a análise quantitativa dos produtos farmacêuticos (WATSON, 2012). É uma técnica que possibilita realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de

compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com eficiência, resolução e detectabilidade (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Na literatura há métodos analíticos desenvolvidos para a análise de cloridrato de tizanidina, além de métodos concomitante com outros fármacos, por CLAE. Estes trabalhos foram descritos na revisão bibliográfica deste trabalho.

O objetivo deste capítulo foi desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade por CLAE para determinação de cloridrato de tizanidina em derivação farmacêutica, a partir de comprimidos. Os parâmetros avaliados no processo foram especificidade, linearidade, limite de quantificação e limite de detecção, precisão, exatidão e robustez conforme os guias disponíveis.

4.2 MATERIAIS

4.2.1 PRODUTO FARMACÊUTICO E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

Comprimidos contendo 2 mg de cloridrato de tizanidina, com o nome comercial de Sirdalud®, fabricados pelo laboratório Novartis, lote 1601363, fabricação 01/2016 e validade 12/2017. Excipientes: lactose, ácido esteárico, dióxido de silício e celulose microcristalina.

Substância química de referência (SQR) de cloridrato de tizanidina, com teor de pureza de 99,8%, identificada pelo lote nº GOM166, adquirida da Farmacopeia Americana por intermédio da LAS do Brasil.

4.2.2 SOLVENTES E REAGENTES

- Ácido orto-fosfórico 85% grau analítico, Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil;
- Água purificada, Direct-Q3UV, Millipore®, Molsheim, France;
- Metanol grau cromatográfico, Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil;
- Trietilamina grau analítico, Tedia®, Fairfield, Estados Unidos;
- Hidróxido de sódio, Nuclear®, Diadema, Brasil;
- Ácido clorídrico 37%, Neon®, São Paulo, Brasil;

- Peróxido de hidrogênio 30%, Fmaia®, Belo Horizonte, Brasil.

4.2.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Coluna cromatográfica Phenyl Zorbax Eclipse XBD Agilent® (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), Estados Unidos;
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu 20A, equipado com controlador CBM-20A, bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20 AC, forno CTO-20AC, detector PDA SPD-M20A e software utilizado para controle e aquisição dos dados LC-solution, Shimadzu®, Japão;
- Estufa DeLeo®, Brasil;
- Potenciômetro Digimed®, modelo DM-20, Brasil;
- Banho de ultrassom Unique®, modelo USC 2850, Brasil;
- Balança analítica AND®, modelo HM – 202, Japão;
- Espectrofotômetro UV-VIS, Shimadzu®, modelo UV-1800, Japão;
- Câmara de radiação com lâmpada UV-A (352 nm) e câmara de radiação com lâmpada UV-C (254 nm) (100 cmx18 cmx17 cm), Ecolume®, Estados Unidos.

4.3 MÉTODO

4.3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As condições estabelecidas para análise de cloridrato de tizanidina, através do método por CLAE, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições cromatográficas para execução do método por CLAE.

Parâmetros	Descrição
Coluna	Phenyl Zorbax Eclipse XBD Agilent® (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Temperatura	25 °C
Fase móvel	metanol:água:triethylamina (50:50:0,5 v/v/v), pH 3,5
Vazão	0,6 mL/min
Detecção	227 nm
Volume de Injeção	20 µL

A fase móvel aquosa foi preparada adicionando-se 0,5% de trietilamina à água purificada, ajustando-se o pH da solução para 3,5 com ácido orto-fosfórico 10%. Todas as amostras foram filtradas em membrana com porosidade de 0,45 µm antes de serem analisadas.

4.3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação foi conduzida de acordo com o ICH (2005), Farmacopeia Americana (USP 38, 2015) e resolução RE 899/03. Os parâmetros de validação avaliados foram: especificidade, linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

4.3.2.1 ESPECIFICIDADE

A especificidade do método analítico foi determinada pela análise da amostra placebo e pelo estudo de degradação forçada da amostra do fármaco, com o objetivo de propor um método indicativo de estabilidade. O fármaco foi submetido a condições de hidrólise ácida, básica, fotólise, oxidação e temperatura. Todas as amostras foram comparadas com uma amostra controle e a pureza do pico foi verificada através da ferramenta disponível no software do equipamento.

- **Preparo da solução amostra**

Foi determinado o peso médio de 20 comprimidos, conforme a FB. Os comprimidos foram triturados até a formação de um pó homogêneo. Pesou-se do pó, o equivalente a 20,0 mg de cloridrato de tizanidina e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de 90 mL de água. A suspensão foi submetida a banho de ultrassom por 2 minutos. Completou-se o volume com água, homogeneizou-se e filtrou-se a solução em papel filtro, obtendo-se a solução estoque com concentração de 200,0 µg/mL. Alíquota de 3,0 mL do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração final de 30,0 µg/mL.

- **Preparo da solução placebo**

Pesou-se quantidade de excipiente (lactose 62,5%, ácido esteárico 2%, dióxido de silício 0,5% e celulose microcristalina 35%) equivalente a 20,0 mg de cloridrato de tizanidina e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se aproximadamente 90 mL de água e colocou-se em banho de ultrassom por 2 minutos. Completou-se o volume com água, homogeneizou-se e filtrou-se a solução em papel filtro. Alíquota de 3,0 mL do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com água.

O excipiente foi produzido de acordo com a composição indicada na bula do medicamento Sirdalud®, nas quantidades recomendadas pelo Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE *et al.*, 2012).

- **Hidrólise ácida**

Transferiu-se alíquota de 10,0 mL da solução estoque de cloridrato de tizanidina (200,0 µg/mL) para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com HCl 0,1 M. Após 72 horas, retirou-se alíquota de 6,0 mL para balão volumétrico de 20 mL, neutralizou-se com NaOH 0,1 M e completou-se o volume com água.

- **Hidrólise básica**

Transferiu-se alíquota de 10,0 mL da solução estoque de cloridrato de tizanidina (200,0 µg/mL) para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com NaOH 0,1 M. Após 72 horas, retirou-se alíquota de 6,0 mL para balão volumétrico de 20 mL, neutralizou-se com HCl 0,1 M e completou-se o volume com água.

- **Fotólise (luz UV-A)**

Transferiu-se alíquotas de 2,0 mL da solução estoque de cloridrato de tizanidina (200,0 µg/mL) para cubetas de plástico. A amostra foi exposta a câmara de radiação com lâmpada UV-A emitindo radiação a 352 nm. Após 72 horas, retirou-se alíquota de 3,0 mL para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com água. Preparou-se uma solução controle sob as mesmas condições e protegida da luz.

- **Fotólise (luz UV-C)**

Transferiu-se alíquotas de 2,0 mL da solução estoque de cloridrato de tizanidina (200,0 µg/mL) para cubetas de plástico. A amostra foi exposta a câmara de radiação com lâmpada UV-C emitindo radiação a 254 nm. Após 72 horas, retirou-se alíquota de 3,0 mL para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com água. Preparou-se uma solução controle sob as mesmas condições e protegida da luz.

- **Oxidação**

Transferiu-se alíquota de 10,0 mL da solução estoque de cloridrato de tizanidina (200,0 µg/mL) para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com peróxido de hidrogênio 3%. Após 72 horas, retirou-se alíquota de 6,0 mL para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com água.

- **Temperatura**

Transferiu-se alíquota de 10,0 mL da solução estoque de cloridrato de tizanidina (200,0 µg/mL) para estufa e manteve-se a 60 °C. Após 72 horas, retirou-se

alíquota de 3,0 mL para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com água.

4.3.2.2 LINEARIDADE

- **Preparo da solução SQR**

Pesou-se o equivalente a 5,0 mg da SQR de cloridrato de tizanidina e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com água, obtendo-se a solução estoque com concentração de 200,0 µg/mL. Alíquota de 3,0 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 20 mL. Completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração final de 30,0 µg/mL.

Para o preparo da curva padrão, foram transferidas alíquotas de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; e 4,5 mL da solução com concentração de 200,0 µg/mL para balões de 20 mL. Os volumes foram completados com água, obtendo-se soluções com concentrações de 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0 e 45,0 µg/mL. As curvas foram preparadas em triplicata e os dados foram estatisticamente avaliados através da análise de variância (ANOVA).

4.3.2.3 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os LD e LQ foram estimados através do desvio padrão da resposta e da razão sinal/ruído. Considerando o método de desvio padrão da resposta, foram calculados a partir de fórmulas descritas na RE 899/03, baseadas no desvio padrão do intercepto (Dpa) e na inclinação da curva padrão (IC), segundo as equações a seguir:

$$LD = (Dpa \times 3) / IC$$

$$LQ = (Dpa \times 10) / IC$$

A razão sinal/ruído foi experimentalmente determinada através da análise de soluções diluídas da solução SQR de cloridrato de tizanidina, em triplicata, para encontrar a concentração do fármaco cujo sinal correspondesse a 3 vezes o ruído da linha de base para o LD e 10 vezes o ruído da linha de base para o LQ, com precisão e exatidão.

4.3.2.4 PRECISÃO

Preparou-se solução amostra contendo 30,0 µg/mL de cloridrato de tizanidina, conforme descrito no item 4.3.2.1 e preparou-se solução SQR contendo 30,0 µg/mL de cloridrato de tizanidina, conforme descrito no item 4.3.2.2.

Para a amostra foi realizada a determinação no mesmo dia (n=6), a fim de avaliar a repetibilidade (precisão intradia) e em diferentes dias (n=3), a fim de avaliar a precisão intermediária (precisão interdia) do método. A concentração de cloridrato de tizanidina nas amostras foi obtida através da seguinte equação:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

C_A = Concentração de cloridrato de tizanidina nas amostras

A_A = Área média da amostra

C_{SQR} = Concentração da SQR

A_{SQR} = Área média da SQR

O teor de cloridrato de tizanidina nas amostras foi calculado pela equação abaixo:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

$C_A\%$ = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de cloridrato de tizanidina encontrado na amostra

C_T = Concentração teórica de cloridrato de tizanidina na amostra

4.3.2.5 EXATIDÃO

Preparou-se solução estoque da amostra contendo 200,0 µg/mL de cloridrato de tizanidina, conforme descrito no item 4.3.2.1. Alíquotas de 3,0 mL foram transferidas para balões volumétricos de 20 mL, denominados R₁, R₂, R₃. A cada balão volumétrico acrescentou-se, respectivamente, 0,5; 1,0; e 1,5 mL da solução estoque da SQR contendo 200,0 µg/mL de cloridrato de tizanidina, preparada conforme descrito no item 4.3.2.2, e completou-se o volume com água. Obteve-se soluções com

concentrações finais de 35,0; 40,0; e 45,0 µg/mL de cloridrato de tizanidina. Preparou-se solução amostra e solução SQR de 30,0 µg/mL, denominadas de A e P.

As soluções denominadas de R₁, R₂ e R₃ foram preparadas em triplicata e para cada solução foram realizadas três análises. A Tabela 3 representa o preparo das soluções para o estudo de exatidão.

Tabela 3 - Preparo das soluções para o estudo de exatidão de cloridrato de tizanidina por CLAE.

Soluções	Volume (mL) da solução amostra (200,0 µg/mL) *	Volume (mL) da solução SQR (200,0 µg/mL) *	Concentração final (µg/mL)
A	3,0	-	30,0
P	-	3,0	30,0
R ₁	3,0	0,5	35,0
R ₂	3,0	1,0	40,0
R ₃	3,0	1,5	45,0

*Alíquotas adicionadas em balões volumétricos de 20 mL.

As porcentagens de recuperação (R%) foram calculadas pela equação:

$$R\% = [(C_A - C_{NA}) / C_{SQR}] \cdot 100$$

C_A = Concentração de cloridrato de tizanidina encontrada na amostra adicionada de SQR

C_{NA} = Concentração de cloridrato de tizanidina encontrado na amostra não adicionada de SQR

C_{SQR} = Concentração da SQR adicionada à amostra

4.3.2.6 ROBUSTEZ

A robustez do método foi avaliada por pequenas modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, como alteração do pH da fase aquosa de 3,5 para 3,0 e 4,0, mudança na proporção da fase móvel com variação da fase orgânica de 50% para 48 e 52%, alteração da vazão de 0,6 mL/min para 0,5 e 0,7 mL/min, comprimento de onda de 227 nm para 225 e 229 nm e troca da coluna Phenyl Zorbax Eclipse XBD Agilent® (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) para a coluna Phenyl Shim-pack CLC Shimadzu®

(250 mm x 4,6 mm x 5 µm). Realizou-se o cálculo do teor para verificar a influência das modificações sobre o método.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, os parâmetros analíticos foram estudados para demonstrar que o método é confiável para a quantificação do fármaco. Considerando trabalhos anteriores que descrevem métodos para análise de cloridrato de tizanidina por CLAE, o foco foi desenvolver um método simples, utilizando colunas e solventes disponíveis, que podem facilmente serem empregados no controle de qualidade de rotina.

Primeiramente, a solubilidade de cloridrato de tizanidina foi testada com o uso dos solventes água e metanol. Ambos solventes se mostraram adequados, uma vez que dissolveram facilmente o fármaco. Devido à água e o metanol serem solventes polares, conseqüentemente, são solventes adequados para a solubilização de aminas que são compostos polares. Optou-se por utilizar a água por tratar-se do solvente utilizado no preparo das derivações, além de ser atóxico e de baixo custo.

Posteriormente, definiu-se o comprimento de onda a ser utilizado, através da varredura no espectro do ultravioleta, demonstrando que o cloridrato de tizanidina absorve intensamente em 227 nm. O espectro da solução amostra de cloridrato de tizanidina, diluída em água, na concentração 30,0 µg/mL, está apresentado na Figura 2.

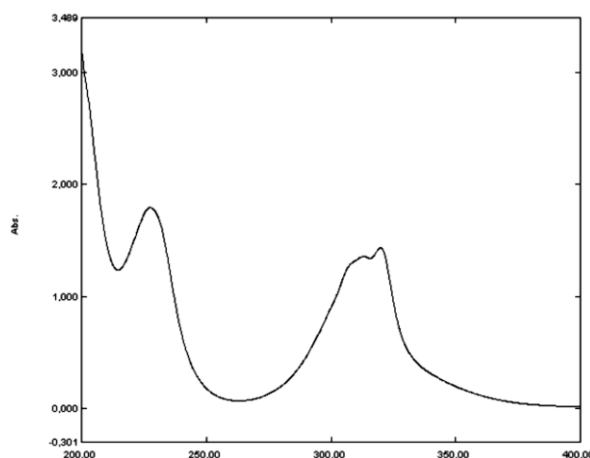


Figura 2 - Espectro de absorção no ultravioleta da solução amostra de cloridrato de tizanidina em água, na concentração de 30,0 µg/mL.

Investigou-se diferentes tempos de extração com o uso de agitador mecânico e banho de ultrassom. Demonstrou-se que o uso de agitador mecânico foi desnecessário e o tempo de extração com banho de ultrassom de 2 minutos foi apropriado.

Durante o desenvolvimento do método, testaram-se diferentes colunas (C_{18} , C_8 e Phenyl), de diferentes fabricantes e diversas composições de fase móvel, variando-se porcentagem entre metanol:água e acetonitrila:água utilizando ou não trietilamina, em diferentes proporções, vazões e valores de pHs.

No desenvolvimento do método proposto empregou-se inicialmente coluna cromatográfica C_{18} , devido ao seu maior uso envolvendo cloridrato de tizanidina em artigos, descritos na Tabela 1, na Farmacopéia Americana (USP 38, 2015) e na Farmacopéia Japonesa (THE PHARMACOPOEIA OF JAPAN, 2011).

Em uma fase prévia, utilizando a coluna C_{18} Luna Phenomenex® (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), com fase móvel metanol:água na proporção 50:50 (v/v) e vazão 1,0 mL/min, foi possível obter eluição em 3,1 minutos de análise, com alargamento do sinal cromatográfico e número de pratos teóricos com valor insatisfatório. Com o ajuste do pH da fase móvel para 3,5 ou 8,0 com o uso de solução de ácido ortofosfórico 10% ou solução de NaOH 0,1 M respectivamente, o pico apresentou-se mais afilado, porém eluiu próximo ao tempo morto do sistema e os parâmetros cromatográficos não foram apropriados. Com a substituição do metanol por acetonitrila na fase móvel, obteve-se resultados semelhantes e, portanto, inadequados também.

Empregando-se a coluna C_{18} Zorbax Eclipse Plus Agilent® (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m), com as mesmas fases móveis utilizados na coluna anterior, conseguiu-se resultados aproximados. Como o tempo de eluição permaneceu reduzido, tentou-se alterar a fase móvel metanol:água na proporção de 50:50 (v/v) pH 3,5, vazão 1,0 mL/min para a proporção 40:60 (v/v). O aumento da proporção de água na fase móvel aumentou o tempo de eluição do fármaco de 1,6 para 1,7 minutos e a tentativa de alterar a vazão de 1,0 mL/min para 0,7 mL/min, deslocou a eluição de 1,6 para 2,3 minutos.

Com os resultados insatisfatórios obtidos com as colunas C_{18} , a primeira modificação foi alterar o tipo coluna. Como segunda opção utilizou-se a coluna C_8 , considerada também coluna de fase reversa, porém com menor número de carbonos ligados. Assim, utilizando-se a coluna C_8 Luna Phenomenex® (250 mm x 4,6 mm x

5 μ m), a eluição ocorreu em 2,7 minutos para a fase móvel metanol:água na proporção de 50:50 (v/v) pH 3,5, vazão 1,0 mL/min. Então, novamente alterou-se as proporções da fase móvel e vazão afim de otimizar a eluição do pico. Como a coluna C₈ também não apresentou resultados satisfatórios, incluindo eficiência e simetria, optou-se por utilizar uma coluna com empacotamento diferente.

A coluna Phenyl Zorbax Eclipse XBD Agilent® (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), também de fase reversa e menos apolar às demais, apresentou como resultado promissor a fase móvel constituída por metanol:água:triethylamina na proporção 50:50:0,5 (v/v/v) pH 3,5, vazão 0,6 mL/min e tempo de eluição de cloridrato de tizanidina de 5,8 minutos. Da mesma maneira, com o propósito de otimizar os parâmetros cromatográficos, testaram-se diferentes proporções de fase orgânica e aquosa. O cromatograma obtido com a coluna Phenyl está apresentado na Figura 3.

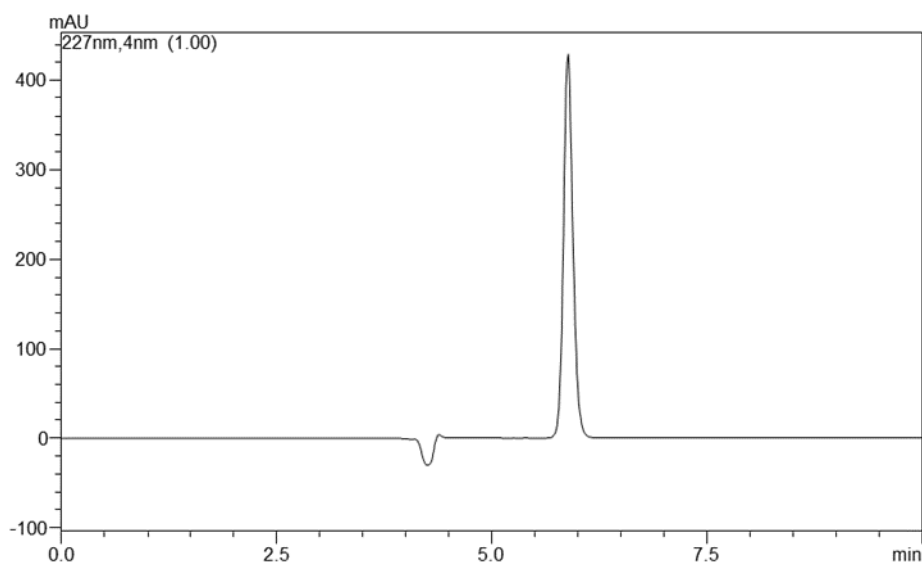


Figura 3 - Cromatograma da solução amostra de cloridrato de tizanidina na concentração de 30,0 μ g/mL. Condições cromatográficas: Coluna Phenyl Zorbax Eclipse XBD Agilent® (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m); fase móvel: metanol:água:triethylamina 50:50:0,5 (v/v/v) pH 3,5; vazão: 0,6 mL/min; detecção 227 nm e temperatura de 25 °C.

Alterações testadas no decorrer do desenvolvimento do método iniciaram com a possibilidade de retirar a triethylamina, porém a supressão da triethylamina ocasionou excessivo alargamento do sinal cromatográfico, resultando em aumento do fator cauda sem a adição da base (1,19 para 2,54).

A partir dos resultados dessas alterações na constituição da fase aquosa, decidiu-se manter a adição de 0,5% de trietilamina para obter boa simetria e ajuste do pH para 3,5. A fase móvel metanol:água:trietilamina 50:50:0,5 (v/v/v) pH 3,5 mostrou-se adequada, proporcionando um tempo de retenção reproduzível e boa eficiência.

Cabe ressaltar que o baixo consumo de solvente orgânico desta fase móvel colabora com o meio ambiente.

Na avaliação da pureza do pico com o uso do DAD, foi indicada a ausência de impurezas no pico de cloridrato de tizanidina (Figura 4).

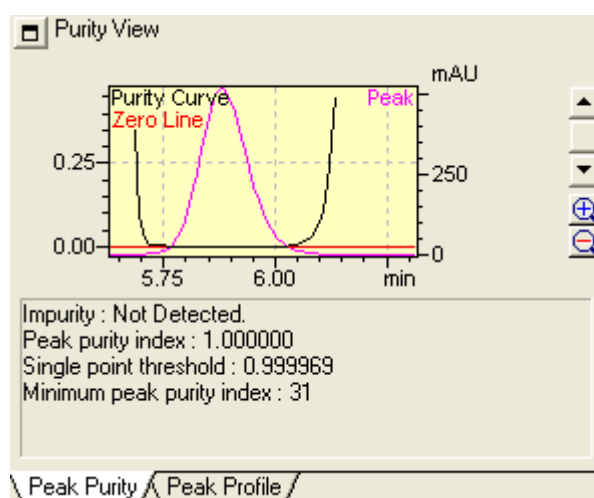


Figura 4 - Pureza apresentada para a solução amostra de cloridrato de tizanidina, indicando a pureza total do pico do fármaco de 1,000000.

Na Tabela 4 estão descritos os resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos pelo método cromatográfico.

Tabela 4 - Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos durante o desenvolvimento do método analítico por CLAE.

Fase móvel	Tempo de retenção (minutos)	Fator de retenção	Pratos teóricos	Fator cauda
metanol:água: trietilamina 50:50:0,5 (v/v/v), pH 3,5	5,8	2,1	11568,72	1,19

Para ser considerado específico, um método analítico deve ser capaz de julgar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes

(excipientes, produtos de degradação, impurezas) que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A especificidade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse e se não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão altamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

A avaliação da especificidade do método foi executada pela comparação de uma solução preparada com os excipientes com uma solução amostra de cloridrato de tizanidina e submetendo-se a amostra à degradação forçada. No cromatograma da Figura 5 pode-se observar que não há interferência dos excipientes no tempo de eluição de cloridrato de tizanidina.

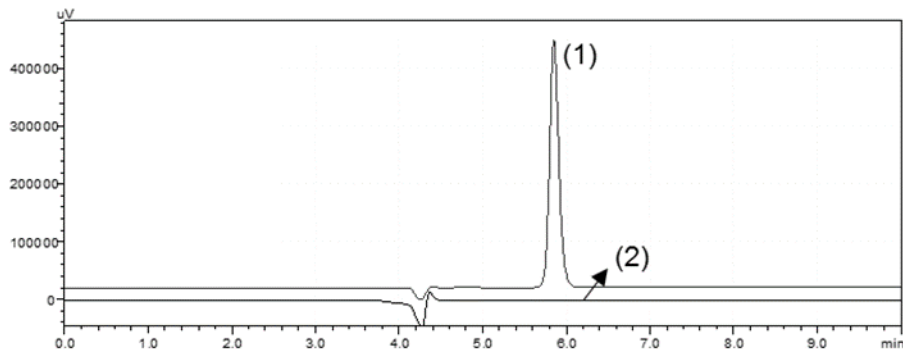


Figura 5 - Cromatogramas obtidos da solução amostra de cloridrato de tizanidina na concentração 30,0 µg/mL (1) e da solução placebo (2).

Nos cromatogramas da amostra de cloridrato de tizanidina, ao ser submetida à hidrólise ácida em HCl 0,1M, frente à luz UV-A (352 nm), à oxidação com peróxido de hidrogênio 3% e à temperatura de 60 °C, todas por 72 horas, não foram detectados picos de produtos de degradação. Quando o cloridrato de tizanidina foi submetido à hidrólise alcalina em NaOH 0,1M e frente à luz UV-C (254 nm), ambas por 72 horas, a reação de degradação foi evidenciada e ocorreram a formação de picos adicionais (em 5,5 minutos na hidrólise alcalina e 6,3 minutos na luz UV-C), indicando que o cloridrato de tizanidina pode ser considerado um fármaco fotossensível e que exhibe sensibilidade frente a condições alcalinas, sugerindo produtos de degradação com grupamentos cromóforos em sua estrutura (Figura 6).

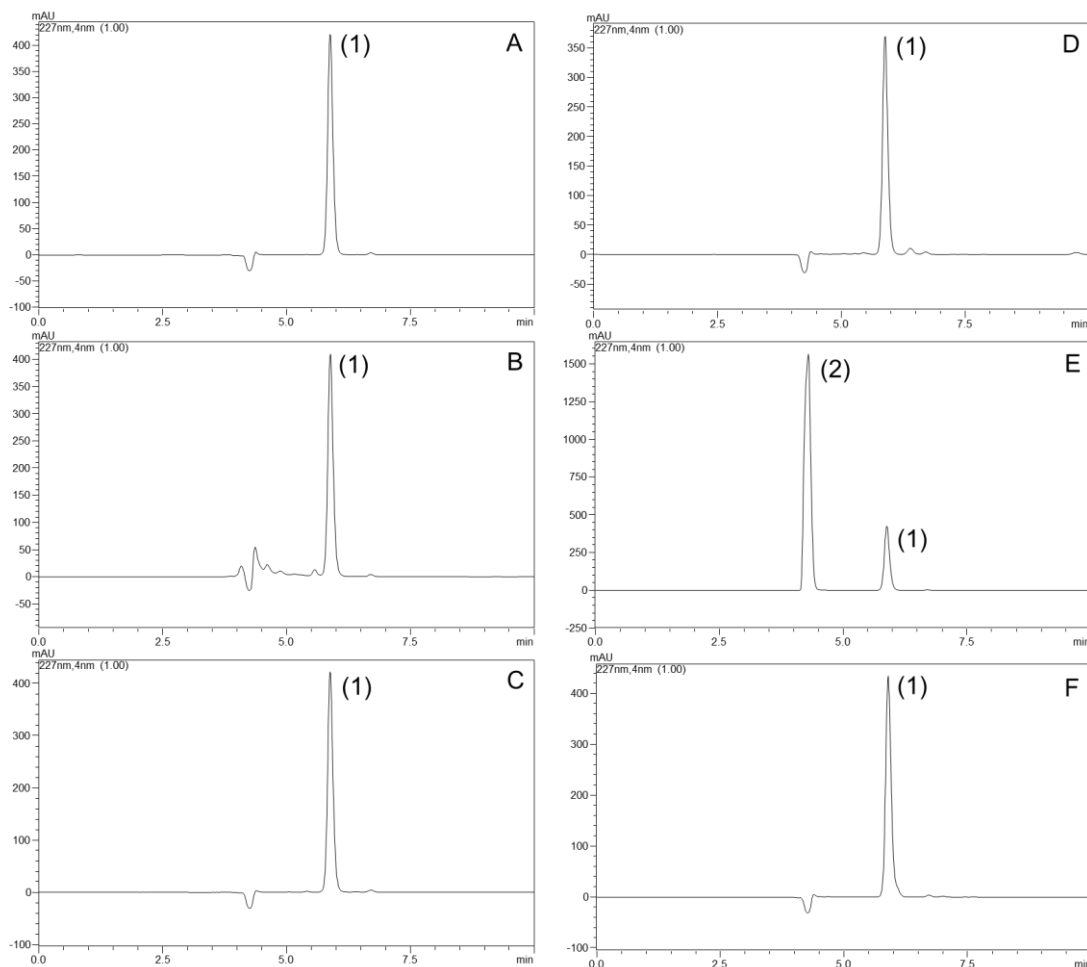


Figura 6 - Cromatogramas das degradações forçadas da amostra de cloridrato de tizanidina (1) após ser submetida à hidrólise ácida em HCl 0,1 M (A), à hidrólise alcalina em NaOH 0,1 M (B), após exposição à luz UV-A (352 nm) (C), após exposição à luz UV-C (254 nm) (D), à oxidação com peróxido de hidrogênio 3% (2) (E) e à temperatura de 60 °C (F), todas por 72 horas.

Após 72 horas de exposição aos agentes de degradação, observou-se redução nas áreas dos picos de cloridrato de tizanidina de 25,13% frente à luz UV-C e 5,53% quando submetido à hidrólise alcalina, com surgimento de picos adicionais. As resoluções entre o fármaco e os picos de degradações foram de 2,3 e 1,6 para a exposição à luz UV-C e hidrólise alcalina, respectivamente. A análise dos cromatogramas de degradação da amostra e a aplicação da pureza do pico demonstraram que o cloridrato de tizanidina permaneceu com elevada pureza em todas as situações, permitindo concluir que os produtos de degradação se encontram bem resolvidos em relação ao fármaco e não interferem na sua quantificação. De acordo com COLLINS, BRAGA e BONATO (2006), a análise quantitativa robusta

requer que a resolução para desenvolvimentos de métodos por CLAE seja maior que 1,5. Baseado nos resultados obtidos sugere-se que o método possui especificidade, podendo ser utilizado como indicativo de estabilidade.

O gráfico de concentração *versus* área foi plotado e mostrou linearidade adequada na faixa de 15,0 a 45,0 µg/mL (Figura 7). Para fins de quantificação, a faixa de variação deve abranger de 80 a 120% da concentração de trabalho. A faixa de variação empregada nesse estudo foi de 50 a 150% da concentração de trabalho.

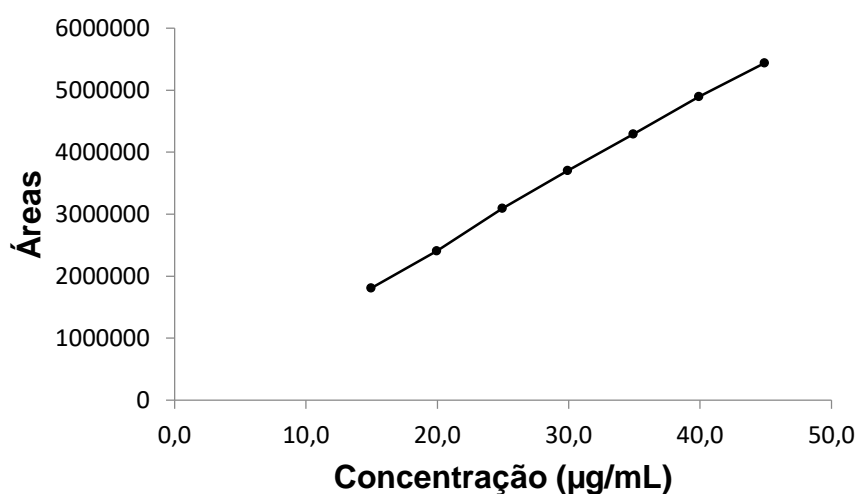


Figura 7 - Representação gráfica da curva padrão de cloridrato de tizanidina através do método por CLAE.

A Tabela 5 apresenta os resultados sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão.

Tabela 5 - Resultados da curva padrão para o método por CLAE.

Parâmetros	Resultados
Faixa da linearidade	15,0 – 45,0 µg/mL
Equação: $y = ax + b$	$y = 122215x + 2904,3$
Coefficiente de correlação (r)	0,9996

Os resultados da avaliação da linearidade do método demonstraram que as soluções SQR de cloridrato de tizanidina apresentam coeficiente de correlação de 0,9996 e coeficiente de determinação (r^2) de 0,9992, ou seja, 99,92% da variação da área pode ser explicada pelo acréscimo da concentração. Há uma forte relação entre

a concentração do fármaco e a resposta da área do pico. Na estatística do intercepto, o valor de P foi maior que 0,05 ($P= 0,95$), demonstrando que o intercepto não difere estatisticamente da origem. A ANOVA efetuada sobre os valores de área da curva padrão de cloridrato de tizanidina, demonstra regressão linear significativa, não havendo desvio de linearidade para um nível de significância de 5%, comprovando a linearidade do método. Os valores estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de variância das áreas determinadas para obtenção da curva padrão de cloridrato de tizanidina por CLAE.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variâncias	F calculado	F tabelado
Entre	6	$3,12 \cdot 10^{13}$	$5,21 \cdot 10^{12}$	81	2,85
Regressão linear	1	$3,12 \cdot 10^{13}$	$3,12 \cdot 10^{13}$	488	4,60
Desvio de linearidade	5	$2,68 \cdot 10^{10}$	$5,36 \cdot 10^{09}$	0,08	2,96
Resíduo	14	$8,96 \cdot 10^{11}$	$6,40 \cdot 10^{10}$		
Total	20	$3,21 \cdot 10^{13}$			

A partir dos dados da ANOVA pode-se concluir que a regressão linear foi significativa, com $F= 488$ e que não ocorreu desvio de linearidade, dado que o F calculado (0,08) para esta fonte de variação foi menor que o F tabelado (2,96).

Os resíduos constituem a diferença entre os valores experimentais e os valores preditos pela equação da reta, apresentando uma estimativa de erro da regressão. A análise dos resíduos não apresentou nenhum padrão de distribuição, dispondo-se aleatoriamente e sem tendência. A Figura 8 demonstra que a variação dos resíduos não ultrapassou o intervalo -2,00 e +2,00, caracterizando que não há valores *outliers*.

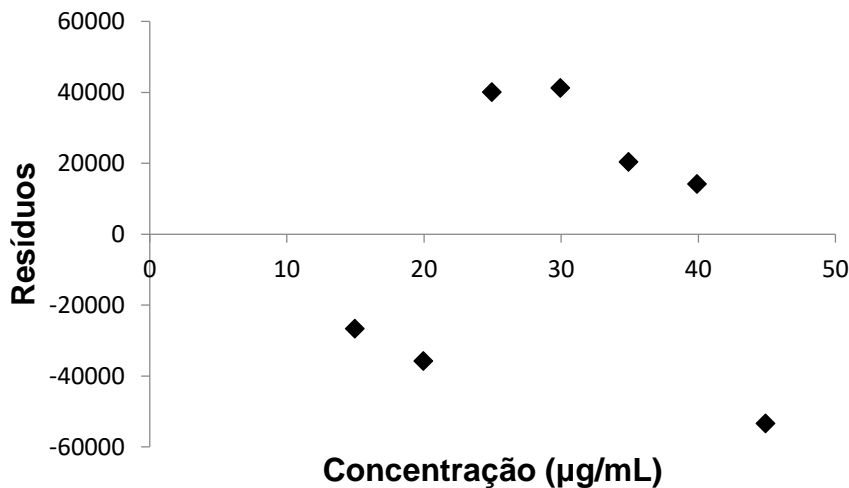


Figura 8 - Gráfico dos resíduos da linearidade de cloridrato de tizanidina por CLAE.

A sensibilidade do método cromatográfico foi avaliada através da determinação do LD e do LQ de cloridrato de tizanidina no sistema empregado. O LD é a concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada, mas não necessariamente quantificada e o LQ é expresso como a concentração na qual a substância pode ser quantificada com precisão e exatidão nas condições estabelecidas pelo método. As proporções aceitas para LD e LQ são respectivamente 3:1 e 10:1 (SHABIR, 2003). Para estimar o valor experimental dos limites, utilizou-se duas maneiras: o desvio padrão da resposta e a razão sinal/ruído.

Conforme os cálculos apresentados na RE 899/03, pelo método de desvio padrão da resposta, o LD encontrado foi 1,23 µg/mL e o LQ 4,09 µg/mL. Ao analisar soluções nessas concentrações, os cromatogramas apresentaram picos com proporções superiores a 3:1 e 10:1. Deste modo, prepararam-se soluções em concentrações inferiores compreendendo a faixa de 0,012 a 0,24 µg/mL e verificou-se que na concentração 0,024 µg/mL houve alteração na linha de base, com proporção sinal/ruído 3:1. A proporção 10:1 foi alcançada na concentração 0,09 µg/mL. Como apresentado nos resultados, o método razão sinal/ruído mostrou-se mais sensível, com os valores obtidos para o LD de 0,024 µg/mL e para o LQ de 0,09 µg/mL, indicando a sensibilidade do método com valores reduzidos.

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia), sendo expressa pelo desvio padrão relativo (DPR). O valor obtido para a determinação de cloridrato de tizanidina, nas amostras analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, foi de 101,74%. Nas análises

realizadas no segundo e terceiro dias obteve-se, respectivamente 102,13 e 102,81% (Tabela 7). Os desvios padrões relativos encontrados para os três dias de análise foram inferiores a 2%, indicando que o método proposto é preciso.

Tabela 7 - Valores referentes à determinação de cloridrato de tizanidina por CLAE, para a avaliação da precisão intra e interdia.

Amostras	Teor (%)		
	Primeiro dia	Segundo dia	Terceiro dia
1	101,23	102,33	102,18
2	101,96	101,65	100,42
3	103,13	103,05	103,99
4	101,83	101,50	103,01
5	102,77	101,88	104,20
6	99,51	102,39	103,04
Média	101,74	102,13	102,81
DPR	1,28	0,57	1,38
Média / DPR interdia	102,23 / 1,14		

A exatidão do método foi avaliada e a faixa de recuperação média encontrada foi de 98,49%, demonstrando a boa exatidão do método, conforme representado na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores do estudo de exatidão de cloridrato de tizanidina realizado por CLAE.

Amostras	Quantidade de SQR ($\mu\text{g/mL}$)		% de Recuperação
	Adicionada	Recuperada	
R ₁	5,0	4,91	98,18
R ₂	10,0	9,84	98,39
R ₃	15,0	14,83	98,89

Um método é robusto quando não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (RIBANI *et al.*, 2004). Na avaliação dos resultados

obtidos no teste de robustez verificou-se que, após alterações no pH da fase aquosa, mudança na proporção de fase móvel, alteração da vazão, modificação do comprimento de onda e troca da coluna, os parâmetros cromatográficos avaliados não apresentaram variações que comprometem a quantificação de cloridrato de tizanidina. Observou-se, como previsto, que a modificação da vazão é o que mais afeta os valores de tempo de retenção. Os resultados foram avaliados comparando os valores da condição usual do método com os obtidos nas alterações propostas (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores obtidos no estudo da robustez do método de cloridrato de tizanidina por CLAE.

Condição	Tempo de retenção (minutos)	Fator cauda	Pratos teóricos	Teor (%)
Usual*	5,8	1,19	10764,41	100,29
pH 3,0	5,8	1,26	10118,44	100,21
pH 4,0	5,9	1,24	9561,79	100,00
48% de metanol	6,1	1,19	10907,29	100,23
52% de metanol	5,6	1,20	10393,41	100,28
Vazão 0,5 mL/min	7,0	1,20	12100,00	100,20
Vazão 0,7 mL/min	5,0	1,20	9690,48	100,29
Comprimento de onda 225 nm	5,8	1,19	10809,02	100,31
Comprimento de onda 229 nm	5,8	1,19	10737,47	100,27
Coluna Phenyl Shim-pack CLC Shimadzu®	6,1	1,17	13577,63	100,17

* Coluna Phenyl Zorbax Eclipse XBD Agilent® (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); fase móvel: metanol:água:triethylamina 50:50:0,5 (v/v/v) pH 3,5; vazão: 0,6 mL/min; detecção 227 nm e temperatura de 25 °C.

O método proposto mostrou-se adequado e cumpre com os requisitos de validação, apresentando especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. Tendo em vista seu caráter indicativo de

estabilidade, o mesmo será aplicado na quantificação de amostras reais de derivações de cloridrato de tizanidina, tal como está descrita no Capítulo II, além do estudo de cinética de degradação de cloridrato de tizanidina, descrito no Capítulo IV.

**5. CAPÍTULO II: ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS
DERIVAÇÕES DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA**

5.1 INTRODUÇÃO

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz, e de outros fatores do próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedade dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005). Portanto, quando se desenvolvem ou modificam formulações, é necessário realizar estudos de estabilidade que permitam prever como varia o fármaco ao longo do tempo sob influência desses elementos.

A temperatura é um dos fatores primários que afetam a estabilidade de fármacos (YOSHIOKA e STELLA, 2000). Dentre os fatores ambientais envolvidos, a temperatura é o mais importante na degradação de produtos farmacêuticos, já que na maioria dos casos, a velocidade de degradação química aumenta com o aumento da temperatura (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999).

Outro fator que impacta bastante na estabilidade dos medicamentos são os materiais de embalagem, pois o material de embalagem é um dos principais responsáveis pela integridade do produto. A resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005 salienta a importância de os estudos de estabilidade serem realizados na embalagem primária, visto que a embalagem entra em contato direto com o medicamento.

Os materiais de acondicionamento e embalagem constituem prolongamento das formas farmacêuticas, sendo responsáveis pela manutenção e eficácia terapêutica dos medicamentos, garantindo a integridade do fármaco. Estes materiais devem assegurar a conservação do medicamento e do seu ativo durante o período de estocagem até o momento da utilização, assegurando a estabilidade e não formação de produtos de degradação (CAVALCANTI e CICERI, 2002). As características a serem planejadas numa especificação de material de acondicionamento são de natureza mecânica (dureza, flexibilidade), física (hermeticidade, permeabilidade) e química, devendo os materiais serem atóxicos e compatíveis com o produto neles contido (PINTO, KANEKO e PINTO, 2010).

O vidro tem sido o material preferido para embalar medicamentos devido à sua resistência à decomposição pelas condições atmosféricas ou, pelos conteúdos sólidos ou líquidos com composições químicas diferentes. Embora tenha muitas propriedades adequadas, tem-se verificado o uso cada vez maior de recipientes que tem toda, ou parte de sua estrutura, composta por plástico para a armazenagem de preparações

farmacêuticas. Uma desvantagem importante dos recipientes de plástico, em relação aos de vidro, é o problema da permeabilidade, que varia consideravelmente de um material plástico para outro (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2010).

Neste capítulo foram avaliadas a influência das temperaturas ambiente, refrigerada e a 40 °C juntamente com os materiais de embalagem frasco PET e frasco vidro, avaliando-se a estabilidade físico-química das derivações de cloridrato de tizanidina durante o período de 8 semanas. Como não há monografia farmacopeica para o cloridrato de tizanidina na forma de suspensão oral, utilizou-se como especificação para o doseamento o intervalo mais comumente empregado no caso de formas farmacêuticas, de 90 a 110 % de teor de ativo (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O objetivo deste capítulo foi estabelecer o prazo de utilização e recomendar as condições de armazenamento adequadas. Empregou-se para a análise das amostras o método por CLAE, descrito e validado no Capítulo I.

5.2 MATERIAIS

5.2.1 DERIVAÇÕES

As amostras das derivações de cloridrato de tizanidina foram preparadas na Farmácia Semi-industrial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5.2.2 SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes e reagentes utilizados foram ácido orto-fosfórico 85%, água purificada, metanol grau cromatográfico e trietilamina grau analítico, já referidos em 4.2.2. Utilizou-se água para injetáveis, Fresenius Kabi®.

5.2.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Frascos PET âmbar de 100 mL, Vedapack®;
- Frascos de vidro âmbar de 100 mL, Wheaton®;
- Refrigerador, modelo CRA 300, marca Consul®;
- Seringas de 20mL, marca BD®;

- Demais itens estão referidos em 4.2.3.

5.3 MÉTODO

5.3.1 PREPARAÇÃO DAS DERIVAÇÕES DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA

Preparou-se amostras das derivações de cloridrato de tizanidina contendo 60 µg/mL e volume de 100 mL em câmara de fluxo laminar vertical, na Farmácia Semi-industrial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

No procedimento para preparação das derivações, adicionou-se em cada frasco 3 comprimidos de cloridrato de tizanidina 2 mg e 100 mL de água para injetáveis, medindo-se o volume com seringa. Após o enchimento, fechou-se os frascos com tampa lacre e agitou-se manualmente até apresentarem aspecto homogêneo. No total preparou-se amostras em 9 frascos de PET âmbar e em 9 frascos de vidro âmbar para o estudo de estabilidade físico-química.

O acondicionamento das derivações deu-se da seguinte maneira:

- Temperatura ambiente (15 a 30 °C)
3 frascos de PET âmbar
3 frascos de vidro âmbar
- Temperatura refrigerada (2 a 8 °C)
3 frascos de PET âmbar
3 frascos de vidro âmbar
- Temperatura em estufa (40 °C)
3 frascos de PET âmbar
3 frascos de vidro âmbar

A temperatura do ambiente, do refrigerador e da estufa foram monitoradas diariamente.

5.3.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA DOSEAMENTO DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA

Para determinar o teor de cloridrato de tizanidina, os frascos foram submetidos à agitação manual por 2 minutos. Alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água. Homogeneizou-se e filtrou-se em papel filtro, obtendo-se solução com concentração de 30,0 µg/mL. Todas as amostras foram filtradas em membrana com porosidade de 0,45 µm antes de serem analisadas.

5.3.3 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA

Para monitorar os resultados obtidos durante a estabilidade físico-química, utilizou-se solução SQR de cloridrato de tizanidina com concentração de 30 µg/mL, diluída a partir da solução estoque com concentração de 200 µg/mL, conforme descrito no item 4.3.2.2.

5.3.4 PROTOCOLO DE ESTABILIDADE

Em relação ao aspecto físico das derivações, verificou-se que apresentaram coloração branca, sem cheiro característico, sabor levemente amargo e com aspecto homogêneo após agitação. As amostras mantiveram-se sem formação de sedimento durante um período de tempo suficiente para permitir as coletas.

Coletou-se amostras para análise nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias e analisou-se os tempos de coleta juntamente com a solução de SQR de cloridrato de tizanidina. Definiu-se a estabilidade físico-química como a manutenção do teor de cloridrato de tizanidina compreendido entre 90 e 110%, sem alterações significativas em qualquer outro parâmetro avaliado.

Acompanhou-se simultaneamente os valores de pH das derivações utilizando potenciômetro, sendo as leituras efetuadas em temperatura ambiente.

5.3.5 CÁLCULO PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA NAS DERIVAÇÕES

A concentração de cloridrato de tizanidina nas derivações foi obtida através da seguinte equação:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

C_A = Concentração de cloridrato de tizanidina na derivação

A_A = Área média da derivação

C_{SQR} = Concentração da SQR

A_{SQR} = Área média da SQR

O teor de cloridrato de tizanidina nas derivações foi calculado pela equação abaixo:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

$C_A\%$ = Concentração percentual de cloridrato de tizanidina na derivação

C_A = Concentração de cloridrato de tizanidina encontrado na derivação

C_T = Concentração teórica de cloridrato de tizanidina na derivação

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a avaliação da estabilidade, muitas variáveis podem interferir sobre a estabilidade dos fármacos. Neste trabalho, avaliou-se a influência da temperatura e o tipo de material de embalagem. A escolha baseou-se em condições usuais em que os medicamentos são armazenados, uma vez que o clima ambiente alcança temperaturas bastante elevadas e próximas a 40 °C no verão, na cidade de Porto Alegre.

Os teores de cloridrato de tizanidina nas derivações, armazenadas nas 3 temperaturas, estão apresentados nas Tabelas 10, 11 e 12. As Figuras 9, 10 e 11 apresentam a representação gráfica do teor de cloridrato de tizanidina *versus* tempo durante a avaliação de estabilidade.

Tabela 10 - Resultado dos teores de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frascos de PET âmbar e de vidro âmbar, em temperatura ambiente (15 a 30 °C).

Temperatura Ambiente (15 a 30 °C)				
Teor (%)				
Tempo (dias)	Frasco PET*	DPR (%)	Frasco vidro*	DPR (%)
0	101,76	1,77	102,12	2,71
7	101,99	1,30	103,07	1,45
14	101,63	1,54	102,73	1,51
21	102,71	1,39	103,18	2,57
28	102,93	2,12	103,44	1,71
35	102,64	2,13	103,36	1,47
42	103,21	1,87	103,32	1,63
49	103,52	1,64	103,81	0,97
56	103,99	1,99	103,78	1,90

*média de 3 frascos

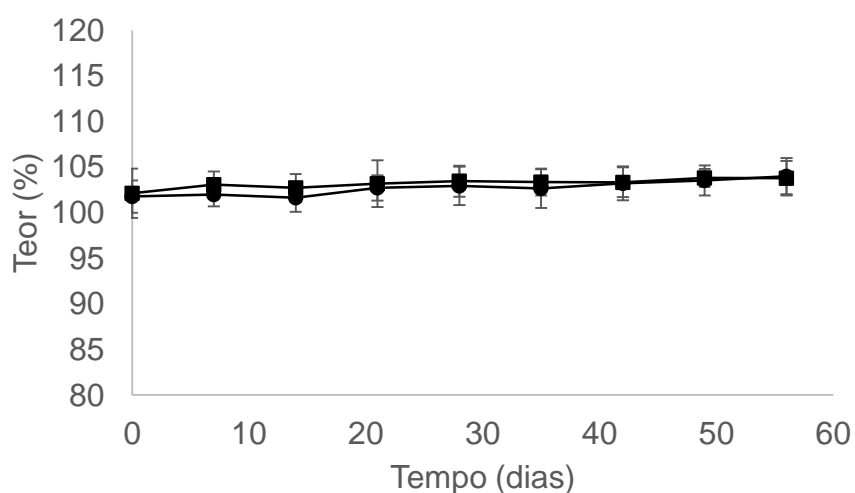


Figura 9 - Representação gráfica do teor de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frasco de PET âmbar (●) e de vidro âmbar (■), em temperatura ambiente (15 a 30 °C) versus tempo.

Tabela 11 - Resultado dos teores de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frascos de PET âmbar e de vidro âmbar, em refrigeração (2 a 8 °C).

Temperatura Refrigerada (2 a 8 °C)				
Teor (%)				
Tempo (dias)	Frasco PET*	DPR (%)	Frasco vidro*	DPR (%)
0	100,19	1,09	100,81	1,77
7	100,70	0,83	100,44	1,28
14	100,91	0,89	100,74	0,77
21	101,64	2,44	101,92	2,77
28	101,50	0,90	101,76	0,77
35	101,81	1,35	102,51	1,30
42	101,83	1,25	102,47	2,56
49	103,25	0,74	103,29	1,40
56	104,20	0,74	104,57	0,94

*média de 3 frascos

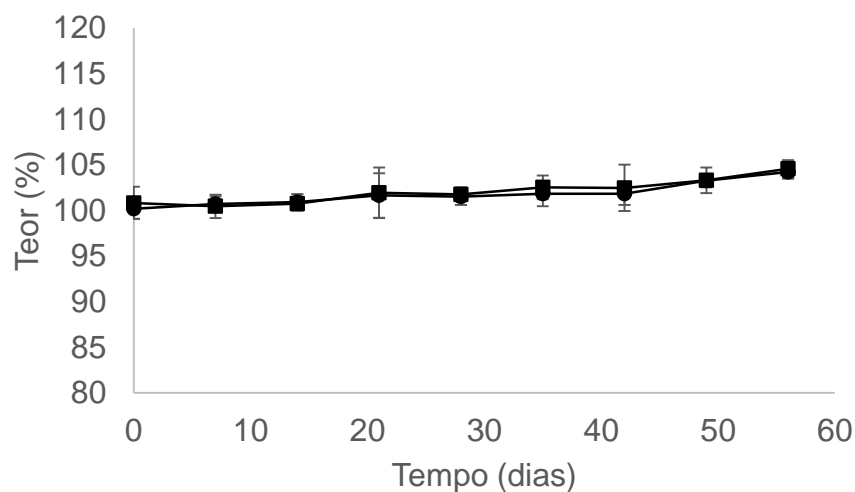


Figura 10 - Representação gráfica do teor de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frasco de PET âmbar (●) e de vidro âmbar (■), em refrigeração (2 a 8 °C) *versus* tempo.

Tabela 12 - Resultado dos teores de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frascos de PET âmbar e de vidro âmbar, em estufa (40 °C).

Temperatura de Estufa (40 °C)				
Teor (%)				
Tempo (dias)	Frasco PET*	DPR (%)	Frasco vidro*	DPR (%)
0	100,46	0,93	102,28	2,21
7	101,59	1,47	102,50	1,97
14	101,68	0,92	103,62	1,64
21	101,62	2,05	103,71	1,64
28	102,62	0,87	103,52	1,91
35	103,45	1,05	103,16	1,79
42	103,26	1,38	102,98	1,89
49	104,78	0,97	103,86	0,98
56	105,53	1,27	106,24	2,28

*média de 3 frascos

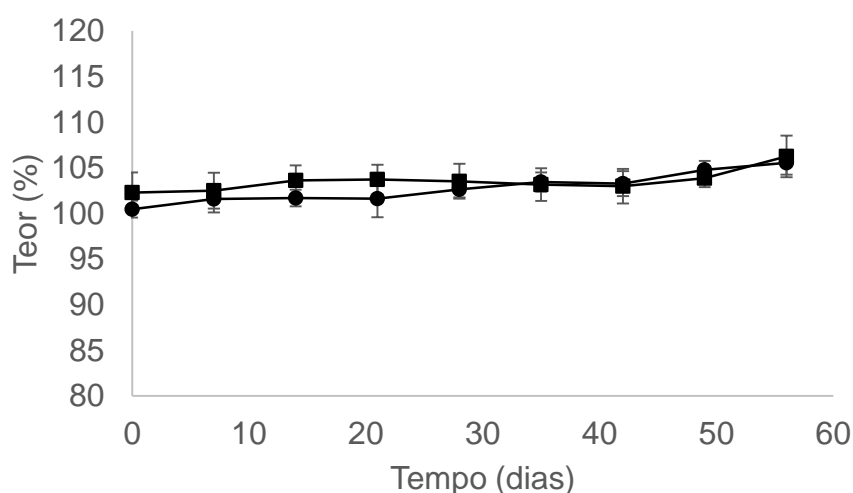


Figura 11 - Representação gráfica do teor de cloridrato de tizanidina nas derivações armazenadas em frasco de PET âmbar (●) e de vidro âmbar (■), em estufa (40 °C) *versus* tempo.

Considerou-se como valor de teor a média dos 3 frascos de cada condição. Verificou-se uma variabilidade no teor do tempo zero ao tempo 56 dias de 2,23% (frasco PET) e 1,66% (frasco vidro) em temperatura ambiente, 4,01% (frasco PET) e 3,76% (frasco vidro) em temperatura refrigerada e 5,07% (frasco PET) e 3,96% (frasco vidro) em estufa a 40 °C.

O teor de cloridrato de tizanidina nas derivações, armazenadas nas 3 temperaturas, permaneceu dentro dos valores estipulados durante todo o tempo de

avaliação. Em todos os casos observou-se no decorrer do tempo a elevação do teor, o que pode ser o resultado de má vedação e conseqüentemente evaporação da água da amostra. Isso pode explicar a maior variação do teor na temperatura a 40 °C, tanto para frasco PET como para frasco vidro.

Os resultados em relação aos tipos de material de embalagem apresentaram variação inferior a 1,2% em todas as temperaturas estudadas, sugerindo uma variação mínima entre a embalagem de PET e a de vidro. Verificou-se a maior variação no teor entre os frascos PET e vidro na temperatura a 40 °C, de 1,1%.

As derivações foram realizadas com o propósito de obter volume suficiente para as amostragens, adicionando-se em cada frasco 3 comprimidos e 100 mL de água para injetáveis, e não se pesando uma quantidade equivalente a 3 comprimidos a partir de um *pool* de 20 comprimidos. Isso pode explicar a variação nos desvios padrões relativos, dado que a dose varia entre os comprimidos.

Os resultados demonstraram que o teor de cloridrato de tizanidina em todas as derivações nunca atingiu o valor mínimo definido, por este fato o fármaco é quimicamente estável em água. Constatou-se que em nenhum dos casos houve diminuição no teor ao longo de tempo. A pequena variabilidade no teor do fármaco significa que se permite administrar doses reprodutíveis e confiáveis desde que as derivações sejam feitas de acordo com a técnica de preparação hospitalar.

Os resultados indicaram que a temperatura e o recipiente de armazenamento parecem influenciar pouco na concentração do fármaco durante 8 semanas, demonstrando que as derivações estudadas são estáveis por este período. O teor durante a utilização do medicamento é importante para garantir a eficácia terapêutica relativa à dose que é administrada.

Além da temperatura e do recipiente de armazenamento, o pH também é uma variável importante na degradação de fármacos. O efeito do pH na degradação de fármacos pode ser explicado pela ação catalítica que os íons H^+ e OH^- podem exercer sobre várias reações químicas. A catálise mediada por prótons predomina para valores de pH baixos, enquanto que a catálise com íons hidroxilos ocorre para valores de pH mais elevados (YOSHIOKA e STELLA, 2000; LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2010).

Determinou-se os valores de pH das derivações de cloridrato de tizanidina nos dias de amostragem da avaliação de estabilidade e estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores de pH das derivações de cloridrato de tizanidina durante a avaliação de estabilidade.

Valores de pH						
Temperatura	Ambiente (15 a 30 °C)		Refrigerada (2 a 8 °C)		Estufa (40 °C)	
Frasco	PET	Vidro	PET	Vidro	PET	Vidro
Tempo (dias)						
0	6,20	6,44	6,37	6,16	6,46	6,42
7	5,98	6,40	6,19	6,11	6,33	6,32
14	6,16	6,37	6,20	6,04	6,30	6,33
21	6,13	6,31	5,96	6,19	6,22	6,25
28	5,95	6,21	5,97	6,15	6,29	6,20
35	5,92	6,28	5,93	6,21	6,19	6,30
42	5,99	6,31	6,01	6,19	6,21	6,23
49	6,02	6,29	6,11	6,09	6,23	6,29
56	5,91	6,28	6,18	5,96	6,29	6,32

Através dos resultados da Tabela acima pode-se verificar que o pH inicial das derivações abrangeu valores entre 6,16 e 6,46. Apesar das derivações terem sido submetidas a temperaturas e frascos de armazenamento diferentes, os valores de pH registrados variaram pouco em todas as amostras. No final do estudo obtiveram-se valores entre 5,91 e 6,32 para todas as amostras, o que indica que durante 8 semanas o pH das derivações está sujeito a variações mínimas.

A representação gráfica dos valores de pH está apresentada nas Figuras 12, 13 e 14.

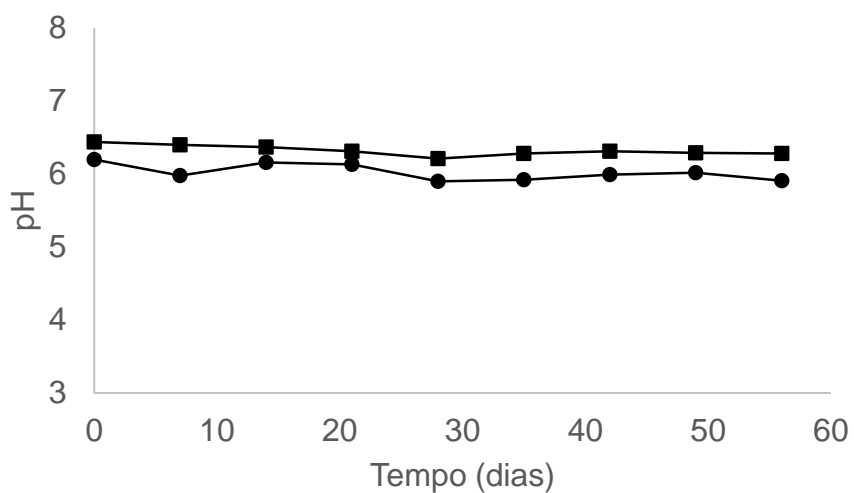


Figura 12 - Representação gráfica do pH de cloridrato de tizanidina armazenado em frasco de PET âmbar (●) e de vidro âmbar (■) em temperatura ambiente (15 a 30 °C) *versus* tempo.

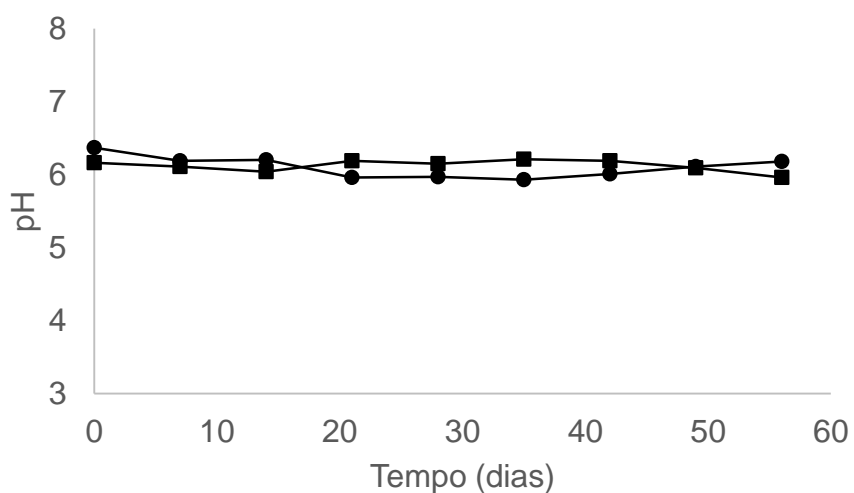


Figura 13 - Representação gráfica do pH de cloridrato de tizanidina armazenado em frasco de PET âmbar (●) e de vidro âmbar (■) em refrigeração (2 a 8 °C) *versus* tempo.

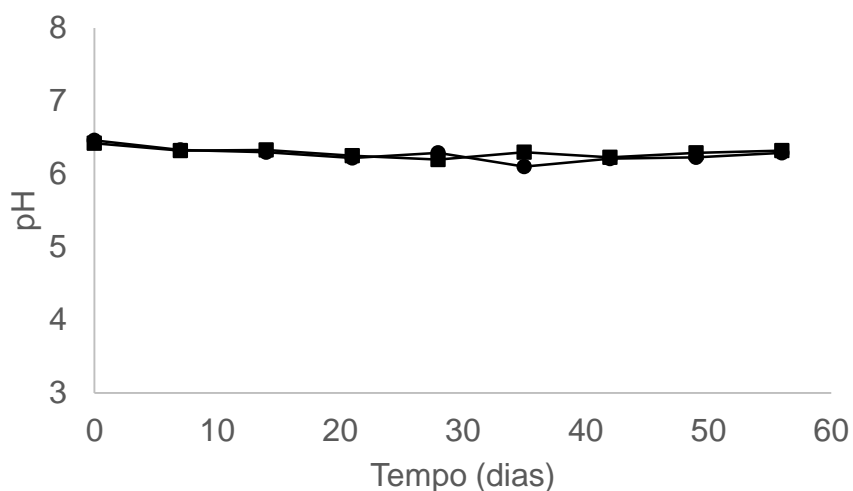


Figura 14 - Representação gráfica do pH de cloridrato de tizanidina armazenado em frasco de PET âmbar (●) e de vidro âmbar (■) em estufa (40 °C) *versus* tempo.

Do tempo zero ao tempo 56 dias, observou-se redução do pH na temperatura ambiente de 4,68% no frasco de PET e redução de 2,48% no frasco de vidro. Em temperatura refrigerada, observou-se variação de pH com redução de 2,98% no frasco de PET e de 3,25% no frasco de vidro. Já na temperatura de 40 °C os resultados foram de menor redução de pH, com 2,63% no frasco de PET e apenas 1,56% no frasco de vidro.

A redução de pH com maior variação entre os tempos zero e 56 dias ocorreu na temperatura ambiente para o frasco de PET e na temperatura refrigerada para o frasco de vidro. Houve diferença de 2,20%, 0,27% e 1,07% entre os tipos de material de embalagem para temperatura ambiente, temperatura refrigerada e temperatura 40 °C, respectivamente. Através dos resultados pode-se constatar que, independente das temperaturas e materiais de acondicionamento, os valores do pH obtidos para todas as derivações foram muito semelhantes e não houve formação de substâncias que pudessem provocar modificações neste parâmetro.

Durante a avaliação da estabilidade, os aspectos das derivações não se alteraram, exceto após o 14º dia, onde visualizou-se o surgimento de turvação característica de contaminação fúngica em um dos frascos armazenados em temperatura ambiente. É de se referir que, entre os tempos de amostragem, as derivações ficaram em repouso, ou seja, num período de 8 semanas só foram submetidas a agitação nos dias de amostragem, os quais totalizaram 8 dias. Apesar

disso, nunca se notou visualmente formação de aglomerados ou dificuldade em ressuspender as amostras.

Em todas as condições avaliadas, verificou-se a pureza do pico com o uso do detector de arranjo de diodos, indicando a pureza do pico de cloridrato de tizanidina em todos os tempos de coleta.

Durante a avaliação da estabilidade das derivações, fez-se necessário levar em conta não só a estabilidade físico-química, mas também a estabilidade microbiológica, combinando eficácia terapêutica e segurança, tal como está descrito no Capítulo III.

**6. CAPÍTULO III: ESTUDO DE ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DAS
DERIVAÇÕES DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA**

6.1 INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana de um produto pode acarretar alterações em suas propriedades físicas e químicas e ainda caracteriza o risco de infecção para o usuário. Assim produtos farmacêuticos de uso oral que não tem requerimento serem estéreis devem estar sujeitos ao controle de contaminação microbiana. Para a realização dos testes devem ser considerados os limites microbianos, o tipo de contaminação mais provável nas diferentes categorias de produtos e a via de administração (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A atenção no controle dos produtos não estéreis assegura que a carga microbiana presente no produto, seja no aspecto qualitativo ou quantitativo, não comprometa a sua qualidade final, ou a segurança do paciente. O objetivo imediato é comprovar a ausência de microrganismos patogênicos e determinar o número de microrganismos viáveis, em função dos tipos de utilização do produto (PINTO, KANEKO e PINTO, 2010).

As derivações de cloridrato de tizanidina são suspensões aquosas administradas oralmente e sem adição de conservantes, apresentando por este motivo maior suscetibilidade à contaminação microbiana. Embora a avaliação da estabilidade físico-química tenha demonstrado que as derivações mantêm seu teor por 8 semanas, diversos fatores podem conduzir à contaminação microbiana, reduzindo a estabilidade das derivações.

Infecções nosocomiais são causas significativas de mortalidade em recém-nascidos e lactentes que necessitam de cuidados intensivos. Embora o risco apresentado pela maioria das formas de contaminação de formulações líquidas não estéreis seja baixo, os níveis elevados de microrganismos não patogênicos devem ser evitados. As bactérias e fungos ambientais são as causas mais comumente reconhecidas de infecção, mas os surtos também podem estar relacionados a fontes da farmácia, onde a formulação de produtos estáveis permite a preparação de soluções ou suspensões de estoque (SALGADO *et al.*, 2005).

As condições de estocagem dos produtos podem afetar o potencial para proliferação microbiana. Geralmente, a refrigeração e o congelamento reduzirão ou evitarão a proliferação microbiana, e a maioria dos microrganismos terá crescimento inibido acima de 50 °C (PINTO, KANEKO e PINTO, 2010). A manipulação, o acondicionamento e a conservação das preparações devem ser conduzidos de modo

a assegurar que durante o prazo de utilização, mantenha-se a qualidade microbiológica satisfatória (ALBUQUERQUE, 2007). Na literatura, os estudos de estabilidade microbiológica de formulações extemporâneas são escassos, mesmo sendo este um aspecto tão importante na segurança de medicamentos (POY *et al.*, 2016).

Embora os medicamentos para uso oral não necessitem cumprir com os testes de esterilidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), a contaminação microbiana acima dos limites permitidos para formas farmacêuticas não estéreis pode facilmente comprometer a estabilidade dos medicamentos e a saúde do paciente. Consequências deste comprometimento podem estar associadas com a perda de eficácia terapêutica por degradação do ativo (BAUMER *et al.*, 2011).

Não há parâmetros microbiológicos definidos para serem utilizados como limites de aprovação para suspensões orais de cloridrato de tizanidina, por não haver monografia para esta forma farmacêutica em farmacopeias. Entretanto, a FB recomenda que, para preparações aquosas para uso oral, os limites de bactérias aeróbias e de fungos/leveduras sejam de 10^2 e 10^1 UFC/mL, respectivamente, e ausência de *Escherichia coli*.

Neste capítulo avaliou-se a estabilidade microbiológica de derivações de cloridrato de tizanidina, estabelecendo um prazo de utilização seguro através de metodologia descrita na FB.

6.2 MATERIAIS

6.2.1 DERIVAÇÕES

As amostras das derivações utilizadas foram descritas em 5.2.1.

6.2.2 MICRORGANISMOS

- *Staphylococcus aureus* - American type culture collection (ATCC) 6538;
- *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853;
- *Bacillus subtilis* - ATCC 6633;
- *Cândida albicans* - ATCC 24433;

- *Aspergillus niger* - ATCC 16888.

6.2.3 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

Nos ensaios microbiológicos foram utilizados as seguintes soluções e meios de cultura para permitir o crescimento e quantificação de microrganismos:

- Ágar Caseína-soja;
- Ágar Sabouraud-dextrose;
- Ágar MacConkey;
- Ágar Sangue;
- Caldo Caseína-soja;
- Solução salina 0,9%;
- Solução tampão fosfato pH 7,2.

Como diluente utilizou-se água purificada.

6.3 MÉTODOS

6.3.1 PREPARO DAS DERIVAÇÕES DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA

O procedimento para preparação e acondicionamento das derivações já foi descrito em 5.3.1. Durante a avaliação da estabilidade microbiológica, coletou-se alíquotas sempre do mesmo frasco de cada condição, a fim de mimetizar a rotina hospitalar e o risco de contaminação microbiana ao longo do uso.

6.3.2 ADEQUAÇÃO DO MÉTODO FARMACOPEICO

Para adequação dos métodos farmacopeicos aos produtos não estéreis, deve ser demonstrada a eliminação de qualquer propriedade antimicrobiana antes da verificação da existência de contaminação microbiana nos produtos. Durante a adequação, demonstrar que a escolha do método para a estimativa qualitativa e/ou quantitativa dos microrganismos é sensível, exato e confiável e que é capaz de

eliminar qualquer interferência ou inibição durante a recuperação dos microrganismos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Efetuuou-se o ensaio segundo as indicações da FB em Ensaio microbiológicos. Primeiramente inoculou-se através da técnica de esgotamento uma pequena quantidade de microrganismos de culturas já reidratadas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Cândida albicans* em Ágar Sangue e *Aspergillus niger* em Ágar Sabouraud-dextrose. Incubou-se em temperatura de $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ as bactérias e $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ os fungos pelo período de 24 a 48 horas. Utilizou-se os microrganismos ATCC disponíveis no laboratório.

Após o crescimento dos microrganismos, fez-se o controle (sem amostra) para demonstrar a capacidade do meio de cultura em detectar microrganismos na presença e na ausência da amostra. Com auxílio de alça bacteriológica fez-se a suspensão direta da colônia, transferindo 3 a 4 colônias com a mesma morfologia para tubos de ensaio com 5 mL de solução salina 0,9% e comparou-se o inóculo com a escala 0,5 de McFarland até obter turvação correspondente. A escala McFarland significa que há aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Alíquotas foram diluídas em solução salina obtendo-se 10^3 UFC/mL e em seguida adicionou-se a superfície de cada meio de cultura 0,1 mL desta suspensão, com o intuito de obter uma pequena quantidade de microrganismos, inferior ou igual a 100 UFC. Os microrganismos, meios de cultura, temperaturas e tempo de incubação estão descritos na Tabela 14.

Realizou-se o mesmo procedimento na presença da amostra, substituindo-se a última diluição em solução salina 0,9% por derivação de cloridrato de tizanidina (diluição 10^{-1}), obtendo-se 10^3 UFC/mL e em seguida adicionou-se a superfície de cada meio de cultura 0,1 mL desta suspensão. Todas as amostras foram realizadas em duplicada e após a incubação contou-se o número de UFC.

Tabela 14 - Condições do ensaio para adequação do método farmacopeico.

Microrganismos	Meios de cultura	Temperatura de incubação	Tempo de incubação (dias)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ágar Caseína-soja	32,5 °C ± 2,5 °C	≤ 3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ágar Caseína-soja	32,5 °C ± 2,5 °C	≤ 3
<i>Bacillus subtilis</i>	Ágar Caseína-soja	32,5 °C ± 2,5 °C	≤ 3
<i>Cândida albicans</i>	Ágar Sabouraud-dextrose	22,5 °C ± 2,5 °C	≤ 5
<i>Aspergillus niger</i>	Ágar Sabouraud-dextrose	22,5 °C ± 2,5 °C	≤ 5

6.3.3 PROTOCOLO DE ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA

O método utilizado na avaliação da estabilidade microbiológica seguiu as normas da FB em Ensaio microbiológicos, onde determina-se o número de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e pesquisa de *Escherichia coli* em preparação aquosa para uso oral. Na contagem total de bactérias aeróbias o limite é 10^2 UFC/mL, na contagem de bolores e leveduras o limite é 10^1 UFC/mL e na pesquisa de *Escherichia coli* deve estar ausente.

A contagem dos microrganismos foi realizada pelo método de contagem em placa por método de superfície. Empregando-se pipetas estéreis, volumes de 0,1 a 0,5 mL de cada diluição considerada são distribuídos na superfície do gel já solidificado, sendo o espalhamento efetuado com movimentos cuidadosos, ou com o auxílio de bastão de vidro ou alça de Drigalski (PINTO, KANEKO e PINTO, 2010).

Para a avaliação da estabilidade microbiológica utilizou-se derivações preparadas da mesma maneira da avaliação da estabilidade físico-química e conservadas à temperatura ambiente, refrigerada e em estufa à 40 °C. Coletaram-se amostras para as análises nos dias 0, 7, 14 e 21 dias.

Após a agitação manual retirou-se de cada derivação alíquota de 10 mL e fez-se a diluição, na relação 1/10 com solução tampão fosfato pH 7,2, homogeneizou-se e obteve-se as soluções S1 (diluição 10^{-1}). Retirou-se alíquota de 1 mL e fez-se a diluição na relação 1/10 novamente, obtendo-se as soluções S2 (diluição 10^{-2}) e posteriormente fez-se as soluções S3 (diluição 10^{-3}) da mesma maneira. Então, retirou-se alíquotas de 100 µL das soluções S1, S2 e S3 de cada condição e adicionou-se à superfície das placas contendo os meios de cultura Ágar caseína-soja

(utilizado para crescimento de microrganismos aeróbicos totais) e Ágar Sabouraud-dextrose (utilizado para crescimento de bolores e leveduras). Fez-se o espalhamento e incubou-se durante os tempo e temperaturas corretos, descritos na Tabela 15.

Para a pesquisa de *Escherichia coli*, retirou-se volumes de 1 mL das soluções S1, S2 e S3 de cada condição e diluiu-se em 9 mL de Caldo Caseína-soja, homogeneizou-se e obteve-se as soluções E1, E2 e E3, respectivamente. Incubou-se essas soluções a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ durante 18 a 24 horas. Retirou-se alíquotas de 100 μL e adicionou-se à superfície das placas contendo o meio de cultura Ágar MacConkey (utilizado para o crescimento de *Escherichia coli*), fez-se o espalhamento e incubou-se durante o tempo e temperatura correto (Tabela 15). Nas leituras das placas pesquisou-se o crescimento de colônias características de *Escherichia coli*, que apresentam coloração vermelha e aspecto geralmente não mucoso. Todas as amostragens foram realizadas em duplicada e após a incubação calculou-se a média aritmética das placas e o número de UFC/mL.

Tabela 15 - Condições de incubação das derivações de cloridrato de tizanidina para determinação de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e pesquisa de *Escherichia coli*.

Determinações	Meios de cultura	Temperatura de incubação	Tempo de incubação
Bactérias aeróbias	Ágar Caseína-soja	$32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$	3 a 5 dias
Bolores e leveduras	Ágar Sabouraud-dextrose	$22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$	5 a 7 dias
<i>Escherichia coli</i>	Ágar Macconkey	$32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$	18 a 72 horas

As formulações líquidas orais não necessitam esterilidade, mas é muito relevante aplicar estratégias para minimizar a carga microbiana e cumprir os limites da FB. Os frascos utilizados eram novos e foram enxaguados no hospital com álcool 70%, secos em estufa, colocadas as tampas e guardados em caixas específicas até o uso. Toda a lavagem foi realizada com paramentação, favorecendo uma redução na carga microbiana inicial das amostras, que poderia atuar como fonte de contaminação. Realizou-se todos os procedimentos em condições de assepsia e com materiais autoclavados para evitar qualquer tipo de contaminação.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a adequação do método farmacopeico, tanto para os microrganismos inoculados na presença e na ausência da amostra, a quantidade de microrganismos desenvolvida mostrou-se muito semelhante (Figura 15). Após a contagem das UFC por placa, comprovou-se que a escolha do método não possui qualquer interferência ou inibição que possa afetar no crescimento de microrganismos.

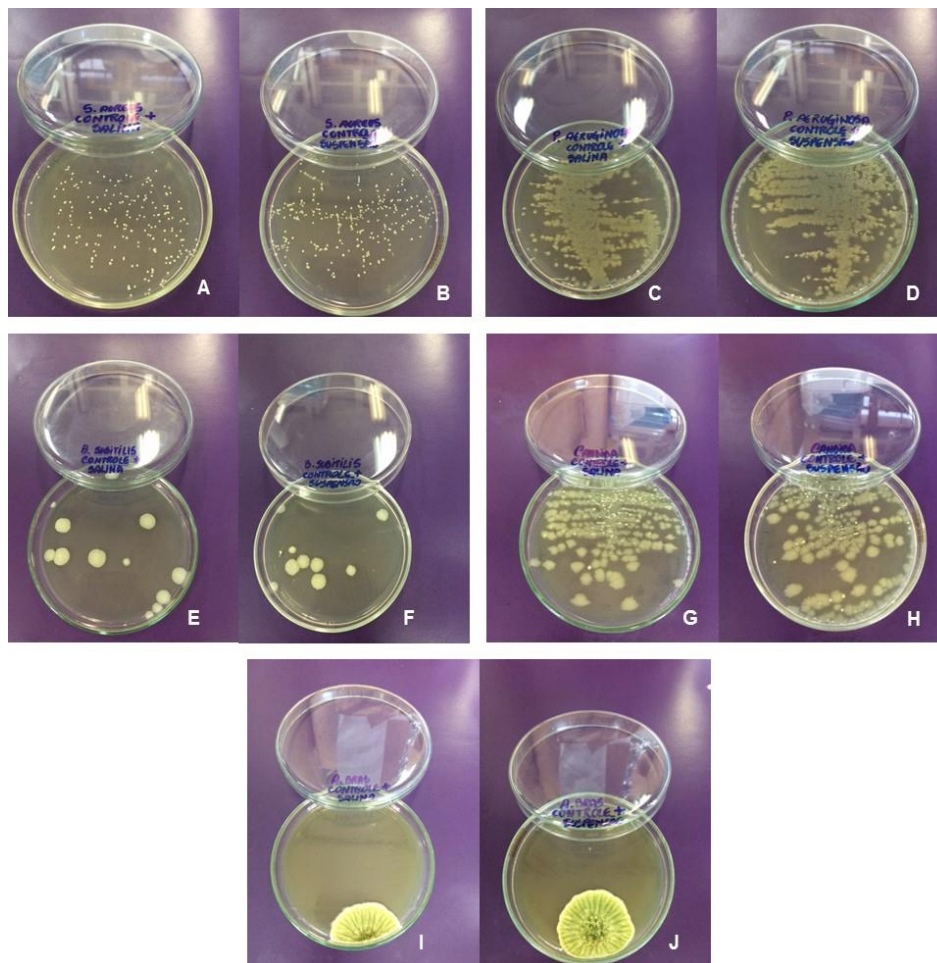


Figura 15 - Crescimento de *Staphylococcus aureus* na ausência (A) e na presença (B) da amostra; crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* na ausência (C) e na presença (D) da amostra; crescimento de *Bacillus subtilis* na ausência (E) e na presença (F) da amostra; crescimento de *Cândida albicans* na ausência (G) e na presença (H) da amostra e crescimento de *Aspergillus niger* na ausência (I) e na presença (J) da amostra.

Embora a FB oriente inocular em cada placa valor igual ou inferior a 100 UFC, observou-se que para alguns microrganismos o crescimento foi superior a este valor.

Contudo, dado que a primeira diluição dos microrganismos em salina foi realizada visualmente, comparando-se a turvação com a escala 0,5 de McFarland, o erro na técnica tornou-se bastante elevado. Apesar disso, optou-se por permanecer com esse método, uma vez que se pode visualizar bem as colônias e os resultados apresentaram mínima diferença de microrganismos inoculados na presença e na ausência da amostra, demonstrando a eliminação de qualquer propriedade antimicrobiana.

A avaliação da estabilidade microbiológica foi realizada para estabelecer o prazo de utilização seguro das derivações, demonstrando o período e condições de armazenamento que mantêm as propriedades e evitam os efeitos nocivos resultantes de contaminação microbiana. As determinações de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e pesquisa de *Escherichia coli*, armazenadas em 3 temperaturas diferentes, estão apresentadas nas Tabelas 16, 17, e 18.

Tabela 16 - Determinação de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e pesquisa de *Escherichia coli* nas derivações armazenadas em temperatura ambiente (15 a 30 °C).

Temperatura Ambiente (15 a 30 °C)				
Tempo (dias)	Frasco	Bactérias aeróbias (UFC/mL)	Bolores e leveduras (UFC/mL)	<i>Escherichia coli</i>
0	PET	0	0	ausente
	vidro	0	0	ausente
7	PET	0	0	ausente
	vidro	0	0	ausente
14	PET	2,5x 10 ³	7,1x 10 ²	ausente
	vidro	8,3x 10 ³	2,6x 10 ²	ausente
21	PET	4,7x 10 ⁴	1,7x 10 ³	ausente
	vidro	2,5x 10 ⁴	2,1x 10 ³	ausente

Tabela 17 - Determinação de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e pesquisa de *Escherichia coli* nas derivações armazenadas em refrigeração (2 a 8 °C).

Temperatura Refrigerada (2 a 8 °C)				
Tempo (dias)	Frasco	Bactérias aeróbias (UFC/mL)	Bolores e leveduras (UFC/mL)	<i>Escherichia coli</i>
0	PET	0	0	ausente
	vidro	0	0	ausente
7	PET	0	0	ausente
	vidro	0	0	ausente
14	PET	8,4x 10 ³	6,0x 10 ²	ausente
	vidro	2,0x 10 ³	9,8x 10 ²	ausente
21	PET	1,6x 10 ⁴	8,6x 10 ²	ausente
	vidro	1,5x 10 ⁴	1,6x 10 ³	ausente

Tabela 18 - Determinação de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e pesquisa de *Escherichia coli* nas derivações armazenadas em estufa (40 °C).

Temperatura de Estufa (40 °C)				
Tempo (dias)	Frasco	Bactérias aeróbias (UFC/mL)	Bolores e leveduras (UFC/mL)	<i>Escherichia coli</i>
0	PET	0	0	ausente
	vidro	0	0	ausente
7	PET	0	0	ausente
	vidro	0	0	ausente
14	PET	2,9x 10 ⁴	6,8x 10 ²	ausente
	vidro	1,0x 10 ⁴	8,8x 10 ²	ausente
21	PET	3,4x 10 ⁵	2,6x 10 ³	ausente
	vidro	3,0x 10 ⁴	3,6x 10 ³	ausente

Fez-se o controle para verificar a esterilidade dos meios de cultura Ágar Caseína-soja, Ágar Sabouraud-dextrose e Ágar MacConkey. Colocou-se as placas contendo os meios de cultura em incubação por mais de 72 horas em temperatura adequada e não houve crescimento de microrganismos.

Em todas as temperaturas armazenadas, verificou-se que até o 7º dia não houve desenvolvimento microbiano. No 14º dia de coleta das amostras, contabilizaram-se valores de UFC/mL acima dos limites de aceitação estabelecidos (superior a 10² UFC/mL para bactérias aeróbias e superior a 10¹ UFC/mL para bolores e leveduras). Esses dados coincidem com o dado observado durante a estabilidade físico-química, onde verificou-se visualmente no 14º dia a presença de turvação

característica de contaminação fúngica em um dos frascos armazenados em temperatura ambiente.

Contudo, dado que na semana anterior não houve nenhum tipo de proliferação bacteriana e fúngica, realizou-se amostragem no tempo seguinte (21° dia), considerando a hipótese de que no 14° dia poderia ser uma contaminação pontual relacionada com a técnica ou coleta das amostras. Porém no 21° dia os dados confirmaram os valores obtidos no 14° dia, contabilizando valores maiores ainda e acima dos limites estabelecidos para preparações aquosas para uso oral. Em nenhuma das derivações foi verificado crescimento de colônias características da presença de *Escherichia coli*.

Embora o crescimento microbiano seja desfavorecido em temperaturas refrigeradas, a avaliação da estabilidade microbiológica demonstrou que tanto em temperatura ambiente como em temperatura refrigerada os valores de crescimento microbiano mantiveram-se próximos, o que pode sugerir uma contaminação da técnica ou da amostragem durante as análises com os frascos refrigerados. Em relação a temperatura de 40 °C, como já era esperado, os valores de crescimento bacteriano mantiveram-se superiores aos demais. Cabe ressaltar que na composição dos comprimidos, provavelmente a lactose seja o excipiente em maior concentração, podendo atuar como fonte de nutrição e favorecer o crescimento de microrganismos.

Os resultados evidenciaram que as derivações têm estabilidade microbiológica de 7 dias, independente das temperaturas e frascos utilizados. A ausência de microrganismos durante este período significa que se permite administrar doses seguras sem haver compromisso de sua estabilidade microbiológica, desde que as derivações sejam feitas de acordo com a técnica de preparação hospitalar. Deste modo, as derivações de cloridrato de tizanidina constituem um meio para a proliferação microbiana a partir do 7° dia, visto que são preparadas apenas em água para injetáveis e não apresentam agentes conservantes em sua composição.

Por precaução, sugere-se a utilização de frascos PET e temperatura refrigerada na conservação das derivações. Os recipientes de plástico são extremamente resistentes à quebra, conferindo segurança aos consumidores paralelamente com a redução de perdas. Em relação ao PET, a sua elevada resistência ao impacto e eficaz barreira aos gases e aromas, são aspectos relevantes para produtos em que a resistência, dureza e barreira são considerações importantes. Além disso apresentam custo de produção relativamente baixo e são mais leves se

comparados a outros materiais. No que se refere à temperatura, geralmente a refrigeração reduz ou evita a proliferação microbiana (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2010; PINTO, KANEKO e PINTO, 2010; SILVA *et al.*, 2014).

Apesar de terem sido tomados os cuidados necessários, acredita-se que as possíveis causas de contaminação microbiana podem ter sido provenientes do ambiente ou do processo de abertura e fechamento das embalagens para a retirada das alíquotas. Além disso, o pH da amostra, se menor que 4,0 ou maior que 10,0, geralmente irá inibir os microrganismos (PINTO, KANEKO e PINTO, 2010). No caso das derivações de cloridrato de tizanidina, onde o pH encontrava-se próximo a neutralidade, a inibição ou lentidão no desenvolvimento microbiano não foram favorecidas.

Uma limitação do estudo é que a abertura dos frascos foi realizada uma vez por semana, mas as amostras podem ser utilizadas para a administração diária ou ainda várias vezes ao dia. Neste caso, sendo a abertura dos frascos mais frequente, é desconhecido como esse fator pode influenciar na estabilidade microbiológica.

A avaliação da estabilidade microbiológica é um aspecto crítico a ser considerado pelo farmacêutico na preparação de medicamentos, podendo os resultados deste trabalho contribuir na qualidade e segurança de derivações de cloridrato de tizanidina.

7. CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE

7.1 INTRODUÇÃO

7.1.1 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

O objetivo do teste de estabilidade é fornecer indícios sobre como a qualidade de um fármaco ou produto acabado varia com o tempo, sob a influência de uma variedade de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e estabelecer o prazo de validade nas condições de armazenamento recomendadas (ICH, 2003). Além disso, a estabilidade é influenciada por outros fatores, como interações entre fármacos, excipientes e o recipiente de embalagem utilizado (BAJAJ, SINGLA e SAKHUJA, 2012).

A qualidade deve ser mantida sob as várias condições em que os produtos farmacêuticos encontram-se, durante a produção, transporte e armazenamento, bem como em moradia. Portanto, compreender os fatores que alteram a estabilidade dos medicamentos e identificar formas de estabilidade são fundamentais (YOSHIOKA e STELLA, 2000).

No Brasil, os estudos de estabilidade para a determinação do prazo de validade de um produto farmacêutico são regidos pela Resolução RE nº1 de 29 de julho de 2005. Esses estudos podem ser acelerados, de longa duração e de acompanhamento.

A exposição à luz é um dos fatores ambientais que podem estar relacionados a diversas reações de degradação em medicamentos. Reações de oxidação e redução, rearranjo de anéis, polimerização ou modificação, podem ocorrer frente à exposição à luz em determinados comprimentos de onda. As reações absorvidas em baixo comprimento de onda contribuem mais facilmente para o início de reações químicas do que as absorvidas a partir de comprimentos de onda maiores (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2010).

O objetivo do teste de fotoestabilidade é demonstrar como a qualidade do fármaco pode variar quando é exposto à influência da luz, e que esta exposição não resulta em alterações inaceitáveis. O guia do ICH Q1B apresenta as condições para o estudo de fotoestabilidade e exige a realização de análises de degradação forçada para a elucidação das características intrínsecas da estabilidade de fármacos (ICH, 1996).

As reações degradativas podem apresentar cinética de ordem zero (velocidade da reação independe da concentração da substância ativa), primeira ordem (velocidade da reação depende da concentração de um dos reagentes) e segunda ordem (velocidade da reação depende da concentração de dois reagentes ou de um deles na segunda potência). Para a determinação da ordem da reação, considera-se a concentração do fármaco ao longo do estudo de degradação. Para a reação de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem, elaboram-se os gráficos de concentração *versus* tempo, log concentração *versus* tempo e 1/concentração *versus* tempo, respectivamente (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2010; NUDELMAN, 1975).

Os estudos de cinética de degradação apresentam vários objetivos, entre eles a obtenção experimental dos dados cinéticos, a proposição do mecanismo de ação e o estabelecimento das condições para acelerar ou diminuir a velocidade de reação conforme necessidade. O conhecimento do mecanismo de degradação pode contribuir na obtenção de maior estabilidade em formulações instáveis (NUDELMAN, 1975).

O estudo de degradação forçada foi a primeira etapa realizada na avaliação da estabilidade de cloridrato de tizanidina, e com base nos resultados obtidos determinou-se a exposição à luz UV-C como o fator de maior sensibilidade do fármaco. Considerando-se os poucos trabalhos de degradação do cloridrato de tizanidina na literatura, o objetivo deste capítulo foi a avaliação da cinética de fotodegradação do cloridrato de tizanidina. As análises das amostras foram realizadas pelo método por CLAE, descrito e validado no Capítulo I.

7.2 MATERIAIS

7.2.1 PRODUTO FARMACÊUTICO

Comprimidos contendo 2 mg de cloridrato de tizanidina, com o nome comercial de Sirdalud®, fabricados pelo laboratório Novartis, lote 1601363, fabricação 01/2016 e validade 12/2017. Excipientes: lactose, ácido esteárico, dióxido de silício e celulose microcristalina.

7.2.2 SOLVENTES E REAGENTES

- Ácido orto-fosfórico 85% grau analítico, Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil;
- Água purificada, Direct-Q3UV, Millipore®, Molsheim, France;
- Metanol grau cromatográfico, Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil;
- Trietilamina grau analítico, Tedia®, Fairfield, Estados Unidos.

7.2.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Coluna cromatográfica Phenyl Zorbax Eclipse XBD Agilent® (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), Estados Unidos;
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu 20A, equipado com controlador CBM-20A, bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20 AC, forno CTO-20AC, detector PDA SPD-M20A e software utilizado para controle e aquisição dos dados LC-solution, Shimadzu®, Japão;
- Potenciômetro Digimed®, modelo DM-20, Brasil;
- Banho de ultrassom Unique®, modelo USC 2850, Brasil;
- Balança analítica AND®, modelo HM – 202, Japão;
- Câmara de radiação com lâmpada UV-C (254 nm) (100 cm×18 cm×17 cm), Ecolume®, Estados Unidos.

7.3 MÉTODO

7.3.1 DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO

Preparou-se solução amostra estoque de cloridrato de tizandina na concentração de 200 µg/mL, conforme descrito em 4.3.2.1. Desta solução foram colocados 2 mL em cubetas de plástico, as quais foram dispostas em câmara espelhada com lâmpada UV-C emitindo radiação a 254 nm. As amostras foram retiradas em triplicata nos diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias). Depois de cada tempo de coleta, alíquotas de 1,5 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, completando-se os volumes com água, obtendo-se soluções na concentração de 30,0 µg/mL. As amostras foram filtradas em membrana com porosidade de 0,45 µm e analisadas pelo método por CLAE, descrito e validado no

Capítulo I. Preparou-se uma solução controle sob as mesmas condições e protegida da luz para avaliar a influência da temperatura durante a exposição das amostras à luz UV-C.

7.3.2 CÁLCULO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

A determinação da ordem de reação do cloridrato de tizanidina foi realizada plotando-se os gráficos de concentração *versus* tempo, log de concentração *versus* tempo e 1/concentração *versus* tempo. Coeficientes de regressão (r) foram obtidos a partir das retas construídas. A reta que apresentou o valor de r mais próximo à unidade determinou a ordem de reação para o fármaco.

Após a determinação da ordem da reação, calculou-se os valores da constante de velocidade de reação (k) (indica a quantidade de fármaco que se degrada por unidade de tempo) e $t_{90\%}$ (tempo em que a concentração do fármaco é 90% do valor inicial).

Os modelos cinéticos podem ser representados como (NUDELMAN, 1975):

- Cinética de ordem zero:

$$C = C_0 - kt$$

$$t_{90\%} = 0,1 \cdot C_0 / k$$

- Cinética de primeira ordem:

$$\ln C = \ln C_0 - kt$$

$$t_{90\%} = 0,106 / k$$

- Cinética de segunda ordem:

$$1 / C = 1 / C_0 + kt$$

$$t_{90\%} = 1 / 9k \cdot C_0$$

C_0 = Concentração do fármaco a reagir no tempo zero

C = Concentração do fármaco após a reação no tempo t

k = Constante de velocidade de reação

$t_{90\%}$ = Tempo com concentração 90%

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos no Capítulo I, onde submeteu-se a amostra às condições drásticas de degradação: hidrólise ácida e básica, oxidação, temperatura, luz UV-A e luz UV-C para determinar o fator de degradação mais suscetível, fez-se o estudo da cinética de degradação. Nestes estudos, realizados durante a especificidade do método por CLAE (item 4.3.2.1), observou-se que o cloridrato de tizanidina é suscetível à hidrólise básica e frente à luz UV-C. O processo de degradação do fármaco exposto à luz UV-C demonstrou-se gradual, enquanto que na hidrólise básica manteve-se apenas nos primeiros intervalos de tempo.

É necessário que as reações cinéticas apresentem uma porcentagem de degradação avançada (50% no mínimo), caso contrário o valor da velocidade de reação torna-se impreciso e geralmente maior do que o valor real (NUDELMAN, 1975).

As concentrações residuais de cloridrato de tizanidina em função do tempo de exposição à luz UV-C estão apresentadas na Tabela 19. Constatou-se que 55,16% do fármaco sofreu degradação após 7 dias de exposição.

Tabela 19 - Valores de concentração residual de cloridrato de tizanidina após exposição das amostras frente à luz UV-C, obtidos por CLAE.

Tempo (dias)	Concentração residual ($\mu\text{g/mL}$) *	DPR (%)
0	30,00 (100%)	0,54
1	27,30 (91,00%)	0,75
2	25,09 (83,65%)	0,12
3	22,46 (74,87%)	0,03
4	19,91 (66,38%)	1,76
5	18,15 (60,52%)	4,11
6	15,16 (50,53%)	1,41
7	13,45 (44,84%)	2,85

*n = 3

Na Figura 16 estão apresentados os cromatogramas obtidos para a solução amostra de cloridrato de tizanidina no tempo zero e sua degradação após 7 dias de exposição à luz UV-C. Pode-se verificar no cromatograma exposto à luz UV-C a presença de produtos de degradação majoritários em 6,3 e 9,5 minutos (resolução de 2,3 e 12,3 em relação ao pico do fármaco). A análise da solução controle sob as mesmas condições e protegida da luz não demonstrou haver influência da

temperatura no interior da câmara, uma vez que a concentração do fármaco permaneceu inalterada.

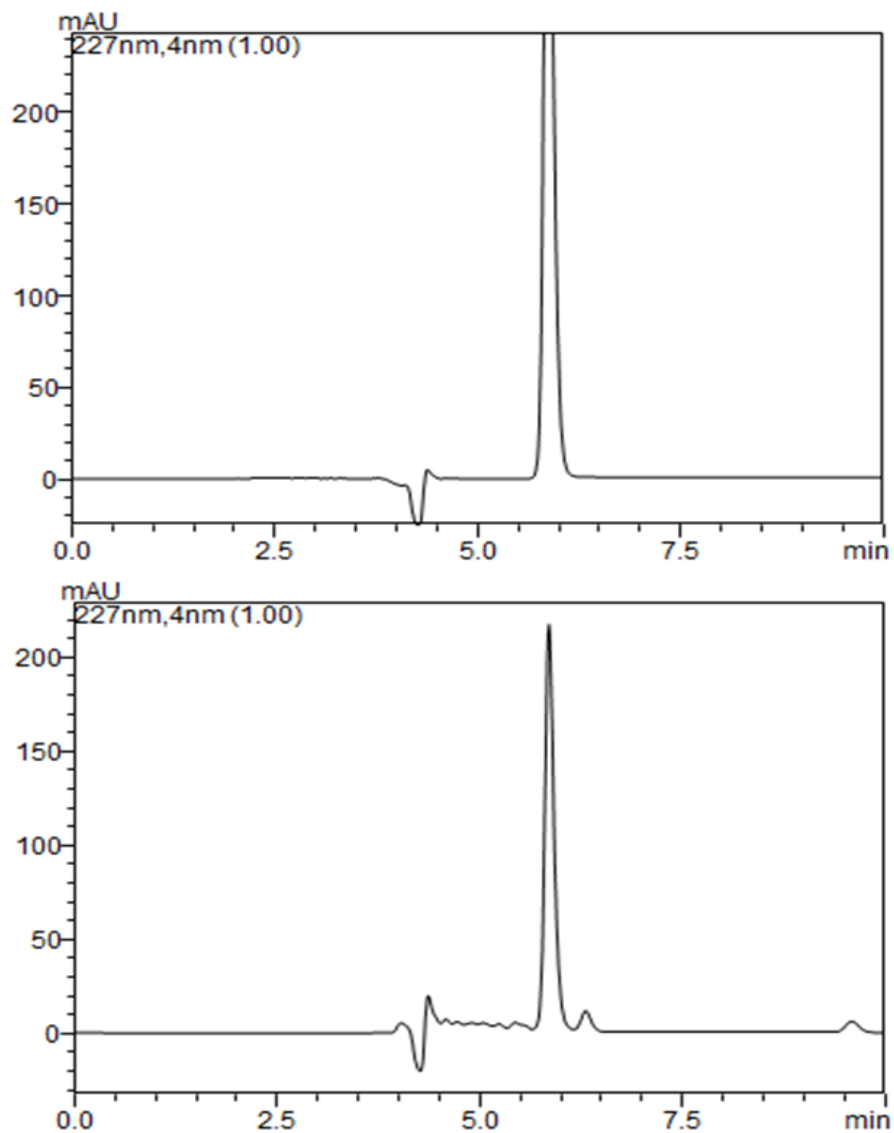


Figura 16 - Cromatogramas obtidos da amostra de cloridrato de tizanidina no tempo zero (1) e após 7 dias (2) de exposição à luz UV-C em escala ampliada.

A cinética de degradação foi calculada baseada na redução da concentração de cloridrato de tizanidina no intervalo de tempo determinado. Os gráficos obtidos plotando-se os dados de concentração *versus* tempo (cinética de ordem zero), log de concentração *versus* tempo (cinética de primeira ordem) e $1/\text{concentração}$ *versus* tempo (cinética de segunda ordem) estão apresentados na Figura 17.

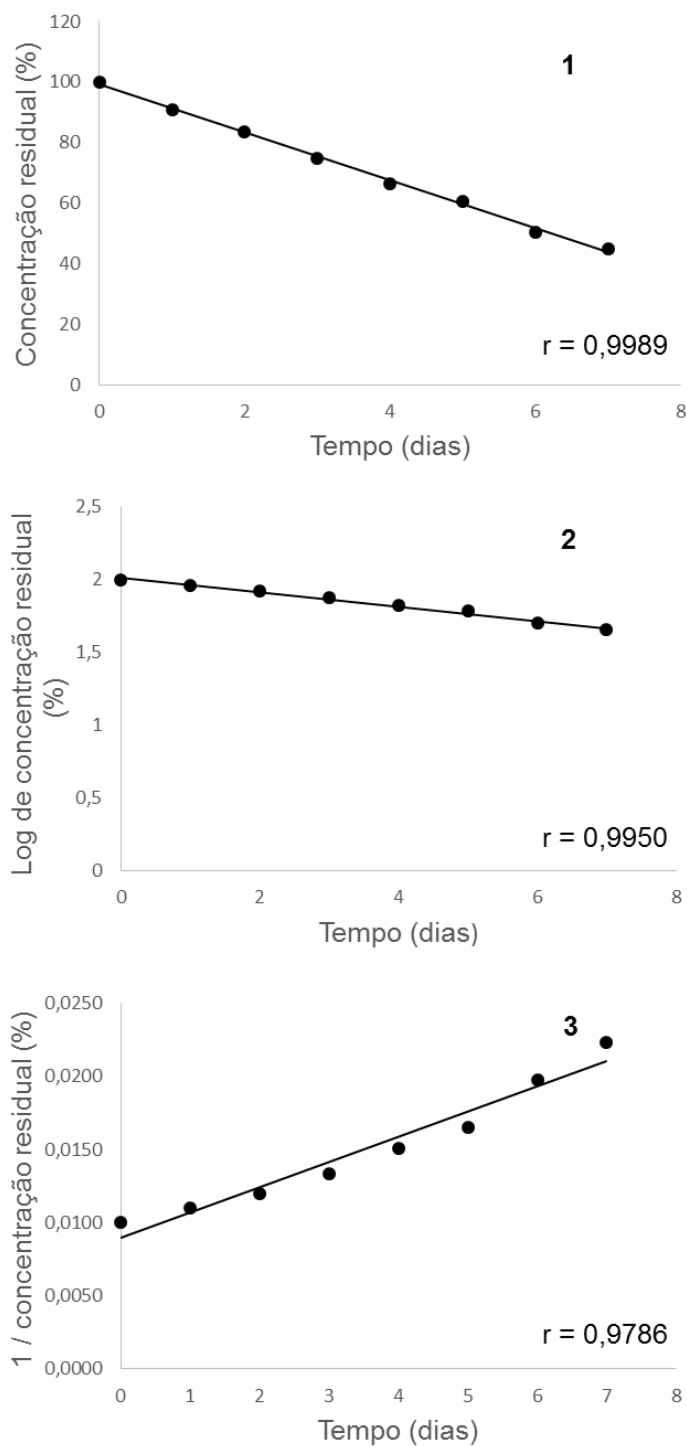


Figura 17 - Gráfico de concentração *versus* tempo (1), log de concentração *versus* tempo (2) e 1/concentração *versus* tempo na determinação da ordem de reação de cloridrato de tizanidina.

Os gráficos obtidos para a determinação da ordem da reação demonstraram que a reta que apresenta melhor coeficiente de correlação ($r = 0,9989$), representa a cinética de reação de ordem zero (velocidade de reação independente da

concentração do reagente). Os valores de k e $t_{90\%}$ calculados para a cinética de ordem zero foram $2,48 \text{ dias}^{-1}$ e 1,20 dias, respectivamente.

Outros trabalhos do nosso grupo também observaram que o processo de degradação seguiu cinética de ordem zero. Determinou-se a cinética de fotodegradação de rabeprazol sódico no intervalo entre 0 a 30 minutos e de cloridrato de tizanidina até 180 minutos, ambos verificando cinética de reação de mesma ordem (GARCIA *et al.*, 2008; SFAIR *et al.*, 2012).

A avaliação da cinética de degradação apresentou resultados importantes, evidenciando a sensibilidade do cloridrato de tizanidina frente à luz UV-C e a necessidade de compreender seu comportamento. Como perspectivas deste capítulo, serão elucidados os produtos de degradação por análise através de cromatografia acoplada à espectrometria de massas.

A existência de formas farmacêuticas apropriadas facilitaria a administração e o cumprimento dos tratamentos e evitaria perdas desnecessárias, reduzindo os custos em saúde. Uma formulação ideal teria facilidade de preparo pelo farmacêutico e de administração pela enfermagem, concentração e volumes suficientes para obtenção da medida ou da dosagem necessária, sabor agradável e apresentaria dados científicos que respaldassem o preparo e a determinação do prazo de validade. Entretanto, essa não é a realidade da pediatria, dada a carência de formas líquidas, o que se verifica, mais frequentemente, é a adaptação de formas farmacêuticas sólidas para líquidas e a prescrição de formulações magistrais (COSTA, LIMA e COELHO, 2009).

Desta forma, destina-se ao profissional farmacêutico a preparação desses medicamentos à população. Essa manipulação não está isenta de risco, e portando é necessário assegurar a qualidade e segurança através da realização de estudos de estabilidade. Salienta-se que muitas formulações carecem de dados documentados de estabilidade, sendo esta situação mais agravante no que se refere à estabilidade microbiológica, pois a maioria dos estudos incidem sobre estabilidade físico-química.

Considerando a necessidade de formulações apropriadas para a pediatria, no presente trabalho procedeu-se à derivação para administração oral de cloridrato de tizanidina e o estudo de estabilidade, pois como já foi referido, este fármaco existe apenas em comprimidos de 2 mg no mercado brasileiro.

Os resultados permitiram obter conclusões sobre a sua estabilidade e conhecer a viabilidade para uso terapêutico. Levando em consideração todos os resultados dos estudos, estabeleceu-se um prazo de utilização. Assim, as derivações de cloridrato de tizanidina têm um prazo de utilização de 56 dias, quando avaliadas segundo a estabilidade físico-química, independente das temperaturas e materiais de embalagem utilizados. Porém, quando avaliadas em relação a estabilidade microbiológica, resistem a um prazo de utilização de 7 dias. As derivações foram preparadas apenas em água para injetáveis e sem uso de excipientes, conforme a rotina do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, já que as derivações são preparadas como preparações extemporâneas. Portanto, por segurança e devido à variabilidade nos resultados obtidos, estabelece-se um prazo de utilização de no máximo 7 dias.

Esses resultados são bastante satisfatórios, pois o cloridrato de tizanidina poderá ser incorporado na rotina de preparo das derivações do hospital, atendendo a necessidade da enfermagem referente ao preparo e administração aos pacientes.

Essas derivações têm um papel relevante, preenchendo carências referentes ao medicamento e garantindo o acesso aos pacientes.

Apesar dos estudos de estabilidade assegurarem a qualidade, não representam garantia absoluta. Convém ressaltar que a correta preparação, conservação e administração das derivações em meio hospitalar não podem ser esquecidas, pois também são etapas muito importantes, principalmente para evitar contaminações microbianas. Apesar das dificuldades existentes, cabe ao profissional farmacêutico, dentro das instituições onde trabalha, atuar com competência técnica e reivindicar condições adequadas de trabalho.

Para completar os estudos realizados no presente trabalho e aumentar as informações disponíveis sobre a estabilidade, foi determinada a cinética de fotodegradação do fármaco, demonstrando perfil de ordem zero. Os conhecimentos de cinética, aplicados à velocidade de degradação e possíveis mecanismos de reação envolvidos, permitem a discussão em torno de uma série de fatores envolvidos na formulação, estabilização e administração de fármacos (MARTIN, 1993). Embora as condições forçadas de degradação não reproduzam a situação de rotina de armazenamento do fármaco, esses dados cinéticos contribuem para maiores informações sobre sua estabilidade.

A carência de medicamentos adequados para uso em crianças, envolve diversos medicamentos de grande utilidade clínica e constitui um problema de saúde não apenas do Brasil, mas mundial. Há necessidade de melhoria e um esforço conjunto dos profissionais da saúde, autoridades regulamentadoras e indústria farmacêutica, para estimularem estudos que envolvem medicamentos pediátricos.

Apesar de iniciativas importantes realizadas no exterior para aumentar a disponibilidade de medicamentos desenvolvidos para crianças, seu impacto na prática clínica ainda é muito pequeno. No Brasil alguns estudos evidenciam a relevância do problema, particularmente no contexto hospitalar, onde o uso de medicamentos não licenciados ou não padronizados para crianças, é uma realidade (COSTA, LIMA e COELHO, 2009). No futuro, os incentivos que têm sido disponibilizados à indústria farmacêutica europeia e americana deverão contribuir para aumentar o número de medicamentos pediátricos produzidos. Contudo, por várias razões, não é provável que estes venham a preencher todas as necessidades terapêuticas, muitas das quais continuarão a ser resolvidas através do recurso à prescrição ou preparação de medicamentos manipulados (PINTO e BARBOSA, 2008).

Certamente, os estudos de estabilidade fornecem informações relevantes quanto à qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos, podendo o farmacêutico preparar, dispensar e cumprir os requisitos de segurança exigidos com maior confiança. Diante disso, é imprescindível a busca de informações a respeito de estudos em preparações derivadas, para superar os desafios enfrentados no dia a dia em hospitais e assegurar às crianças um patamar elevado de segurança no uso de medicamentos.

- O método por CLAE para análise de cloridrato de tizanidina foi desenvolvido e validado, apresentando especificidade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez adequados;
- As derivações de cloridrato de tizanidina não apresentaram variação de teor maior do que os limites estipulados, pelo período de 56 dias, em temperatura ambiente, refrigerada e à 40 °C. Da mesma forma, o teor manteve-se dentro dos limites para as embalagens PET e vidro âmbar;
- As derivações apresentaram valores de pH ligeiramente inferiores quando comparadas com o valor inicial, porém com variações mínimas durante 56 dias, sem provocar modificações nas amostras;
- As derivações de cloridrato de tizanidina apresentaram valores dentro dos limites microbianos estipulados, pelo período de 7 dias, em todas as condições avaliadas;
- Os resultados obtidos poderão servir de contribuição para o preparo das derivações de cloridrato de tizanidina na rotina hospitalar, garantindo maior segurança ao paciente durante o tratamento de espasticidade;
- A fotodegradação frente à luz UV-C do cloridrato de tizanidina seguiu cinética de ordem zero.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. I. C. **Formulação em pediatria: preparação e avaliação de uma forma magistral líquida oral de pirazinamida**. 2007. 175f. Dissertação (Mestrado em Farmácia Hospitalar) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

ANRIG, C. Pediatric Drug Testing. **Dynamic Chiropractic**, v. 26, n. 6, 2008. Disponível em: <http://www.dynamicchiropractic.com/mpacms/dc/article.php?id=53106&no_paginate=true&p_friendly=true&no_b=true>. Acesso em: 20 dez. 2016.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224-2234, 2009.

ASHRAF, A.; KHALID, A. M. A.; MOHAMED, W.I. N. A Comparative Study of Different Approaches for Stability Indicating Determination of Tizanidine in Presence of Its Oxidative Degradation Product. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 3, p. 166-195, 2016.

AWAAD, Y.; RIZK, T. Spasticity in children. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 53-60, 2012.

BAJAJ, S.; SINGLA, D.; SAKHUJA, N. Stability Testing of Pharmaceutical Products. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 3, p. 129-138, 2012.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods — critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BAUMER, J. D.; RETZLAFF, F. A.; KRUG, S.; ZÉTOL, M.; BAZZO, G. C. Avaliação da estabilidade Físico-Química e Microbiológica de Formulações Extemporâneas Líquidas de Captopril para uso Pediátrico. **Farmácia & Ciência**, v. 2, p. 10-22, 2011.

BRANDALISE, M. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de cloridrato de tizanidina em formas farmacêuticas**. 2012. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria colegiada nº 67, de 08 de outubro de 2007. Dispões sobre as boas práticas de manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 out. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação do “Guia para a realização dos estudos de estabilidade”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2005.

BRUNTON, L. L. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

CALDERÓN-GUZMÁN, D.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; JUÁREZ-OLGUÍN, H.; TRUJILLO-JIMÉNEZ, F. Medicamentos empleados em dosis pediátricas unitarias. **Acta Pediátrica de México**, v. 33, n. 1, p. 44-47, 2012.

CARRANZA, J. H.; TORREJÓN, J. C. M. **Atención farmacêutica em pediatria**. Madrid: Elsevier, 2007.

CAVALCANTI, O. A.; CICERI, L. Material de acondicionamento e embalagem primário: avaliação da permeabilidade ao vapor d'água. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 6, n. 1, p. 57-60, 2002.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

CONROY S. Extemporaneous (magistral) preparation of oral medicines for children in European hospitals. **Acta Paediatrica**, v. 92, n. 4, p. 408–410, 2003.

COSTA, P. Q.; LIMA, J. E. S.; COELHO, H. L. L. Prescrição e preparo de medicamentos sem formulação adequada para crianças: um estudo de base hospitalar. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 57-66, 2009.

DHANARAJU, M. D.; VARMA, D. P.; MAGESH, A. R.; GUNASEKARAN, V. RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Rofecoxib and Tizanidine Hydrochloride in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. **International Journal of Biopharmaceutics**, v. 1, n. 2, p. 46-50, 2010.

DIPIRO, J. T.; TALBERT, R. L.; YEE, G. C.; MATZKE, G. R.; WELLS, B. G.; POSEY, L. M. **Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach**. 9. ed. New York: McGraw-Hill Education Medical, 2014.

DRUGBANK. Drug and drug target database. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00697>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

DUDHE, P. B.; JADHAV, S.; SAWARKAR, V.; NAGRAS, M. A. Method Development and Validation for Simultaneous Determination of Aceclofenac and Tizanidine in Bulk and Marketed Formulation. **International Journal of PharmTech Research**, v. 5, n. 3, p. 1212-1216, 2013.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

Farmacopéia Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

GANDHIMATHI, M.; RAVI, T. K.; VARGUESE, S. J. Simultaneous LC determination of tizanidine and rofecoxib in tablets. **Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 183-185, 2005.

GARCIA, C. V.; NUDELMAN, N. S.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Structural elucidation of rabeprazole sodium photodegradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 88-93, 2008.

GIAM, J. A.; MCLACHLAN, A. J. Extemporaneous product use in paediatric patients: a systematic review. **International Journal of Pharmacy Practice**, v. 16, p. 3-10, 2008.

GOMES, M. J. V. M.; REIS, A. M. M. **Ciências farmacêuticas: uma abordagem em farmácia hospitalar**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

GUPTA, V.; JAIN, A. D. K.; GILL, N. S.; GUPTA, K. Development and validation of HPLC method - a review. **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 17-25, 2012.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Stability testing: photostability testing of new drug substances and products (Q1B)**, 1996.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2)**, 2003.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, 2005.

KAUL, N.; DHANESHWAR, S. R.; AGRAWAL, H.; KAKAD, A.; PATIL, B. Application of HPLC and HPTLC for simultaneous determination of tizanidine and rofecoxib in pharmaceutical dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 27-38, 2005.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-868, 1999.

KUMAR, R. S.; NATHAN, P. S.; NALLASIVAN, P. K.; SOLOMON, W. D. S.; VENKATNARAYANAN, R. A validated reversed phase HPLC-method for the determination of aceclofenac and tizanidine in tablets. **Journal of pharmaceutical research and health care**, v. 2, p. 84-94, 2010.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 2. ed. Lisboa: Calouste Gulben Kian, 2010. v. 2.

MAHADIK, R. K.; PARADKAR, R. A.; AGRAWAL, H.; KAUL, N. Stability-indicating HPTLC determination of tizanidine hydrochloride in bulk drug and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 545-552, 2003.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1993.

MEADOWS, M. Drug Research and Children. **FDA Consumer Magazine**, jan./fev. 2003. Disponível em: <http://www.chiro.org/pediatrics/FULL/Drug_Research_and_Children.shtml>. Acesso em: 15 dez. 2013.

NALLURI, B. N.; SUSHMITHA, K.; SUNANDANA, B.; BADU, D. P. Development and Validation of RP-HPLC-PDA Method for Simultaneous Estimation of Baclofen and Tizanidine in Bulk and Dosage Forms. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 7, p.111-116, 2012.

NARAJJI, C.; PATEL, H. R.; KARVEKAR, M. D.; BABU, S. Simultaneous Estimation of Aceclofenac, Paracetamol and Tizanidine in Their Combined Dosage Forms by

Spectrophotometric and RP- HPLC Method. **Analytical & Bioanalytical Techniques**. v. 2, n. 4, p. 2-4, 2011.

NIKKHAH, A.; MOHAMMADI, M.; ASHRAFI, M. R.; ZAMANI, G. H. The efficacy and safety of tizanidine in treating spasticity in children with cerebral palsy. **Iranian Journal of Child Neurology**, v. 5, n. 3, p. 19-22, 2011.

NIMJE, H.; WATE, S. P.; DHARKAR, D. P.; RAZDAN, R. Simultaneous RPHPLC Determination of Nimesulide and Tizanidine in Tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 2, p. 281-283, 2007.

NIROGI, R. V.; KANDIKERE, V. N.; SHUKLA, M.; MUDIGONDA, K.; MAURYA, S. Quantification of tizanidine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2286-2292, 2006.

NOCITI, J. R. Agonistas α 2-Adrenérgicos: Perspectiva Atual. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 51, n. 4, p. 271-271, 2001.

NOVARTIS, 2016. Sirdalud® 2 mg. São Paulo, 2016. 1f. Bula.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: Ateneo, 1975.

O'DONNELL, P. B.; BOKSER, A. D. Stability of pharmaceutical products. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 22. ed. Philadelphia: The university of the sciences, 2013. v. 1.

PALADUGU, S.; DIVAKAR, B.; RAMA, H. B.; RAMU, A.; MAHESH, U. Development and Validation of New Analytical Method for the Estimation of Tizanidine Hydrochloride in Bulk and in Formulation by UV Spectrophotometric Method. **International Journal of Pharma Sciences**, v. 3, n. 6, p. 403-407, 2013.

PALAZON, G. R.; BENAVENTE, V. A.; ARROYO, R. O. Protocol for tizanidine use in infantile cerebral palsy. **Anales de Pediatría (Barc)**, v. 68, n. 5, p. 511-515, 2008.

PINTO, S.; BARBOSA, C. M. Medicamentos Manipulados em Pediatria - Estado Actual e Perspectivas Futuras. **Arquivos de Medicina**, v. 22, n. 2/3, p. 75-84, 2008.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

PUBCHEM COMPOUNDS. Compound Summary. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/114869#section=Top>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

PURANIK, M.; WADHER, S. J.; DHOLE, S.; YEOLE, P. G. Simultaneous estimation of valdecoxib and tizanidine hydrochloride in tablets by RP-HPLC. **Indian Journal Pharmaceutical Science**, v. 68, p. 670-672, 2006.

QI, M. L.; WANG, P.; WANG, L. Validated liquid chromatography method for assay of tizanidine in drug substance and formulated product. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, p. 171–177, 2002.

RAMAA, C. S.; DESHPANDE, D. K.; SHIRODE, A. R.; WAMORKAR, V. V.; KAKAD, A. B.; KADAM, V. J. Reserve-Phase High Performance Liquid Chromatographic Determination of Tizanidine and Valdecoxib in Tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 4, p. 514-516, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Rang & Dale farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROSA, A. M.; GERLIN, M. C. G.; ALCÂNTARA, I. C.; SVERSUT, R. A.; CARDOSO, T. F. M.; RODRIGUES, P. O.; AMARAL, M. S.; KASSAB, N. M. Desenvolvimento e

estudo de estabilidade de formulações extemporâneas de uso oral a partir de comprimidos comerciais contendo espironolactona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 385-392, 2014.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; COOK, W. G.; FENTON, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 7. ed. London: Pharmaceutical Press, 2012.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SALGADO, A. C.; ROSA, M. L.; DUARTE, M. A.; ALMEIDA, A. J. Stability of spironolactone in an extemporaneously prepared aqueous suspension: the importance of microbiological quality of compounded paediatric formulations. **The European Journal of Hospital Pharmacy Science**, v. 11, n. 3, p. 68-73, 2005.

SANTOS, L.; HEINECK, L. Drug utilization study in pediatric prescriptions of a university hospital in southern brazil: off-label, unlicensed and high-alert medications. **Farmacia Hospitalaria**, v. 36, n. 4, p. 180-186, 2012.

SANTOS, L.; HEINECK, L. Extemporaneous Oral Preparations. An Alternative for Hospitalized Children. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 5, p. 996-1000, 2011.

SFAIR, L. L.; GRAEFF, J. S.; PAIM, C. S.; PASSOS, C. S.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Photodegradation kinetics, cytotoxicity assay and determination by stability-indicating HPLC method of mianserin hydrochloride. **Pharmazie**, v. 67, p. 490-494, 2012.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and ICH. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SILVA, J. R.; CHOZE, R.; PEIXOTO, D. M.; BASÍLIO, A. R.; MORAIS, A. J. S.; JAILES, A. C. S. Comparação da Estabilidade do Paracetamol Solução Oral Armazenada em Frasco Vidro e Polietileno. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 18, n. 3, p. 143-150, 2014.

SIVASUBRAMANIAN, L.; DEVARAJAN, L. Spectrophotometric and HPLC methods for Simultaneous Estimation of Tizanidine and Valdecoxib from Tablets. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, n. 1, p. 96-102, 2009.

STANDING, J. F.; TULEU, C. Paediatric formulations – getting to the heart of the problem. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 300, p. 56-66, 2005.

SUJATHA, K.; CHITRA, K.; HETTIARACHCHI, D. S.; KRISHNA, M. V.; VASANTHA, J. Spectrophotometric determination of tizanidine hydrochloride. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, p. 519-520, 2003.

SWEETMAN, S. C. **Martindale: The Complete Drug Reference**. 37. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. v. 1.

The Pharmacopoeia of Japan. 16. ed. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011.

TRISSEL, L. A. **Trissel's stability of compounded formulations**. 4. ed. Washington: American Pharmacists Association, 2009.

USP 38. **The United States Pharmacopeia**. 38. ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2015.

USP DI. **Drug Information for the Health Care Professional**. 26. ed. Greenwood Village: Thomson Micromedex, 2006. v. 1.

VAIDYA, V. V.; SINGH, G. R.; CHOUKEKAR, M. P.; KEKARE, M. B. Simultaneous RP HPLC Determination of Aceclofenac, Paracetamol and Tizanidine in Pharmaceutical Preparations. **E-Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 260-264, 2010.

VIJAYAKUMAR, E. K. S.; GORE, V. G.; MAHAJAN, A.; KUMAR, M. Isolation and Characterization of a Process Impurity in Tizanidine Hydrochloride. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 3, p. 360-362, 2010.

WAGSTAFF, A. J.; BRYSON, H. M. Tizanidine: A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of spasticity associated with cerebral and spinal disorders. **Drugs**. v. 53, p. 435-452, 1997.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 3. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2012.

WIBERG, K.; ANDERSSON, M.; HAGMAN, A.; JACOBSSON, S. P. Peak purity determination with principal component analysis of high-performance liquid chromatography-diode array detection data. **Journal of Chromatography A**, v. 1029, p. 13-20, 2004.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000.