



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Rayanne Sales de Araújo Batista

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DA
ESTABILIDADE TÉRMICA DE FORMULAÇÃO CREME DE ÁCIDO RETINOICO**

Campina Grande

2015

Rayanne Sales de Araújo Batista

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE FORMULAÇÃO CREME DE ÁCIDO RETINOICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB como exigência para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Fábio Santos de Souza

Coorientador (a): Mara Rúbia Winter de Vargas

Campina Grande

2015

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

B333d Batista, Rayanne Sales de Araújo.
Desenvolvimento de metodologia analítica para análise da estabilidade térmica de formulação creme de ácido retinoico [manuscrito] / Rayanne Sales de Araújo Batista. - 2015.
83 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.
"Orientação: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza, Departamento de Farmácia".

1. Retinóides. 2. Controle de qualidade. 3. CLAE-UV. 4. DSC. 5. FTIR. I. Título.

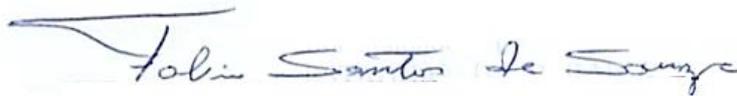
21. ed. CDD 615.19

Rayanne Sales de Araújo Batista

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE FORMULAÇÃO CREME DE ÁCIDO RETINOICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB como exigência para obtenção do título de Mestre.

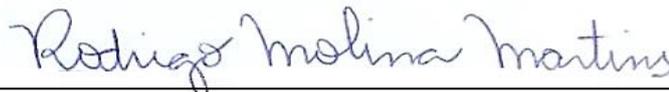
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fábio Santos de Souza
Orientador



Prof.^a Dr.^a Mônica Oliveira da Silva Simões – UEPB
Membro Interno



Dr. Rodrigo Molina Martins – UFPB
Membro Externo

Campina Grande, 19 de março de 2015.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

REITOR

Prof. Dr. Antonio Guedes Rangel Júnior

VICE-REITOR

Prof. Dr. José Ethan de Lucena Barbosa

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Prof.^a Dr.^a Maria José Lima da Silva

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Prof.^a Dr.^a Dilma Maria de Brito Melo Trovão

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

A Deus, meu Senhor,
conselheiro e fiel amigo, e minha paz;

A minha família,
pilar da minha vida;

Ao meu grupo de pesquisa, LUDM;

Aos meus amigos, pelo apoio de sempre;

A todos os estudantes que almejam e buscam um futuro baseado nos estudos e esforços;
E, a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada, impulsionando
essa vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu infinito amor e misericórdia, por me dar a graça de acordar todos os dias com saúde e força para lutar, e por ter a certeza que sem Teu apoio incondicional, Pai, nada teria feito, obrigada pela vitória e realização de um sonho.

A minha família, em especial meus pais, os quais sempre se esforçaram ao máximo para me oferecer o melhor, por sempre acreditar que meus estudos são a melhor herança, por crer em minha capacidade de vencer e, apoiar a cada passo.

Aos meus tios Alda e Edson, por me acolherem no seu seio familiar e terem comigo um tratamento de filha em momento tão importante desta trajetória.

Ao meu namorado e amigo, Ernane Nogueira Nunes, por entender minha vida corrida de pesquisa, minhas ausências, e mesmo assim incentivar-me a continuar nesse caminho, por me atender sempre quando precisei de seus conselhos e ajuda na construção dessa dissertação, além do apoio incondicional em minha vida.

Aos mestres científicos da graduação, os quais me impulsionaram pelo meio científico.

Ao meu orientador, Professor Doutor Fábio Santos de Souza, primeiro por aceitar me orientar e apostar que corresponderia as suas expectativas, segundo por me oferecer uma oportunidade de conhecimento ímpar e ensinamentos tanto no curso da pesquisa quanto da vida. E ao professor Doutor Rui Oliveira Macêdo, pelo apoio e auxílio no decorrer da pesquisa.

Ao grupo de pesquisa LUDEM, por ter me acolhido de braços abertos, e pela ajuda e apoio sempre que precisei.

Em especial às duas companheiras, anjos que O Senhor Deus colocou em minha vida no momento certo, com as quais construí não só uma relação de coleguismo durante a pesquisa, mas sim uma relação de amizade verdadeira, sem as quais não teria conseguido chegar até aqui, aquelas que diversas vezes pedi e prontamente me estenderam a mão, Taynara Lins e Waleska Viana, agradeço imensamente tudo que fizeram por mim.

Aos meus amigos da graduação, do mestrado e da vida, que sempre me incentivaram e apoiaram nessa jornada.

Às doutoras Francinalva Dantas de Medeiros e Elisana Afonso de Moura Pires, pela participação na banca examinadora para qualificação desta dissertação, e pela contribuição depositada neste trabalho.

À professora doutora Mônica Oliveira da Silva Simões e ao Dr. Rodrigo Molina Martins pela participação na banca examinadora da defesa deste trabalho, pelos seus conselhos e contribuição para versão final do mesmo.

À Universidade Estadual da Paraíba, instituição pela qual obtive meu título de Graduação em Farmácia, e pela oportunidade de poder cursar esta Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Universidade Federal da Paraíba, pela infraestrutura concedida para realização deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, pelo apoio e compreensão.

Ao CNPq e a CAPES.

A todos que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento dessa pesquisa.

"Se as coisas são
inatingíveis... ora!
Não é motivo para não
querê-las...
Que tristes os
caminhos, se não fora
A presença distante das
estrelas!"

(Mário Quintana)

“No campo das
observações, o
acaso só favorece as
mentes preparadas.”

(Luis Pasteur)

RESUMO

BATISTA, R.S.A. **Desenvolvimento de metodologia analítica para análise da estabilidade térmica de formulação creme de ácido retinoico**. 2015. 83f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

O ácido retinoico (AR), largamente utilizado em produtos dermatológicos e cosméticos, apresenta baixa estabilidade na presença de ar e luz, com sensibilidade ao calor e à oxidação, assim, é particularmente importante implementar o controle de qualidade de seus produtos acabados realizando ensaios indicadores de estabilidade. Logo, objetivou-se desenvolver um método analítico para avaliar a estabilidade térmica de uma formulação creme de AR através da correlação de técnicas analíticas, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Previamente foram estabelecidas as condições cromatográficas para desenvolvimento do método analítico utilizando um sistema de CLAE-UV, o qual foi submetido aos testes analíticos especificados na RE ANVISA nº 899/2003 para validação do mesmo. Para avaliação da estabilidade térmica, as amostras do creme foram submetidas a estresse térmico em estufa nas temperaturas de 60, 70 e 80 ° C, e posteriormente analisadas por CLAE-UV no período de 0, 24, 48 e 72 h. As análises de DSC e dos espectros de FTIR foram realizadas a partir das misturas binárias (MB) do AR e excipientes da formulação creme a fim de investigar possíveis interações físicas e/ou químicas. De acordo com os dados obtidos foi possível desenvolver um método analítico por CLAE-UV validado, e com base no mesmo, para análise e quantificação do teor de AR em formulação creme, constatou-se que a partir de 70 ° C ocorreu redução no teor de AR, e cinética de ordem 0; a 80 ° C, obedeceu uma cinética de ordem 2, configurando uma reação do tipo bimolecular. As técnicas analíticas DSC e FTIR mostraram a ausência de interação física e química na maioria das MB entre os componentes da formulação, com exceção apenas para o excipiente metabissulfito de sódio. Desta forma, podemos inferir que a mesma apresenta um comportamento térmico bem definido e compatibilidade entre seus componentes.

Palavras-chave: Retinoides. Estabilidade. CLAE-UV. DSC. FTIR.

ABSTRACT

BATISTA, R.S.A. **Development of an analytical method for analysis of the thermal stability of retinoic acid cream formulation.** 2015. 83f. Dissertation (Master). State University of Paraíba, Campina Grande, in 2015.

Retinoic acid (RA), widely used in dermatological and cosmetic products, has low stability in the presence of air and light, with sensitivity to heat and oxidation, so it is particularly important to implement the quality control of its finished products performing tests indicators of stability. Therefore, the objective was to develop an analytical method to evaluate the thermal stability of an RA cream formulation through the correlation of analytical techniques, high performance liquid chromatography with ultraviolet detection efficiency (HPLC-UV), differential scanning calorimetry (DSC) and vibrational absorption spectroscopy in the infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR). Previously been established chromatographic conditions for development of the analytical method using HPLC-UV system, which was subjected to analytical tests specified in RE ANVISA N° 899/2003 for validation. For evaluation of the thermal stability the cream samples were subjected to thermal stress in an oven at temperatures of 60, 70 and 80 °C and subsequently analyzed by HPLC-UV over the period of 0, 24, 48 and 72 h. DSC analyzes and FTIR spectra were carried out from the binary mixture (BM) of the RA and excipients of the cream formulation to investigate possible physical and/or chemical interactions. According to the data obtained it was possible to develop an analytical method by validated HPLC-UV, and based thereon, for analyzing and quantifying the RA content cream formulation, it has been found that from 70 ° C caused a decrease in the content of RA, and 0-order kinetics; and 80 ° C, followed a kinetic order 2 by setting up a reaction of bimolecular type. The analytical techniques DSC and FTIR showed the absence of chemical and physical interaction in most MB among the components of the formulation, except only for the carrier sodium metabisulfite. Thus, we can infer that it has a well-defined thermal behavior and compatibility of its components.

Keywords: Retinoids. Stability. HPLC-UV. DSC. FTIR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese do ácido retinoico.....	36
Figura 2. Estrutura química do ácido trans-retinoico.....	36
Figura 3. Estrutura do ácido retinoico e das impurezas relacionadas.....	37
Figura 4. Isomerização do ácido retinoico.....	38
Figura 5. Pico de absorção do AR.....	48
Figura 6. Perfil cromatográfico das amostras: placebo (A), padrão AR (B) e placebo contaminado (C) em 342 nm.....	50
Figura 7. Curva de calibração média do padrão de ácido retinoico em 342nm.....	51
Figura 8. Gráfico dos resíduos para o padrão de AR.....	52
Figura 9. Cromatogramas referentes à temperatura de 60 °C (0, 24, 48 e 72 h).....	56
Figura 10. Degradação térmica do creme de AR para 60 e 70 ° C.....	57
Figura 11. Cromatogramas referentes à temperatura de 70 ° C (0, 24, 48 e 72 h).....	57
Figura 12. Degradação térmica do creme de AR para 80 °C.....	58
Figura 13. Cromatogramas referentes à temperatura de 80 ° C (0, 24, 48 e 72 h).....	59
Figura 14. Curva DSC do ácido retinoico.....	61
Figura 15. Espectro FTIR do ácido retinoico (AR).....	62
Figura 16. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) AR, BHT e ARBHT.....	64
Figura 17. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, EDTA e AREDTA.....	65
Figura 18. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, MS e ARMS.....	65
Figura 19. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, PWX e ARPWX.....	66
Figura 20. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, EO e AREO.....	67
Figura 21. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, NZ e ARNZ.....	68
Figura 22. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, NG e ARNG.....	68
Figura 23. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, PGL e ARPGL.....	70
Figura 24. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, SIL e ARSIL.....	71

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Zonas climáticas segundo a OMS para realização de estudos.....	21
Tabela 2. Parâmetros para realização de estudos de estabilidade em formulações semissólidas.....	24
Tabela 3. Condições de estresse preconizadas pela ANVISA para a realização do estudo de degradação forçada.....	25
Quadro 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	31
Quadro 2. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	32
Tabela 4. Componentes do creme de ácido retinoico.....	46
Tabela 5. Dados das curvas analíticas.....	51
Tabela 6. Valores experimentais obtidos no ensaio de repetibilidade.....	53
Tabela 7. Valores experimentais obtidos no ensaio de precisão intermediária.....	53
Tabela 8. Valores obtidos na avaliação da exatidão do método.....	54
Tabela 9. Valores obtidos na avaliação da robustez do método.....	54
Tabela 10. Parâmetros cinéticos da degradação para o estresse térmico da formulação creme de AR.....	56
Tabela 11. Picos IV correspondentes aos grupos químicos do AR.....	62
Tabela 12. Valores de T_{onset} , T_{pico} e entalpia do pico de fusão do AR obtido nas curvas DSC do estudo de compatibilidade do fármaco/excipientes, misturas físicas 1:1.....	63
Tabela 13. Valores dos números de onda (cm^{-1}) dos principais picos de absorção na região do IV para o AR no estudo de compatibilidade do fármaco/excipientes, misturas físicas 1:1.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ADH** – Álcool desidrogenase
- ANVISA** – Agência de Vigilância Sanitária
- AR** – Ácido Retinoico
- AT** – Análise Térmica
- BHT** – Butil-hidroxitolueno
- BP** – British Pharmacopeia
- CG** – Cromatografia Gasosa
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficência
- CV%** - Coeficiente de Variação Percentual
- DP** – Desvio Padrão
- DP_a** – Desvio padrão do intercepto com o eixo Y
- DPR** – Desvio Padrão Relativo
- DSC** – Calorimetria Exploratória Diferencial
- DTA** – Análise Térmica Diferencial
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetraacético
- EO** - Estearato de octila
- FB** – Farmacopéia Brasileira
- FTIR** – Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier
- g** – grama
- h** – hora
- IC** – Inclinação da curva de calibração
- ICH** – International Conference on Harmonisation
- IEC** – Comissão Eletrotécnica Internacional
- IFA** – Insumo Farmacêutico Ativo
- ISO** – Organização Internacional para Padronização
- IT** – Informe Técnico
- IV** – Infravermelho
- K** – Constante de velocidade de degradação
- LD** – Limite de detecção
- LQ** – Limite de quantificação
- m:m** – massa:massa
- mg** - miligrama

min – minuto
mL – mililitro
MS - Metabissulfito de sódio
NBR – Norma Brasileira
NG – Nipagin
nm – nanômetro
NZ – Nipazol
° C – graus Celsius
OMS – Organização Mundial da Saúde
pf – ponto de fusão
PGL – Propilenoglicol
PTFE – TEFLON
PVDF – Fluoreto Polivinidileno
PWX – Polawax
r² – Coeficiente de Correlação Linear
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RE – Resolução
SE – Solução estoque
SIL - Silicone
TG – Termogravimetria
T_{onset} – Temperatura inicial
T_{pico} – Temperatura do pico
UR – Umidade Relativa
USP – United States Pharmacopeia
UV-Vis – Ultravioleta-Visível
v/v – volume/volume
WHO – World Health Organization
ΔH_{fus} – variação da entalpia de fusão
λ – Número de onda
µg – micrograma
µL – microlitro
µm – micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO I	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1. Estabilidade de produtos farmacêuticos	20
3.1.1. Estabilidade de cosméticos semissólidos	22
3.1.2. Testes de estresse	24
3.2. Técnicas analíticas empregadas na avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos	25
3.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	26
3.2.2. Análise térmica.....	27
3.2.3. Espectroscopia por Infravermelho	28
3.3. Método de Arrhenius	29
3.4. Validação de metodologias analíticas	30
3.4.1. Parâmetros de validação	32
3.5. Ácido retinoico – fármaco modelo	35
CAPÍTULO II	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Local da pesquisa.....	40
4.2. Reagentes e materiais	40
4.3. Desenvolvimento do método cromatográfico	40
4.4. Tecnologia de extração do analito.....	41
4.5. Validação de metodologia analítica de análise por CLAE.....	41
4.5.1. Especificidade	42
4.5.2. Linearidade	42
4.5.3. Intervalo	42
4.5.4. Precisão	43
4.5.5. Precisão intermediária.....	43
4.5.6. Limite de detecção	43
4.5.7. Limite de quantificação	43
4.5.8. Exatidão.....	44
4.5.9. Robustez.....	44
4.6. Estresse térmico	44
4.6.1. Preparo das amostras	44
4.6.2. Condições de estresse	45
4.6.3. Avaliação por CLAE	45
4.7. Estudo de compatibilidade.....	45
4.7.1. Preparo das amostras	45

4.7.2. <i>Condições de análise</i>	46
CAPÍTULO III	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Validação do método analítico por CLAE	48
5.1.1. <i>Especificidade</i>	48
5.1.2. <i>Linearidade</i>	50
5.1.3. <i>Precisão</i>	52
5.1.4. <i>Exatidão</i>	54
5.1.5. <i>Robustez</i>	54
5.2. Estresse térmico da formulação de AR	55
5.3. Estudo de compatibilidade	60
5.3.1. <i>Fármaco</i>	60
5.3.2. <i>Misturas binárias</i>	62
CAPÍTULO IV	72
6. CONCLUSÃO	73
CAPÍTULO V	74
7. PERSPECTIVAS	75
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	76

1. INTRODUÇÃO

No campo farmacêutico, os retinoides, com ênfase no ácido retinoico e seus isômeros, são amplamente utilizados no tratamento de condições dermatológicas tais como acne, desordens de queratinização, câncer de pele, assim como para reduzir os sinais clínicos de envelhecimento da pele, regulando o crescimento e diferenciação de células epiteliais, a produção de sebo, e a síntese de colágeno (BRECHER, ORLOW, 2003; IOELE et al., 2005; KANE, 2012).

Em adição ao largo uso do ácido retinoico em formulações cosméticas e ainda de preparo magistral, informações sobre seus níveis de concentração (HUBINGER, 2009) em tais produtos é muito limitado, e a elucidação de parâmetros de estabilidade, tendo em vista a já consagrada sensibilidade da tretinoína ao calor e à oxidação durante o armazenamento, e sua fotolabilidade (GATTI, GIOIA, CAVRINI, 2000), são importantes para o controle de qualidade dos produtos acabados.

Dessa forma, as agências reguladoras em todo o mundo exigem que o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) ou produto acabado mantenham a sua identidade, qualidade, pureza e potência para o tempo que está disponível comercialmente e, tal capacidade refere-se à estabilidade dos produtos farmacêuticos, a qual pode ser garantida por meio da promoção de estudos de estabilidade (CHA et al., 2011; LOFTSSON, 2014). Os estudos de estabilidade proporcionam evidências de como a qualidade do produto final do fármaco, IFA, ou excipiente farmacêutico varia com o tempo sob a influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, pH e luz. Ainda podem auxiliar na sugestão de transporte, materiais de embalagem, excipientes farmacêuticos, e microrganismos que afetam o produto (LOFTSSON, 2014).

No Brasil aplica-se a RE nº1/2005 (BRASIL, 2005) como guia para realização de estudos de estabilidade, esta resolução visa à determinação de prazos de validade de produtos farmacêuticos, como também menciona a quantificação dos produtos de degradação e o método analítico correspondente, sendo necessária a aplicação de testes de estresse. Ainda regulamenta-se pelas RDC Nº 45/ 2012, que dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de IFAs, e RDC Nº 58/2013, que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos (BRASIL, 2012; BRASIL, 2013).

Concordante com Zhou et al. (2009), os testes de estresse são considerados uma ferramenta preditiva com ênfase em resultados qualitativos, porém de grande utilidade para o

desenvolvimento de novas formulações, pois a partir dos primeiros sinais de instabilidade de um fármaco já é possível auxiliar na identificação de problemas potenciais de desenvolvimento, assim como articular estratégias de estabilização e sugerir maneiras de otimizar os processos de fabricação.

Técnicas analíticas de alta sensibilidade têm sido utilizadas para promover estudos de estabilidade, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) que é um dos métodos analíticos largamente utilizados para a análise, tanto quantitativa quanto qualitativa do IFA (TASHTOUSH, JACOBSON, JACOBSON, 2007; HUBINGER, 2009; VELLOSO et al., 2009; GUIMARAES, 2010; JAIN, BASNIWAL, 2013). Em adição a análise cromatográfica outra técnica tem contribuído para o avanço da ciência cosmética, a Análise Térmica, que pode ser utilizada tanto no controle da matéria-prima, quanto do produto acabado, avaliando rapidamente uma possível interação entre os componentes ativos e os excipientes em estudos de compatibilidade na pré-formulação, além de avaliar a existência de polimorfismo, assim como processos produtivos (SILVA, DE PAOLA, MATOS, 2007; NETO, 2009). Corroborando com as técnicas analíticas citadas, a espectrofotometria na região do infravermelho (IV) é também uma ferramenta útil na determinação quantitativa dos componentes da formulação, e assim para sua estabilidade, sendo um método sensível e rápido, permitindo detectar sua identidade por comparação com substâncias químicas padronizadas (BRASIL, 2004).

Logo, ressaltamos a importância da correlação de tais técnicas analíticas visando à avaliação da estabilidade térmica de uma formulação creme de ácido retinoico quando submetida a condições de estresse térmico, o que possibilita avaliar a sua integridade química e física, ou seja, análise de teor do princípio ativo, possíveis produtos de degradação e sua cinética, como também a compatibilidade entre os componentes da formulação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a estabilidade térmica da formulação creme de ácido retinoico (AR) através da correlação de técnicas analíticas, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), análise térmica (AT) e infravermelho (IV).

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de ácido retinoico em formulação creme por CLAE;
- Aplicação do método analítico por CLAE na determinação da estabilidade térmica da formulação creme de AR frente à degradação térmica por calor seco;
- Determinar os parâmetros cinéticos de degradação do AR em formulação creme submetida ao estresse térmico;
- Correlação dos dados de compatibilidade obtidos por DSC com os dados de IV das misturas binárias dos constituintes da formulação magistral.

CAPÍTULO I
Fundamentação Teórica

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Estabilidade de produtos farmacêuticos

Concordante com Guo e colaboradores (2013), a estabilidade de um fármaco, como parâmetro de qualidade e desempenho, deve ser avaliada e controlada desde o desenvolvimento farmacêutico até os estudos clínicos e durante a comercialização, uma vez que estudos de estabilidade proporcionam evidências sobre como a qualidade de um IFA ou um produto do fármaco varia com o tempo, sob temperatura e umidade relativa controladas, além de ser considerado um procedimento preditivo para estabelecer o tempo de prateleira e condições de armazenamento do produto farmacêutico.

Nesse âmbito, a estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de vários fatores, desde ambientais, como temperatura, umidade, luz, e de outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas, de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens, conforme estabelecido na RE nº1/2005 (BRASIL, 2005).

Para fins práticos desse tipo de estudo é necessário definir as zonas climáticas as quais se submetem o IFA e/ou o produto acabado, uma vez que devido à grande variabilidade climática, subdividiu-se o globo em áreas com destoantes condições de temperatura e umidade, a fim de propiciar a comercialização destes em outras zonas climáticas (CARVALHO et al., 2005; BOTT, OLIVEIRA, 2007).

De acordo com o “World Health Organization” (WHO), as zonas climáticas e suas respectivas condições de armazenamento para estudos de estabilidade de longa duração estão descritas na Tabela 1.

No Brasil, zona climática IV, o procedimento dos ensaios de estabilidade segue a RE nº1/05 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a qual destaca que os estudos de estabilidade de fármacos e medicamentos para predição de seu prazo de validade, os quais podem ser classificados como estudos acelerados, estudos de longa duração ou estudos de acompanhamento.

Tabela 1. Zonas climáticas segundo o WHO para realização de estudos de estabilidade.

Zona Climática	Definição	Condições de Armazenamento
I	Temperada	21°C / 45 % UR
II	Mediterrânea	25°C / 60 % UR
III	Quente e Seco	30°C / 35 % UR
IV	Quente e Úmido	30°C / 65 % UR

Fonte: Who, 2004.

Os estudos de estabilidade acelerada são realizados para obtenção de registro e prazo de validade provisórios de produtos farmacêuticos, aceito por um período de 6 meses. Eles são propostos visando acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento, os quais seguem a condição de 40 °C \pm 2 °C / 75% \pm 5% de umidade relativa (BRASIL, 2005).

Findo o período provisório de seis meses dos estudos acelerados, os de longa duração devem ser apresentados para comprovar o prazo de validade e as condições de armazenamento do produto. Estes são propostos para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico, dentro das condições mais próximas possíveis em que o produto será comercializado. Em geral, devem ser realizados a 30°C \pm 2 °C / 65% \pm 5% de umidade relativa, pelo período de 12 meses, com alguma variação dependendo da forma farmacêutica (BRASIL, 2005).

E com o fim de verificar a manutenção das características do produto farmacêutico, sejam elas, físicas, biológicas e microbiológicas, os estudos de acompanhamento devem ser aplicados, os quais podem ser realizados uma vez ao ano durante o prazo de validade proposto, nas condições climáticas preconizadas para o estudo de longa duração, desde que o produto não tenha sido modificado (BRASIL, 2005).

Além do preconizado pela literatura e legislação vigente para as condições de armazenamento utilizadas para realização dos ensaios de estabilidade outras condições podem ser empregadas, a exemplo de produtos farmacêuticos acondicionados em recipientes impermeáveis, logo não há necessidade de controle da umidade relativa, para tanto é necessário realizar testes de estresse, também conhecidos como estudos de degradação forçada, os quais assumem diversas condições que permitem prever as consequências sofridas

pelo IFA ou produto farmacêutico sob circunstâncias extremas de degradação, ultrapassando as previstas para estudos acelerados (ICH, 2003; KLICK et al., 2005).

Para a indústria farmacêutica tanto os testes de estresse quanto o desenvolvimento de métodos analíticos que possam identificar e quantificar produtos de degradação são de alta relevância, pois esse estudo crítico deve ser realizado nas etapas de registro, pós-registro e renovação do IFA ou medicamento (NETO, 2009). Neste passo, o “International Conference on Harmonisation”, no guia Q1A R2 (ICH, 2003), intitulado “Stability Testing of New Drug Substances and Products”, afirma que o exame de produtos de degradação sob condições de estresse é útil para estabelecer vias de degradação e desenvolvimento e validação de procedimentos analíticos adequados.

No Brasil, apoiando a RE nº01/2005, dispõe-se da RDC nº45/2012 que aprova o Regulamento Técnico para realização dos testes de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos com o objetivo de prever, determinar ou acompanhar sua data de reteste ou seu prazo de validade, incluindo os testes de degradação forçada; e ainda a RDC nº 58/2013 que estabelece parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento.

Para realização dos testes de estabilidade se faz necessário não apenas se cercar dos procedimentos adequados para isso, mas também compreender a teoria das reações de degradação e dos princípios de cinética química, visto que as reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química, podendo ser aceleradas através do aumento da temperatura. Além disso, é na cinética de reação, ou seja, no estudo de velocidade de degradação e no modo como essa velocidade é influenciada pelos fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o produto, que se baseia a determinação da estabilidade e prazo de validade de fármacos e medicamentos (PRISTA et al., 1990; LACHMAN et al., 2001; ZHOU, PORTER, ZHANG, 2009).

3.1.1. Estabilidade de cosméticos semissólidos

Um ramo da indústria farmacêutica que está em constante avanço e mudança é a indústria cosmética, e por se tratar de um setor de alta competitividade entre as empresas afins, além da ausência de normas específicas padronizadas para a mesma, os profissionais

ligados à área têm empregado referências sobre estudos de estabilidade utilizados pela indústria farmacêutica, com as alterações necessárias (BRASIL, 2004).

Em geral, os fármacos degradam a velocidades muito mais rápidas em solução do que no seu estado sólido, e muito mais rapidamente em soluções aquosas do que em soluções não aquosas. Degradação de drogas em formas farmacêuticas semissólidas frequentemente se assemelha a degradação da droga em soluções, particularmente aquelas que consistem em uma fase líquida, tais como géis. Em se tratando de formas farmacêuticas semissólidas, os cremes são largamente utilizados, e consistem em emulsões com uma fase lipofílica e uma fase aquosa. Cremes hidrofílicos são emulsões óleo em água (o/a) e cremes lipofílicos são emulsões água em óleo (a/o). Também usuais, as pomadas podem conter suspensões farmacêuticas, caso em que o medicamento é, em parte, uma fase sólida. A cinética de degradação da droga, então, é semelhante às de suspensões aquosas de drogas. Em cremes, a droga é dispersa entre a fase oleosa e a fase aquosa, e frequentemente a droga se degrada muito mais rapidamente na fase aquosa do que na fase oleosa. Logo, a constante de velocidade observada para a degradação é a média ponderada das constantes de velocidade das fases oleosa e aquosa (LOFTSSON, 2014).

No tocante a exposição a fatores extrínsecos, conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004), extremos de temperatura alteram reações físico-químicas e químicas assim como aspectos físicos do produto, levando a modificações na atividade de componentes, viscosidade, aspecto, cor e odor do produto, turvação, precipitação, cristalização. Tais eventos, em função da temperatura, podem ser decorrentes também de não-conformidades no processo de fabricação, armazenamento ou transporte do produto. Desta forma, a estabilidade térmica revela-se um parâmetro de grande relevância tratando-se da garantia da qualidade, eficácia e segurança de produtos farmacêuticos.

Segundo a resolução nº1/2005 (BRASIL, 2005), os parâmetros para realização de estudos de estabilidade de formulações semissólidas seguem definidos na Tabela 2, de acordo com o tipo de embalagem que são acondicionados e as condições climáticas de sua zona de comercialização.

Tabela 2. Parâmetros para realização de estudos de estabilidade em formulações semissólidas.

Condição de Armazenamento	Embalagem	Estudo Acelerado	Estudo de Longa Duração
15°C – 30°C	Semipermeável	40°C ± 2°C 75% ± 5% UR	30°C ± 2°C 75% ± 5% UR
15°C – 30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C

Fonte: Brasil, 2005.

3.1.2. Testes de estresse

Segundo a legislação brasileira, RDC n°45/2012 e RDC n°58/2013, testes de estresse ou degradação forçada são estudos executados sob condições mais severas do que as utilizadas no estudo de estabilidade acelerada, permitindo a geração de produtos de degradação através da exposição do IFA e produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica e oxidação, entre outras. Este estudo permite auxiliar em parte à estratégia de desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, bem como fornecer informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto.

Além de fornecer informações sobre as vias de degradação do IFA, isolado e em medicamento, os estudos de degradação forçada indicam eventuais substâncias polimórficas ou enantioméricas e alteração da droga relacionada à degradação e as interferências do excipiente (RAO; RAJU; NARSIMHA, 2008).

De acordo com o ICH (2003), adotado pelo “European Medicines Agency”, a natureza do teste de estresse irá depender do fármaco individualmente e do tipo de medicamento envolvido. Ela deve incluir o efeito de temperaturas em incrementos de 10 ° C acima da temperatura acelerada para as condições do teste (por exemplo, 50 ° C, 60 ° C, etc.), umidade (por exemplo, 75% UR ou superior) se for o caso, oxidação e fotólise da substância medicamentosa. O teste deve também avaliar a suscetibilidade do IFA por hidrólise através de uma ampla gama de valores de pH, quando em solução ou suspensão. Testes de fotoestabilidade deve ser parte integrante dos testes de estresse. Porém não reporta detalhes para realização dos estudos de oxidação, fotólise e hidrólise, configurando-se uma barreira

para tomada de decisões a respeito das condições de estresse empregadas no estudo, e dessa forma a necessidade de pesquisas nesse âmbito.

Na RE N° 01, de 29/07/2005 - Guia para Realização dos Estudos de Estabilidade no Brasil, já era preconizada a realização do ensaio de identificação e quantificação de produtos de degradação e método analítico correspondente no estudo de estabilidade, para todos os produtos a serem registrados. Como visto o estudo de degradação não era e não é um conceito novo nas legislações e compêndios farmacêuticos nacionais e internacionais, porém não havia legislação ou normas que definissem um procedimento para sua realização.

Na tentativa de solucionar os anseios de quais procedimentos deveriam ser utilizados no desenvolvimento de um estudo de produtos de degradação, a ANVISA lançou, em 2008, o Informe Técnico (IT) n° 1 contendo diretrizes e especificações para conduzir os estudos de degradação forçada. Neste informe técnico, o órgão regulatório nacional, preconizou que para as documentações de registro, pós-registro e renovação, deveriam apresentar estudos iniciais submetendo o medicamento a condições de estresse e análise crítica conforme as condições de estresse especificadas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições de estresse preconizadas pela ANVISA para a realização do estudo de degradação forçada.

Aquecimento	60 °C
Umidade	75% UR ou >
Solução Ácida	0,1 M HCl
Solução Básica	0,1 M NaOH
Solução Oxidativa	3% H ₂ O ₂
Fotolítica	UV-B fluorescente
Íons metálicos (opcional)	0,05M Fe ²⁺ ou Cu ²⁺

Fonte: Brasil, 2008.

3.2. Técnicas analíticas empregadas na avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos

Avaliando os relatos da literatura encontram-se as técnicas titulométricas, espectrofotométricas e cromatográficas como técnicas comumente empregadas na análise da

estabilidade de amostras, além de poucos relatos de uso de técnicas variadas (BAKSHI, SINGH, 2002).

De acordo com centros habilitados para fiscalização e monitoramento dos medicamentos comercializados, a metodologia analítica utilizada é o doseamento do princípio ativo, assim como as indicadas pelo fabricante ou compêndios oficiais, como as farmacopeias (CARVALHO et al., 2005).

Para o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004), quando necessário, diferentes técnicas analíticas podem ser utilizadas na determinação quantitativa dos componentes da formulação, entre elas: espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (UV-Vis) e Infravermelho (IV), cromatografia (camada delgada, gasosa e líquida de alta eficiência), eletroforese capilar, entre outras. Tais testes são recomendações, de forma que cabe ao formulador avaliar sua adequação ao produto levando em consideração características particulares do mesmo.

3.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Esta técnica destaca-se como uma das técnicas preconizadas pelos compêndios oficiais, como a Farmacopeia Brasileira e a “United States Pharmacopeia” (USP), em métodos analíticos validados indicativos de estabilidade, os quais sejam exatos e precisos para doseamento e análise de teor de ingredientes ativos livres de impurezas de processo, excipientes e produtos de degradação (BIRADAR et al., 2014).

O processo cromatográfico baseia-se em uma técnica de separação na qual os componentes são distribuídos entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial, denominada fase estacionária, e outra, denominada fase móvel, um fluido que percola através da fase estacionária. A separação dos componentes da amostra ocorre pela diferença do coeficiente de distribuição da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária (LANÇAS, 2009).

Através do cromatograma gerado a partir da técnica de CLAE, é feita a leitura da análise, no qual é possível obter, de forma ideal, o pico do IFA e do produto de degradação em tempos de retenção diferentes. Porém, existem alguns fenômenos na cromatografia que encobrem o produto de degradação como a transparência, a estimativa equivocada e o tempo de retenção coincidente. Desta forma, a metodologia para esse tipo de análise deve considerar o estabelecimento de um padrão com caracterização do tempo de retenção e comprimento de onda adequados (CARVALHO et al., 2005).

Esta técnica é mais utilizada para doseamento de IFAs e, para identificação do produto de degradação por essa metodologia, utiliza-se amostra que contenha a substância ativa e o produto de interesse (CARVALHO et al., 2005). Muitos estudos têm utilizado esta técnica, a exemplo de Hubinger (2009), que a utilizou para quantificar vários retinoides e seus isômeros em produtos cosméticos; de Velloso e colaboradores (2009), que desenvolveram um método para quantificação de AR em microcápsulas de alginato e quitosana em CLAE-UV, obtendo bons resultados com o uso da técnica; assim como Gaspar e Campos (2010) utilizaram CLAE para avaliar a influência de fotoestabilizantes em formulações cosméticas contendo filtros UV e vitaminas A e E.

3.2.2. *Análise térmica*

Outro método utilizado para entender a degradação por temperatura é a análise térmica, que proporciona resultados quantitativos termodinâmicos e cinéticos quanto às propriedades do fármaco com a vantagem do menor tempo de ensaio e a utilização de pequenas quantidades de amostras. Pode ser empregado para diferentes aplicações, como: identificação e análise da pureza de materiais, estudos de compatibilidade, determinação de temperaturas e entalpias características de mudanças de estados físicos (fusão e vaporização), transformações de fases e reações e avaliação da cinética de decomposição térmica (SILVA, PAOLA, MATOS, 2007).

Dentre as técnicas termoanalíticas empregadas com maior frequência na indústria farmacêutica estão: a termogravimetria (TG); análise térmica diferencial (DTA); calorimetria exploratória diferencial (DSC) (ARAÚJO et al., 2006).

De acordo com Silva e colaboradores (2007), as técnicas termoanalíticas são de grande importância no âmbito da indústria cosmética pela grande variedade de aplicações, uma vez que pode ser utilizada tanto no controle da matéria-prima, quanto do produto acabado, possuindo potencial de emprego no desenvolvimento e na caracterização de novos produtos, avaliação dos processos produtivos, além de outras aplicações.

Embora não substituam os estudos convencionais, os quais requerem longos períodos de armazenamento das amostras, sob condições controladas de temperatura e umidade, as técnicas termoanalíticas mostram-se extremamente úteis em estudos de estabilidade, possibilitando a escolha das formulações mais estáveis com extrema rapidez, fator desejável especialmente para a indústria farmacêutica (BAZZO, SILVA, 2005; RODANTE et al., 2002).

No âmbito científico, muitos pesquisadores têm contribuído com estudos os quais aplicam a análise térmica em análises de IFAs de uso cosmético, assim como em todo o processo desde o desenvolvimento ao controle de produtos cosméticos. Perioli et al. (2006) utilizaram entre outras técnicas as termoanalíticas para caracterizar a inclusão do filtro solar, ácido sulfônico fenibenzilimidazol, em argila aniônica chegando a conclusões sobre boas matrizes para incorporação do filtro solar. Lima et al. (2014) utilizaram DSC e TG como técnicas complementares para avaliar a compatibilidade entre AR e vários excipientes farmacêuticos. E, Guillen et al. (2006) avaliaram o comportamento térmico das substâncias DMAE e ácido ascórbico isoladamente e incorporados em emulsões ou géis, sendo que o ácido ascórbico foi a substância que apresentou maior estabilidade.

3.2.3. Espectroscopia por Infravermelho

A espectroscopia por infravermelho compreende a seção do espectro eletromagnético entre os números de ondas de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Esta técnica não só fornece identificações únicas para cada molécula, como também identifica grupamentos funcionais independentemente da molécula a que pertencem. É uma técnica rápida e com o mínimo ou nenhuma preparação de amostra necessária para a caracterização e elucidação de estrutura molecular, na qual as moléculas ou grupamentos funcionais vibram (deformação angular ou estiramento) quando absorvem a radiação do infravermelho em determinado número de onda (SILVERTEIN et al., 2006).

Os métodos espectrofotométricos são frequentemente empregados em análises farmacêuticas devido a sua fácil execução, baixo custo, além de propiciar sua utilização no controle de qualidade de rotina de inúmeros produtos farmacêuticos, e a comparação do perfil espectral permite auxiliar na identificação da substância em análise (ZARBIELLI et al., 2006).

A espectroscopia na região do infravermelho médio era pouco usada em análises quantitativas devido a algumas limitações da técnica. Porém, com o advento da transformada de Fourier na espectroscopia por infravermelho (FTIR), associada ao surgimento dos microprocessadores digitais e de técnicas computacionais avançadas, permitiu-se a análise de misturas complexas como fármacos, por exemplo, sem a necessidade de qualquer separação prévia de seus componentes (DE SOUZA, FERRÃO, 2006).

Esta ferramenta analítica apresenta-se bastante útil nos estudos de caracterização, compatibilidade e estabilidade de formulações farmacêuticas e tem sido usada em diversas

pesquisas como técnica complementar para avaliação de possíveis interações entre componentes de fórmulas. Ascenso e colaboradores (2011) utilizaram a técnica de FTIR complementarmente a outras técnicas para estudo de caracterização do AR e seu complexo com dimetil-beta-ciclodextrina, auxiliando na escolha do melhor método de complexação. Singh e Nath (2011) avaliaram a compatibilidade da lamivudina comparando as técnicas de DSC e FTIR. E, esta técnica foi também utilizada por Lima e colaboradores (2014) como suplementar para investigação de possíveis interações entre AR e excipientes usados em formas farmacêuticas semissólidas.

3.3. Método de Arrhenius

Na maior parte dos processos de degradação química de um IFA é necessária a presença de energia para ultrapassar a barreira de ativação, a qual é denominada como energia de ativação (E_a), ou seja, a E_a é a energia mínima necessária para que ocorra uma reação. A combinação de moléculas irá originar uma distribuição de energia, a qual depende da temperatura, e à temperatura mais elevada existe um maior número de moléculas a produzir mais e melhor energia (WATERMAN, 2009).

Vários métodos para determinação da estabilidade química de produtos farmacêuticos são reportados na literatura, dentre eles o método de Arrhenius apresenta uma relação quantitativa entre velocidade de reação e temperatura, dada pela equação de Arrhenius:

$$K(T) = A e^{-E_a/RT}$$

Onde:

K é a velocidade específica da reação;

A é o fator pré-exponencial ou fator de frequência;

E_a é a energia de ativação;

R é a constante geral dos gases e

T é a temperatura absoluta (WATERMAN e ADAMI, 2005; PRISTA et al., 2009).

Dessa forma é possível prever a estabilidade de numerosos IFAs, para uma temperatura normal de armazenamento a partir dos resultados obtidos com base em ensaios acelerados de estabilidade (LACHMAN et al., 2001). Isto porque a energia de ativação é diretamente proporcional à estabilidade (OLIVEIRA et al., 2011).

Este método consiste em expor o fármaco ou medicamento a, no mínimo, três condições de temperatura superiores à normal e acompanhar, em tempos determinados, o decréscimo da concentração da substância ativa.

Com esses dados, elaboram-se representações gráficas ($C \times t$; $\log C \times t$; $1/C \times t$), correspondendo às três ordens de reação: zero, primeira e segunda. Dessa forma, a avaliação da cinética química e determinação da ordem das reações permite obter o perfil de degradação de um fármaco ou medicamento, ou seja, a sua concentração versus tempo (MURAKAMI et al., 2009). E, aquela representação gráfica que proporcionar a curva mais próxima de uma reta determinará a ordem de reação e a sua inclinação fornecerá a constante de velocidade (K) da reação de degradação do fármaco, em cada temperatura utilizada.

3.4. Validação de metodologias analíticas

Os estudos de estabilidade abordam também o desenvolvimento de métodos analíticos indicadores de estabilidade, os quais devem permitir a quantificação exata da substância ativa, assim como separar a mesma dos produtos de degradação. Para tanto, é relevante que o método proposto seja validado para assegurar sua eficiência (HONG, SHAH, 2000).

Quando há necessidade da detecção exata e da quantificação dos produtos de degradação o uso de métodos indicadores de estabilidade é obrigatório; portanto, segundo Baertschi (2006), o desenvolvimento destes métodos começa com a detecção de produtos de degradação relevantes, a partir de condições de degradação forçada, prevendo sua possível formação, também em estudos de estabilidade acelerada ou de longa duração. A validação de um método analítico indicador de estabilidade parte da determinação de sua especificidade frente à análise da substância de interesse e seus produtos de degradação, avaliando também a precisão e a exatidão do ensaio. O desenvolvimento e validação dos métodos analíticos indicadores de estabilidade é justificado pela necessidade de técnicas potenciais para a separação dos componentes de uma mistura física do fármaco e seus produtos de degradação (BAKSHI, SINGH, 2002).

De maneira geral, conforme a NBR ISO/IEC (2001), BRASIL (2003) e “World Health Organization” (WHO) (1992), a validação de um método analítico é a confirmação por ensaios e fornecimento de evidência objetiva, de que o procedimento analítico selecionado dará resultados reprodutíveis e confiáveis para a proposta pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

No Brasil, o guia para estudos de validação de métodos analíticos é a resolução RE nº 899, de 2003 (BRASIL, 2003), a qual se aplica para técnicas analíticas que façam uso de métodos cromatográficos, como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A resolução diz que para que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados, o mesmo deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão adequados à análise.

De acordo com a RE nº 899, de 2003 (BRASIL, 2003), no caso de metodologia analítica não descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, deve-se avaliar os parâmetros relacionados com a finalidade do teste, consoante aos Quadros 1 e 2.

Quadro 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: Brasil, 2003.

Quadro 2. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade					
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: Brasil, 2003.

(*) pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

(**) se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

3.4.1. Parâmetros de validação

De acordo com a Tabela 8, para os testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas são exigidos os testes de especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade), limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

3.4.1.1. Especificidade e Seletividade

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). Segundo Lanças (2009), seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar um analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias suscetíveis de interferirem na determinação.

3.4.1.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$ (BRASIL, 2003).

Efetivamente a linearidade é determinada por gráficos de calibração, seguida de um tratamento estatístico, o qual deve ser adequado, envolvendo, no mínimo, a equação da função (usualmente, uma reta), a análise da regressão e os dados de correlação e determinação (LANÇAS, 2009).

3.4.1.3. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados, quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003).

Dessa forma, o método não deve ser empregado fora destes limites, e caso precise ser modificado para estender o intervalo de aplicação, deve ser planejado e exercido um novo procedimento de validação (LANÇAS, 2009).

3.4.1.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto, que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que vinte. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (RIBANI et al, 2004). Esta é considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-corrída), concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o

mesmo analista e mesma instrumentação; precisão intermediária (precisão inter-corridas), concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes; reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias (BRASIL, 2003).

3.4.1.5. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. No caso de métodos instrumentais (CLAE, Cromatografia Gasosa - CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003).

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL; INMETRO, 2003; ICH, 1995). O limite de quantificação é um parâmetro determinado principalmente para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas, sendo expresso como concentração do analito na amostra. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003).

Tanto LD quanto LQ podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica. Porém, o melhor caminho para o cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. A curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ (RIBANI et al., 2004).

3.4.1.6. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). O número de ensaios varia

segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH (1995) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA (BRASIL, 2003). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão (RIBANI et al, 2004).

3.4.1.7. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir, ou seja, sua sensibilidade, a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003). No desenvolvimento da metodologia que utiliza técnicas cromatográficas, deve-se considerar a avaliação da robustez pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, bem como o tempo de extração, entre outros (RIBANI et al, 2004). Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

3.5. Ácido retinoico – fármaco modelo

Dos retinoides, o ácido retinoico (AR), também conhecido como ácido all-trans-retinoico, vitamina A ácida ou tretinoína, é considerado o mais bioativo e de ocorrência natural, no tocante a modulação das funções da pele, ainda levando em consideração que todos os outros retinoides se convertem neste produto para exercerem os seus efeitos benéficos na pele, ou seja, é a forma ativa do produto metabólico da vitamina A (LUPO, 2001; RIGOPOULOS et al., 2004; YAMAGUCHI et al., 2005).

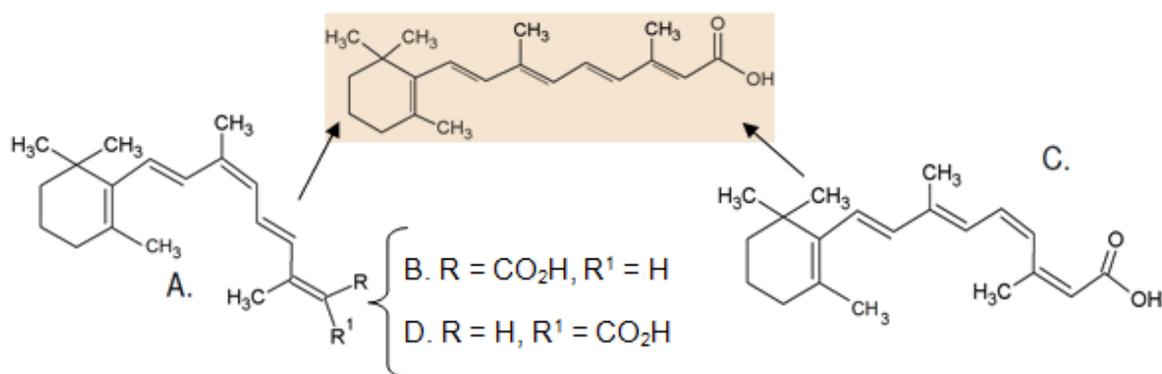
O AR pode ser obtido por síntese através do metabolismo do retinol, no qual o retinol é convertido por oxidação para retinol-aldeído, e em seguida, para ácido retinoico (Figura 1) (STEINER, 2006).

presença de luz, calor, ácidos fortes e solventes contendo oxigênio ou peróxido (GATTI, GIOIA, CAVRINI, 2000).

De acordo com os relatos da literatura, estudos de estabilidade de várias formulações comerciais contendo ácido retinoico vêm sendo realizados e, em sua maioria, colocam a sensibilidade à luz senão como a principal causa, mas como uma das mais relevantes para instabilidade e formação de produtos de degradação do ácido retinoico, principalmente por fotoisomerização (MARTIN et al., 1998; BRISAERT, PLAIZIER-VERCAMMEN, 2000; LIN et al., 2000; NYIRADY et al., 2002; MANCONI et al., 2003; IOELE et al., 2005; NIGHLAND et al., 2006; BRISAERT, PLAIZIER-VERCAMMEN, 2007).

A Farmacopeia Britânica (2009) relata como possíveis impurezas da tretinoína o seu isômero isotretinoína (A), assim como 9,13-di-*cis*-ácido retinoico (B), 11,13-di-*cis*-ácido retinoico (C), 9-*cis*-ácido retinoico (D), e produtos da oxidação da tretinoína (Figura 3).

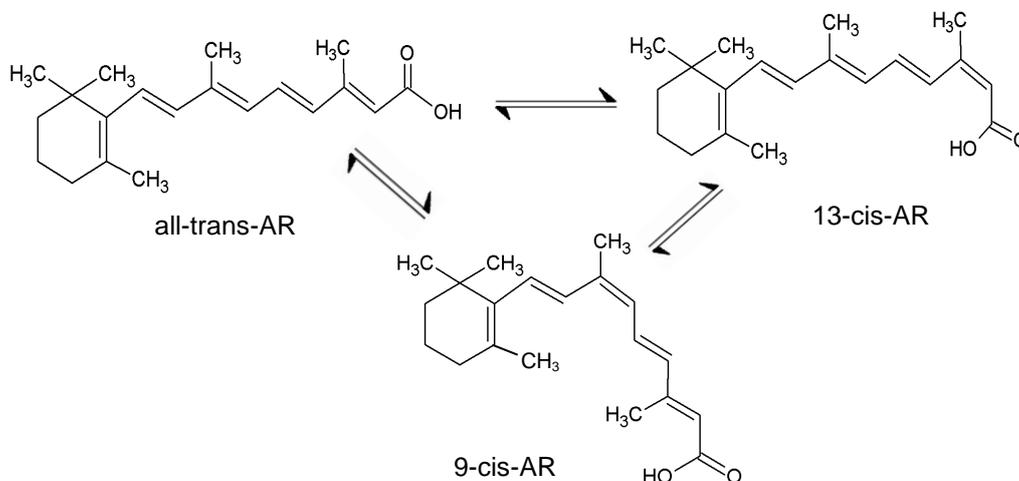
Figura 3. Estrutura do ácido retinoico e das impurezas relacionadas.



Fonte: Adaptado da Farmacopeia Britânica, 2009.

Estudos revelam que a irradiação em formulações contendo tretinoína levou à formação de vários e diferentes isômeros desta (ácido all-*trans* retinoico), e embora a isotretinoína (13-*cis*-ácido retinoico) seja um dos isômeros mais importantes, assim como também é relatado o isômero alitretinoína (9-*cis*-ácido retinoico), os quais também apresentam atividade terapêutica, em torno de 40% de tretinoína é isomerizada para isômeros inativos (Figura 4) (MOTTO et al., 1989; LOVAT et al., 1997; BRISAERT E PLAIZIER-VERCAMMEN, 2000).

Figura 4. Isomerização do ácido retinoico.



Fonte: pesquisadora.

Desde as últimas décadas, o ácido retinoico continua sendo o agente comedolítico tópico mais efetivo disponível (BROWN, SHALITA, 1998), pois tem demonstrado eficácia em distúrbios de queratinização e no tratamento de outras lesões cutâneas, quando aplicado topicamente (CONTRERAS et al., 2005). As reações adversas da tretinoína são limitadas à pele, uma vez que apenas cerca de 1% do fármaco aplicado topicamente é absorvido, de forma que não é suficiente para modificar o nível de vitamina A plasmática (WEBSTER, 1998). Como desvantagem para sua aplicação tópica, o AR apresenta irritação local, eritema, descamação, queimação e secura da pele, assim como aumenta a sensibilidade da pele à radiação solar, portanto, o uso de protetores solares é evidentemente necessário.

O AR encontra-se disponível comercialmente em concentrações que variam de 0,025% a 0,1% nas formas farmacêuticas creme, gel e solução alcoólica e, em especial na prática clínica, as formulações em creme de tretinoína são prescritas como preparações magistrais com frequência (BROWN, SHALITA, 1998; BRISAERT, PLAIZIER-VERCAMMEN, 2007).

Como já foi abordado, muitos estudos a respeito da estabilidade de formulações comerciais de ácido retinoico vem sendo realizados, porém é escasso o número de pesquisas no âmbito da estabilidade térmica de formulações creme de ácido retinoico, justificando-se sua avaliação e ainda a utilização de técnicas analíticas para este fim, à exemplo de cromatografia líquida de alta eficiência, análise térmica e infravermelho de forma correlacionada.

CAPÍTULO II
Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada nas dependências dos Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas / Centro de Ciências da Saúde / Universidade Federal da Paraíba (LUDEM/DCF/CCS/UFPB).

4.2. Reagentes e materiais

Ácido retinoico grau farmacêutico (Fagron, São Paulo, Brasil), BHT (Pharmaspecial, São Paulo, Brasil), EDTA (Sintética, São Paulo, Brasil), metabissulfito de sódio (Valdequímica, São Paulo, Brasil), estearato de octila (Fragon, São Paulo, Brasil), nipazol (DEG, São Paulo, Brasil), nipagin (Purifarma, São Paulo, Brasil), polawax (Pharma Nostra Comec, Rio de Janeiro, Brasil), propilenoglicol (AAL Chemistry, São Paulo, Brasil), silicone (Pharma Nostra Comec, Rio de Janeiro, Brasil), etanol grau CLAE (Tédia, Rio de Janeiro, Brasil), ácido acético glacial (Quimex, São Paulo, Brasil), metanol grau CLAE (J.T. Baker, USA).

As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas de uma farmácia magistral do comércio local, na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba. O creme de ácido retinoico obtido nessa farmácia apresenta-se na concentração de 0,025%, acondicionado em bisnagas de plástico laminadas, hermeticamente seladas.

Para os estudos de compatibilidade as misturas binárias foram preparadas na proporção 1:1 (m:m) adicionando 100 mg de ácido retinoico a 100 mg de cada excipiente, seguidas de uma mistura física.

4.3. Desenvolvimento do método cromatográfico

O método cromatográfico baseou-se nos estudos de Velloso e colaboradores (2009) com alguns ajustes, no qual as condições cromatográficas de análise do ácido retinoico foram empregadas em cromatógrafo Shimadzu[®], modelo LC-10 equipado com detector UV-VIS (SPD-10A), com sistema de bomba quaternária (LC-10AD), e sistema de degaseificação on-line (DGU-14A), válvula de injeção (Rheodyne[®] LCC), loop de 20 µL, forno (CTO 20) a temperatura de 40 ° C, Sistema de Software Class VP. A coluna analítica utilizada foi a

Phenomenex Gemini NX C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) de fase reversa, utilizando a pré-coluna Gemini NX C18 (10 mm x 4 mm).

A fase móvel foi constituída por metanol e ácido acético glacial a 1%. Foram testadas as proporções 50:50, 80:20, 90:10 e 85:15 (v/v), das quais a última proporção mostrou-se como opção de escolha por melhor tempo de retenção com boa separação dos picos. A vazão foi de 1,0 mL min^{-1} , em modo isocrático, e com volume de injeção de 20 μL . O comprimento de onda utilizado foi de 342 nm, o qual foi predefinido por varredura de uma solução padrão de AR em um espectrofotômetro UV-mini 1240 SHIMADZU 120 V.

A cada análise foi realizada a adequabilidade do equipamento com injeção do padrão de ácido retinoico (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em triplicata.

4.4. Tecnologia de extração do analito

A quantidade amostral foi ajustada para que após o processo de extração a solução de injeção estivesse na mesma concentração do padrão de ácido retinoico, de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Logo, 1,0 g de massa do creme (equivalente a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi pesada utilizando a balança analítica Sartorius modelo 2842 e em seguida foi transferida para um tubo de ensaio com tampa rosqueada.

O analito foi extraído por extração líquido-líquido em 5 mL do solvente etanol, o qual forneceu resultados mais satisfatório de extração, além de se tratar de um solvente de baixo custo em relação aos demais. Em seguida foi submetido à agitação em um agitador mecânico vortex por 5 min. Após solubilização do analito no solvente extrator, o tubo foi submetido à centrifugação (CentriBio[®]) por 10 min, a rotação de 4000 rpm. Da fração sobrenadante foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e transferida para um balão volumétrico de 10 mL para diluição final em fase móvel, com concentração teórica de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido retinoico. A solução foi filtrada utilizando um filtro de seringa PTFE (membrana de TEFLON), com poro de 0,45 μm , e em seguida injetada no sistema cromatográfico.

4.5. Validação de metodologia analítica de análise por CLAE

A metodologia analítica foi validada de acordo com a RE ANVISA nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) e conforme a classificação para os testes analíticos, descritos nesta resolução, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade,

intervalo, precisão, precisão intermediária, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

4.5.1. Especificidade

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise dos perfis cromatográficos de três tipos de amostras: a solução padrão, a solução placebo (creme base) e o placebo adicionado a 100% de ácido retinoico, a fim de investigar a existência de alguma substância que possa estar em coeluição com AR no comprimento de onda usado.

4.5.2. Linearidade

Foi obtida solução estoque (SE) do padrão de AR a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir da SE foram retiradas alíquotas desta solução e diluídas em fase móvel para obter os pontos correspondentes aos níveis (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175%) assumindo a concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ como o nível de 100%. As concentrações correspondem aos pontos: 0,5, 1,25, 2,5, 3,75, 5, 6,25, 7,5 e $8,75 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram analisadas por CLAE-UV e os resultados obtidos foram relacionados em um gráfico da concentração da solução em função da área sob o pico. As curvas foram realizadas em triplicata ($n=3$) e uma curva média foi obtida.

A análise da linearidade seguiu o método dos mínimos quadrados de regressão linear, estabelecendo a curva de calibração média proporcional à concentração e resposta, mediante determinação do coeficiente de correlação linear (r^2), coeficiente angular e desvio padrão relativo. Aplicou-se análise estatística ANOVA com auxílio do programa Prism 3.0.

4.5.3. Intervalo

O intervalo especificado foi definido pela obtenção dos limites de quantificação superior e inferior do método analítico, sendo representado pela faixa entre os mesmos, derivando do estudo de linearidade.

4.5.4. *Precisão*

A repetibilidade do método, ou precisão intra-corrída, foi verificada por 6 (seis) determinações a 100% da concentração do teste, utilizando o mesmo analista e mesma instrumentação e foi efetuada pelo desvio padrão relativo ou coeficiente de variação percentual (CV%). Utilizou-se a amostra de creme a 100% de ácido retinoico, ou seja, na concentração teórica de 250 µg mL⁻¹, chegando ao final do preparo da amostra na concentração final de injeção de 5 µg mL⁻¹. O método foi considerado preciso quando apresentou CV% menor ou igual a 5%, de acordo com a legislação vigente.

4.5.5. *Precisão intermediária*

Para determinação da precisão intermediária ou inter-corrídas procedeu-se conforme o método utilizado para avaliação da repetibilidade do método, utilizando os mesmos parâmetros amostrais e estatísticos para análise dos dados, sendo avaliada pela concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, com analistas diferentes.

4.5.6. *Limite de detecção*

O limite de detecção foi estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável, através da equação,

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação e, IC é a inclinação da curva de calibração.

4.5.7. *Limite de quantificação*

O limite de quantificação foi estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável, através da equação,

$$LQ = \frac{DP_{ax} \times 10}{IC}$$

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva de calibração.

4.5.8. Exatidão

Para avaliação desse parâmetro 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, 25%, 100% e 175%, foram realizadas em triplicata. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

4.5.9. Robustez

Para análise do parâmetro de robustez foram preparadas amostras 100% da concentração teórica do teste, em triplicata, avaliando 4 (quatro) condições: o tipo de filtro utilizado no preparo da amostra, variando de PTFE (usual) para PVDF (Fluoreto Polivinidileno); o fluxo da fase móvel (1,0 mL min⁻¹), variando em ±0,2 ml min⁻¹; a temperatura do forno (40 ° C), variando ± 2 ° C ; e a estabilidade, variando o tempo de injeção da amostra no tempo zero e 24 horas de preparo. As análises foram realizadas em triplicata para cada ponto avaliado. Para fins estatísticos utilizou-se o cálculo do desvio padrão relativo, sendo considerado robusto o método quando não ultrapassado o desvio de até 5%.

4.6. Estresse térmico

4.6.1. Preparo das amostras

O creme de ácido retinoico, na concentração de 0,025 % foi acondicionado em bisnagas de plástico laminadas, hermeticamente seladas com cerca de 10 g de creme por bisnaga, em sextuplicata.

4.6.2. Condições de estresse

As amostras foram submetidas ao estresse térmico nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C, monitorando o intervalo de tempo de 0, 24, 48 e 72h. Utilizou-se estufa de ar circulante Nova Ética[®], na qual foram armazenadas as bisnagas para análise em cada temperatura, no intervalo de tempo determinado, em sextuplicata. A estufa foi previamente estabilizada na temperatura selecionada, com auxílio confirmatório de um termômetro calibrado.

4.6.3. Avaliação por CLAE

Utilizou-se o cromatógrafo Shimadzu[®], modelo LC-10 equipado com detector UV-VIS (SPD-10A), em número de onda 342 nm, com forno à temperatura de 40 ° C, Sistema de Software Class VP. A coluna analítica utilizada foi a Phenomenex Gemini NX C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) de fase reversa, utilizando a pré-coluna Gemini NX C18 (10 mm x 4 mm). A fase móvel foi constituída por metanol e ácido acético glacial a 1% na proporção 85:15 (v/v), com vazão de 1,0 mL min⁻¹, em modo isocrático, e volume de injeção de 20 µL.

A cada análise foi realizada a adequabilidade do equipamento com injeção do padrão de ácido retinoico (5 µg mL⁻¹) em triplicata.

As amostras da formulação creme de AR foram preparadas para leitura em CLAE conforme o tópico 3.4.. E para análise dos dados obtidos foi avaliado o desvio padrão relativo (CV%), assim como para a avaliação da estabilidade da formulação e determinação dos parâmetros cinéticos de degradação para o estresse térmico da formulação seguiu-se o modelo de Arrhenius.

4.7. Estudo de compatibilidade

4.7.1. Preparo das amostras

As misturas binárias foram preparadas na proporção 1:1 (m:m) adicionando 100 mg de ácido retinoico a 100 mg de cada excipiente que constitui a fórmula (Tabela 4), individualmente, seguidas de uma mistura física.

Tabela 4. Componentes do creme de ácido retinoico.

Ácido retinoico	Fármaco	0,025 %
Creme base (não iônico)		qsp
Butil-hidroxitolueno (BHT)	Antioxidante	0,1%
Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA)	Agente quelante	0,1%
Metabissulfito de sódio (MS)	Antioxidante	0,2%
Estearato de octila (EO)	Emoliente	2,0%
Nipazol(NZ)	Conservante	0,05%
Nipagin (NG)	Conservante	0,1%
Polawax (PWX)	Emulsificante	15%
Água destilada qsp	Solvente	79,85%
Propilenoglicol (PGL)	Umectante	2%
Silicone SF1204 (SIL)	Emoliente/Umectante	1%

4.7.2. Condições de análise

Foi realizado o estudo de compatibilidade física por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e por correlação dos dados de espectroscopia na região do infravermelho (IV), avaliou-se a compatibilidade química.

Para análise por DSC, utilizou-se um calorímetro Shimadzu, modelo DSC-50, e em cadinhos de alumínio pesou-se o equivalente a 5 mg de cada mistura e de cada componente isoladamente, para fins comparativos, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹, submetida ao aquecimento com razão de 5 °C min⁻¹, em intervalo de temperatura de 25-450 °C. A célula de DSC foi calibrada com índio (pf 156,6 °C; $\Delta H_{fus} = 28,54 \text{ J g}^{-1}$) e zinco (pf 419,6 °C).

Para avaliação por IV, foram obtidos os espectros de cada mistura e componentes isoladamente em um sedimento de brometo de potássio, utilizando o modelo de sistema Shimadzu IR Prestige-21 ao longo de um intervalo de 400-4.000 cm⁻¹.

A análise dos dados obtidos por DSC foi realizada utilizando o software TASYs, e para IV o software IR Solution, ambos da Shimadzu.

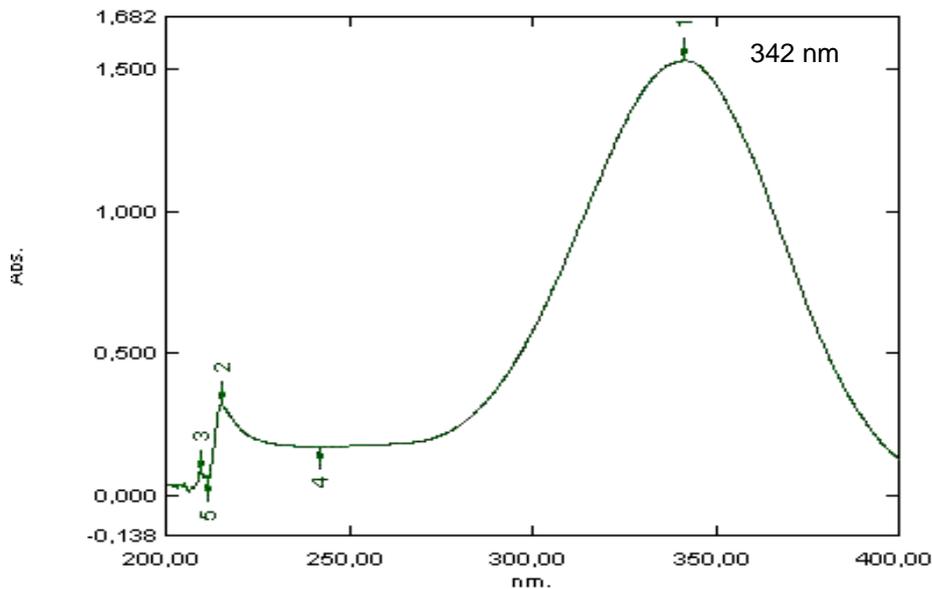
CAPÍTULO III
Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Validação do método analítico por CLAE

Previamente à análise cromatográfica, foi determinado o comprimento de onda (λ) de absorção máxima para o ácido retinoico no ultravioleta, sendo de 342 nm (Figura 5) e estando dentro da faixa relatada na literatura para o fármaco (320 a 365 nm) (ZARGHI, JENABI E EBRAHIMIAN, 1998; BRISAERT, PLAISIER-VERCAMMEN, 2000, 2007; TASHTOUSH, JACOBSON E JACOBSON, 2007; VELLOSO et al, 2009; TEGLIA et al, 2014). Segundo Berbenni et al. (2001), essa pequena diferença entre os valores é decorrente da possível ocorrência de alterações na dissolução, solvatação, pontes de hidrogênio, interação com o solvente e temperatura.

Figura 5. Pico de absorção do AR.



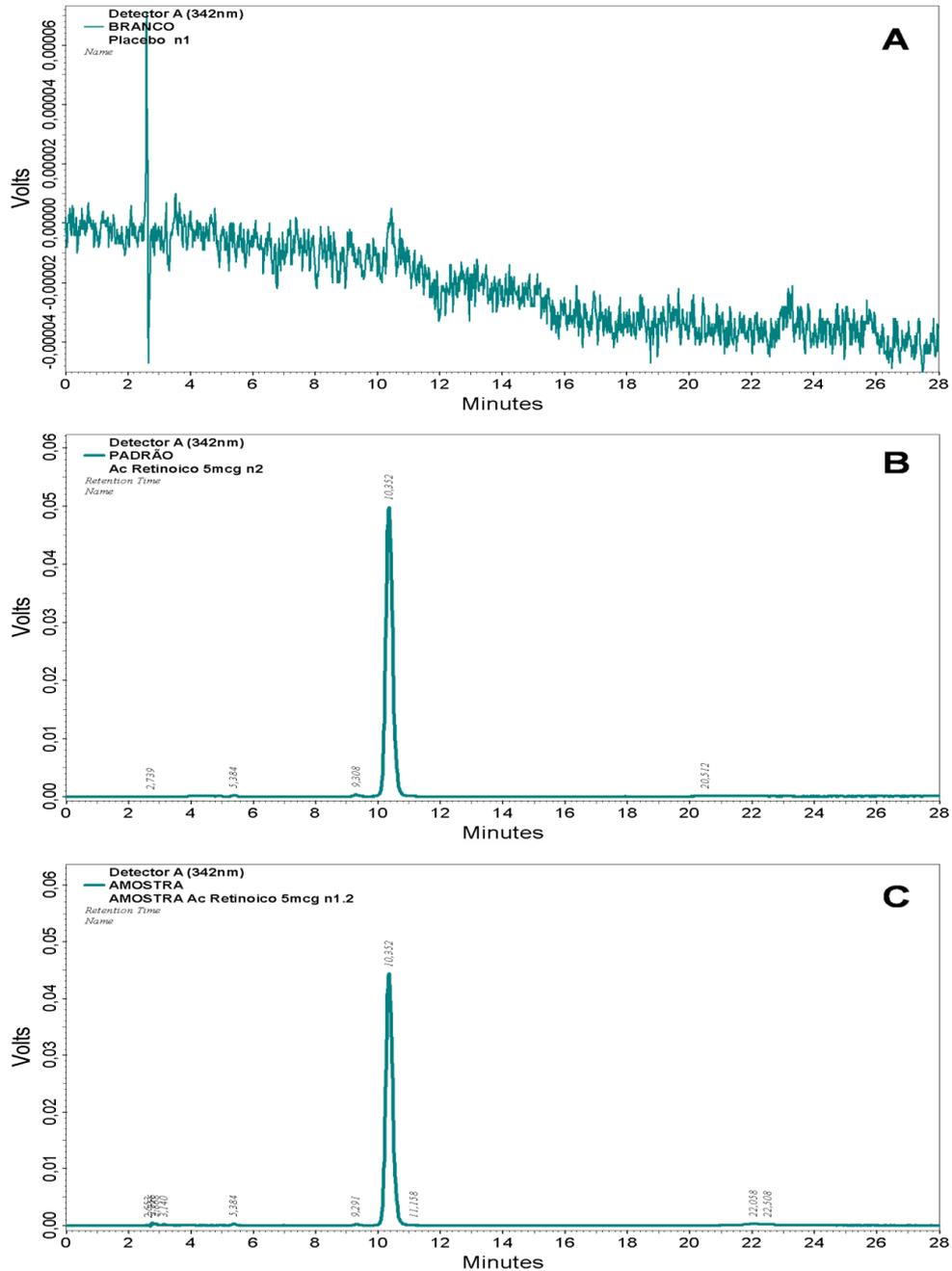
5.1.1. Especificidade

A análise cromatográfica pelo método proposto mostrou-se eficiente na separação do pico do ácido retinoico dos demais, e observa-se que o pico do fármaco manteve-se no tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos, um tempo relativamente curto, conforme Figura 6 (B e C).

Analisando alguns tempos de retenção obtidos para métodos cromatográficos CLAE-UV relatados na literatura, o tempo de retenção do ácido retinoico encontrado no presente estudo, modo isocrático, apresentou-se menor em relação aos tempos citados, uma vez que pela proporção de metanol usada na fase móvel o AR apresentou maior afinidade pela mesma e assim ficou menos tempo retido na fase estacionária. Brisaert e Plaizier-Vercammen (2000) avaliaram a degradação do ácido retinoico em loção utilizando método CLAE-UV, modo gradiente, com fase móvel constituída de metanol, água e ácido acético (75:12, 5:1 v/v), fluxo $1,8 \text{ mL min}^{-1}$, variando para acetonitrila, água e ácido acético (80:20:1 v/v), fluxo 1 mL min^{-1} , obteve tempo de retenção para o ácido retinoico em torno de 15 minutos. Trotta e colaboradores (2003) utilizaram o modo isocrático CLAE-UV, com fase móvel composta por acetonitrila, metanol, ácido acético e água (45:40:1:14 v/v), e encontraram tempo de retenção de 12,3 minutos. Brisaert e Plaizier-Vercammen (2007) avaliaram a fotoestabilidade do ácido retinoico em cremes, utilizando como fase móvel acetonitrila, água e ácido acético (80:20:1 v/v), fluxo 1 mL min^{-1} , porém o tempo de retenção não foi especificado. Ainda, a Farmacopeia Brasileira (2010) determina em seu método para identificação por doseamento do ácido retinoico em creme, uma fase móvel composta por tampão fosfato e tetraidrofurano (55:45 v/v), com ajustes necessários para que o tempo de retenção seja de 15 minutos.

Avaliando os perfis cromatográficos, placebo, padrão e placebo adicionado, observa-se que o método foi específico para quantificação de ácido retinoico incorporado na base creme não-iônico, o qual não apresentou interferentes em nenhuma das amostras analisadas (Figura 6).

Figura 6. Perfil cromatográfico das amostras: placebo (A), padrão AR (B) e placebo contaminado (C) em 342 nm.



5.1.2. Linearidade

A linearidade da curva analítica foi realizada pela injeção do padrão de ácido retinoico no intervalo de 0,5 a 8,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata, a qual foi obtida a partir do ajuste de regressão linear, obtendo-se a equação da reta. Os dados referentes às curvas analíticas estão dispostos na Tabela 5. De acordo com a RE ANVISA nº 899/2003 (BRASIL, 2003), a

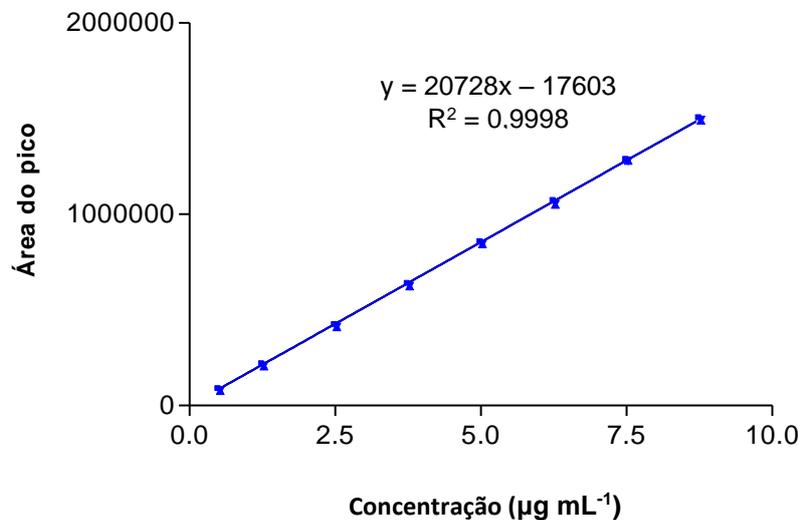
ANVISA limita que o coeficiente de correlação linear (r^2) deve ser igual ou superior a 0,99 para métodos analíticos. Dessa forma, o método proposto se adequa aos limites exigidos, indicando a existência de correlação linear, uma vez que o valor de r^2 obtido na análise do ácido retinoico pelo método CLAE-UV desenvolvido foi de 0,9998 (Figura 7).

Tabela 5. Dados das curvas analíticas.

	Área dos picos para o ácido retinoico em diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
	0,5	1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5	8,75
C 1	84820	213596	419111	634786	851854	1067481	1282215	1500021
C 2	85705	214076	418680	632578	852222	1059564	1288921	1499920
C 3	86548	215682	418562	632770	853048	1061638	1287054	1501121
CV%	1,0084	0,5094	0,0690	0,1931	0,0717	0,3862	0,2691	0,0444
* <i>p-value</i>					0,8598			
** <i>F</i>					0,1527			

* Valores estatisticamente diferentes para $p\text{-value} \leq 0,05$. ***F* (F calculado) F crítico (4,74).

Figura 7. Curva de calibração média do padrão de ácido retinoico em 342 nm.



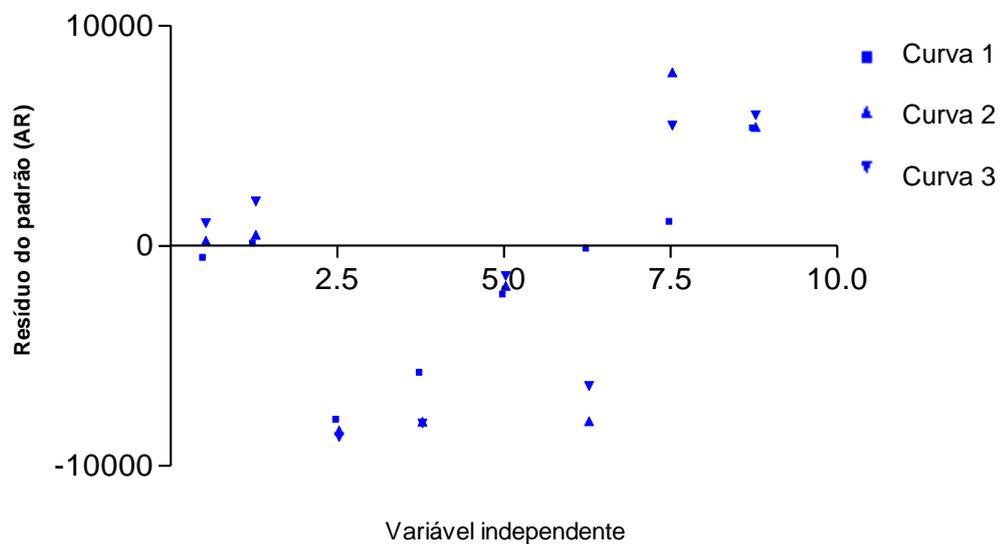
Sobre o coeficiente de correlação linear, Ribani e colaboradores (2004) concordam que este representa um parâmetro o qual permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados, o que apoia os dados encontrados.

Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa foi efetuado o teste de ajuste, a partir do estudo dos parâmetros do modelo linear gerando um gráfico de

resíduos do padrão AR, o qual corrobora com o dado do coeficiente de regressão, uma vez que se observa uma distribuição normal e independente entre os resíduos (Figura 8), sendo então dito homocedástico, garantindo os requisitos necessários para que o método seja empregado na análise de regressão linear que, segundo Ribeiro et al. (2008), uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, variância constante (homocedasticidade), e ausência de amostras atípicas.

Através da análise da curva de calibração calculou-se com 95% de confiança o limite de detecção ($LD = 0,0857 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o limite de quantificação ($LQ = 0,2858 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Figura 8. Gráfico dos resíduos para o padrão de AR.



5.1.3. Precisão

5.1.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi analisada a partir de 6 (seis) determinações de 100% da amostra (Tabela 6), levando em consideração o desvio padrão relativo máximo de 5%. Observou-se que o método é repetível, uma vez que houve concordância entre os resultados no período de análise de um dia, com o mesmo analista e mesmo equipamento, corroborando com os limites preconizados pela legislação vigente, RE 899/2003, assim como com as normas impostas pelo Guia Q2 (R1) - Validação de Procedimentos Analíticos do ICH (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 6. Valores experimentais obtidos no ensaio de repetibilidade.

Concentração da amostra ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Média \pm DP	CV%
224,50	227,49 \pm 4,36	1,91
223,19		
224,73		
226,75		
233,69		
232,08		

5.1.3.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi analisada a partir de 12 (doze) determinações de 100% da amostra (Tabela 7), realizadas em 2 (dois) dias diferentes, por analistas diferentes, levando em consideração o desvio padrão relativo máximo de 5%. Observou-se que o método é preciso, uma vez que houve concordância entre os resultados no período de análise, com analistas e dias diferentes, obtendo desvio padrão relativo médio de 2,47 %, correspondendo aos limites preconizados pela RE ANVISA nº 899/2003 e pelo Guia Q2(R1) do ICH (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Logo, atende ao objetivo da validação da precisão intermediária que é verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al, 2004).

Tabela 7. Valores experimentais obtidos no ensaio de precisão intermediária.

Análise	Concentração da amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média \pm DP	CV%
1º dia	224,72	227,94 \pm 4,38	1,92
	225,25		
	224,82		
	225,70		
	233,91		
	233,24		
2º dia	235,36	237,20 \pm 1,36	0,57
	238,31		
	239,23		
	236,76		
	236,85		
	236,71		
Média		232,57 \pm 5,74	2,47

5.1.4. Exatidão

Para análise da exatidão dos resultados foram avaliados três níveis de recuperação, baixo (25%), médio (100%) e alto (175%), conforme apresentado na tabela 8. Devido à dificuldade de se obter materiais de referência certificados, dos processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método o mais comum é o uso de medições de recuperação (BURNS, DANZER, TOWNSHEND, 2002; RIBANI et al., 2004), o qual foi avaliado na faixa de concentração esperada para o composto de interesse.

Tabela 8. Valores obtidos na avaliação da exatidão do método.

Nível%	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área média	Concentração		CV%
			experimental média	Teor médio	
			$\mu\text{g mL}^{-1}$	%	
25	62,5	183408,6	56,09	89,08	2,53
100	250	696954,8	227,52	90,37	1,78
175	437,5	1221701,9	398,83	88,83	1,09

5.1.5. Robustez

Ao avaliar a robustez do método foram monitoradas as condições e parâmetros de análise seguintes, tipo de filtro de seringa (PTFE/PVDF), fluxo da fase móvel ($1,0 \text{ mL min}^{-1} \pm 0,2$), temperatura do forno ($40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$) e estabilidade da amostra (0 e 24 h), conforme pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9. Valores obtidos na avaliação da robustez do método.

Condição		Concentração média		Teor	
		$\mu\text{g mL}^{-1}$	CV%	%	CV%
Filtro	PVDF	239,79	0,11	97,64	0,11
Fluxo	$1,2 \text{ mL min}^{-1}$	245,47	0,30	99,95	0,30
	$0,8 \text{ mL min}^{-1}$	236,99	0,72	96,20	0,99
Temperatura	$42 \text{ }^\circ\text{C}$	236,02	0,95	96,10	0,95
	$38 \text{ }^\circ\text{C}$	235,99	0,58	96,09	0,58
Tempo (estabilidade)	0h	237,20	0,57	96,29	0,66
	24h	237,69	0,59	96,49	0,44

Para variação de fluxo da fase móvel foi observada redução de 2 min do tempo de retenção do fármaco quando utilizado o fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, e aumento de 2 min, para o fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, porém o teor do fármaco recuperado e o perfil cromatográfico não sofreram alterações. Ademais, não foram constatadas alterações no teor de AR recuperado para as condições avaliadas, logo, o método apresenta-se robusto, mantendo a concentração média acima de 95% de recuperação e com tempo de retenção de aproximadamente 10 min.

O método proposto cumpriu todos os parâmetros exigidos pela legislação vigente, apresentando concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma amostra, em diferentes preparações, sob as mesmas condições de medição, assim como constatou-se que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados e apresentou recuperação interessante para quantificação da substância avaliada. E este método não sofre influência de pequenas e deliberadas modificações em seus parâmetros, sendo capaz de avaliar de forma linear e inequívoca a substância de interesse.

5.2. Estresse térmico da formulação de AR

Dentre os fatores ambientais envolvidos na degradação de produtos farmacêuticos, aponta-se a temperatura como o fator mais relevante, pois na maioria dos casos, o aumento da temperatura é diretamente proporcional ao aumento da velocidade de degradação química, e não há um acondicionamento capaz de proteger tais produtos dos efeitos do calor (KOMMANABOYINA, RHODES, 1999; POMBAL et al., 2010; LOFTSSON, 2014). No presente estudo foi observada situação semelhante, corroborando com as informações da literatura, no qual frente ao estresse térmico com diversas temperaturas ao longo do tempo (0, 24, 48, 72 h) foi possível avaliar a diminuição do teor de fármaco na formulação.

Avaliando a temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ observou-se que praticamente não houve redução de teor do fármaco, com desvio menor que 2% entre os tempos estudados, que pode ser observado nos cromatogramas representativos para esta condição, nos quais não se observa alterações evidentes (Figura 9). E, analisando a constante de degradação, que caracteriza a velocidade específica da reação, ou seja, a taxa de reação que está relacionada à temperatura do sistema, observa-se que esta foi pequena, justificando o fato de não ter havido uma degradação considerável do fármaco quando submetido a esta temperatura, durante exposição de 24 a 72h, e dessa forma não foi possível determinar ordem cinética para a reação (Tabela 10 e Figura 10).

Tabela 10. Parâmetros cinéticos da degradação para o estresse térmico da formulação creme de AR.

Tempo (h)	Temperatura (° C)		
	60	70	80
	Teor (%)		
0	89,23±1,70*	89,23±1,70	89,23±1,70
24	90,21±2,65	82,00±3,05	60,85±9,80
48	87,13±2,63	75,07±1,67	54,83±8,33
72	88,36±1,78	69,58±2,72	50,95±5,57
r ²	0,59	0,99	0,95
ordem	-	0	2
K (µg h ⁻¹)	0,0250	0,2745	5,0 x 10 ⁻⁵

*DPR n=6

Figura 9. Cromatogramas referentes à temperatura de 60 ° C (0, 24, 48 e 72 h).

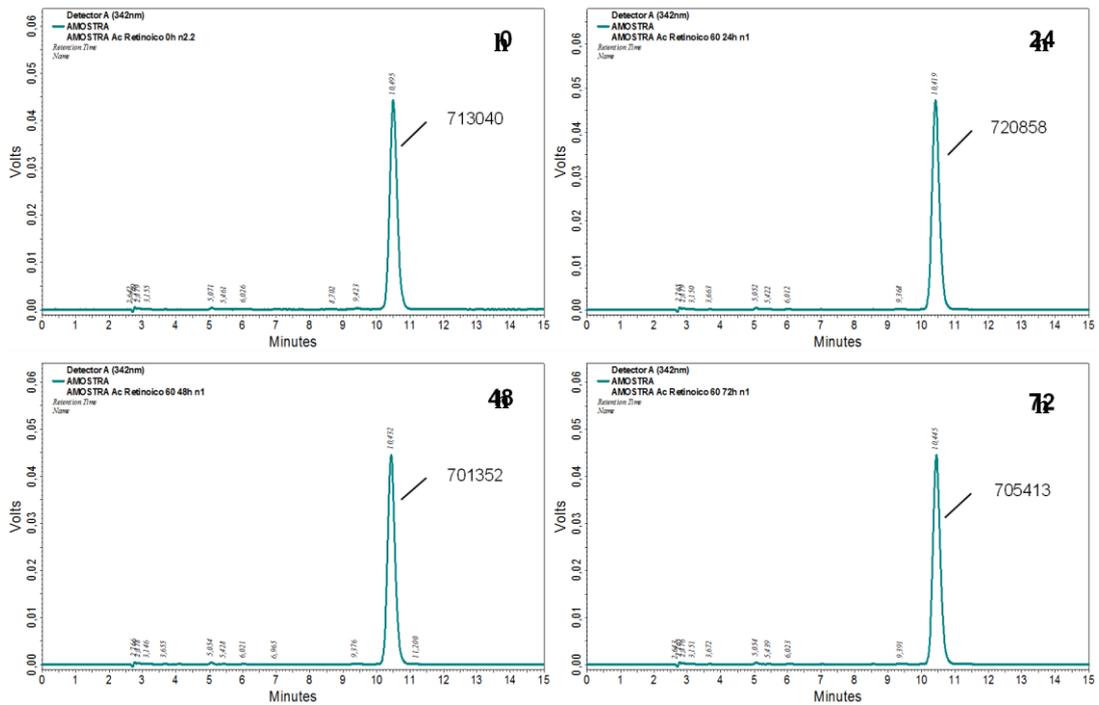
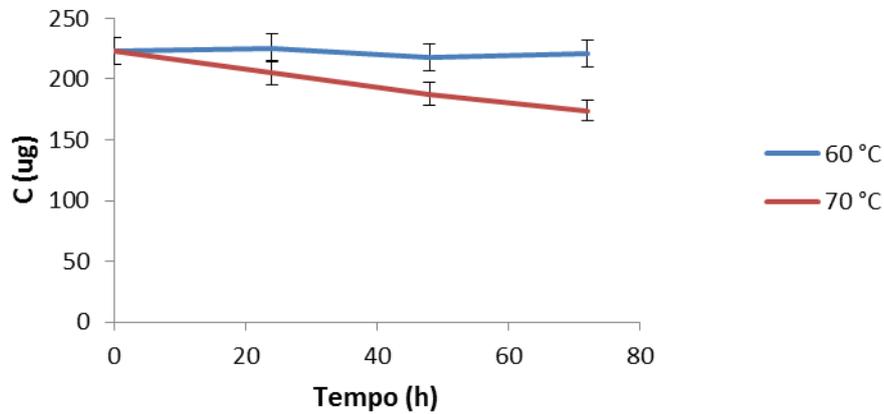
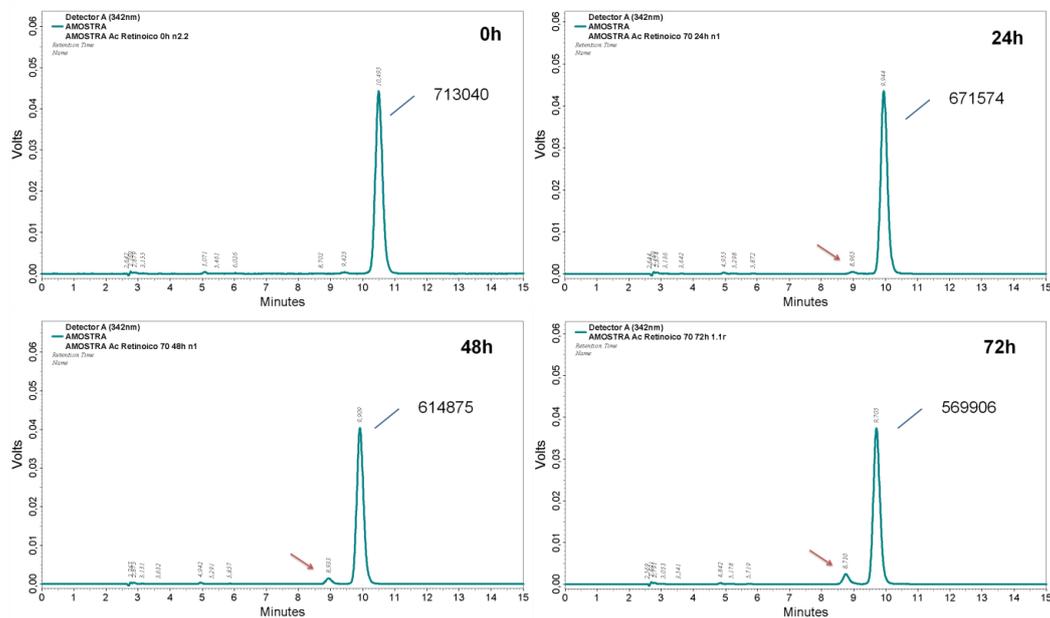


Figura 10. Degradação térmica do creme de AR para 60 e 70 ° C.



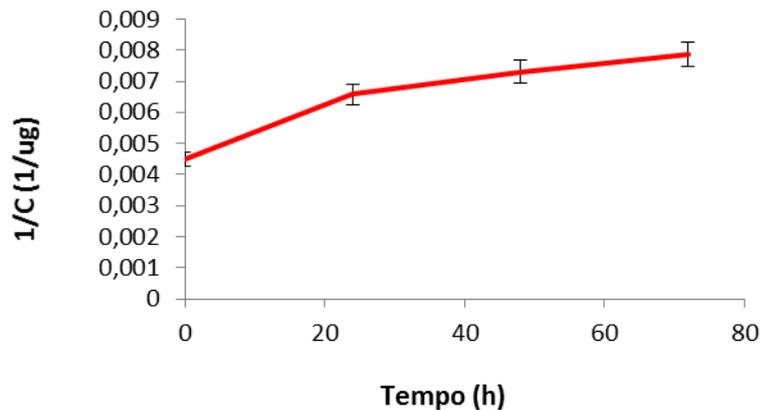
A partir da temperatura de 70 ° C nota-se uma redução mais acentuada no teor de AR na formulação. Observa-se nos cromatogramas referentes a esta temperatura a redução da área do pico do fármaco e o aumento gradual da área do pico que aparece ao lado do pico do fármaco, sugerindo a formação de um produto da degradação do fármaco (Figura 11). Atendendo a uma cinética de reação de ordem zero para degradação do fármaco, com constante de degradação (K), obtida da inclinação da reta, igual a $0,2745 \mu\text{g h}^{-1}$ (Tabela 10), o que representa uma velocidade de reação constante, independente da concentração da amostra, a qual diminui com o passar do tempo, que também pode ser observado no gráfico C (μg) x T (h) (Figura 10), evidenciando um comportamento linear, com coeficiente de correlação linear (r^2) igual a 0,99.

Figura 11. Cromatogramas referentes à temperatura de 70 ° C (0, 24, 48 e 72 h).



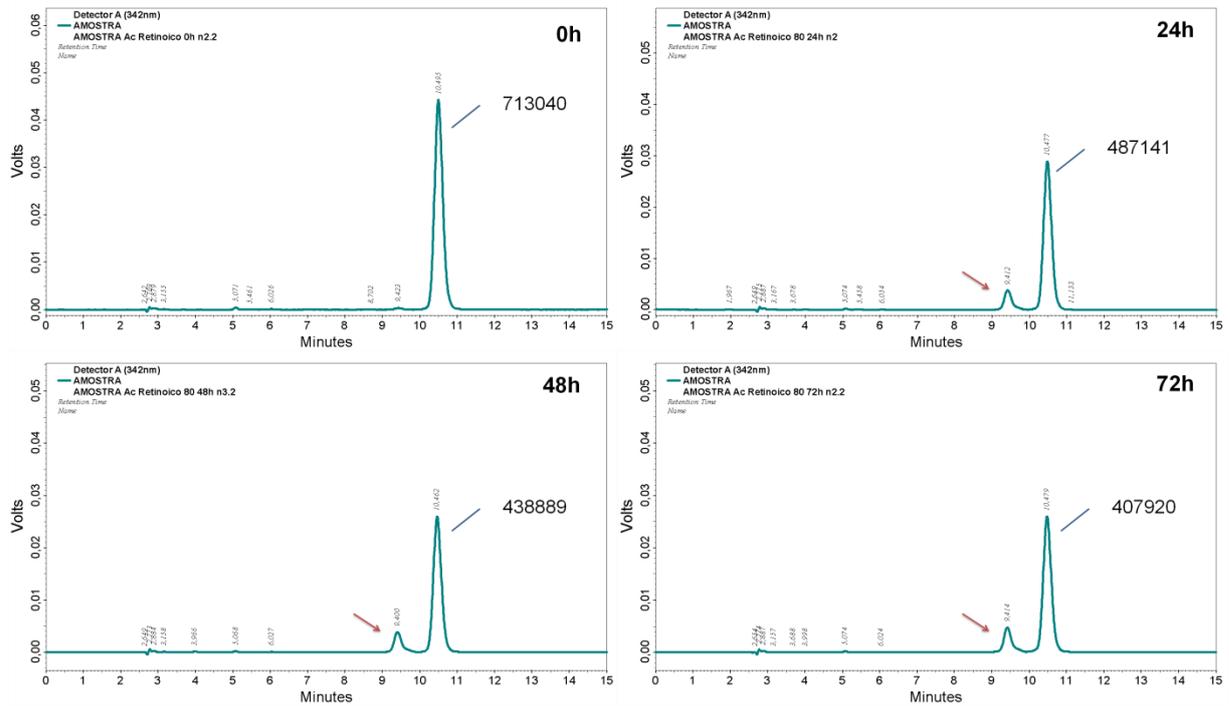
Quando avaliada a degradação do fármaco submetido à temperatura de 80 ° C percebe-se que a velocidade em que ocorre a redução do teor de AR na formulação obedece a uma cinética de reação de segunda ordem com constante de degradação (K) igual a $5,0 \times 10^{-5} \mu\text{g h}^{-1}$, na qual a velocidade da reação depende da concentração do fármaco na amostra e da concentração de outro componente presente na formulação, caracterizando uma reação bimolecular (Tabela 10 e Figura 12). E avaliando os cromatogramas obtidos observa-se que, assim como à temperatura de 70 ° C, há o aumento gradual e evidente do pico de um possível produto da degradação do fármaco, proporcional a redução de teor do mesmo ao passar do tempo (Figura 13).

Figura 12. Degradação térmica do creme de AR para 80 ° C.



Com base nos dados obtidos, não há diferença do teor de AR com DPR menor que 2% entre os tempos estudados na temperatura de 60 ° C. Isto mostra que o processo de degradação se inicia de forma mais evidente às temperaturas de 70 e 80 ° C, mostrando que a partir do cálculo das constantes de velocidade de degradação foi possível observar o efeito da temperatura na degradação do produto no decorrer do tempo, onde segundo Waterman (2009) à temperatura mais elevada há um maior número de moléculas a produzir mais e melhor energia para que a reação ocorra. Também pôde ser observado nos cromatogramas obtidos, nos quais nota-se de forma mais clara a formação de um produto de degradação do fármaco, com aumento gradual da área do pico do referido produto quando submetido a estas condições de temperatura e tempo.

Figura 13. Cromatogramas referentes à temperatura de 80 ° C (0, 24, 48 e 72 h).



A partir da cinética de reação de ordem zero observada quando a amostra foi submetida à temperaturas de 70 ° C, pelo período de tempo estudado, podemos inferir que a degradação sofrida pelo fármaco não está ligada a fatores intrínsecos a fórmula, mas a fatores externos, no caso, a temperatura imposta como um fator limitante, pois conforme o fármaco é degradado, a sua concentração baixa até que tenha reagido na sua totalidade (LACHMAN et al., 2001).

De acordo com a teoria da colisão, a energia cinética média das moléculas aumenta com o aumento da temperatura. E, como a temperatura aumenta, uma maior fração de moléculas terá energia suficiente para ultrapassar a barreira de energia de ativação, e dessa forma, a maioria das reações ocorre mais rapidamente a temperaturas mais elevadas do que a temperaturas mais baixas (YOSHIOKA E STELLA, 2002; LOFTSSON, 2014). Assim, observou-se que a constante de velocidade de reação (k) aumentou e a reação prosseguiu mais rapidamente com o aumento da temperatura de 60 para 70 ° C, de 0,0250 a 0,2745 $\mu\text{g h}^{-1}$.

Isso nos mostra que a formulação apresenta boa estabilidade, quando submetidas às condições de estudo, exceto à temperatura de 80 ° C, concordando com dados da literatura de que, em geral, as reações de degradação de produtos farmacêuticos, tais como as suspensões aquosas, as quais se assemelham as formulações creme, são de ordem zero ou pseudo-ordem zero, e independem da concentração de reagentes e sim, apenas de fatores externos (LACHMAN, 2001; LOFTSSON, 2014).

De acordo com o crescimento do viés da manipulação magistral direcionado as necessidades individuais de cada paciente e suas particularidades dermatológicas, e o pouco investimento no controle de qualidade desse ramo farmacêutico é imprescindível o conhecimento de métodos indicativos de estabilidade, assim como a análise crítica de resultados de degradação de amostras submetidas a determinadas condições de estresse e a cinética da degradação do produto em questão (BRASIL, 2005; BONFILIO et al, 2010; LINDINO et al, 2010; GIAM, MCLACHLAN, KRASS, 2012).

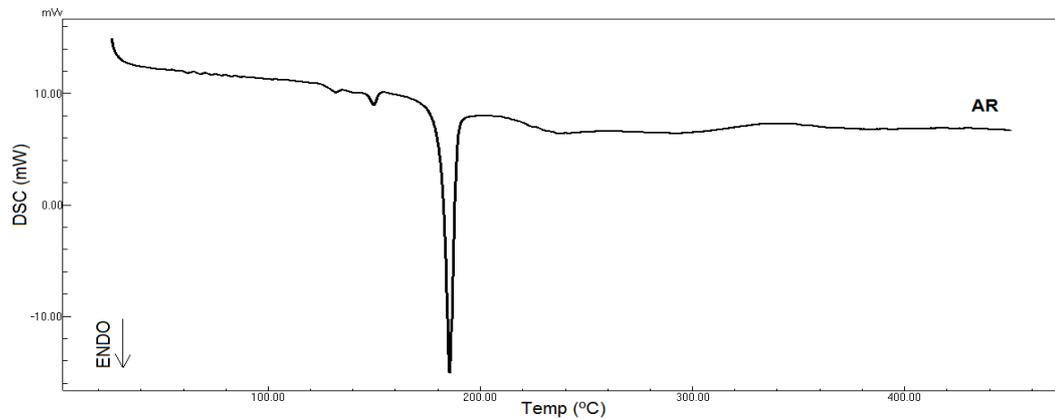
Sendo assim, este estudo mostra sua importância por gerar informações que auxiliem na determinação do mecanismo de degradação do fármaco veiculado na forma farmacêutica creme, uma vez que se trata de um sistema emulsionado termodinamicamente instável e propício à alterações químicas quando submetido a variações de temperatura (FISHER et al., 2007), e a partir da velocidade com que este forma produtos indesejáveis seja possível determinar o tempo de análise para prevenir interferentes.

5.3. Estudo de compatibilidade

5.3.1. Fármaco

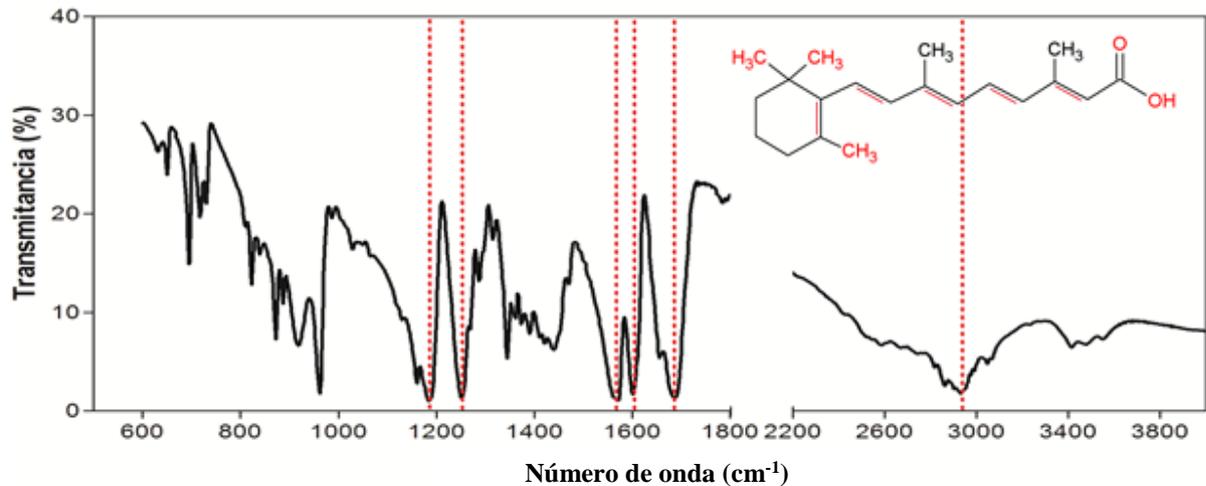
A Figura 14 mostra a curva de DSC do AR com dois eventos endotérmicos característicos do seu comportamento térmico. O primeiro evento provavelmente corresponde, segundo Tan et al. (1992), Berbenni et al. (2001) e Mendonça et al. (2014), a uma transição cristalina de uma estrutura monoclínica para uma triclínica, com T_{onset} 147,3 ° C e entalpia de 3,3 J g⁻¹, enquanto que o segundo corresponde ao evento de fusão do fármaco com T_{onset} 182,74 e T_{pico} 186,08° C, e entalpia de 102,13 J g⁻¹, o qual concorda com valor de fusão descrito na literatura, de aproximadamente 182 ° C (ASCENSO et al., 2011; MENDONÇA et al., 2014; LIMA et al., 2014).

Figura 14. Curva DSC do ácido retinoico.



Na figura 15 e Tabela 11, podemos observar o espectro de absorção na região do infravermelho para o ácido retinoico e os seus principais picos. Dentre os picos que caracterizam as bandas de absorção do AR, apresentam-se com mais intensidade e relevância os picos de $1184\text{-}1251\text{ cm}^{-1}$, os quais são referentes às vibrações do grupo do ácido carboxílico (COOH), assim como o pico referente ao estiramento OH em 2931 cm^{-1} . Geralmente a carbonila (C=O) do grupo COOH absorve no número de onda entre $1725\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, porém este grupo presente no AR sofre efeito de conjugação com uma ligação C=C, o que move a banda de absorção para uma frequência mais baixa (PAVIA et al., 2010), sendo absorvida a 1685 cm^{-1} . O grupo alceno conjugado é representado no espectro por bandas de absorção de alta intensidade em 1570 e 1600 cm^{-1} . Outros picos relevantes apresentam-se a 962 cm^{-1} , que representa a deformação CH=CH do anel trimetilciclohexeno do AR, e entre as bandas largas de 1438 e 1344 cm^{-1} , que abrangem as deformações do grupo metil e metileno.

Os dados encontrados referentes ao espectro do infravermelho para o AR corroboram com aqueles relatados na literatura (BERBENNI et al., 2001, ASCENSO et al., 2011, LIMA et al., 2014).

Figura 15. Espectro FTIR do ácido retinoico (AR).**Tabela 11.** Picos IV correspondentes aos grupos químicos do AR.

Ácido Retinoico	
Picos (cm^{-1})	Grupo químico
2818-3064 (2931) + 1184-1251	Ácido carboxílico C=O-OH
1570-1600	C=C
1685	C=O

5.3.2. Misturas binárias

A coleta de dados de estabilidade e compatibilidade em tempo real é demorada e de alto custo, por isso a obtenção de informação rápida e confiável sobre possíveis interações entre fármaco e excipiente é altamente desejável. A técnica DSC e análise por espectroscopia de IV com transformada de Fourier foram utilizadas como técnicas investigativas e complementares de possíveis interações físicas e químicas entre o AR e os excipientes da formulação. As Tabelas 12 e 13, expõem o T_{onset} , T_{pico} e ΔH dos picos referentes ao AR nas misturas binárias e os números de onda (λ) relacionados aos principais picos de absorção no infravermelho do AR nas misturas binárias, respectivamente.

Tabela 12. Valores de T_{onset} , T_{pico} e entalpia do pico de fusão do AR obtido nas curvas DSC do estudo de compatibilidade do fármaco/excipientes, misturas físicas 1:1.

Amostra	$T_{onset}DSC(^{\circ}C)$	$T_{pico}DSC(^{\circ}C)$	$\Delta H/Jg^{-1}$
<i>Fármaco</i>			
Ácido retinoico	182,74	186,08	102,13
<i>Fármaco/Excipiente (1:1)</i>			
BHT	172,85	180,95	46,14
EDTA	182,91	185,14	45,33
Metabissulfito de sódio	166,91	171,34	49,77
Estearato de octila	175,65	181,72	13,46
Nipazol*	-	-	-
Nipagin*	-	-	-
Polawax	176,28	182,78	37,07
Propilenoglicol*	-	-	-
Silicone SF1204	182,99	185,65	7,42

*mistura física em que o evento de fusão do AR não foi evidenciado.

Tabela 13. Valores dos números de onda (cm^{-1}) dos principais picos de absorção na região do IV para o AR no estudo de compatibilidade do fármaco/excipientes, misturas físicas 1:1.

Amostra	Número de onda (cm^{-1})		
	C=O-OH	C=C	C=O
<i>Fármaco</i>			
Ácido retinoico	2931 e 1184-1251	1570-1600	1685
<i>Fármaco/Excipiente (1:1)</i>			
BHT	2933 e 1184-1251	1570-1600	1685
EDTA	2931 e 1184-1251	1570-1602	1685
Metabissulfito de sódio	2931 e 1184-1251	1570-1600	1685
Estearato de octila	2926 e 1184-1251	1570-1602	1687
Nipazol	2933 e 1184-1251	1570-1602	1685
Nipagin	2931 e 1184-1251	1570-1602	1681
Polawax	2916 e 1184-1251	1570-1602	1685
Propilenoglicol	2931 e 1184-1251	1570-1602	1685
Silicone SF1204	2933 e 1184-1261	1570-1602	1687

As curvas de DSC das misturas ARBHT, AREDTA e ARPWX (Figuras 16, 17 e 19 A) apresentaram menor intensidade e deslocamento do pico de fusão do AR puro para menor temperatura, assim como redução da entalpia envolvida no processo, a qual foi, no geral, de aproximadamente 50% (Tabela 12). Porém a redução da entalpia isolada, sem significativas mudanças nas temperaturas (T_{onset} e T_{pico}) não representa necessariamente uma interação fármaco-excipiente (LIMA et al., 2014). Analisando os espectros do IV para as referidas misturas, os picos referentes ao AR permanecem, apenas com discretos deslocamentos de

número de onda para algumas bandas (Tabela 13), assim como alguns alargamentos de picos são observados, o que pode ser explicado pelo somatório das bandas características das espécies individuais (Figuras 16, 17 e 19 B). Esses resultados nos mostram que provavelmente não aconteceu modificação química no fármaco em presença destes excipientes.

Na curva de DSC para a mistura ARMS (Figura 18 A) se pode observar uma redução da intensidade e deslocamento da temperatura de fusão tanto do fármaco quanto do excipiente, com diminuição da entalpia de fusão do fármaco (Tabela 13), o que pode ser considerado uma interação física. Porém, avaliando a compatibilidade química por IV (Figura 18 B) observou-se apenas o somatório das bandas de absorção características das espécies individuais, mantendo o perfil espectroscópico do fármaco, denotando ausência de interação química entre o AR e o MS.

Figura 16. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) AR, BHT e ARBHT.

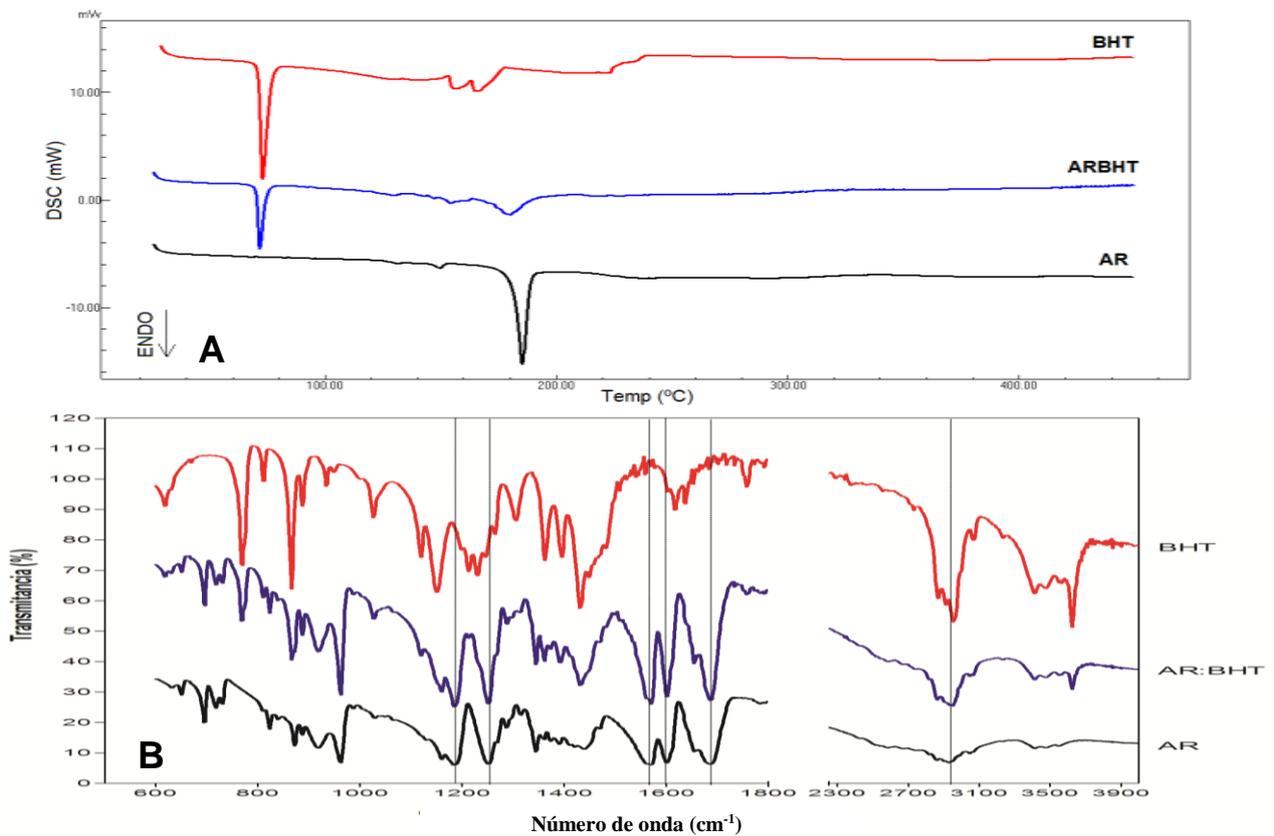


Figura 17. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, EDTA e AREDTA.

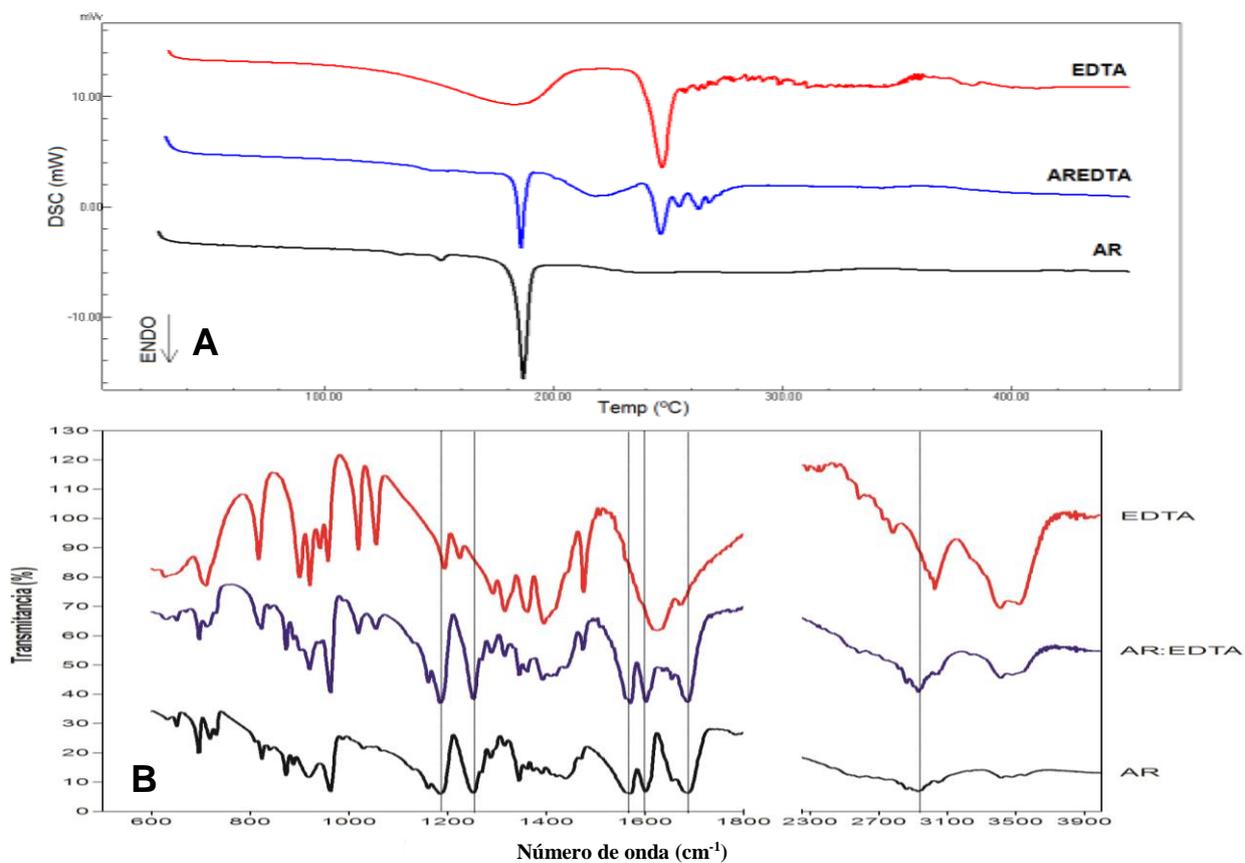


Figura 18. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, MS e ARMS.

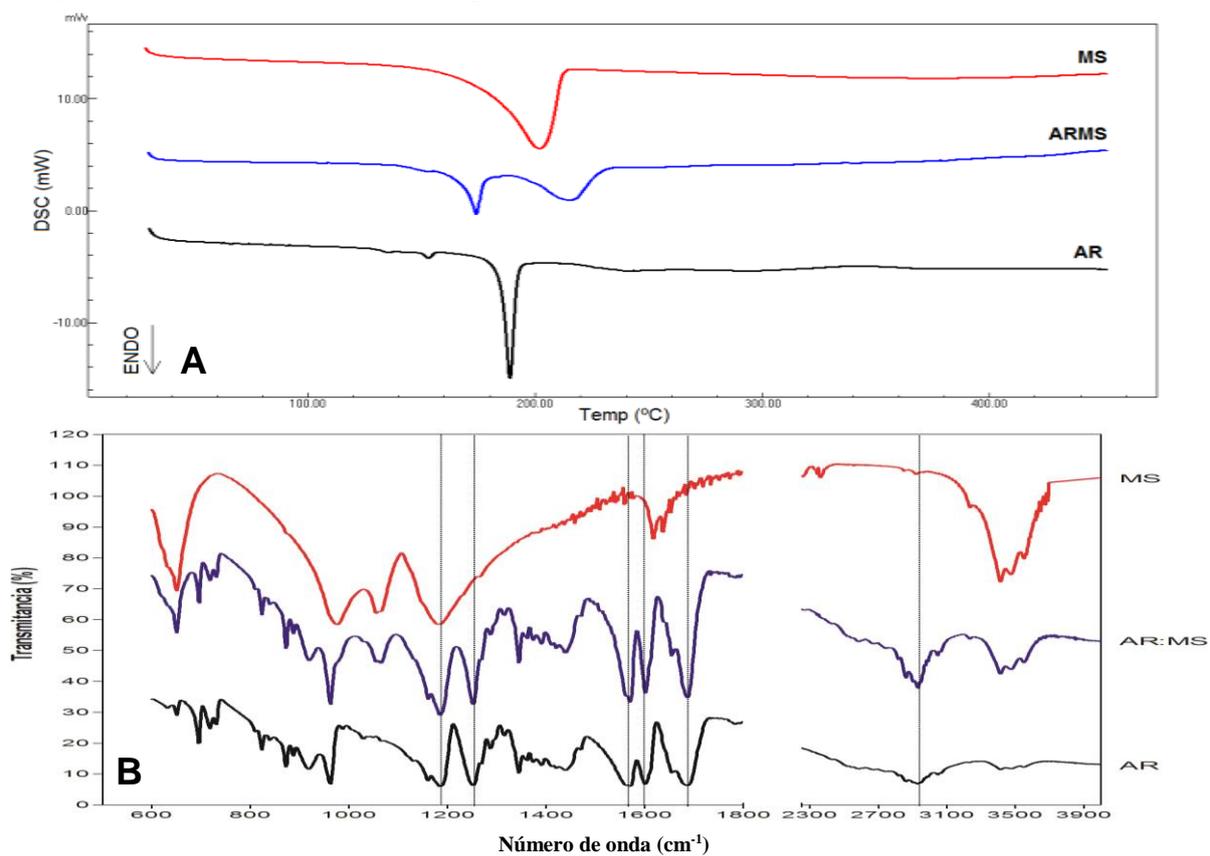
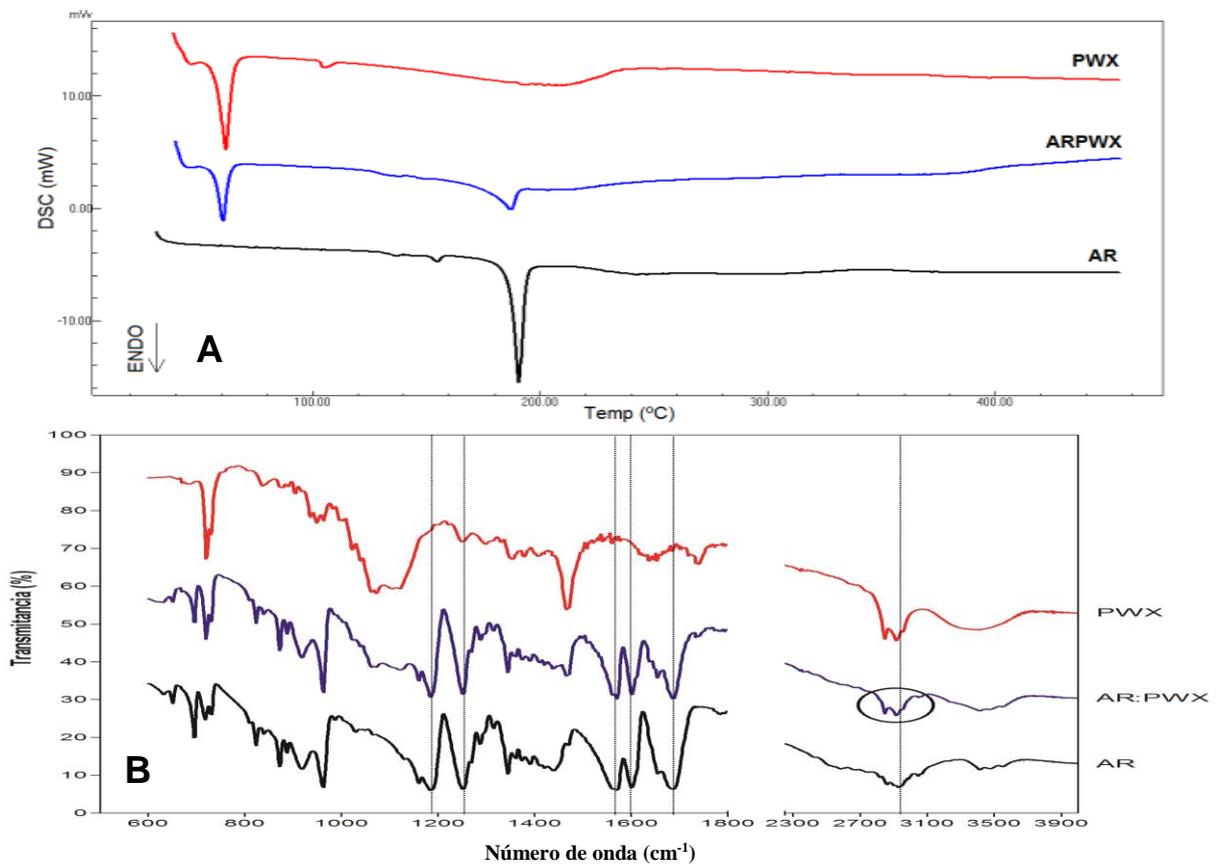
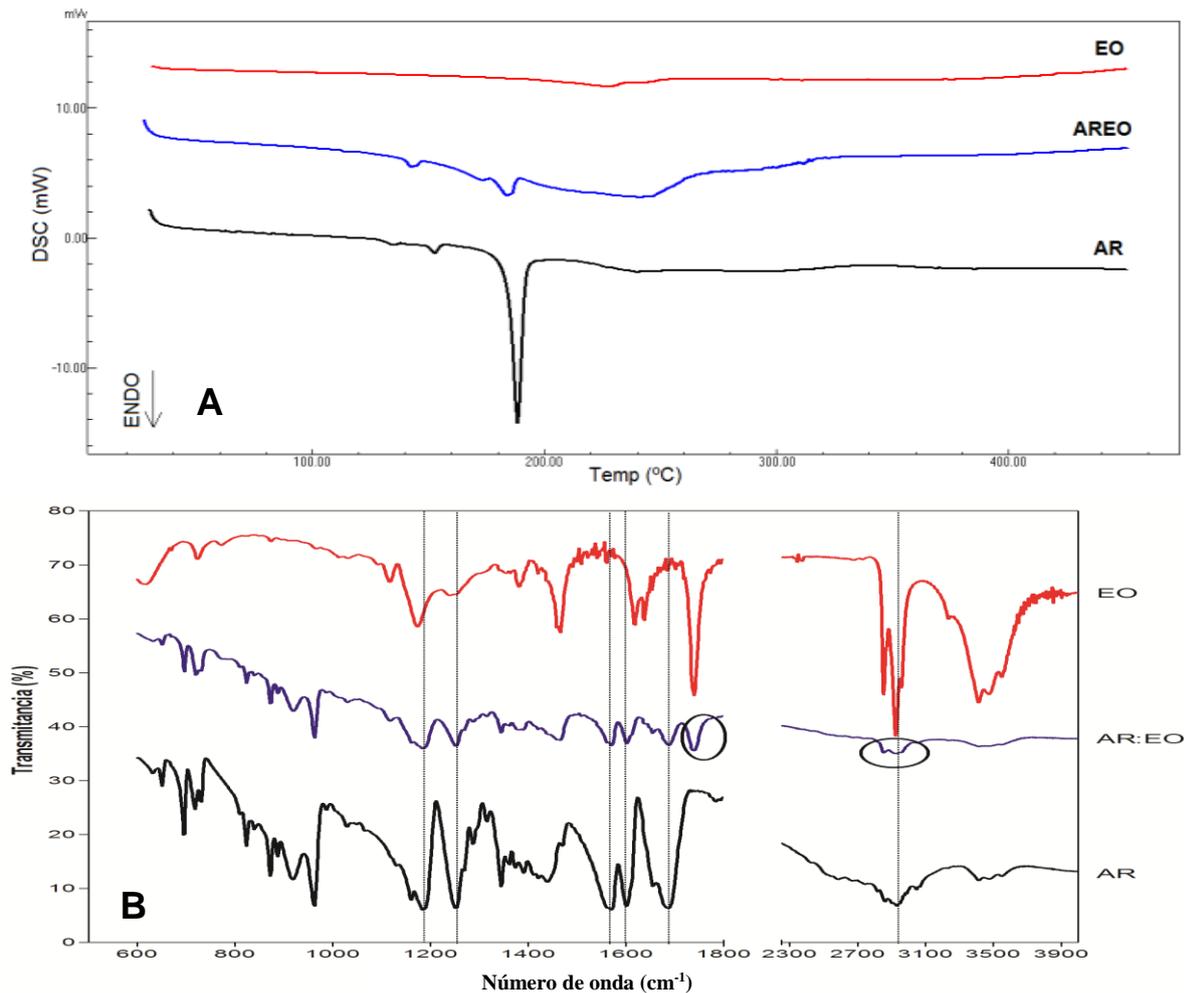


Figura 19. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, PWX e ARPWX.



Avaliando a curva de DSC para AREO (Figura 20 A) se pode observar uma redução da intensidade e pequeno deslocamento da temperatura de fusão do fármaco, com acentuada diminuição da entalpia do evento de 102,13 para 13,46 J g⁻¹, o que provavelmente pode ter sido efeito da solubilização de boa parte do fármaco no excipiente, o qual se apresenta na forma líquida, logo, se ainda existem cristais de fármaco intactos, este funde na faixa adequada e por isso não existe interferência na análise de compatibilidade proposta, caracterizando um processo apenas físico (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011). Quimicamente, não se observam alterações na mistura AREO quando avaliado o espectro de IV (Figura 20 B), pois os discretos deslocamentos de número de onda que ocorrem em algumas bandas podem ser devido à absorção de bandas no espectro do EO em regiões próximas aos números de onda desse grupo funcional.

Figura 20. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, EO e AREO.



Nas curvas de DSC de ARNZ e ARNG (Figuras 21 e 22 A) nota-se que estas assumiram o comportamento do excipiente isolado, com supressão do pico de fusão do AR, porém com base no pico de fusão desses excipientes em mistura não sofrem alteração e seu processo de degradação ocorre em faixa de temperatura próxima a faixa de fusão do fármaco, desta forma não se pode avaliar apenas por DSC que ocorre interação. Logo, avaliando os espectros de IV, mínimos deslocamentos de número de onda das bandas características do AR foram observados para ambas as misturas (Tabela 13 e Figuras 21 e 22 B), considerando o espectro da mistura uma possível soma das bandas características das espécies individuais, e desta forma indicando ausência de interação entre os componentes.

Figura 21. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, NZ e ARNZ.

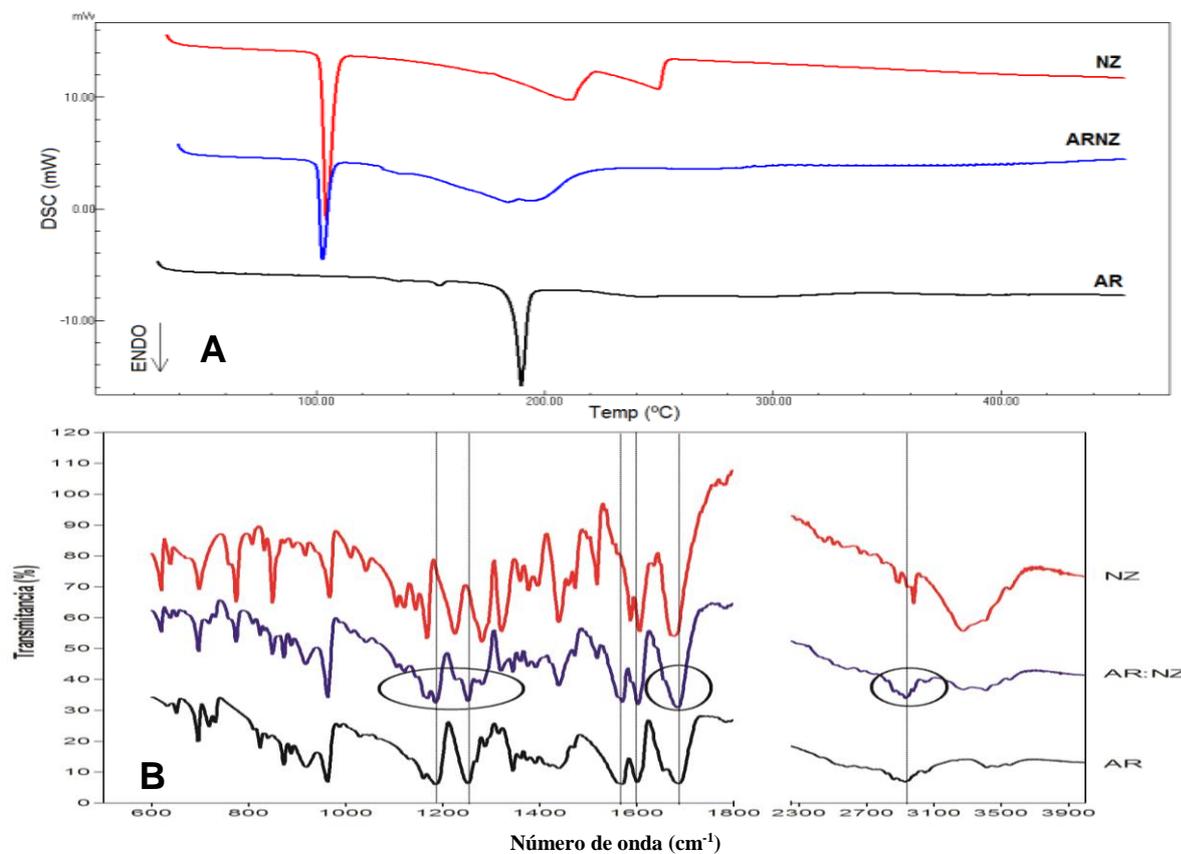
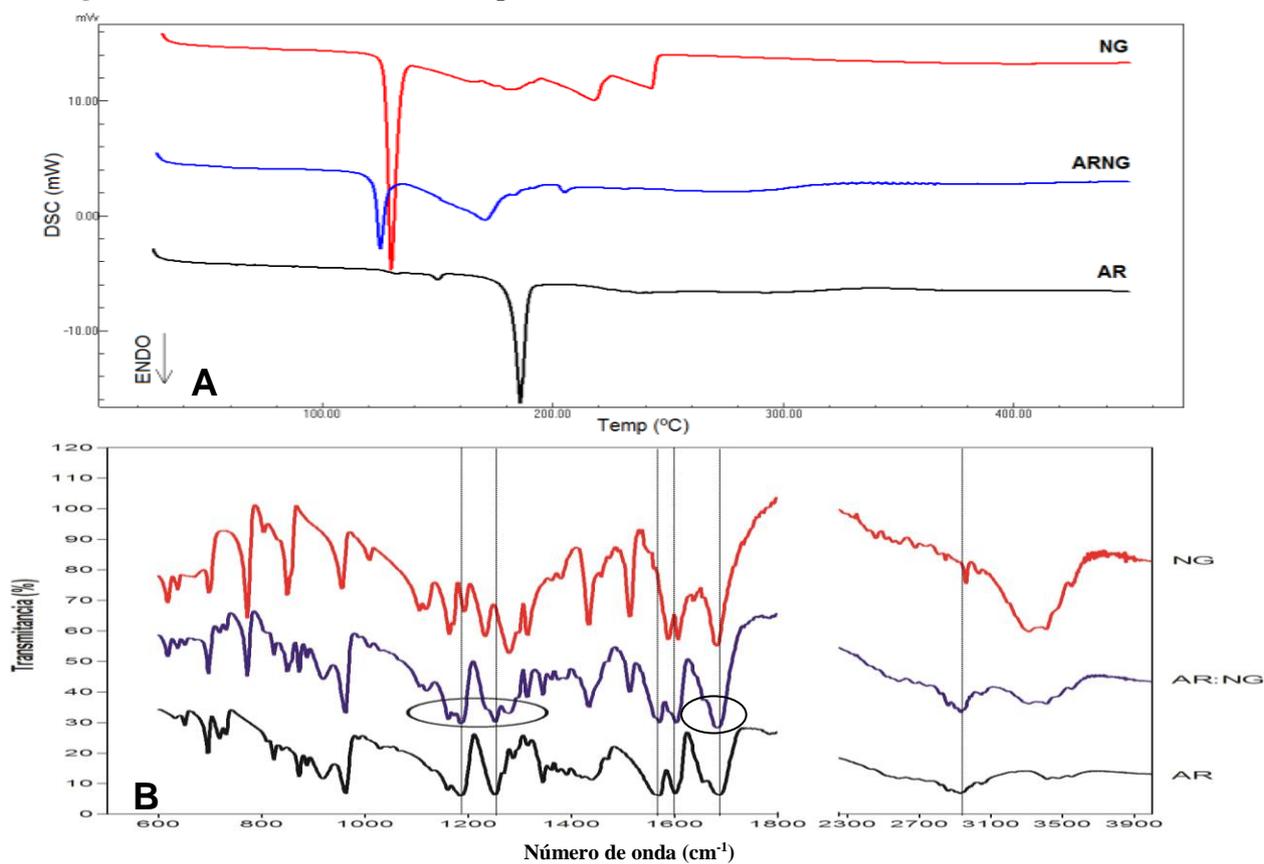


Figura 22. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, NG e ARNG.

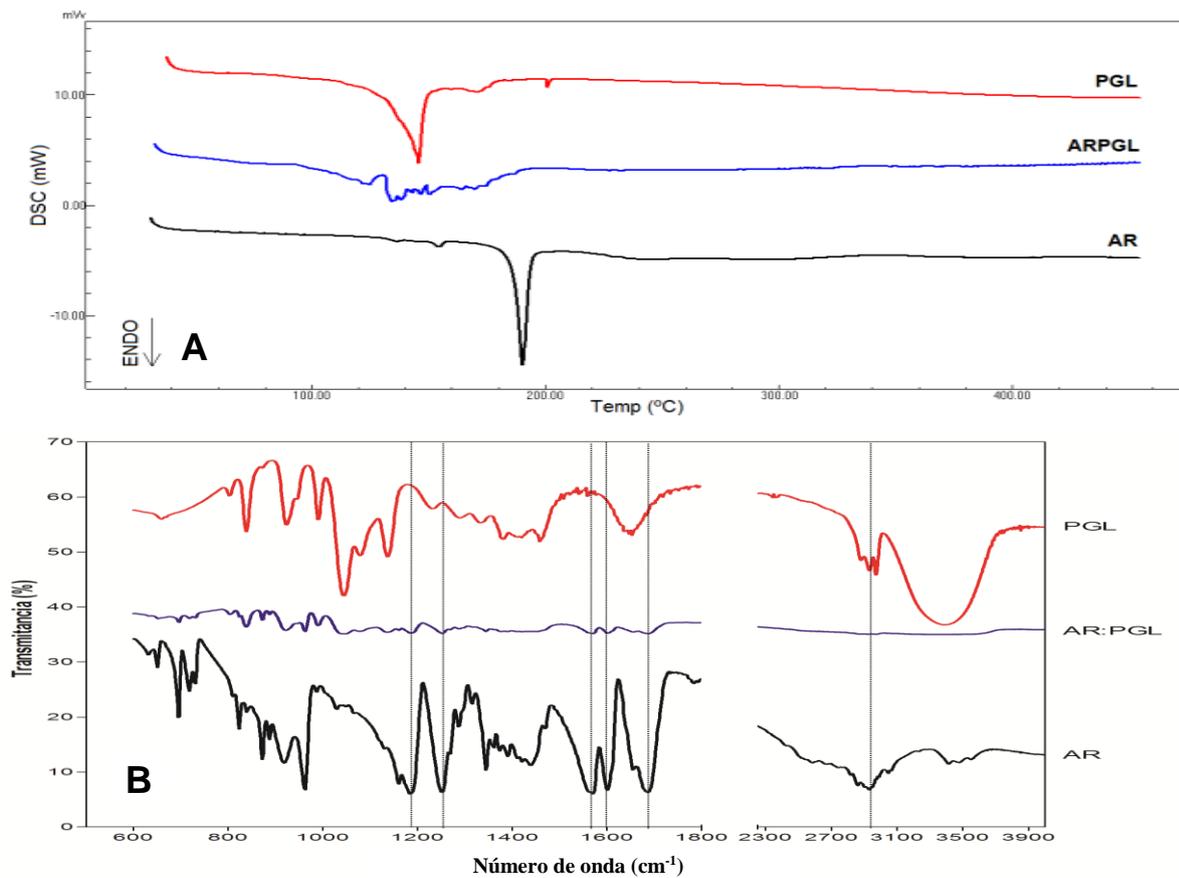


Ambos os excipientes, NZ e NG, apresentam comportamento térmico semelhante em mistura com o IFA, uma vez que suas estruturas químicas são similares, com as seguintes fórmulas, $C_{10}H_{12}O_3$ para o NZ, e $C_8H_8O_3$ para o NG, e, além disso, têm a mesma função em formulações semissólidas, que é a de conservantes antimicrobianos. Desta forma, mesmo com indicativo de incompatibilidade por análise térmica, os espectros de IV não apresentam indícios de interação química, devido sobreposição de bandas, logo ocorre apenas interação física entre estes conservantes e o AR. E os achados no presente estudo corroboram com o estudo de Lima e colaboradores (2014), no qual tanto o NZ quanto o NG em mistura física (1:1) apresentaram o mesmo comportamento tanto térmico quanto no espectro de IV.

Estudos de interação realizados por Neto e colaboradores (2009) sobre a compatibilidade dos excipientes metilparabeno (nipagin) e propilparabeno (nipazol) com prednicarbato, que possui ponto de fusão próximo ao do AR, também mostrou comportamento térmico similar, com ausência do pico de fusão do fármaco em mistura binária com esses excipientes. Já nos estudos de Lira et al. (2007), avaliando a compatibilidade entre lapachol e metilparabeno em mistura binária foi visto um comportamento térmico por DSC diferente do encontrado na MB ARNG em nosso estudo, ocorrendo a formação de uma mistura eutética e aparecimento de um único pico deslocado a temperatura inferior dos eventos endotérmicos do IFA e excipiente isolados.

Para a mistura física ARPGL, a curva de DSC (Figura 23 A) revela uma supressão do pico referente à fusão do fármaco, como também não mantém o perfil do excipiente isolado. Uma possibilidade de explicação seria a solubilização do AR no PGL, já que este excipiente apresenta um evento endotérmico anterior ao do AR, e também se trata de um componente de alta miscibilidade e viscosidade, o qual é rotineiramente usado para solubilização do AR em manipulação (ROWE, 2009; OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011). As bandas de absorção no IV características do AR se mantêm, não sendo observada qualquer alteração do tipo química na mistura (Tabela 13 e Figura 23 B).

Figura 23. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, PGL e ARPGL.



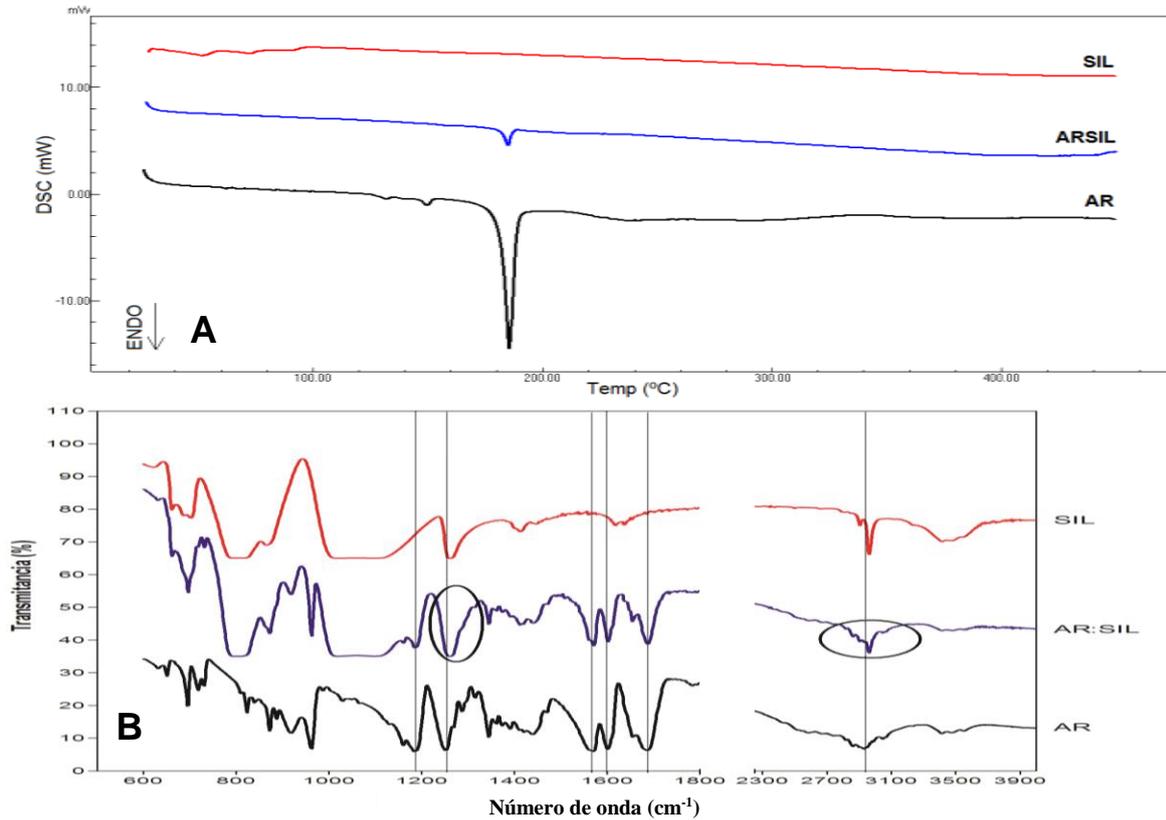
Para a mistura ARSIL, observa-se na curva de DSC (Figura 24 A) uma discreta diminuição da temperatura do pico de fusão do AR, porém uma brusca redução da entalpia de fusão para $7,42 \text{ J g}^{-1}$ (Tabela 12), o que pode ser explicado pelo mesmo motivo assinalado para a mistura AREO, tratando-se de um processo físico. No espectro do IV (Figura 24 B e Tabela 13) evidenciam-se pequenos deslocamentos em algumas bandas características do AR que podem ser atribuídos à sobreposição de bandas presentes na mesma região de número de onda para ambas as espécies.

Entre a maioria das misturas avaliadas se faz importante observar que existe uma alteração no valor da entalpia de fusão do fármaco quando associado aos excipientes (mistura física), porém este valor equivale a praticamente a metade do valor de ΔH do fármaco isolado, uma vez que se tratam de misturas físicas na proporção 1:1, demonstrando que essa diminuição da entalpia está relacionada a uma menor quantidade do fármaco.

De acordo com Oliveira e colaboradores (2011) os eventos térmicos mais significativos devem ocorrer nas mesmas faixas de temperatura para não serem considerados como

incompatibilidade, o que ocorreu no presente estudo, com exceção das misturas ARNZ, ARNG e ARPGL, as quais apresentaram ausência do pico de fusão do fármaco e ARMS, que apresentou deslocamento na faixa de temperatura do evento de fusão do AR.

Figura 24. Curva de DSC (A) e espectro de IV (B) de AR, SIL e ARSIL.



Os resultados para análise por IV se encontram concordantes com a literatura, a qual diz que o desaparecimento de um pico de absorção ou redução da intensidade do pico combinado com o aparecimento de novos picos fornecem uma clara evidência de interações entre fármaco-excipiente (LILTORG et al., 2011), porém os achados encontrados estão relacionados à sobreposição de bandas com somatório dos picos de absorção, característicos das espécies individuais, o que não confere interação química entre os componentes da fórmula.

CAPÍTULO IV
Conclusão

6. CONCLUSÃO

O método CLAE-UV isocrático, desenvolvido e validado no presente trabalho atendeu às normas preconizadas pela legislação vigente, RE nº 899/2003 para um método analítico, o qual foi capaz de quantificar o ácido retinoico em formulação creme, apontando a cromatografia líquida de alta eficiência como ferramenta de análise sensível e apta para esse tipo de estudo.

Avaliando-se a estabilidade da formulação frente ao estresse térmico, foi possível evidenciar o início do processo de degradação do AR de forma mais evidente em 70 ° C, e à temperatura de 80 ° C foi possível observar alteração na cinética de reação para degradação do fármaco, passando de uma cinética de ordem 0 em 70 ° C para ordem 2, quando submeteu-se a temperatura de 80 ° C, denotando uma reação do tipo bimolecular.

A partir de estudos térmicos por DSC correlacionados à análise por FTIR foi possível inferir que a formulação apresenta considerável compatibilidade entre seus componentes, uma vez que não foi vista interação física entre estes componentes por análise calorimétrica, com exceção do componente metabissulfito de sódio que modificou a temperatura de fusão do AR. E seguida da avaliação por FTIR, observou-se quimicamente que não houve alterações relevantes nos perfis espectrais das misturas em relação ao fármaco e ao componente avaliado em cada mistura isoladamente.

Portanto, a formulação foi considerada estável quando submetida a temperatura de 60 e 70 ° C, independente da concentração do fármaco, corroborando para sua estabilidade a boa compatibilidade entre os seus componentes.

O método analítico apresentado nesse trabalho contribuiu como uma alternativa prática e econômica para o estudo da estabilidade do ácido retinoico, diminuindo a lacuna existente na área de controle de qualidade de formulações cosméticas.

CAPÍTULO V
Perspectivas

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho outros passos estão sendo tomados, como:

- A elucidação o processo químico que ocorre a 80 ° C, determinando qual outro componente da formulação possa estar interagindo com o AR para gerar uma cinética de reação de segunda ordem, já que denota uma reação do tipo bimolecular;
- A realização do estudo de estabilidade acelerada e de longa duração da formulação, determinando o prazo de validade da formulação;
- Assim como, avaliar a formulação quanto a estudos de permeação e retenção *in vitro*, uma vez que para formulações de uso tópico deseja-se pequena permeabilidade e grande retentividade.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ARAÚJO, A.A.S.; MERCURI, L.P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 270-277, abr./jun., 2006.

ASCENSO, A.; GUEDES, R.; BERNARDINO, R.; DIOGO, H.; CARVALHO, F.A.; SANTOS, N.C.; SILVA, A.M.; MARQUES, H.C. Complexation and full characterization of the tretinoin and dimethyl-beta-cyclodextrin complex. **AAPS PharmSciTech**, v.12, p.553-63, 2011.

BAERTSCHI, S. W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 8, p. 758-767, 2006.

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

BAZZO, G. C.; SILVA, M. A. S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

BERBENNI, V.; MARINI, A.; BRUNI, G.; CARDINI, A. Thermoanalytical and spectroscopic characterisation of solid-state retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v.221, p.123-41, 2001.

BIRADAR, S. P. et al. Stability Indicating HPLC Method Development : Review. **Asian Journal of Medicinal and Analytical Chemistry**, v. 01, n. 01, p. 21-26, 2014.

BONFILIO, R.; EMERICK, G.L.; JÚNIOR, A.N.; SALGADO, H.R.N. Farmácia magistral: sua importância e seu perfil de qualidade. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.34, n.3, p.653-664, 2010.

BOTT, R.F.; OLIVEIRA, W.P. Storage conditions for stability testing of pharmaceuticals in hot and humid regions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.33, n.4, p.393-401, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 45, de 9 de agosto de 2012**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 ago. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 20 dez. 2013.

BRASIL. Informe técnico nº01, de 15 de julho de 2008 – **Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº 01 de 29/07/2005**, que trata do Guia para realização dos

estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 15 jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução- RDC, nº 899, de 29 de maio de 2003**. Dispõe sobre o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da república federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de Junho de 2003.

BRASIL. **Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005**. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005.

BRECHER, A. R.; ORLOW, S. J. Oral retinoid therapy for dermatologic conditions in children and adolescents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 2, p. 171–182, ago. 2003.

BRISAERT, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. A. Investigation on the photostability of a tretinoin lotion and stabilization with additives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 49–57, 2000.

BRISAERT, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. A. Investigation on the photostability of tretinoin in creams. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 334, n. 1-2, p. 56–61, 4 abr. 2007.

BRITISH PHARMACOPEIA: 2005. London: The Stationary Office, v.5, 2005.

BRITISH PHARMACOPEIA: 2009. London: The Stationary Office, v.1 e 2, 2009.

BROWN, S. K.; SHALITA, A. R. Acne vulgaris. **The Lancet**, v. 351, p. 1871-1876, 1998.

BURNS, D. T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. Use of the terms “recovery” and “apparentrecovery” in analytical procedures. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.11, p.2201–2205, 2002.

CARVALHO, J.P.; SANTOS, A.S.; SÁ, A.S.; TEIXEIRA, C.S.; NOGUEIRA, M.S. Estabilidade de medicamentos no âmbito farmacológico. **Revista Farm. Med.**, v.34, n. 6, p. 22-7, 2005.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 689, n.1, p.175-180, 1997.

CHA, J. et al. STABILITY STUDIES. In: **Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis - Separation Science and Technology**. 2. ed. Elsevier, v. 10, p. 459–505, 2011.

CONTRERAS, M. J. F.; SORIANO, M. M. J.; DIÉGUEZ, A. R. In vitro percutaneous absorption of all-trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 297, p. 134-145, 2005.

DE SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: dosagem por regressão multivariada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª ed. São Paulo, Atheneu, 2010.

FISCHER, P.; EUGSTERB, A.; WINDHAB, E.J.; SCHULEIT, M. Predictive Stress Tests to Study the Influence of Processing Procedures on Long Term Stability of Supersaturated Pharmaceutical O/W Creams. **International Journal of Pharmaceutics**, v.339, p.189-96, 2007.

GASPAR, L.R.; CAMPOS, P.M.B.G.M. A HPLC method to evaluate the influence of photostabilizers on cosmetic formulations containing UV-filters and vitamins A and E. **Talanta**, v.82, p.1490-1494, 2010.

GATTI, R.; GIOIA, M. G.; CAVRINI, V. Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 147–159, 2000.

GIAM, J.A.; MCLACHLAN, A.J.; KRASS, I. Characterizing specialized compounding in community pharmacies. **Research in Social and Administrative Pharmacy**, v.8, p.240–252, 2012.

GUILLEN, J.S.Q.; BATISTA, I.A.S.A.; MATOS, J.R.M. Contribuição da análise térmica na avaliação de princípios ativos empregados na prevenção do envelhecimento da pele isolados e/ou incorporados em geis e emulsões. **Cosmetics & Toiletries**, v.18, n.2, p.50-52, 2006.

GUIMARAES, C. A. Determination of isotretinoin in pharmaceutical formulations by reversed-phase HPLC. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 03, n. 05, p. 454–458, 2010.

GUO, Y.; SHALAEV, E.; SMITH, S. Physical stability of pharmaceutical formulations : solid-state characterization of amorphous dispersions. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 137–144, 2013.

HONG, D. D.; SHAH, M. **Development and validation of HPLC stability-indicating assays**. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. Drug Stability: Principles and Practice. New York: Marcel Dekker, cap. 11, p. 329-384, 2000.

HUBINGER, J. C. Determination of retinol, retinyl palmitate, and retinoic acid in consumer cosmetic products. **Journal of Cosmetic Science**, v. 60, n. 5, p. 485–500, 2009.

HWANG, S.R.; LIM, S.J.; PARK, J.S.; KIM, C.K. Phospholipid-based microemulsion formulation of all-trans-retinoic acid for parenteral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 276, p. 175-183, 2004.

ICH, Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Geneva, Switzerland, 2003.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B. 1995.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). 2005.

INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

International Standard Organization. **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025,** 2001.

IOELE, G. et al. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, n. 1-2, p. 251–60, 11 abr. 2005.

JAIN, D.; BASNIWAL, P. K. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 86, p. 11–35, dez. 2013.

KANE, M. A. Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1821, n. 1, p. 10–20, jan. 2012.

KLICK, S. et al. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. **Pharmaceutical Technology**, p. 48–66, 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.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. v. 2, 2001.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE.** Campinas, SP. Editora Átomo, 2009.

LEHMAN, P.A.; SLATTERY, J.T.; FRANZ, T.J. Percutaneous absorption of retinoids: Influence on vehicle, light exposure and dose. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 91, n.1, p.56-61, 1988.

LILTROP, K.; LARSEN, T.G.; WILLUMSEN, B.; HOLM, R. Solid state compatibility studies with tablet excipients using non thermal methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, p.424–8, 2011.

LIMA, I.P.B.; LIMA, N.G.P.B.; BARROS, D.M.C.B.; OLIVEIRA, T.S.; BARBOSA, E.G.; GOMES, A.P.B.; FERRARI, M.; NASCIMENTO, T.G.; ARAGÃO, C.F.S. Compatibility study of tretinoin with several pharmaceutical excipients by thermal and non-thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, dez, 2014.

LIN, H.S.; CHEAN, C.S.; NG, Y.Y.; CHAN, S.Y.; HO, P.C. 2-Hydroxypropylbeta-cyclodextrin increases aqueous solubility and photostability of alltrans-retinoic acid. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v.25, p.265–269, 2000.

LINDINO, C.A.; MITSUI, M.L.; ORTIGUARA, R.; FELIN, D.; ROSA, M.R.; BARICCATTI, R.A. Estudo de estabilidade do fosfato dissódico de prednisolona em condições de estresse oxidativo e térmico, em formulação oral. **Eclética Química**, v.35, n.4, 2010.

LIRA, A.M.; ARAÚJO, A.A.S.; BASÍLIO, I.D.J.; SANTOS, B.L.L.; SANTANA, D.P.; MACÊDO, R.O. Compatibility studies of lapachol with pharmaceutical excipients for the development of topical formulations. **Thermochemica Acta**, v.457, p.1–6, 2007.

LOFTSSON, T. **Drug Stability for Pharmaceutical Scientists**. 1. ed. Elsevier, p. 170, 2014.

LOVAT, P.E., IRVING, H., MALCOLM, A.J., PEARSON, A.D.J., REDFERN, C.P.F. 9-cis retinoic acid—a better retinoid for the modulation of differentiation, proliferation and gene expression in human neuroblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v.31, p.85–91, 1997.

LUPO, M.P. **Antioxidants and vitamins in Cosmetics**. Elsevier Science Inc., 2001.

MANCONI, M.; VALENTI, D.; SINICO, C.; LAI, F.; LOY, G.; FADDA, A.M. Niosomes as carriers for tretinoin. II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. **International Journal of Pharmaceutics**, v.260, p.261–272, 2003.

MARTIN, B.; MEUNIER, C.; MONTELS, D.; WATTS, O. Chemical stability of adapalene and tretinoin when combined with benzoyl peroxide in presence and in absence of visible light and ultraviolet radiation. **British Journal of Dermatology**, v.139, p.8–11, 1998.

MENDONÇA, C. M. S.; LIMA, I. P. B.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2277–2285, 23 jan. 2014.

MOTTO, M.G.; FACCHINE, K.L.; HAMBURG, P.F.; et al. Separation and identification of retinoic acid photo-isomers. **Journal of Chromatography**, v.481, p.255–262, 1989.

MURAKAMI, F.S., MENDES, C., PEREIRA, R.N., VALENTE, B.R., FRANCHI, S.M., SILVA, M.A.S. Estudo de estabilidade de comprimidos gastro-resistentes contendo 20 mg de omeprazol. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n.5, p. 645-652, 2009.

NETO, H.S.; NOVAK, C.S.; MATOS, J.R. Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi solid pharmaceutical form. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.97, p.367–74, 2009.

NETO, R. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

NIGHLAND, M.; YUSUF, M.; WISNIEWSKI, S.; HUDDLESTON, K.; NYIRADY, J. The effect of simulated solar UV irradiation on tretinoin in tretinoin gel microsphere 0.1% and tretinoin gel 0.025%. **Cutis**, v.77, p.313–316, 2006.

NYIRADY, J.; LUCAS, C.; YUSUF, M.; MIGNONE, P.; WISNIEWSKI, S. The stability of tretinoin in tretinoin gel microsphere 0.1%. **Cutis**, v.70, p.295–298, 2002.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n.7, p.1224-1230, 2011.

OURIQUE, A.F.; MELERO, A.; BONA DA SILVA, C.; SCHAEFER, U.F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRESA, S.S.; LEHRF, C.; KOSTKAG, K.; BECKA, R.C.R. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, n.1, p.95-101, 2011.

PAVIA, D.L.; LAPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; ROSSI, C.; LATTERINI, L.; NOCCHETTI, M.; COSTANTINO, U. Use of anionic clays for photoprotection and sunscreen photostability: hydrocalcites and phenylbenzimidazole sulfonic acid. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v.20, p.1079-1083, 2006.

POMBAL, R., BARATA, P., OLIVEIRA, R. Estabilidade dos medicamentos manipulados. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v.7, p.322-333, 2010.

PRISTA, L.V.N.; ALVES, A.C.M.; CAMPOS, R.M. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 3 ed. Lisboa: Fundação Galouste Guldenkian, 1990.

PRISTA, N., ALVES, A.C., MORGADO, R.M.B., LOBO, J.S. **Tecnologia farmacêutica**. vol. 3, 6ª edição, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009.

RAO, R.N.; RAJU, A.N.; NARSIMHA, R. Isolation and characterization of process related impurities and degradation products of bicalutamide and development of RP-HPLC method for impurity profile study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.46, p.505–519, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B., 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.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIRDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n.1, p.164-171, 2008.

RIGOPOULOS, D.; IOANNIDES, D.; KALOGEROMITROS, D.; KATSAMAS, A. D. Comparison of topical retinoids in the treatment of acne. **Clinics in Dermatology**, v. 22, p.408-411, 2004.

RODANTE, F.; VECCHIO, S.; CATALANI, G.; TOMASSETTI, M. Compatibility between active components of a commercial drug. **Farmaco**, v.57, p.833-43, 2002.

ROWE, R.C., et al. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6ª edição. 2009.

SEN, T.; TARIMCI, N. The effect of cyclodextrins on the in vitro characteristics of semisolid formulations of all-trans retinoic acid. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.10, n.1, p.95-108, 2013.

SHAPIRO, S.S.; SALIOU, C. Role of vitamins in skin care. **Nutrition**, New York, v.17, n.10, p.839-844, 2001.

SINGH, A.V.; NATH, L.K. Evaluation of compatibility of lamivudine with tablet excipients and novel synthesized polymer. **Journal of Materials and Environmental Science**, v.2, n.3, p.243-250, 2011.

SILVA, E.C.; DE PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed., Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SOBREIRA, T.J.P. **Análise da via de regulação gênica por ácido retinoico: uma abordagem por bioinformática e biologia estrutural**. 2008. 177f. Tese (Doutorado em Bioinformática) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

STEINER, D. Vitaminas em cosméticos: vitaminas e minerais fazem parte do conceito moderno da cosmetologia de prevenção do envelhecimento. **Cosmetics & Toiletries**, v. 18, p. 46, nov/dez 2006.

SWEETMAN, S.C. **Martindale: the complete drug reference**. 34th ed. London: Pharmaceutical Press, p.2756, 2005.

TAN, X.; METZER, N.; LINDENBAUM, S. Solid-state stability studies of 13-cis-retinoic acid and all-trans retinoic acid using microcalorimetry and HPLC analysis. **Pharmaceutical Research** v.9, p.1203–1208, 1992.

TASHTOUSH, B. M.; JACOBSON, E. L.; JACOBSON, M. K. A rapid HPLC method for simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 3, p. 859–64, 19 fev. 2007.

TEGLIA, C.M.; GARCÍA, M.D.G.; GALERA, M.M.B.; GOICOECHEA, H.C.A. Enhanced high-performance liquid chromatography method for the determination of retinoic acid in plasma. Development, optimization and validation. **Journal of Chromatography A**, v.1353, p.40-48, 2014.

TITA, D.; JURCA, T.; FULIAS, A.; MARIAN, E.; TITA, B. Compatibility study of the acetylsalicylic acid with different solid dosage forms excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.112, p.407–19, 2013.

TROTTA, M.; UGAZIO, E.; PEIRA, E.; PULITANO, C. Influence of ion pairing on topical delivery of retinoic acid from microemulsions. **Journal of Controlled Release**, v.86, n.2-3, p.315-321, 2003.

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

USP. The United States Pharmacopeia XXIV. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Covention, 1999.

VELLOSO, F. T. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-UV para a quantificação de ácido retinoico em microcápsulas de alginato e quitosana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, 2009.

WATERMAN, K.C., ADAMI, R.C. Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v.293, p. 101-125, 2005.

WATERMAN, K.C. Understanding and predicting pharmaceutical product shelf-life. In: Huynh-Ba, K. **Handbook of stability testing in pharmaceutical development**. New York, Springer, p. 115-135, 2009.

WEBSTER, G. H. Topical tretinoin in acne therapy. **Journal of the Academy of Dermatology**, v.39, p. S38-S44, 1998.

WHO. Aspects of Quality Assurance. **WHO Drug Information**, v.18, n.2, p.113-116, 2004.

World Health Organization. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; Thirty-second report, WHO Technical Report Series, No.823, Geneva, 1992.

YAMAGUCHI, Y. et al. Successful treatment of photo-damaged skin of nano-scale at RA particles using a novel transdermal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 104, p. 29-40, 2005.

YOSHIOKA, S., STELLA, V.J. **Stability of drugs and dosage forms**. New York, Kluwer Academic Publishers, 2002.

ZARBIELLI, M.G.; MACEDO, S.M.D.; MENDEZ, A.S.L. Controle de qualidade de cápsulas de piroxicam manipuladas em farmácias do município de Erechim – RS. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 2, p. 55-59, 2006.

ZARGHI, A.; JENABI, M.; EBRAHIMIAN, A.J. HPLC determination of the stability of tretinoin in tretinoin–minoxidil solution. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.73, p.163–165, 1998.

ZHOU, D.; PORTER, W. R.; ZHANG, G. G. Z. **Drug Stability and Degradation Studies**. p. 87–124, 2009.