

**UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO**  
Carina Agostinho Rodrigues

**ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE DA  
1,5-BIS-(4-HIDROXI-3-METOXIFENIL)-1,4-  
PENTADIEN-3-ONA E DO 4-[5-(4-HIDROXI-3-  
METOXI-FENIL)-3-OXO-PENTA-1,4-DIENIL]-2-  
METOXI-FENOLATO DE SÓDIO**

São Paulo  
2009

**UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO**  
Carina Agostinho Rodrigues

**ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE DA  
1,5-BIS-(4-HIDROXI-3-METOXIFENIL)-1,4-  
PENTADIEN-3-ONA E DO 4-[5-(4-HIDROXI-3-  
METOXI-FENIL)-3-OXO-PENTA-1,4-DIENIL]-2-  
METOXI-FENOLATO DE SÓDIO**

**Trabalho de conclusão de mestrado orientado pelo Prof.  
Dr. José Agustín Quincoces Suárez**

São Paulo  
2009

Dedico este trabalho a minha mãe Edna Bertin  
e minha irmã Carla A. Rodrigues que são as maiores riquezas da minha  
vida e minhas eternas incentivadoras.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, que proporcionou e continuará me proporcionando grandes vitórias.

À Professora Doutora Magda Dias Gonçalves Rios pela orientação, dedicação e amizade na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Agustín Quincoces Suárez pela orientação e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Professor Luiz Antônio Baffile Leoni e a Universidade São Judas Tadeu pela amizade e colaboração.

À Professora Doutora Maria Cristina Marcucci Ribeiro pela essencial participação na finalização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Celso Pardi pelo convívio e preciosas sugestões no transcorrer do trabalho.

À Professora Doutora Marilene Devuono Camargo Penteado pela cooperação.

À Professora Claudete Justina Valduga pela contribuição de fornecimento de dados cromatográficos para a realização deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Síntese Orgânica, C-125, Reginaldo Pereira Santos e Oseraldo Vieira Rocha pelo fornecimento dos produtos **1** e **2** com um grau de pureza alto.

A todos os professores integrantes do corpo de Mestrado em Farmácia da UNIBAN, bem como a todos os funcionários da Secretária da Pós-Graduação pela cooperação, especialmente ao Fabrício Flores.

À minha mãe e minha irmã pela compreensão, ajuda e maior incentivo na realização deste trabalho.

À todos aqueles que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Há ainda muitos caminhos a percorrer,  
Por mim, esse ser fragmentado  
Alguém sempre em construção  
Imperfeito, incompleto, inacabado.

Há ainda muito a conhecer  
O crescimento é parcelado  
E quanto mais eu aprendo  
Nunca estou, por completo, “terminado”.

Há de haver muito a refazer  
A oportunidade de corrigir, de ser reciclado  
De insistir no que penso ser certo  
E corrigir, reformular o que é errado.

Haverá sempre o que se viver  
A oportunidade de ser renovado!

Carla

## RESUMO

Os compostos **1** e **2** são 1,4-pentadienonas de base fenólica que foram sintetizados no laboratório de Síntese Orgânica C-125 da UNIBAN pela equipe do Professor Quincoces, que exibiram propriedades antitumorais, antimicrobianas, antioxidantes, antiparasitárias, entre outras. Destacando-se a atividade antitumoral devido à alta seletividade e baixa toxicidade, comprovadas por estudos biológicos.

O composto **1** apresenta propriedades como indicador de pH, exibindo três cores diferentes, amarelo em meio ácido, laranja em meio neutro e vermelho em meio básico, tendo um grande potencial como indicador de pH em titulações.

Uma importante indústria farmacêutica brasileira tem mostrado interesse nas patentes desses compostos, mas um dos requisitos exigidos pela mesma, são os estudos preliminares de testes de estabilidade e condições de armazenamento.

Os testes de estabilidade determinam o tempo de validade de um medicamento e a melhor condição de armazenamento para o mesmo.

Nesta dissertação os compostos **1** e **2** foram expostos à diferentes condições de armazenamento por um período de 180 dias, a saber, sob à ação da luz, umidade e diferentes temperaturas.

As diferentes amostras foram analisadas para acompanhamento da degradação, por método de espectrofotometria UV/VIS e HPLC. Esses métodos foram validados por linearidade, limite de detecção, quantificação e repetibilidade.

Após 180 dias de armazenamento o composto **1** apresentou resultados que comprovam a sua maior estabilidade em relação ao composto **2**. Sendo a alta temperatura e a presença de luz dois fatores que maior favoreceram a degradação desses compostos.

O composto **1** apresenta validade preliminar de 02 anos, enquanto que o composto **2**, sendo menos estável, a validade preliminar é de 01 ano.

## **ABSTRACT**

Compounds **1** and **2** are phenolic 1,4-pentadienones that were synthesized in the laboratory of Organic Synthesis C-125 of UNIBAN by Professor Quincoces team, which exhibited antitumor properties, antimicrobial, antioxidant, antiparasitic, among others. The antitumor activity is evidenced due to the high selectivity and low toxicity, atested by biological studies.

Compound **1** has properties such as pH indicator, displaying three different colors, yellow in acid, orange in neutral and red in basic. Also, compound **1** acts as a high potential indicator of pH in titulations.

A major Brazilian pharmaceutical industry has shown interest in the patents of these compounds, but one of the requirements for it, are the preliminary studies of stability testing and storage conditions.

Stability tests determine the shelf life of a drug and the best storage condition for the same.

In this thesis the compounds **1** and **2** were exposed to different storage conditions for a period of 180 days, ie, under the action of light, humidity and different temperatures.

The different samples were analyzed in order to monitor its degradation, by method of spectrophotometry UV / VIS and HPLC. These methods were validated by linearity, limit of detection, quantification and repeatability.

After being stored for 180 days, compound **1** presented results that demonstrate its higher stability compared to compound **2**. The high temperatures and the presence of light are the two factors that most favored the degradation of these compounds.

Compound **1** presents preliminary validity of 02 years, while compound **2**, less stable, presents preliminary validity of 01 year only.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
<b>Figura 1:</b> Estrutura química do composto 1	1
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do composto 2	2
<b>Figura 3:</b> Cromatogramas dos compostos 1 e 2 puros	28
<b>Figura 4:</b> Curva de calibração do composto 1 por espectrofotometria UV/VIS	29
<b>Figura 5:</b> Curva de calibração do composto 2 por Espectrofotometria UV/VIS	30
<b>Figura 6:</b> Curva de calibração do composto 1 por HPLC	31
<b>Figura 7:</b> Curva de calibração do composto 2 por HPLC	32
<b>Figura 8:</b> Gráfico das residuais do composto 1	34
<b>Figura 9:</b> Gráfico das residuais do composto 2	34
<b>Figura 10:</b> Relação não linear entre a concentração e o sinal	35
<b>Figura 11:</b> Gráfico genérico da reação de 2° ordem	47
<b>Figura 12:</b> Cinética do composto 1 em -20°C	47
<b>Figura 13:</b> Cinética do composto 1 em temperatura ambiente	48



<b>Figura 14:</b> Cinética do composto <b>1</b> em 40°C	<b>48</b>
<b>Figura 15:</b> Cromatograma do composto <b>1</b> após armazenamento em 40°C	<b>49</b>
<b>Figura 16:</b> Espectrofotometria de massas do composto <b>1</b> após armazenamento em 40°C	<b>49</b>
<b>Figura 17:</b> Cinética do composto <b>1</b> em 6°C	<b>50</b>
<b>Figura 18:</b> Cinética do composto <b>2</b> em -20°C	<b>50</b>
<b>Figura 19:</b> Cromatograma do composto <b>2</b> após armazenamento em -20°C	<b>51</b>
<b>Figura 20:</b> Espectrofotometria de massas do composto <b>2</b> após armazenamento em -20°C	<b>51</b>
<b>Figura 21:</b> Cinética do composto <b>2</b> em temperatura ambiente	<b>52</b>
<b>Figura 22:</b> Cromatograma do composto <b>2</b> após armazenamento em T.A.	<b>52</b>
<b>Figura 23:</b> Espectrofotometria de massas do composto <b>2</b> após armazenamento em temperatura ambiente	<b>52</b>
<b>Figura 24:</b> Íon fragmento do composto <b>1</b> após perda do grupo vinila e rearranjo dos íons	<b>53</b>
<b>Figura 25:</b> Íon fragmento de 205 unidades de massa do composto <b>1</b> após perda de 122 unidades de massa	<b>53</b>
<b>Figura 26:</b> Íon fragmento de 149 unidades de massa detectado no espectro	<b>54</b>

<b>Figura 27:</b> Cinética do composto <b>2</b> em 40°C	<b>54</b>
<b>Figura 28:</b> Cromatograma do composto <b>2</b> após armazenamento em 40°C	<b>54</b>
<b>Figura 29:</b> Espectrofotometria de massas do composto <b>2</b> após armazenamento em 40°C	<b>55</b>
<b>Figura 30:</b> Cinética do composto <b>2</b> em 6°C	<b>55</b>
<b>Figura 31:</b> Cromatograma do composto <b>2</b> após armazenamento em 6°C	<b>56</b>
<b>Figura 32:</b> Espectrofotometria de massas do composto <b>2</b> após armazenamento em 6°C	<b>56</b>
<b>Figura 33:</b> Coloração do composto <b>1</b> em diferentes pH	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
<b>Tabela 1:</b> Condições de armazenamento das amostras	<b>26</b>
<b>Tabela 2</b> – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do composto <b>1</b> por UV/VIS	<b>30</b>
<b>Tabela 3</b> – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do composto por espectrofotometria UV/VIS	<b>31</b>
<b>Tabela 4</b> – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do composto <b>1</b> por HPLC	<b>32</b>
<b>Tabela 5</b> – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do composto <b>2</b> por HPLC	<b>33</b>
<b>Tabela 6</b> – Resultados das análises de repetibilidade do composto <b>1</b> por espectrofotometria UV/VIS	<b>35</b>
<b>Tabela 7</b> – Resultados das análises de repetibilidade do composto <b>1</b> por HPLC	<b>36</b>
<b>Tabela 8</b> Resultados das análises de repetibilidade do composto <b>2</b> por espectrofotometria UV/VIS	<b>37</b>
<b>Tabela 9</b> – Resultados das análises de repetibilidade do composto <b>2</b> por HPLC	<b>39</b>
<b>Tabela 10</b> - Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação dos compostos <b>1</b> e <b>2</b>	<b>40</b>

<b>Tabela 11</b> – Teores das amostras do composto <b>1</b> analisadas por espectrofotometria no UV/VIS	<b>41</b>
<b>Tabela 12</b> Teores das amostras do composto <b>2</b> analisadas por espectrofotometria no UV/VIS	<b>41</b>
<b>Tabela 13</b> – Teores das amostras do composto <b>1</b> analisadas por HPLC	<b>42</b>
<b>Tabela 14</b> – Teores das amostras do composto <b>2</b> analisadas por HPLC	<b>42</b>
<b>Tabela 15</b> – Teores dos compostos <b>1</b> e <b>2</b> após exposição à luz pelo método de espectrometria no UV/VIS	<b>43</b>
<b>Tabela 16</b> Teores dos compostos <b>1</b> e <b>2</b> após exposição à luz pelo método de HPLC	<b>43</b>
<b>Tabela 17</b> – Valores de pH do composto <b>2</b> durante o armazenamento	<b>43</b>
<b>Tabela 18</b> – Teores das soluções do composto <b>2</b> em pH 3,5 e 7,0 por espectrofotometria UV/VIS	<b>44</b>
<b>Tabela 19</b> – Teores das soluções do composto <b>2</b> em pH 3,5 e 7,0 por HPLC	<b>44</b>
<b>Tabela 20</b> – Resultados biológicos dos compostos <b>1</b> e <b>2</b> após degradação	<b>59</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

A = absorvância

ACN = acetonitrila

ANVISA= Agência de Vigilância Sanitária

CV = coeficiente de variação

DMSO = dimetilsulfóxido

DP = desvio padrão

D65/ID65= Lâmpadas fluorescentes UV/VIS

HPLC= Chromatography em High Performance Liquid

ICH = Internacional Conference on Harmonization

K = constante da velocidade de degradação

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

min.= minutos

pH = potencial hidrogeniônico

R = coeficiente de correlação

TA = temperatura ambiente

Tr = tempo de retenção

UR = umidade relativa

UV = ultravioleta

VIS = visível

$\lambda$  = comprimento de onda

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Objetivos</b>	<b>7</b>
<b>3 Introdução da literatura</b>	<b>8</b>
3.1 Análise Quantitativa	8
3.2 Validação dos Métodos Analíticos	11
3.3 Linearidade	12
3.4 Limite de Detecção e Quantificação	13
3.6 Estudo de Estabilidade	16
3.7 Cinética	18
3.7.1 Ordem das reações	18
3.8 Metodologia química utilizada no estudo da estabilidade	19
<b>4 Materiais e Métodos</b>	<b>21</b>
4.1 Materiais, solventes e reagentes	21
4.2 Amostras	22

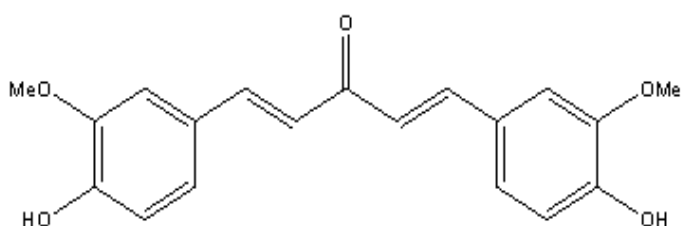
4.3 Metodologia	23
4.3.1 Preparação das amostras dos compostos <b>1</b> e <b>2</b> para análise espectrofotométrica UV/VIS e por HPLC	23
4.3.2 Espectrometria no UV/VIS	23
4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	23
4.3.4 Construção das curvas de calibrações dos compostos <b>1</b> e <b>2</b> – Análise espectrofotométrica UV/Vis e HPLC	24
4.3.5 Teste de precisão/repetibilidade dos compostos <b>1</b> e <b>2</b>	24
4.3.6 Determinação do limite de detecção	25
4.3.7 Determinação do limite de quantificação	25
4.3.8 Condições de armazenamento das amostras	26
<b>5 Resultados e Discussão</b>	<b>28</b>
5.1 Determinação dos espectros de absorção	29
5.2 Curva de calibração	29
5.3 Gráfico das residuais	35
5.4 Precisão e Repetibilidade	35
5.5 Limite de Detecção e Quantificação	40



5.6 Características Organolépticas	40
5.7 Determinação do teor das amostras	41
5.8 Análise do pH	43
5.9 Cinética, análise por HPLC/massas dos compostos degradados	46
<b>6 Conclusão</b>	<b>57</b>
<b>7 Sugestões</b>	<b>58</b>
<b>8 Anexos</b>	<b>59</b>
8.1 Testes biológicos das amostras degradadas	59
8.1.1 Metodologia dos testes biológicos	60
8.1.2 Avaliação do citotoxicidade	60
8.2 Propriedade de solução indicadora do composto 1	61
8.3 Planilhas dos resultados obtidos pelo excel	63
<b>9 Referências</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-ona, também denominado composto **1** (Figura 1) é um produto natural que foi isolado da *Curcuma domestica* por Masuda e colaboradores em 1993, exibindo destacadas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias.



**Figura 1:** Estrutura da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-ona

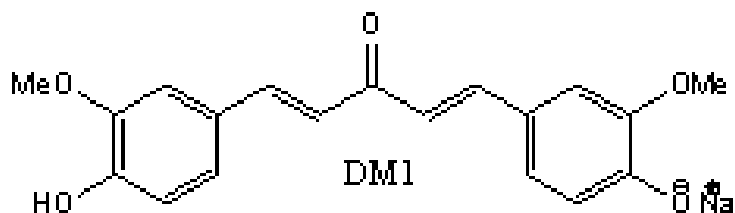
O composto **1** já tinha sido obtido por vários autores antes de ser isolado da *Curcuma domestica*. Glaser e Kramer foram os primeiros a obter esta molécula no ano 1927 a partir de vanilina e acetona em meio ácido, obtendo um 60% de rendimento. Posteriormente Ramanan e Rao sintetizaram no ano 1989 esta substância empregando a 4-O-metoximetilvanilina e acetona em meio alcalino, alcançando somente 42% de rendimento. Em 1997 Sardjiman e colaboradores obtiveram este produto com um 80% de rendimento bruto. O ponto de fusão foi de 58 °C inferior ao obtido por Glaser e Kramer, o que demonstra que a substância não foi sintetizada com um grau de pureza aceitável. Ártico e colaboradores sintetizaram este composto com um 18% de rendimento, sendo o ponto de fusão inferior ao reportado anteriormente, apesar de ter usado uma coluna cromatográfica para purificar o mesmo.

Posteriormente, Quincoces e colaboradores desenvolveram no ano 2002 um novo método de obtenção da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-ona e seus derivados, a partir de vanilina e acetona em meio ácido, empregando a técnica ultra-sônica, isolando e purificando o produto mediante

uma técnica barata e de fácil manipulação, o que permitiu a solicitação da correspondente patente de invenção, pois além disso, não estavam reportadas na literatura as propriedades antiproliferativas destas pentadienonas.

Nos estudos antiproliferativos *in vivo* realizados com a 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-ona e seus derivados na UNIBAN apresentaram-se dificuldades pela baixa solubilidade em água deste produto, o que motivou o emprego de solventes tóxicos, como o DMSO. Depois o DMSO foi substituído pelo Miglyol® 810, mas o emprego deste óleo dificulta a administração do mesmo por via endovenosa, pois causa embolias quando usado em doses altas.

A transformação destes fenóis em espécies hidrossolúveis também foi executada por J. Quincoces e colaboradores no ano 2006. Em meio básico foi possível obter os correspondentes fenolatos, que por ter ligações iônicas são solúveis em água, facilitando isto os estudos farmacológicos *in vivo* e os testes toxicológicos. Na figura 2 aparece a estrutura química deste novo princípio ativo antitumoral.



**Figura 2:** Estrutura química do composto 2, 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio

Os compostos **1** e **2**, estão em fase de estudo pré-clínico e apresentam propriedades antitumorais, antibacterianas, antioxidantes entre outras. Destacando-se propriedades antitumorais do composto **2**, devido a alta seletividade por células neoplásicas de mama e melanoma apresentando baixa

Toxicidade nas células sadias do organismo, aos leucócitos e as hemácias, sendo que outros antitumorais comerciais apresentam alta toxicidade pelas mesmas células.

O composto **2** quando associado com outros antitumorais comerciais apresentou sinergismo, sendo necessárias doses menores de outros antitumorais e conseqüentemente diminuição da toxicidade. Este composto apresentou propriedades antimetastáticas e antimutagênicas quando associado a quimioterápicos comerciais, diminuindo a toxicidade dos mesmos. Todos estes resultados deram origem a uma nova patente de invenção (QUINCOCES, 2009).

Uma importante indústria farmacêutica demonstrou interesse nas três patentes destes compostos e um dos requisitos exigidos pela indústria são os testes preliminares do estudo de estabilidade.

Para que estes compostos concluam os estudos pré-clínicos e sejam estudados em fase clínica é necessário conhecer o tempo de validade e a melhor condição de armazenamento, devido à isto, a importância do estudo preliminar de estabilidade desses compostos.

No processo de desenvolvimento de fármacos a química analítica tem um papel muito importante, pois todos os fármacos estão sujeitos a alguma forma de decomposição, sendo algumas famílias de compostos orgânicos, no entanto, mais vulneráveis que outras,

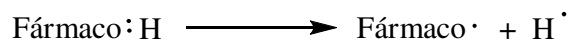
formando-se produtos indesejáveis, mesmo empregando condições de armazenamento normais.

Entre os principais fatores extrínsecos que provocam as decomposições figuram: luz, oxigênio, umidade e temperatura. No caso dos fenóis a oxidação é causa principal de instabilidade. A oxidação envolve a remoção de um átomo

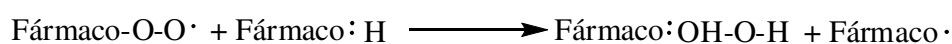
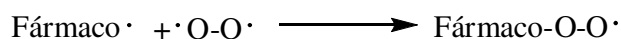
eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. De forma bem simplista, pode-se dizer que uma oxidação ocorre, geralmente, quando há adição de oxigênio e/ou remoção de hidrogênio.

A oxidação se dá em três etapas, conforme o esquema 1:

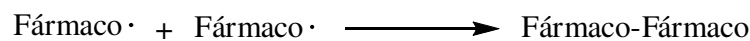
Iniciação



Propagação



Terminação



*Esquema 1: Oxidação de fenóis*

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, os problemas de estabilidade dos fármacos passaram a

ter maior dimensão. A determinação do prazo de validade tornou-se uma preocupação fundamental da tecnologia farmacêutica. Tanto pela necessidade de se conhecer tempo útil para comercialização, quanto por questões legais (GIL, 2007).

Os estudos de estabilidade são realizados de forma à expor substâncias em condições forçadas de armazenamento, desta forma favorecendo à degradação e detectando quais são os fatores e condições externas que mais afetam a estabilidade e pureza destes princípios ativos.

A cromatografia líquida de alta eficiência é um importante membro de uma família de técnicas de separação. O seu emprego em vários laboratórios é considerado atualmente indispensável. Nesta técnica tem-se a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem separar componentes muito semelhantes de misturas complexas. Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária em vários graus. Como consequência dessas diferenças na distribuição, os componentes da amostra se separam em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente (COLLINS, 1997).

A análise quantitativa por HPLC pode atingir uma precisão superior à  $\pm 0,5\%$ , as separações em escala preparativa em miligramas de amostras são relativamente fáceis. As múltiplas vantagens da CLAE fizeram desta técnica analítica uma das mais utilizadas atualmente (COLLINS, 1997).

Medidas de absorção baseadas em radiação ultravioleta e visível encontram vasta aplicação para identificação e determinação quantitativa de espécies inorgânicas e orgânicas. A espectroscopia de absorção molecular está baseada na medida da transmitância T ou absorbância A de soluções contidas em células transparentes tendo um caminho óptico em centímetro. De forma comum, a concentração de um absorvente está relacionada linearmente à absorbância.

Os métodos de absorção molecular talvez sejam os mais amplamente utilizados dentre todas as técnicas de análise quantitativa em laboratórios químicos e clínicos.

O método cromatográfico foi validado, o principal objetivo da validação é tornar os resultados internacionalmente aceitos e passíveis de reprodução em outros laboratórios (LANÇAS, 2004).

Validação: ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa a diminuir ou controlar fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado (LANÇAS, 2004).

A importância da validação em análises químicas tornou-se mais acentuada a partir da constatação da enorme variabilidade de resultados obtidos em análises de amostras submetidas a estudos interlaboratoriais na década de 70 (LANÇAS, 2004).

## 2 OBJETIVOS

Levando-se em conta todas as informações colocadas anteriormente os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

1. Realizar o estudo preliminar de estabilidade da 1,5-Bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-ona (composto **1**).
2. Realizar o estudo preliminar de estabilidade do 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio (composto **2**).
3. Caracterizar as estruturas dos possíveis produtos formados pela degradação mediante o emprego de HPLC/Massa.
4. Propor as condições de armazenamento destes princípios ativos para reservar sua pureza e suas propriedades biológicas, estabelecer um prévio tempo de validade para que estes compostos futuramente sejam clinicamente testados em humanos.



5. Determinar a atividade antiumoral das diferentes amostras após exposição as determinadas condições de armazenamento.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Análise quantitativa**

O objetivo principal da análise quantitativa é determinar quanto de cada espécie está presente na amostra analisada. Um procedimento quantitativo, geralmente irá envolver as seguintes etapas: amostragem, preparo da amostra, análise, integração e cálculos. Todas essas etapas podem introduzir erros nos resultados (RIBANI, 2004).

A amostragem tem por objetivo separar uma pequena quantidade de amostra que seja representativa de uma população, isto é, que contenha as características básicas aplicáveis a todas as outras

espécies daquela população. A escolha de uma amostra inadequada, ou que esteja contaminada, irá introduzir erros, os quais irão acumular-se ao longo da análise (RIBANI, 2004).

O preparo da amostra tem por objetivo deixá-la numa forma adequada para a análise cromatográfica. Para isto, dependendo da natureza da amostra, ela deverá sofrer uma série de processos físicos e químicos, como: trituração, liofilização, filtração, extração, diluição e concentração. Uma vez que esta etapa pode envolver diferentes manipulações com a amostra, é passível de contaminação com certa facilidade. Além disso, deve-se ter cuidado de forma a evitar-se perdas de amostra durante as transferências assim como

modificações na sua natureza química, devido a processos térmicos (RIBANI,2004).

É durante a análise cromatográfica que ocorre a separação dos componentes da amostra a ser analisada. Cada uma das partes do sistema cromatográfico pode introduzir erros no procedimento, daí a importância de selecionar condições cromatográficas ideais como colunas de dimensões ideais com fase estacionária apropriada para a separação desejada, temperatura ideal, vazão, entre outras (LANÇAS, 1993).

A integração de um pico cromatográfico visa relacionar a área do pico com a concentração da amostra. Dentre os métodos de integração existentes, o método de integração eletrônica é o mais

rápido e preciso e tem sido amplamente utilizado na quantificação de picos em cromatografia a líquido. A saída do detector do cromatógrafo é conectada a um conversor analógico digital (A/D), o qual envia uma sequência de pulsos. A integração é efetuada somando-se estes pulsos. Um circuito lógico determina o início, o máximo e o fim do pico, monitorando ainda a inclinação. Um microprocessador calcula e estoca o tempo de retenção e gera informações para o registrador e a impressora (LANÇAS, 2004).

A impressora produz um gráfico (cromatograma), o qual mostra as informações acerca das características cromatográficas dos picos (número, tempo de retenção, altura) além da área e porcentagem de cada pico presente.

Os integradores eletrônicos possuem boa sensibilidade, ampla faixa dinâmica de sinal (de microvolts até Volts), ótima precisão e exatidão, porém apresentam um elevado custo inicial, às vezes comparável ao preço de um cromatógrafo (LANÇAS, 1993).

Após obter-se as áreas dos picos por um dos métodos de integração, é necessário relacioná-las com a concentração, ou seja, o tamanho do pico é proporcional à massa analisada (LANÇAS, 1993; CIOLA, 2003).

O método de padrão externo consiste em comparar as áreas correspondentes às quantidades conhecidas dos analitos com a área para a mesma substância na amostra e cuja concentração se deseja determinar. Inicia-se o processo injetando no cromatógrafo quantidades exatas do analito e se obtém as áreas dos picos. A partir destes dados elabora-se uma curva analítica, na qual se representa graficamente a área do pico em função da concentração; a seguir, injeta-se a amostra de concentração desconhecida e obtém-se a área do analito. Com a área deste, obtém-se no gráfico a concentração do analito. Este método não assume que todos os componentes da amostra injetada sejam eluídos da coluna, porém requer o uso de padrões extremamente puros e o conhecimento exato dos volumes injetados (LANÇAS, 1993).

### **3.2 Validação de métodos analíticos**

O objetivo da validação de uma metodologia analítica é demonstrar que esta é favorável para a aplicação analítica pretendida. A documentação completa da validação de um método analítico é uma parte integral de qualquer documento submetido às agências governamentais e reguladoras (LANÇAS, 2004).

Para dar credibilidade aos dados nas análises quantitativas, deve-se estar atento a determinadas características do método empregado, uma vez que estas vão determinar a confiabilidade da metodologia proposta para a aplicação analítica de interesse (LANÇAS, 2004).

Dessa forma, toda vez que for desenvolvido um procedimento, o mesmo deve ser validado. Existem vários parâmetros para validação de métodos: linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação, sensibilidade, especificidade, robustez e estabilidade. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico e, algumas vezes como figuras analíticas de mérito. Muitos desses termos são familiares e usados diariamente em laboratório (LANÇAS, 2004).

### **3.3 Linearidade**

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado (LANÇAS, 2004).

A linearidade está normalmente relacionada com inclinação da linha de regressão, obtida da resposta do detector em função da concentração, através da equação linear (equação1):

$$y = \underline{a} x + \underline{b} \text{ equação (1)}$$

*Equação 1: Equação genérica da linearidade*

Onde, y é a resposta dada em termos de área do pico, ou altura do pico se ele for simétrico, x é a concentração, a é o coeficiente angular (inclinação) e b o coeficiente linear (intersecção). O coeficiente angular deve ser reprodutível e o coeficiente linear não deve ser significativamente diferente de zero. A regressão linear deve apresentar um coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 (ANVISA, 2003).

O número de padrões é definido em função da faixa de concentração de interesse, devendo ser de no mínimo, cinco. Cada nível de concentração na curva deve ser a média de três medidas (LANÇAS, 2004).

### **3.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)**

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito a qual pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, com um certo nível de confiança, utilizando um determinado método analítico. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (CHASIN, 1998; RIBANI, 2004):

O método visual é utilizado para determinar o LD utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Este procedimento também pode ser feito através do instrumento utilizando parâmetros de detecção no método de integração (RIBANI, 2004).

O método relação sinal-ruído pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a medição do sinal da amostra em baixa concentração conhecida. Assim é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser

de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (RIBANI, 2004).

Para o cálculo do LD baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção (LD) pode ser expresso como (equação 2):

$$LD = 3 \times \frac{S}{\text{Coef. Angular}}$$

*Equação 2: Equação de limite de detecção*

Onde S é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação. O denominador da equação 2 é o coeficiente angular ou inclinação (“slope”) da curva analítica (RIBANI, 2004).

Para calcular estes dados, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção (RIBANI, 2004).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2003).



Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a

relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (S) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica, em níveis próximos ao LQ, a partir da equação 3:

$$LQ = 10 \times \frac{S}{\text{Coef. Angular}} \quad (\text{equação 3})$$

**Equação 3:** Equação de limite de quantificação

### 3.5 Precisão

A precisão representa o grau de repetitividade entre os resultados de análises quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de análise. O termo empregado para avaliar a precisão é o coeficiente de variação (CV), ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD), em um número significativo de amostras (CHASIN, 1998), obtido através da equação (4):

$$RSD = \frac{100 \times S}{\bar{X}} \quad (\text{equação 4})$$

*Equação 4: Equação do coeficiente de variação*

Onde, S = estimativa do desvio padrão e  $\bar{X}$  = média das medidas em replicata.

A precisão expressa em termos de CV, deve ser menor que 15%, sendo que este valor pode atingir até 20%, dependendo da complexidade da matriz e da finalidade a que se propõe a análise (JENKE, 1998).

A precisão deve ser medida em três diferentes níveis:

- Precisão intralaboratorial ou Repetitividade: corresponde aos resultados obtidos para várias análises de amostras homogêneas, usando o mesmo método, o mesmo laboratório, o mesmo equipamento, feito pelo mesmo analista em um curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser realizada a partir de um mínimo de nove determinações (ex. três níveis, três repetições cada um) (JENKE, 1998).
- Precisão intermediária: expressa o efeito das variações dentro do laboratório em diferentes dias (JENKE, 1998).
- Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial): refere-se aos resultados obtidos em colaboração com outros laboratórios, envolvendo

diferentes analistas, diferentes dias e usando diferentes equipamentos(JENKE, 1998).

### **3.6 Estudo de estabilidade**

São os estudos destinados a aumentar a velocidade de degradação química e a modificação física de uma substância e/ou alterações características da forma farmacêutica, usando condições forçadas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento (BRASIL, 2001; UNITED STATES, 1994).

Já o estudo de estabilidade prolongada é empregado para confirmar os resultados obtidos nos estudos de estabilidade. A partir destes resultados, é possível estabelecer os prazos de validade e determinar as condições de armazenamento (GIL, 2007; ANVISA, 2004).

Para fins de prazo de validade provisório de 24 meses será aprovado o relatório de estabilidade acelerado ou de longa duração de 12 meses que apresentar variação menor ou igual a 5,0% do valor da análise da liberação do lote mantidas as demais especificações. Caso as variações de doseamento estejam entre 5,1% e 10% no estudo de estabilidade acelerado, o prazo de validade provisório será reduzido à metade, ou seja, 12 meses (ANVISA, 2004).

O controle da estabilidade pode ser feito através de estudos preliminares e prolongados. De acordo com a resolução GMC 53/96 do Mercosul, 1999; ICH, 2003 e ANVISA, 2004, o programa de estudo de estabilidade deve levar em

consideração o mercado para o qual está destinado o produto e as zonas climáticas em que será utilizado. O Brasil se enquadra na zona climática IV que é definida como quente e úmida. As condições de armazenamento são 30°C e 70 % de umidade relativa (UR) para estudos de estabilidade prolongados (12 meses) e para os estudos de estabilidade; as condições forçadas de armazenamento são  $40 \pm 2$  °C e  $75 \pm 5\%$  de UR (ANVISA, 2004; SINDUSFARMA, 2000). Todos esses ensaios deveram ser feitos com produtos do mesmo lote ou lotes diversos da substância em estudo. Esses ensaios podem dar informações sobre a vida média e possíveis alterações no medicamento, permitindo a seleção de melhores formulações. As amostras de um estudo acelerado devem ser analisadas em tempo 0, 1, 2, 3 e 6 meses (ANVISA, 2004).

Todos os fármacos estão sujeitos a alguma forma de decomposição química, ou física. Algumas classes químicas, no entanto, são mais vulneráveis e tendem a se decompor mesmo em condições adequadas (GIL, 2007).

As condições externas envolvidas na deterioração de fármacos e medicamentos são tidas como fatores extrínsecos ou ambientais. Entre os principais fatores extrínsecos temos a luz, o ar e a umidade. Estes fatores podem afetar a estabilidade física de medicamentos e acelerar processos de decomposições químicas do fármaco (GIL, 2007).

A estabilidade é definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de

sua fabricação Pode também ser definida como o período compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado até aquele em que sua potência está sendo reduzida de não mais que 10%, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos os seus efeitos (VADAS, 2000).

Vários fatores afetam a estabilidade de um produto farmacêutico, incluindo a estabilidade de matéria-prima ativa, o potencial de interação entre matéria-prima ativa e inativa, o processo de fabricação, a forma farmacêutica, a embalagem e condições ambientais encontradas durante o transporte, a estocagem o manuseio e a duração do tempo entre a produção e distribuição do medicamento (VADAS, 2000).

As alterações podem ser rápidas ou lentas, podendo refletir ou não nas características organolépticas. Estas alterações podem levar à perda parcial ou total da atividade ou à formação de produtos cuja toxicidade é elevada. A partir dos dados obtidos com relação às modificações como, alteração de cor, solubilidade, pH, viscosidade, teor do fármaco e presença de produtos de degradação, é possível com boa margem de segurança, estabelecer um prazo mínimo de validade, no qual a formulação será estável (GIL, 2007).

A temperatura pode acelerar a maioria dos processos que produzem degradação de fármacos e das preparações farmacêuticas e esta é a base de grande parte dos métodos de envelhecimento artificial (DAGAR, 1990; VADAS, 2000).

### **3.7 Cinética**

A cinética química é o estudo das velocidades e mecanismos das reações químicas. A velocidade de uma reação é a medida da rapidez com que se formam os produtos e se consomem os reagentes (RUSSEL,1994).

As reações de degradação do princípio ativo em formulações farmacêuticas ocorrem com velocidades definidas e são de natureza química. Os principais fatores que influenciam a velocidade de degradação são concentração dos reagentes, temperatura, pH, radiações, catálise e oxidação (GIL, 2007).

### **3.7.1 Ordem da reação**

A ordem da reação é uma grandeza experimental que é determinada a partir da lei de velocidade da reação química. As leis de velocidade são obtidas experimentalmente, de modo geral, medindo-se as concentrações de amostras retiradas no decorrer da reação química (LANCHMAN, 2001).

Para a maioria dos casos, a degradação das substâncias ocorre de acordo com reações de ordem zero, primeira ordem ou pseudo-primeira ordem, mesmo que muitas das substâncias se degradem por mecanismos complexos (LANCHMAN, 2001).

Os valores experimentais obtidos das concentrações em função do tempo gasto para os atingir são representados. Quando se obtém uma reta ao relacionar as concentrações em função e tempos, a reação é de ordem zero, se para obter uma reta é necessário relacionar o logaritmo da concentração remanescente e o tempo, a reação é de primeira ordem; finalmente quando se relaciona o inverso das

concentrações e o tempo, obtendo uma reação linear, a reação é de segunda ordem (LANCHMAN, 2001).

### **3.8 Métodos químicos utilizados em estudo de estabilidade**

Os ensaios químicos devem estabelecer se as substâncias contidas nas amostras, conservadas em condições adequadas, permanecem inalteradas ou se parcial ou totalmente inalteradas. Para isso, é necessário identificar a substância e verificar se não há formação de produtos que inicialmente não existiam. Em seguida é necessária a determinação quantitativa das substâncias em ensaio e, se possível, seus produtos de degradação. Uma técnica utilizada para identificação dos possíveis produtos de degradação é a cromatografia em camada delgada. Os métodos de análises quantitativas devem ser, por sua vez, muito específicos de maneira a poderem distinguir entre o fármaco inalterado e o produto de degradação. Um método que não garante esta diferenciação não serve para verificar se um medicamento é estável. Métodos de análise específicos podem ser conseguidos empregando-se técnicas como cromatografia em papel ou coluna, cromatografia preparativa em camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear (GIL, 2007).

É sempre recomendável antes de tirar conclusões sobre a estabilidade fornecida pelos dados experimentais de laboratório, determinar a precisão dos métodos através da estatística. Diversos fatores podem alterar a estabilidade de um produto farmacêutico. Cada componente quer terapeuticamente ativo ou inativo, dependendo da dosagem, pode afetar a estabilidade. Outros fatores, chamados extrínsecos como a temperatura, radiação, luz, ar (especificamente oxigênio, dióxido de carbono e vapores de água), umidade e local de

condicionamento, também alteram a estabilidade. Há também os fatores intrínsecos como; incompatibilidades, pH, hidrólise, racemização e oxidação (GIL, 2007).

O estudo de fotoestabilidade deve ser realizado com uma fonte de luz que é projetado para produzir uma saída similar à D65/ID65 norma de emissão, como uma lâmpada fluorescente luz do dia artificial combinado visível e ultravioleta (UV). D65 é o padrão internacional reconhecido para luz do dia como definido na ISO 10977 (1993). ID65 é o equivalente ao padrão de luz indireta de interiores. (ANVISA, 2003; ICH, 1996).

Para realização do estudo as amostras devem ser expostas à luz fornecendo um conjunto de iluminação de pelo menos 200 watts hora/metro quadrado (ANVISA, 2003; ICH, 1996).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais, soluções e reagentes**

- Espectrofotômetro UV mini 1240 Shimadzu;
- Balança analítica Mettler-Toledo, capacidade 210g, precisão  $\pm 0,0001g$ ;
- Banho de ultra-som Thorton, modelo T-14
- Coluna Cromatográfica Nucleosil C18 - 5  $\mu m$  150 mm x 4.6 mm
- Cromatógrafo Líquido modelo LC – 10AD – VP – Shimadzu
- Detector de ultravioleta visível – SPD – 10 A - VP
- Integrador Shimadzu – C-R8A
- Estufa FABBE regulada a 40°C
- Medidor de pH 21 Digimed TE 901
- Sistema de filtração a vácuo



- Sistema Milipore® de purificação de água MilliQ\_Plus®
- Água purificada obtida pelo sistema MilliQ Plus, Milipore®;
- Acetonitrila grau cromatográfico Merck®;
- Ácido acético glacial 100% p.a. Merck®;
- Membrana de filtro Durapore® PVDF 0,45 µm de tamanho poro, diâmetro 13mm não estéril, Millipore®;
- Unidade filtrante HV Millex em polietileno com membrana Durapore® 0,45 µm de tamanho poro, diâmetro de 13 mm não estéril, Millipore®;
- Vidrarias diversas.

## **4.2 Amostras**

As amostras do composto **1**, 1,5-Bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-ona) e composto **2**, 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxopenta-1,4-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio fornecidos e sintetizados pelo Dr. Prof. José Agustín Quincoces Suárez, do laboratório de Síntese Orgânica da UNIBAN, com um grau de pureza superior a 99% (comprovada a pureza mediante HPLC).

## **4.3 Metodologia**

#### **4.3.1 Preparação das amostras dos compostos 1 e 2 para análise espectrofotométrica e cromatográfica.**

Foram pesados cerca de 0,010 g das amostras e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, o volume foi completado com uma solução de acetonitrila 65 %, água purificada 34 % e ácido acético 1% (fase móvel). Obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL (solução mãe). Foi transferida um alíquota de 5 mL da solução obtida para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi completado com solução da fase móvel, obtendo-se uma concentração de 5 µg/mL de ambos os compostos (solução trabalho).

#### **4.3.2 Espectrofotometria no ultravioleta/visível.**

As análises por espectrofotometria no UV/VIS foram realizadas obedecendo as seguintes condições; limite de absorvância de 0,08 a 0,9, cubeta de quartzo de 1 cm e solução móvel como solvente (65 % de acetonitrila, 34 % de água purificada e 1 % de ácido acético glacial). Comprimento de onda de trabalho de 383 nm.

#### **4.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.**

A metodologia foi validada pela Dra. Profa. Claudete Justina Valduga do laboratório de Síntese Orgânica da UNIBAN e empregada com modificações para ambos os compostos. Os seguintes parâmetros cromatográficos foram utilizados:

1. Coluna cromatográfica: Nucleosil® C18 – 5 µm 150 mm x 4,6 mm;
2. Vazão: 0,6 mL/min;
3. Temperatura: considerou-se a temperatura do local de trabalho 24°C ± 1°C;

4. Volume de injeção: 20 µL;
5. Detecção: 383 nm para ambos os compostos;
6. Fase móvel: acetonitrila 65 %, água purificada 34 % e ácido acético glacial 1%.

#### **4.3.4 Construção das curvas de calibração para os compostos 1 e 2 – análise espectrofotométrica e HPLC.**

As curvas de calibração foi construída a partir da solução mãe numa concentração de 100 µg/mL, utilizando-se cinco concentrações diferentes: composto 1 (1,1; 5,5; 8,25 e 11,0 µg/mL) e composto 2 (1,0 2,0; 5,0; 7,5 e 10 µg/mL), sendo analisadas em triplicata para ambos os métodos e compostos.

Foram calculados os desvios padrão e o coeficiente de correlação, parâmetros estes, importantes para a validação do método (JENKE, 1996). Para cada concentração foram calculadas as médias das leituras, os desvios padrões e os coeficientes de variações.

Construiu-se uma curva de calibração por espectrofotometria UV/VIS utilizando-se cinco concentrações de maneira que correspondessem entre 0,08 a 0,9 de absorbância, no comprimento de onda de 383 nm. A curva foi construída, relacionando-se a absorbância média das três leituras contra a concentração em cada nível.

Construiu-se uma curva de calibração por HPLC relacionando-se área média das três injeções contra a concentração em cada nível.

#### **4.3.5 Teste de precisão através da repetibilidade para os compostos 1 e 2 – análise espectrofotométrica e HPLC.**

Foram transferidas alíquotas de 5 mL da solução mãe contendo 100 µg/mL, para dez balões volumétricos de 100 mL. Os volumes dos balões foram completados com solução de fase móvel, obtendo-se soluções com concentração de 5 µg/mL. Procedeu-se análise em triplicata das dez soluções em dias diferentes.

Os resultados foram analisados estatisticamente, empregando-se o excel.

#### **4.3.6 Determinação do limite de detecção.**

O limite de detecção (LD) é a concentração mais baixa da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade (BRESSOLE, 1996; JENKE, 1996; UNITED, 2000; ICH, 2003). Pode também ser definido como a concentração que alcança um coeficiente de variação (CV) de 20% para a precisão do sistema (JENKE, 1998).

O limite de detecção pode ser determinado por vários métodos como já comentado. O método utilizado para os compostos **1** e **2** foi a relação sinal-ruído, onde foi detectada a menor concentração que proporcionou um pico três vezes maior que o ruído.

#### **4.3.7 Determinação do limite de quantificação.**

Limite de quantificação (LQ) é a concentração mais baixa da substância em exame presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitável (JENKE, 1996; UNITED, 2000).

No cálculo do limite de quantificação dos compostos **1** e **2** também foi utilizado o método de relação sinal ruído, onde foi detectada a menor concentração que proporcionou um pico dez vezes maior que o ruído.

#### 4.3.8 Condições de armazenamento e análises das amostras dos compostos 1 e composto 2.

Foram retiradas alíquotas de 1g de ambos os compostos e armazenados nas condições determinadas na tabela 1.

**Tabela 1:** Condições de armazenamento das amostras

Condições de armazenamento das amostras	Temp. ambiente (15-25°C)	Temp. -20°C	Temp. 40°C e 75% UR	Temp. 6°C	Exposição à luz	pH 3,5	pH 7
<b>Composto 1</b>	*	*	*	*	*	-	-
<b>Composto 2</b>	*	*	*	*	*	*	*

\* Composto armazenado em determinada condição

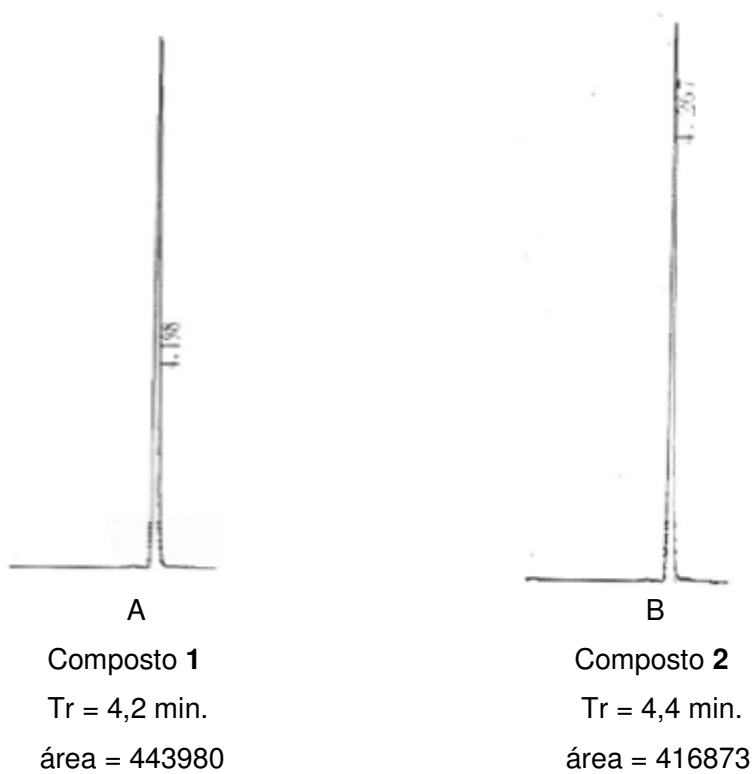
As amostras armazenadas em temperaturas: -20°C, 40°C, 6°C, pH 3,5 e pH 7,0 foram condicionadas em frascos âmbar e sem presença de oxigênio, sendo utilizado nitrogênio. As temperaturas foram controladas por termoímetro.

O composto **2** foi dissolvido em água ultrapura e ajustado em pH 3,5 com ácido acético, pois trata-se do pH da fase móvel, também dissolvido em água ultrapura com pH 7,0 por ser o mesmo pH do sangue. O composto **1** não apresenta solubilidade em água.

Foi realizado um estudo de acompanhamento de fotoestabilidade, as amostras foram expostas à luz UV de emissão D65 de 18 watts por 12 horas, conforme ANVISA, 2004.

As amostras foram coletadas e analisadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 180 dias, após armazenamento, tempos requisitados pela ANVISA 2004, para estudos de estabilidade. Os parâmetros analisados foram os teores químicos através do método espectrofotométrico UV/VIS e HPLC para quantificar a pureza das amostras.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO



**Figura 3** - Cromatogramas obtidos por HPLC: A – Composto 1 puro; B – Composto 2 puro. Condições cromatográficas: Coluna Nucleosil® C18 – 5  $\mu$ m - 150 mm x 4,6 mm. Fase móvel: Acetonitrila/Água/Ácido Acético glacial

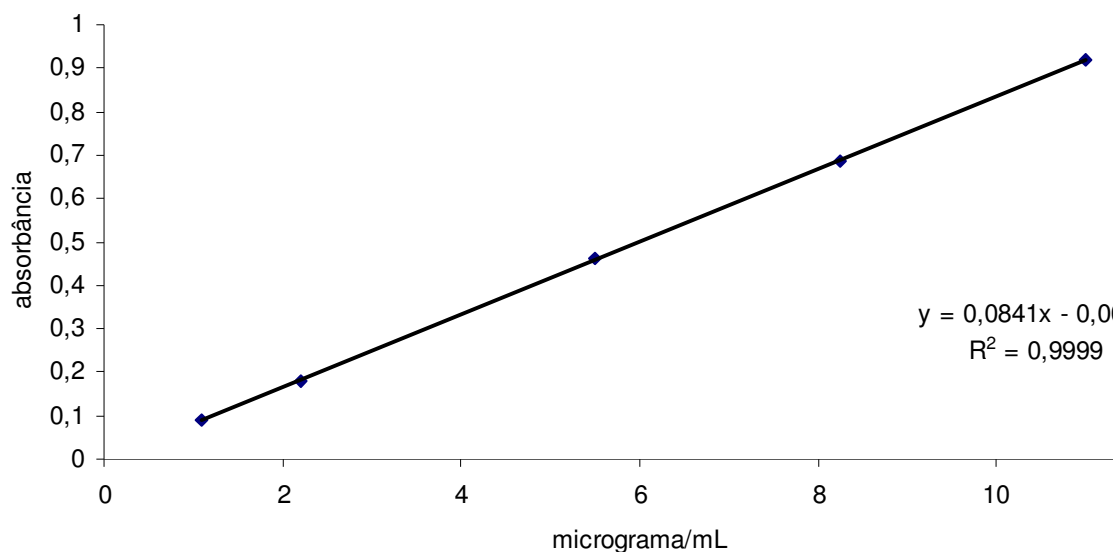
(65:34:10). Vazão 0,6 mL/min. Detector UV/VIS ajustado a 383 nm. Volume de injeção: 20 µL. Temperatura: 24°C ± 1°C. Concentração dos compostos: 5µg/mL.

### **5.1 Determinação do espectro de absorção.**

O comprimento de onda escolhido para os compostos foi aquele onde há a máxima absorção, sendo de 383 nm. Utilizando-se como solvente a fase móvel (65% de acetonitrila, 34% de água ultrapura e 1% de ácido acético). A escolha desse solvente foi em função da solubilidade dos compostos e não interação com os mesmos.

### **5.2 Curvas de calibração**



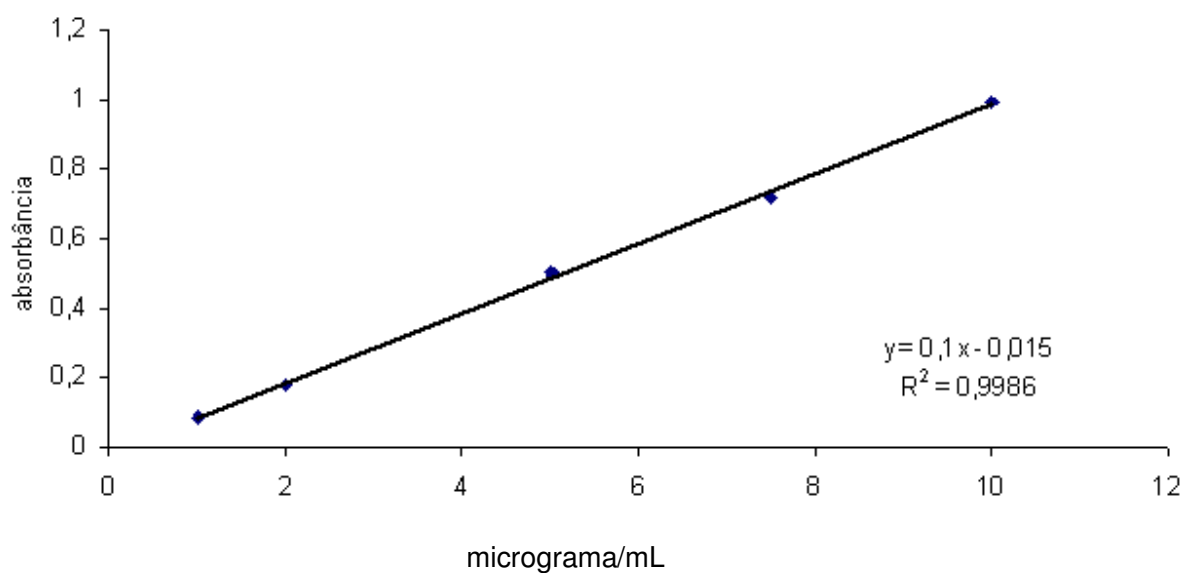


**Figura 4** – Curva de calibração do composto 1, obtidas pelo método espectrométrico UV/VIS.

**Tabela 2** – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração do composto 1, analisado pelo método de espectrofotometria UV/VIS.

<b>Concentração µg/mL</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
1,1	0,0886	0,0001	0,003
2,2	0,1784	0,0004	0,013
5,5	0,4628	0,0001	0,003
8,25	0,6856	0,0003	0,010
11,0	0,9215	0,0001	0,003

n = 3



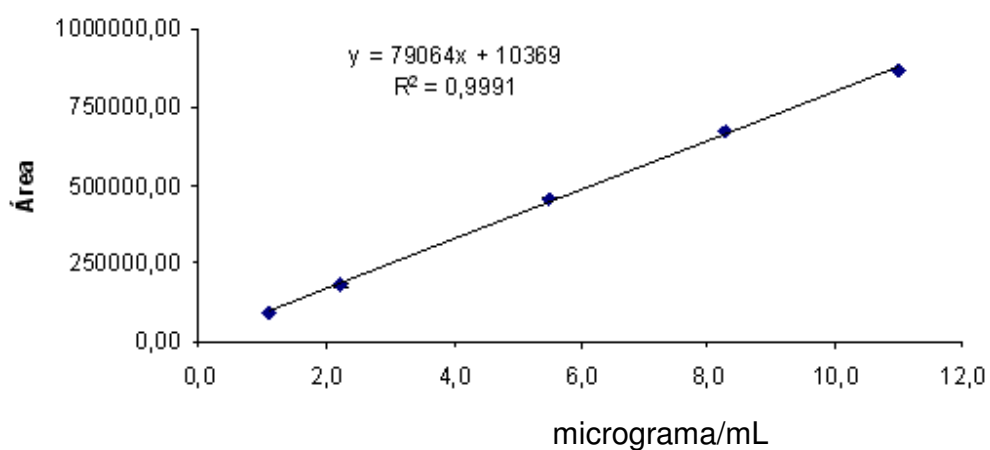
**Figura 5:** Curva de calibração do composto 2, analisado pelo método de espectrométrico UV/VIS.

**Tabela 3** – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração do composto 2, analisado pelo método de espectrofotometria UV/VIS.

<b>Concentração µg/mL</b>	<b>Absorbância</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
1,0	0,0861	0,002	0,06
2,0	0,1804	0,002	0,06
5,0	0,5008	0,002	0,06
7,50	0,7140	0,001	0,03

10,0	0,9936	0,001	0,03
------	--------	-------	------

n = 3



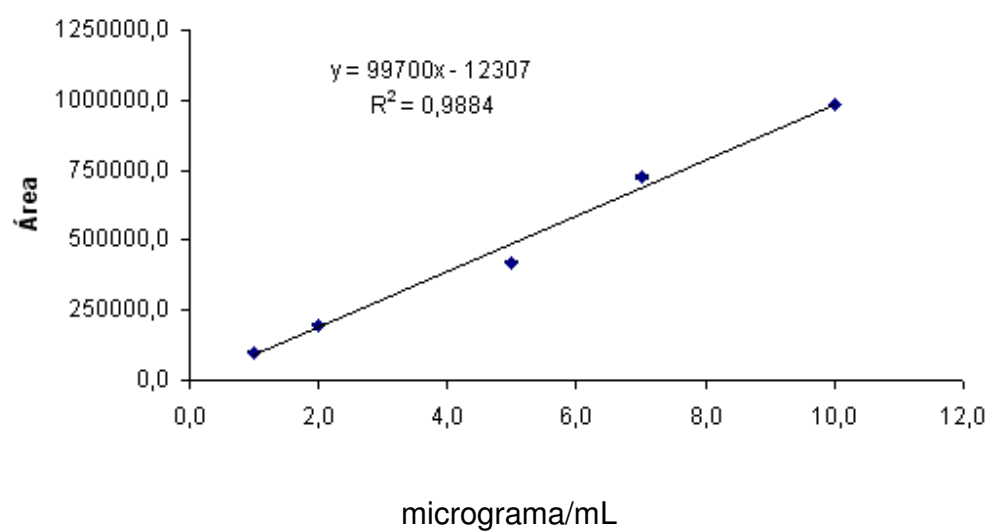
**Figura 6** – Curva de calibração do composto 1, analisado pelo método de HPLC.

**Tabela 4** – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração do composto 1, analisado pelo método de HPLC.

<b>Concentração</b> <i>μg/mL</i>	<b>Área média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
-------------------------------------	-------------------	----------------------	---

1,1	93271	11,01	0,37
2,2	178756	485	16,2
5,5	457326	110	3,7
8,25	670840	188	6,3
11,0	869385	506	16,9

n=3



**Figura 7:** Curva de calibração do composto 2, analisado pelo método de HPLC.

**Tabela 5** – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração do composto 2, analisado pelo método de HPLC.

<b>Concentração <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Área média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
1,0	99981	208	6,9
2,0	197923	497	16,6
5,0	420866	348	11,6
7,50	727824	600	19,0
10,0	984366	604	20,0

n = 3

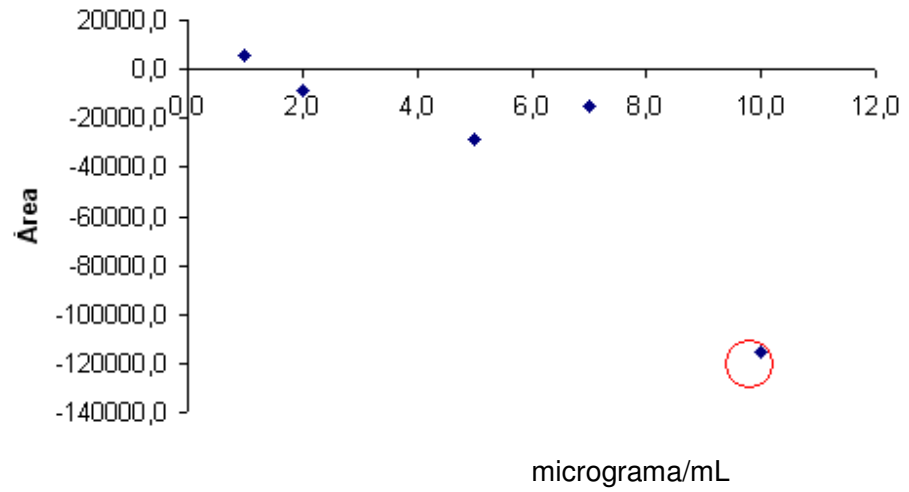
A faixa linear de detecção que obedece a Lei de Beer é dependente do composto analisado e do tipo de detector utilizado (FDA, 1994).

A linearidade foi determinada pelos coeficientes de correlação (r), obtidos pelas curvas padrões, na qual foi verificada a proporcionalidade entre as diferentes concentrações do padrão entre absorvâncias e áreas.

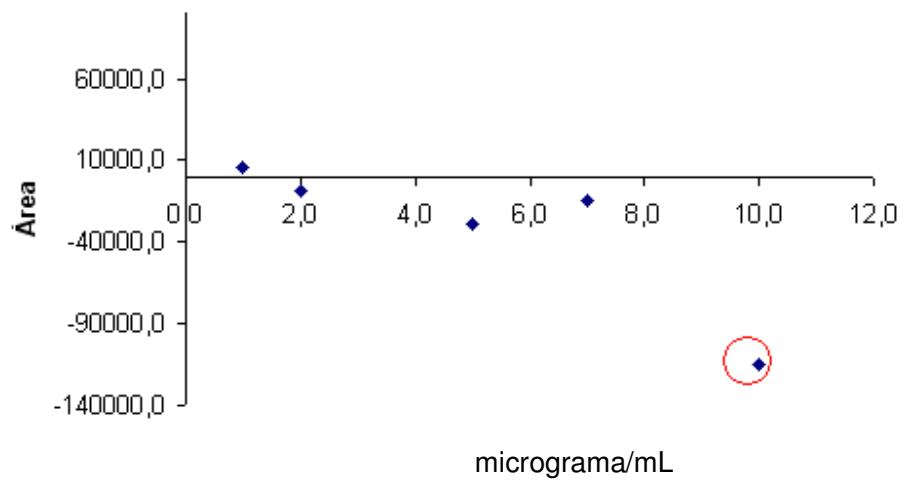
O coeficiente de correlação obtido na padronização do método, demonstra que as soluções dos compostos apresentam boa correlação linear entre absorvância, áreas e concentrações, indicando que os coeficientes de linearidade são adequados devendo estar na faixa de 0,99 a 1,0 segundo a AOAC DRAFT, 2002.

Os valores de coeficiente de variação não ultrapassaram 20%.

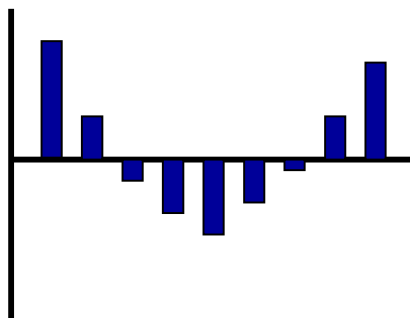
### 5.3 Gráficos das residuais



**Figura 8:** Gráfico das residuais do composto 1



**Figura 9:** Gráfico das residuais do composto 2



**Figura 10:** Relação não linear entre a concentração e o sinal

Nas concentrações assinaladas nos gráficos de ambos os compostos, a relação não é linear entre a concentração e o sinal.

#### 5.4 Precisão / Repetibilidade

**Tabela 6** – Resultados obtidos na precisão/repetibilidade do composto 1 concentração 5µg/mL, analisado pelo método espectrofotométrico UV/VIS a 383 nm.

<b>Absorbância</b>	<b>Média das absorbâncias</b>	<b>CV%</b>	<b>DP</b>
0,4401	-	-	-
0,4402	0,4402	0,02	0,00
0,4403	-	-	-
0,4420	-	-	-
0,4427	0,4424	0,09	0,00
0,4427	-	-	-
0,4413	-	-	-
0,4413	0,4413	0,01	0,00
0,4412	-	-	-
0,4410	-	-	-
0,4412	0,4411	0,03	0,00

0,4412	-	-	-
0,4515	-	-	-
0,4515	0,4515	0,00	0,00
0,4515	-	-	-
0,4430	-	-	-
0,4428	0,4428	0,03	0,00
0,4428	-	-	-
0,4410	-	-	-
0,4408	0,4408	0,03	0,00
0,4407	-	-	-
0,4530	-	-	-
0,4529	0,4529	0,01	0,00
0,4529	-	-	-
0,4408	-	-	-
0,4409	0,4408	0,01	0,00
0,4408	-	-	-
0,4418	-	-	-
0,4419	0,4419	0,02	0,00
0,4420	-	-	-

n=3

**Tabela 7** – Resultados obtidos na precisão / repetibilidade do composto 1 concentração 5µg/mL, analisado pelo método de HPLC.

<b>Áreas</b>	<b>Média das áreas</b>	<b>CV%</b>	<b>DP</b>
443980	-	-	-
442871	443651	0,15	678
444102	-	-	-
441849	-	-	-
468667	458612	3,19	14613



465321	-	-	-
452552	-	-	-
442483	445907	1,29	5755
442686	-	-	-
430857	-	-	-
431573	433613	0,96	4169
438410	-	-	-
442227	-	-	-
443584	442289	0,29	1265
441056	-	-	-
442684	-	-	-
445319	443607	0,33	1483
442820	-	-	-
443788	-	-	-
448963	445777	0,63	2787
444582	-	-	-
453366	-	-	-
459316	458060	0,92	4209
461498	-	-	-
443271	-	-	-
440522	442072	0,32	1407
442423	-	-	-
448324	-	-	-
446629	447196	0,22	976
446636	-	-	-

n=3

**Tabela 8** – Resultados obtidos na precisão/repetibilidade do composto 2 concentração 5µg/mL, analisado pelo método espectrofotométrico UV/VIS a 383 nm.

<b>Absorbância</b>	<b>Média das absorbâncias</b>	<b>CV%</b>	<b>DP</b>
0,4170	-	-	-
0,4170	0,4170	0,01	0,00
0,4171	-	-	-
0,4130	-	-	-
0,4129	0,4129	0,01	0,00
0,4129	-	-	-
0,4130	-	-	-
0,4130	0,4130	0,00	0,00
0,4130	-	-	-
0,4132	-	-	-
0,4133	0,4133	0,01	0,00
0,4133	-	-	-
0,4126	-	-	-
0,4126	0,4126	0,00	0,00
0,4127	-	-	-
0,4118	-	-	-
0,4120	0,4120	0,05	0,00
0,4122	-	-	-
0,4118	-	-	-
0,4118	0,4118	0,00	0,00
0,4118	-	-	-
0,4112	-	-	-
0,4112	0,4112	0,01	0,00
0,4113	-	-	-
0,4127	-	-	-

0,4126	0,4126	0,01	0,00
0,4126	-	-	-
0,4130	-	-	-
0,4132	0,4131	0,03	0,00
0,4132	-	-	-

n=3

**Tabela 9** – Resultados obtidos na precisão/repetibilidade do composto **2** concentração 5µg/mL analisado pelo método de HPLC.

<b>Áreas</b>	<b>Média das áreas</b>	<b>CV%</b>	<b>DP</b>
418198	-	-	-
421697	420136	0,42	1779
420513	-	-	-
416873	-	-	-
408203	415826	1,72	7157
42402	-	-	-
408706	-	-	-
398001	400881	1,71	6854
395937	-	-	-
414148	-	-	-
411710	413970	0,53	2176
416052	-	-	-
413168	-	-	-
411466	412404	0,21	864
412580	-	-	-
411602	-	-	-
411294	412256	0,34	1408
413873	-	-	-
409684	-	-	-

400529	404633	1,15	4650
403686	-	-	-
407278	-	-	-
399368	398375	1,68	6735
393879	-	-	-
417061	-	-	-
406774	410335	1,42	5828
407170	-	-	-
408590	-	-	-
407574	405790	0,99	4001
401208	-	-	-

n=3

Todos os valores de coeficiente de correlação em relação a repetibilidade não estão acima de 2%, estando dentro da faixa ideal.

### 5.5 Limite de detecção e quantificação.

**Tabela 10** - Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico validado para os compostos **1** e **2**.

<b>Parâmetro</b>	<b>Composto 1</b>	<b>Composto 2</b>
Limite de detecção (µg/mL)	0,25	0,30
Limite de quantificação(µg/mL)	1,1	1,0

## 5.6 Características organolépticas.

As amostras do composto **1** mantiveram sua cor amarelada inicial em todas as condições de armazenamento em que foram submetidas as amostras.

As amostras do composto **2** mantiveram sua cor avermelhada inicial em todas as condições de armazenamento em que foram submetidas as amostras, com exceção quando dissolvido em pH 3,5 e 7,0, onde a cor apresentou-se amarelada.

As características organolépticas, apesar de desprovidas de avaliação analítica e apresentar um caráter bastante subjetivo, servem principalmente como subsídio para avaliação primária da estabilidade de fármacos.

## 5.7 Determinação do teor dos compostos 1 e 2 em diferentes condições de armazenamento.

**Tabela 11** – Teores das amostras do composto **1**, analisadas por espectrofotometria UV/VIS, após condições de armazenamento.

<b>Tempo (dias )</b>	<b>Temp. Amb. (15 a 25 °C)</b>	<b>CV %</b>	<b>Temp. 6°C</b>	<b>CV%</b>	<b>Temp. - 20°C</b>	<b>CV%</b>	<b>Temp. 40°C</b>	<b>CV %</b>
0	100%	-	100%	-	100%	-	100%	-
30	100%	0,61	100%	3,7	100%	0,01	94%	0,16
60	100%	0,48	100%	17,3	100%	0,00	94%	0,00
90	98%	2,47	98%	0,0	100%	0,55	93%	0,20
180	98%	0,43	98%	0,50	100%	0,00	92%	0,17

n = 3

**Tabela 12** – Teores das amostras do composto **2**, analisadas por espectrofotometria UV/VIS, após condições de armazenamento.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Temp. Amb. (15 a 25 °C)</b>	<b>CV %</b>	<b>Temp. 6°C</b>	<b>CV%</b>	<b>Temp. - 20°C</b>	<b>CV%</b>	<b>Temp. 40°C</b>	<b>CV%</b>
0	100%	-	100%	-	100%	-	100%	-
30	87%	0,00	100%	0,01	100%	0,00	97%	0,01
60	84%	0,02	100%	0,01	89%	0,13	94%	0,01
90	81%	0,02	98%	0,01	86%	0,00	94%	0,00
180	76%	0,02	92%	0,01	86%	0,10	69%	0,02

n = 3

**Tabela 13** – Teores do composto **1**, analisadas por HPLC, após condições de armazenamento.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Temp. Amb. (15 a 25 °C)</b>	<b>CV %</b>	<b>Temp. 6°C</b>	<b>CV %</b>	<b>Temp. - 20°C</b>	<b>CV %</b>	<b>Temp. 40°C</b>	<b>CV %</b>
0	100%	-	100%	-	100%	-	100%	-
30	100%	12,60	100%	2,80	100%	9,10	93%	2,17
60	100%	10,69	100%	57,34	100%	44,78	92%	10,10
90	98%	24,30	99%	37,14	100%	16,89	92%	13,69
180	98%	7,11	98%	12,19	100%	34,73	92%	8,79

n = 3

**Tabela 14** – Teores do composto **2**, analisadas por HPLC, após condições de armazenamento.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Temp. Amb. (15 a 25 °C)</b>	<b>CV %</b>	<b>Temp. 6°C</b>	<b>CV %</b>	<b>Temp. - 20°C</b>	<b>CV %</b>	<b>Temp. 40°C</b>	<b>CV %</b>
---------------------	--------------------------------	-------------	------------------	-------------	---------------------	-------------	-------------------	-------------

	°C)							
0	100%	-	100%	-	100%	-	100%	-
30	88%	1,17	99%	0,65	100%	11,41	95%	1,15
60	80%	1,14	99%	0,69	90%	7,49	91%	0,64
90	78%	0,80	96%	0,99	83%	2,37	92%	0,95
180	74%	1,44	91%	1,30	83%	2,96	67%	1,37

n = 3

**Tabela 15** – Teor dos compostos **1** e **2**, após exposição à luz, analisadas pelo método de espectrometria no UV/VIS.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Composto 1</b>	<b>CV %</b>	<b>Composto 2</b>	<b>CV %</b>
0	100 %	-	100%	-
12	84%	0,08	63%	0,04

n=3

**Tabela 16** – Teores dos compostos **1** e **2** após exposição à luz, analisados por HPLC.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Composto 1</b>	<b>CV %</b>	<b>Composto 2</b>	<b>CV %</b>
0	100%	-	100%	-
12	86%	17,8	64%	11,6

n=3

## 5.8 Análise do pH.

**Tabela 17** – Valores de pH do composto **2**, após determinados tempos de armazenamento em temperatura de 6°C, analisados por peagâmetro.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Condições de armazenamento</b>	<b>pH 3,5</b>	<b>CV %</b>	<b>pH 7,0</b>	<b>CV %</b>
0	6°C	3,5	-	7,0	-
30	6°C	3,5	0,0	7,0	0,0
60	6°C	3,5	0,0	7,1	0,0
90	6°C	3,4	0,0	7,2	0,0
180	6°C	3,4	0,0	7,2	0,0

n=3

O comportamento do pH das amostras do composto **2** dissolvido, não apresentou alteração considerável, mantendo-se em média no valor de 3,5 e 7,0.

**Tabela 18** – Teores das amostras do composto **2** dissolvidas em soluções de pH 3,5 e 7,0 analisadas por espectrofotometria UV/VIS.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>pH 3,5</b>	<b>CV %</b>	<b>pH 7,0</b>	<b>CV %</b>
0	100%	-	100%	-
30	88%	0,12	88%	0,12
60	88%	0,00	87%	0,11
90	82%	0,15	70%	0,05
180	54%	0,03	45%	0,00

n = 3

**Tabela 19** – Teores das amostras de **2** dissolvidas em soluções de pH 3,5 e 7,0 analisadas por HPLC.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>pH 3,5</b>	<b>CV %</b>	<b>pH 7,0</b>	<b>CV %</b>
0	100%	-	100%	-
30	87%	1,9	88%	9,0



60	87%	7,5	87%	1,9
90	87%	9,5	66%	3,2
180	54%	1,7	42%	1,7

n = 3

Conforme os resultados obtidos das análises das amostras em determinadas condições de armazenamento, o composto **1** apresentou os seguintes teores de degradação após 180 dias:

- 0% em temperatura de -20°C
- 2% em temperatura ambiente (15 à 25°C)
- 2% em temperatura de 6°C
- 8% em temperatura de 40°C
- 14% em presença de luz

O composto **1** apresentou maior degradação em exposição à luz e menor degradação em temperatura de -20°C. Quando armazenado em temperatura de 6°C sem exposição de luz apresentou pequena degradação de 2%.

O composto **2** apresentou as seguintes porcentagens de degradação nas determinadas condições de armazenamento após 180 dias:

- 9% em temperatura de 6°C
- 17% em temperatura de -20°C
- 26% em temperatura ambiente (15 à 25°C)
- 33% em temperatura de 40°C
- 36% em presença de luz
- 46% quando dissolvido em pH 3,5
- 57% quando dissolvido em pH 7,0

O maior fator de degradação do composto **2** foi dissolução em pH 7,0 e apresentando menor degradação em temperatura de 6°C.

O composto **2** apresentou maior estabilidade em temperatura de 6°C do que em temperatura de -20°C, sendo ao contrário do composto **1** que apresentou maior estabilidade em temperatura de -20°C.

Em relação aos valores de pH, o composto **2** apresentou maior estabilidade em pH ácido, com maior teor de degradação em pH básico.

Poucos valores de coeficiente de variação ultrapassaram 20%, sendo estes valores de resultados das análises por HPLC, essas análises foram realizadas manualmente o que justifica pequena alteração de alguns valores de coeficiente de variação.

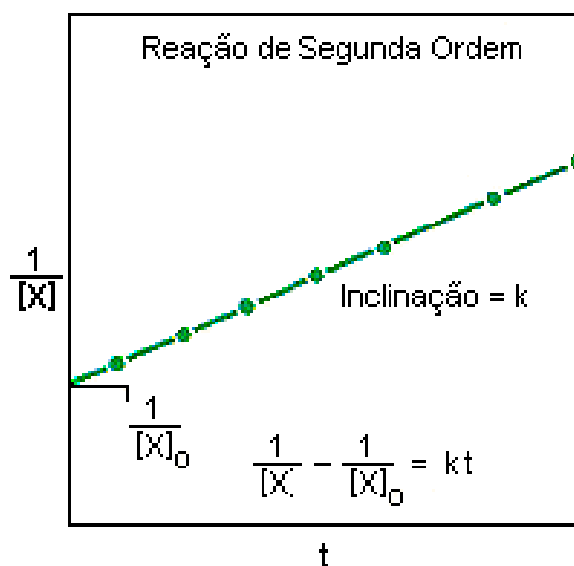
### **5.9 Cinética e resultados de análises por HPLC/Massas das amostras degradadas.**

Foi analisada a ordem da reação dos compostos através dos gráficos da cinética e análises de algumas amostras degradadas pelo método de HPLC/Massas. Devido ao alto custo desse método não foi possível a realização da análise de todas as amostras, sendo realizada dos compostos **1** à 40°C, composto **2** em temperatura ambiente, à 6°C, -20°C e 40°C.

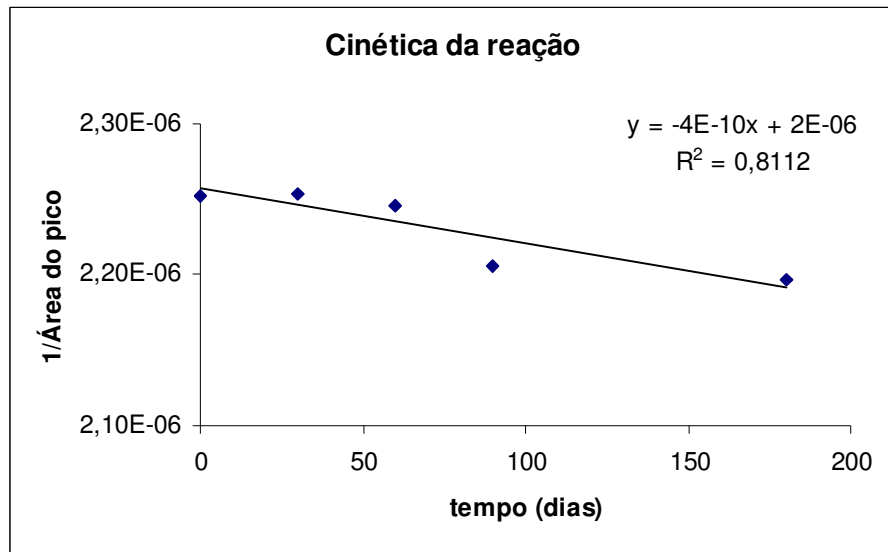
Os resultados das análises por HPLC/Massas foram fornecidos pelo Instituto de Química Analítica da Universidade de São Paulo. Metodologia utilizada: equipamento: Esquire 3000 Plus Bruker Daltonics, capillary: 4000V, nebulizer: 27 psi, dry Gas: 7.0 l/min, dry Temp: 320C e fluxo para massa de 90uL/min.

Os gráficos de cinética indicam que a reação de degradação dos compostos **1** e **2** são de segunda ordem, pois a reta é representada por 1 sobre a área do pico em eixo Y, versus tempo em dias no eixo X, a concentração dos compostos não está relacionada com a velocidade da degradação.

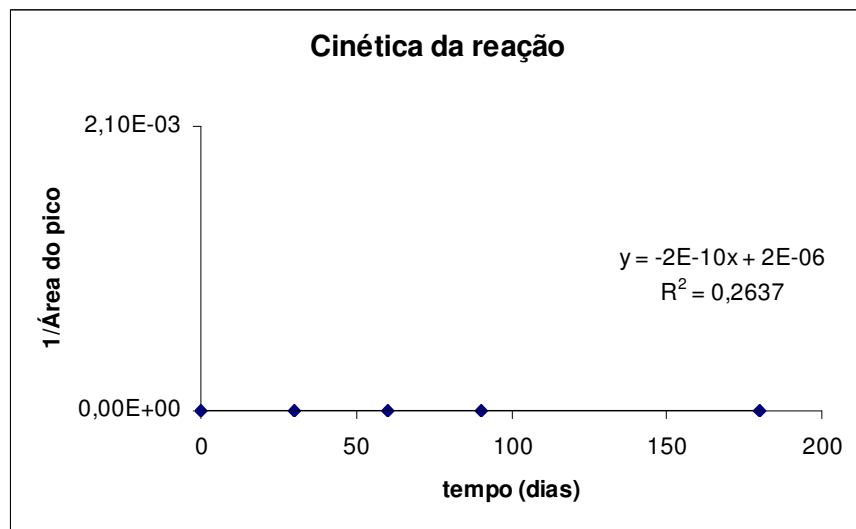
Se a reação é de segunda ordem em X, um gráfico do recíproco da concentração de X versus tempo será uma linha reta com uma inclinação igual a k, conforme ilustra a figura abaixo.



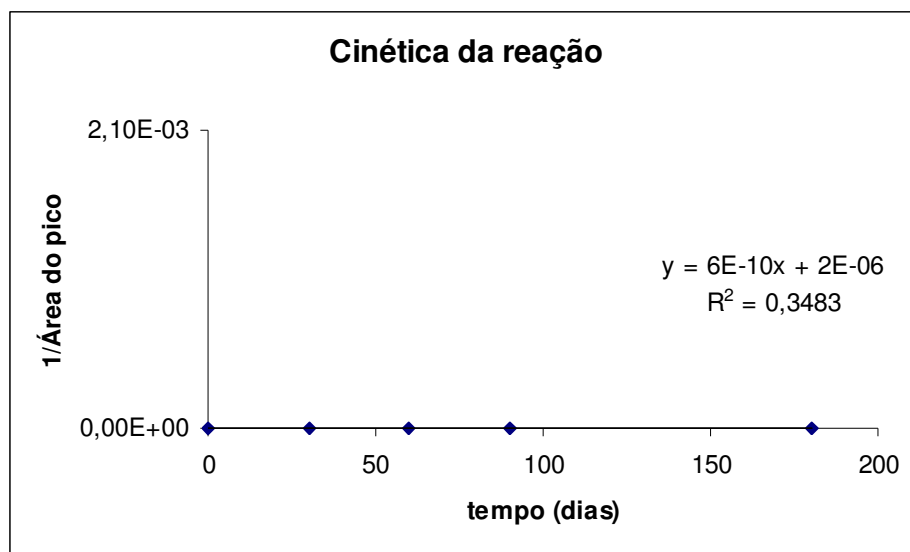
**Figura 11:** Gráfico genérico da reação de segunda ordem



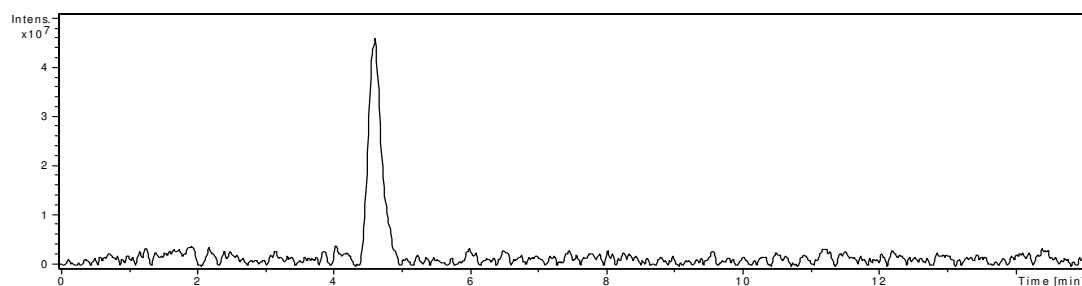
**Figura 12:** Gráfico da cinética do composto 1, armazenado em temperatura de -20°C



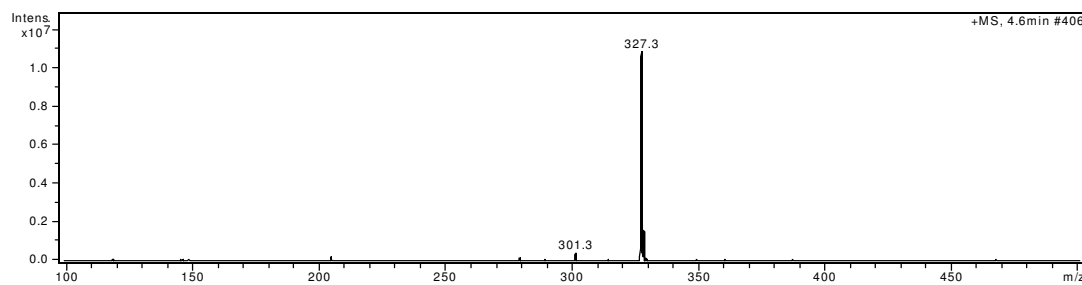
**Figura 13:** Gráfico da cinética do composto 1, armazenado em temperatura ambiente (15 a 25°C).



**Figura 14:** Gráfico da cinética do composto **1**, armazenado em temperatura de 40°C.

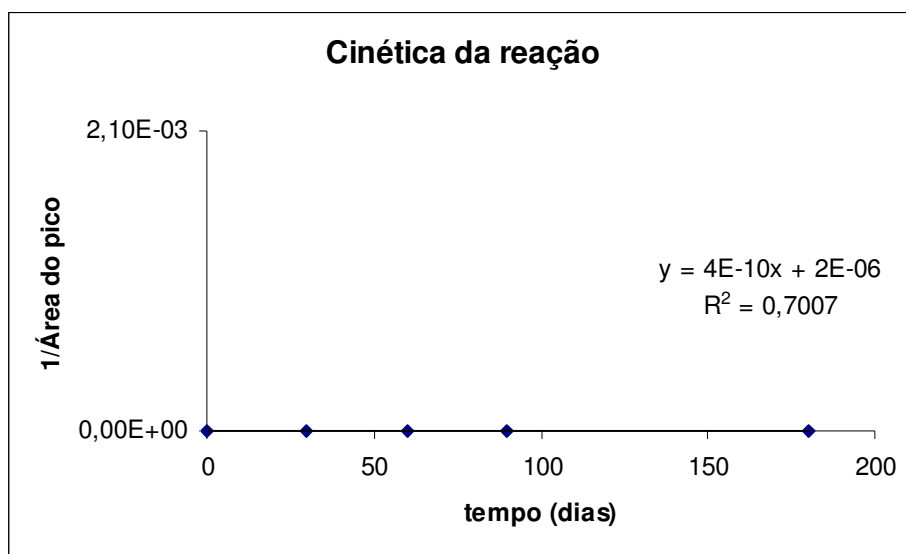


**Figura 15:** Resultado da análise por HPLC da amostra do composto **1**, após 180 dias de armazenamento em temperatura de 40°C.

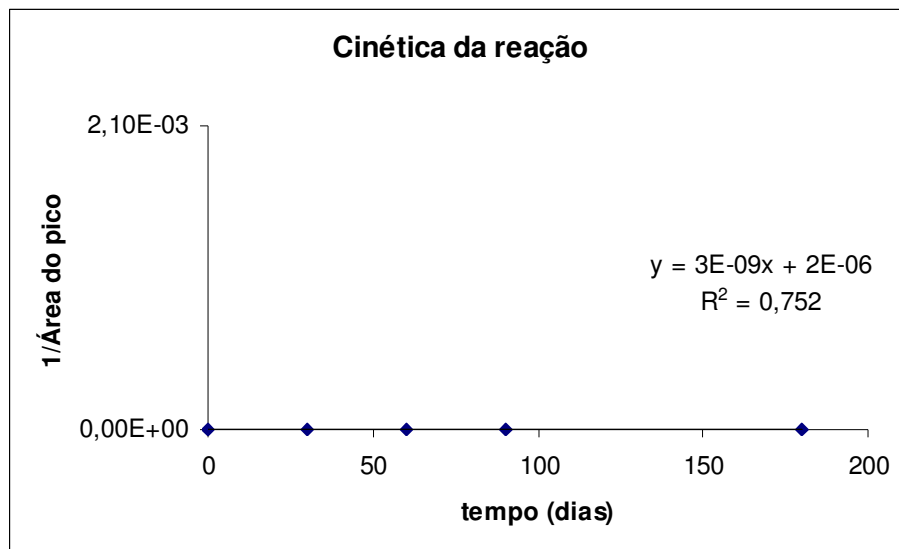


**Figura 16:** Resultado da análise por massas da amostra do composto **1**, após 180 dias de armazenamento em temperatura de 40°C.

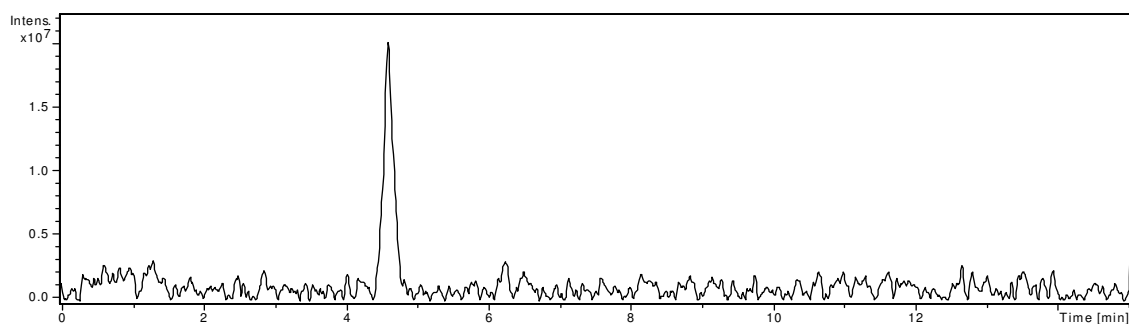
No resultado do HPLC acoplado ao espectrômetro de massas da amostra armazenada em 40°C não se observa no HPLC nenhum pico de degradação significativo, entretanto na avaliação do espectro de massa comprova-se além da massa molecular do composto **1**, que é 326 e que neste tipo de espectro aparece como sendo  $M^{+1}$ , típica da técnica de ionização química, aparece um pequeno pico correspondente à massa molecular 301, o que pode ter sido causado pela perda de 26 unidades de massa, o que representa ao grupo vinila ( $CH=CH$ ).



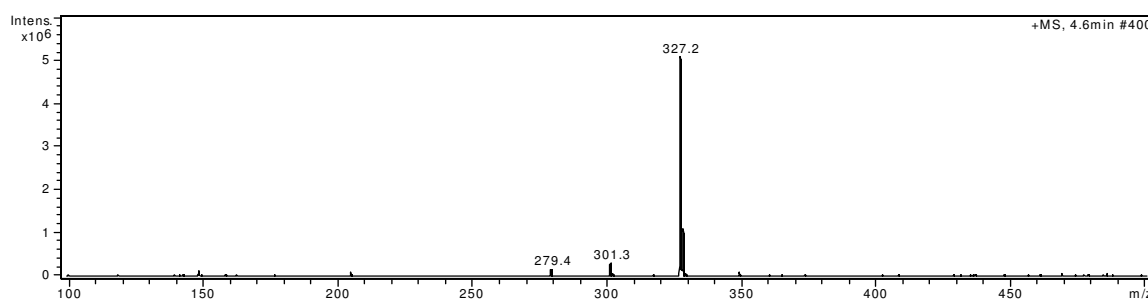
**Figura 17:** Gráfico da cinética do composto **1**, armazenado em temperatura de 6°C.



**Figura 18:** Gráfico da cinética do composto **2**, armazenado em temperatura de -20°C.

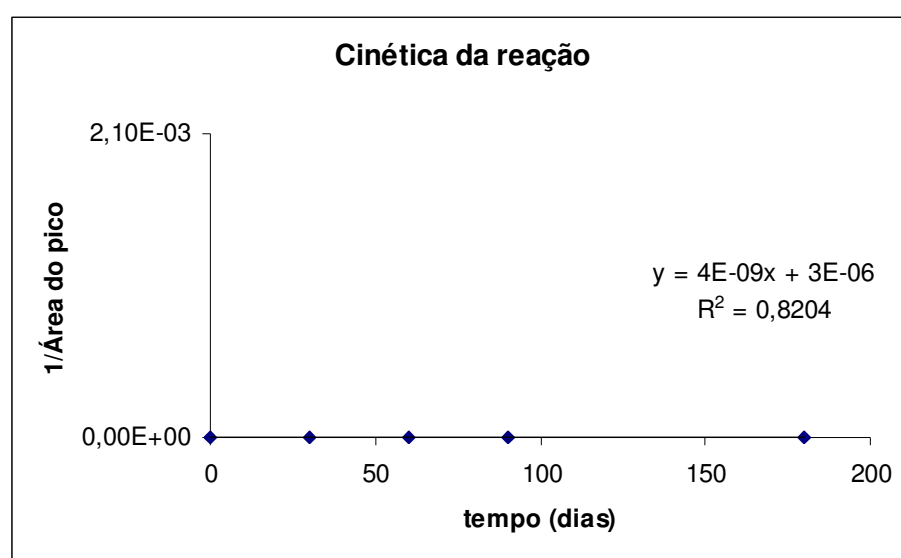


**Figura 19:** Resultado da análise por HPLC da amostra do composto **2**, após 180 dias de armazenamento em temperatura de -20°C.

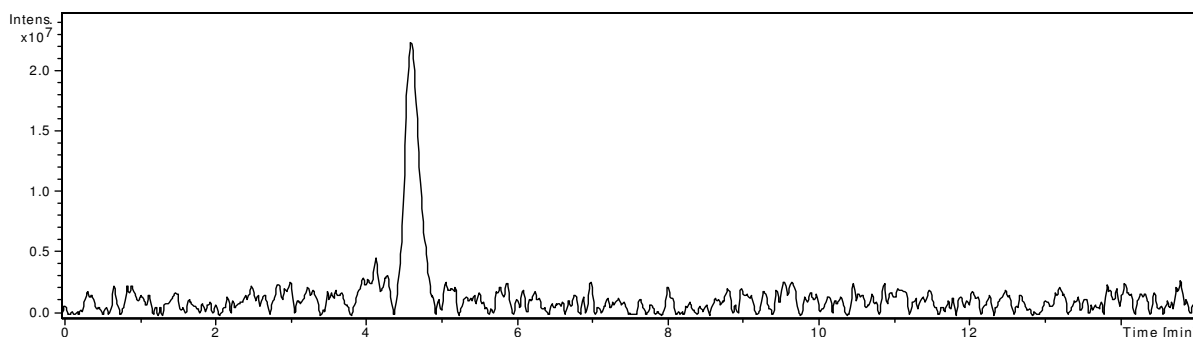


**Figura 20:** Resultado da análise por massas da amostra do composto **2**, após 180 dias de armazenamento em temperatura de -20°C.

Neste espectro de massa foi comprovado que o composto **2** transformou-se em **1** no meio ácido acético da fase móvel, pois o íon molecular registrado no espectro coincide com a massa molecular de **1**. O pico em 301 indica a perda de 26 unidades o que representa o grupo vinila (CH=CH), sendo o pico 279 indica a perda de 48 unidades de massa o que representa a perda do grupamento metoxi e a hidroxila.

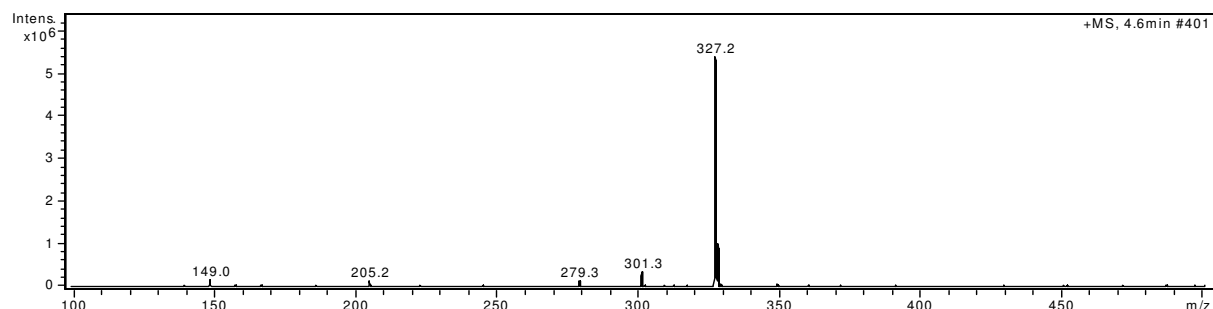


**Figura 21:** Gráfico da cinética do composto **2**, armazenado em temperatura ambiente (15 a 25°C).



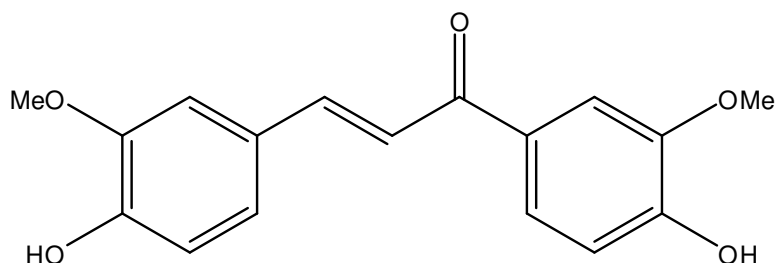
**Figura 22:** Resultado da análise por HPLC da amostra do composto **2**, após 180 dias de armazenamento em temperatura ambiente (15 a 25°C).





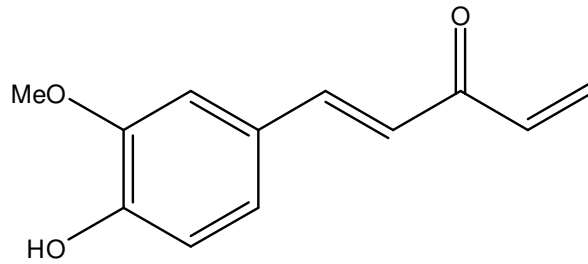
**Figura 23:** Resultado da análise por massas da amostra do composto **2**, após 180 dias de armazenamento em temperatura ambiente (15 a 25°C).

Neste espectro de massa foi comprovado que o composto **2** transformou-se em **1** no meio ácido acético da fase móvel, pois o íon molecular registrado no espectro coincide com a massa molecular de **1**. O pico em 301 indica a perda de 26 unidades o que representa o grupo vinila (CH=CH). Aparecendo um íon fragmento como representado na figura 24 a 301 unidades de massa.

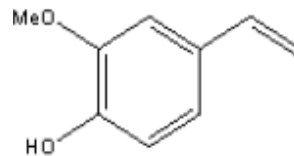


**Figura 24:** Íon fragmento do composto **1** após perda do grupo vinila e rearranjo dos íons formados.

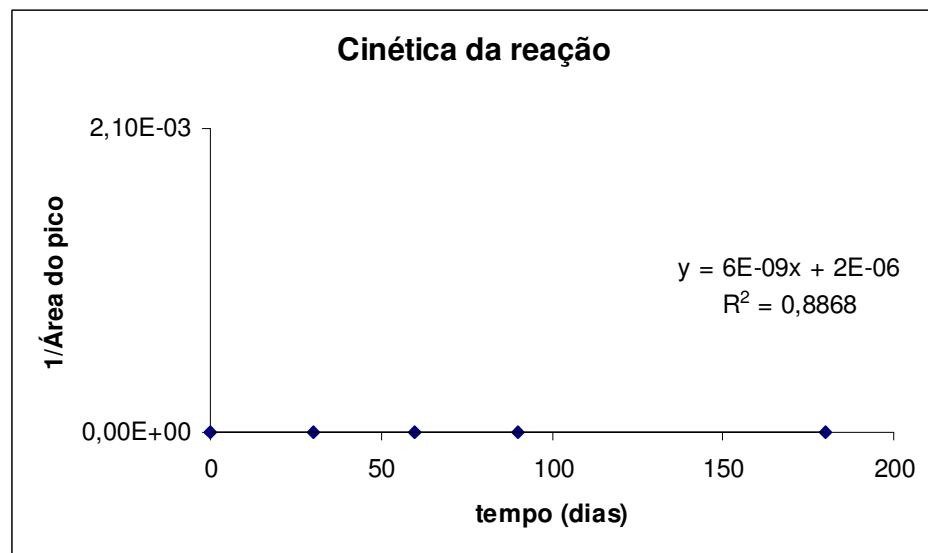
O pico 279 confirma a perda de 48 unidades de massa o que representa a perda do grupamento metoxi e da hidroxila. Sendo o pico 205 perda de 122 unidades de massa, ficando a estrutura química como mostra na figura 25.



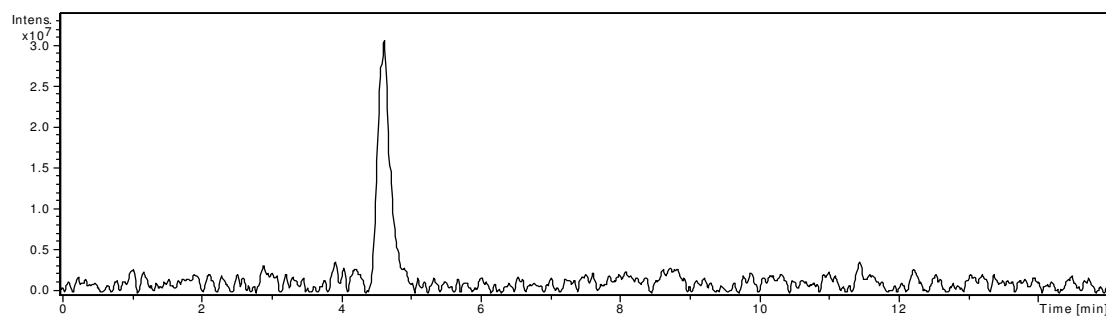
**Figura 25:** Íon fragmento de 205 unidades de massa do composto **1** após perda de 122 unidades de massa.



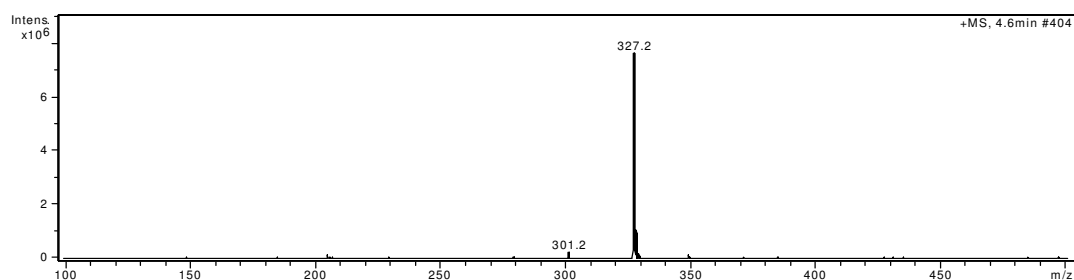
**Figura 26:** Íon fragmento de 149 unidades de massa detectado no espectro.



**Figura 27:** Gráfico da cinética do composto **2**, armazenado em temperatura de 40°C.

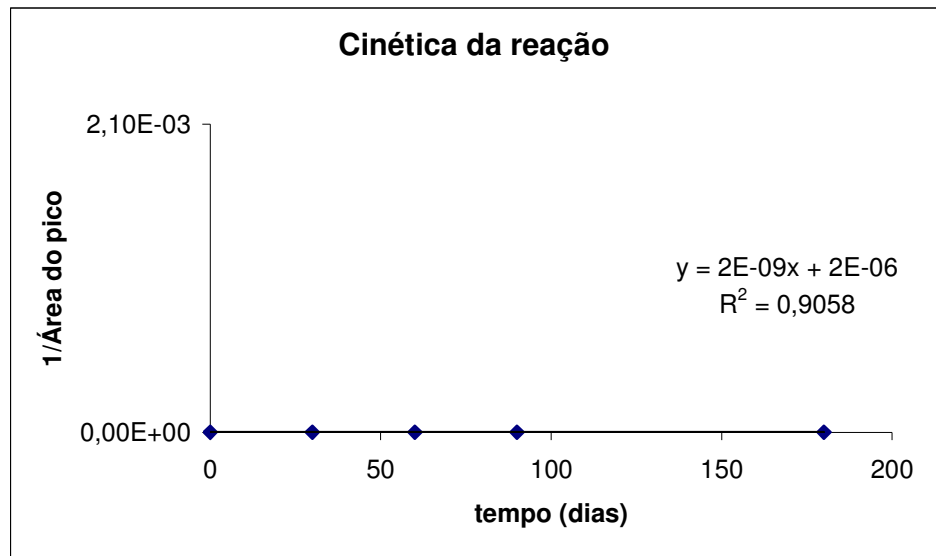


**Figura 28:** Resultado da análise por HPLC da amostra do composto **2**, após 180 dias de armazenamento em temperatura de 40°C.

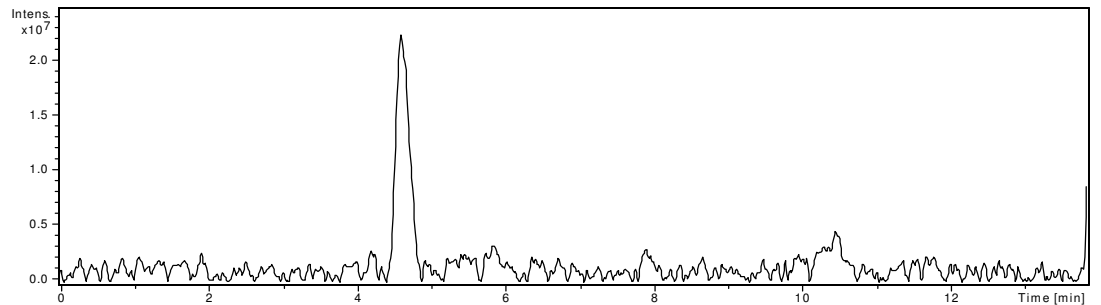


**Figura 29:** Resultado da análise por massas da amostra do composto **2**, após 180 dias de armazenamento em temperatura de 40°C.

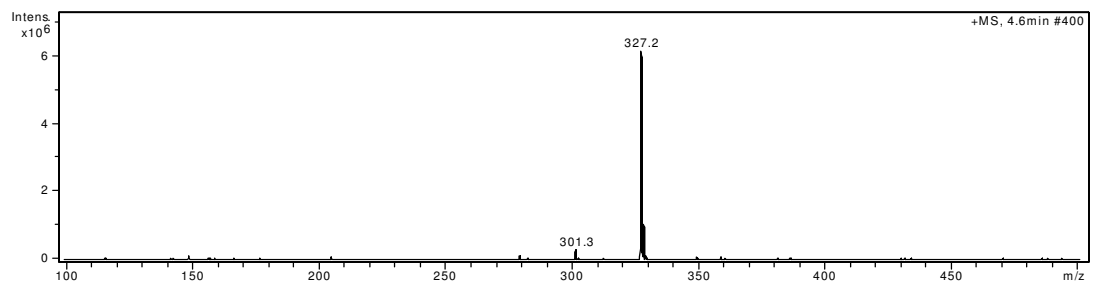
Neste espectro de massa foi comprovado que o composto **2** transformou-se em **1** no meio ácido acético da fase móvel, pois o íon molecular registrado no espectro coincide com a massa molecular de **1**. O pico em 301 indica a perda de 26 unidades o que representa o grupo vinila (CH=CH).



**Figura 30:** Gráfico da cinética do composto **2**, armazenado em temperatura de 6°C.



**Figura 31:** Resultado da análise por HPLC da amostra do composto **2**, após 180 dias de armazenamento em temperatura de 6°C.



**Figura 32:** Resultado da análise por massas da amostra do composto 2, após 180 dias de armazenamento em temperatura de 6°C.

Neste espectro de massa foi comprovado que o composto **2** transformou-se em **1** no meio ácido acético da fase móvel, pois o íon molecular registrado no espectro coincide com a massa molecular de **1**. O pico em 301 indica a perda de 26 unidades o que representa o grupo vinila (CH=CH).

## 6 CONCLUSÕES

1. Analisando os resultados de exposição dos compostos **1** e **2**, nas condições de armazenamento realizadas no estudo, o composto **1** apresentou menores valores de degradação em todas as condições de armazenamento, demonstrando maior estabilidade em relação ao composto **2**.

2. Os fatores de maior contribuição para a degradação dos dois compostos foram temperatura de 40°C e exposição à luz e solução de pH para o composto **2**.

3. Conclui-se que os dois compostos devem ser armazenados em temperatura 6°C em frasco âmbar sem degradação considerável.

4. Os teores de degradação do composto **2** não ultrapassou 10% quando armazenado à 6°C, obtendo-se um prazo de validade prévia de 12 meses, e o composto **1** não ultrapassou 5% obtendo-se previamente 24 meses de validade, segundo recomendação da ANVISA (2004).

5. As análises de espectro de massa dos compostos 1 e 2 foram realizadas apenas do pico principal que aparece no HPLC sendo este pico o do composto, sendo que os picos menores apresentados como produto de degradação não foi realizado espectro de massa, desta forma não sendo possível caracterizar os produtos de degradação dos compostos. Mas através dessas análises foi possível comprovar a transformação do composto **1** em **2** em meio ácido, apresentando o composto **2** a mesma massa molecular do **1** após dissolvido em ácido acético.

## **7 SUGESTÕES**

- Recomenda-se segundo a ANVISA que estes estudos de estabilidade devem ser continuados como estabilidade prolongada para definição da data de validade dos compostos **1** e **2** e desta forma futuramente serem utilizados em testes clínicos em humanos.
- Realizar o estudo de estabilidade prolongada dos compostos **1** e **2** em forma farmacêutica.

- Os compostos **1** e **2** devem ter em sua formulação substâncias para evitar a degradação à luz e alta temperatura.
- Analisar por HPLC/Massas todos os picos apresentados em HPLC para possível caracterização dos compostos degradados.

## **8 ANEXOS**

### **8.1 Testes biológicos do composto 1, após degradação**

Após 180 dias de armazenamento, foram realizados testes biológicos das amostras do composto **1** armazenadas em temperaturas: ambiente (15 à 25°C), -20°C, 40°C e 6°C.

Os resultados das análises biológicas e a metodologia utilizada foi fornecida pelo laboratório de bioquímica e biofísica do Instituto

Butantan pela doutoranda Fernanda Faião Flores e chefiado pelo Dr. Durvanei Augusto Maria.

**Tabela 20:** Resultados dos testes biológicos do composto 1 e 2

<b>COMPOSTOS e TEORES</b>	<b>IC 50% Melanoma B16F10 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>IC 50% Fibroblasto FN1 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1 -20°C 100,00%	3,5	343,0
1 T.A 100,00%	2,4	345,0
1 6°C 98,13%	7,6	601,0
1 40°C 93,78%	6,3	757,0
2 pH 3,5 54,00%	6,6	1440,0
2 pH 7,0 42,57%	30,8	413,0

Os resultados biológicos demonstram que quando os compostos 1 e 2 quando degradados apresentam uma menor seletividade por fibroblastos, ou

seja se tornam menos tóxicos. Recomenda-se que novos estudos com esses compostos degradados sejam realizados para confirmação da diminuição da toxicidade.

### **8.1.1 Metodologia utilizada nos testes biológicos**

#### *Cultura das Linhagens de Células Tumerais e Normais*



As células das linhagens tumorais de melanoma murino (B16F10) e fibroblastos humanos normais (FN1) foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> em meio de cultura (RPMI-1640), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2mM de L-glutamina e antibióticos.

Para a realização dos experimentos *in vitro*, as células foram desprendidas com solução de Tripsina-Edta, neutralizadas com o mesmo volume de soro fetal bovino inativado, centrifugadas duas vezes por 10 minutos á 1500RPM, ressuspensas em meio de cultura e foram ajustadas com concentração celular desejada.

### **8.1.2 Avaliação da Citotoxicidade e Atividade Proliferativa *in vitro* dos compostos em Linhagens de Células Tumorais e Normais**

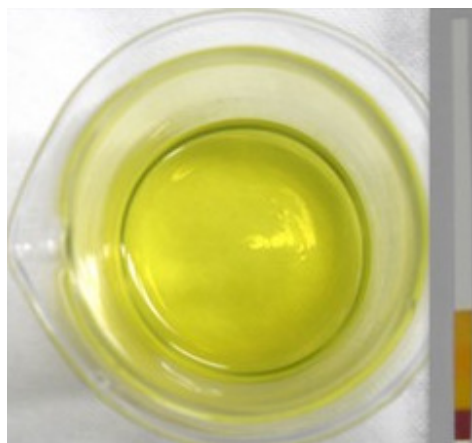
Após o descolamento e centrifugação das células de ambas as linhagens celulares, as mesmas foram ajustadas para a concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL e plaqueadas em placas de 96 orifícios. Após 24 horas da adesão e confluência celular, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos (1mg/mL á 0,002mg/mL) e diluídos em solução fisiológica 0,9% (compostos hidrossolúveis) ou Migliol (compostos lipossolúveis) em diluições seriadas em microplaca.

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio brometo] após 24 horas da incubação dos compostos. Foram adicionados 10 µL de MTT (5mg/mL) às células, e estas incubadas por 3 horas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após este período, o meio foi removido e acrescentou-se 100 µL de metanol absoluto para dissolver os cristais formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi avaliada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 540 nm.

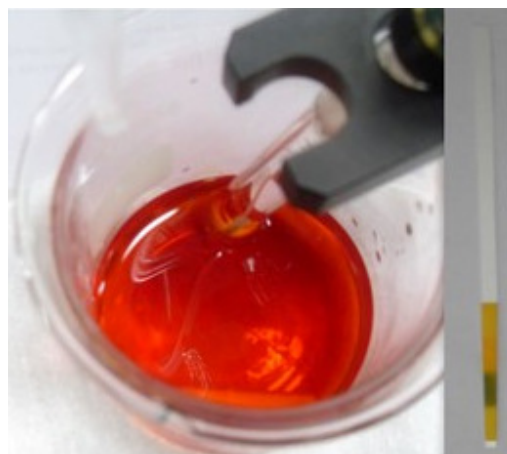
## **8.2 Propriedade de solução indicadora do composto 1**

Foram realizadas titulações com o composto **1** que indicam característica de solução indicadora deste composto. As soluções utilizadas na titulação foram ácido clorídrico 0,1N e hidróxido de sódio 0,1N.

Os resultados e a metodologia das análises foram fornecidos pelo laboratório de síntese orgânica da UNIBAN pelo farmacêutico Oseraldo Vieira Rocha.



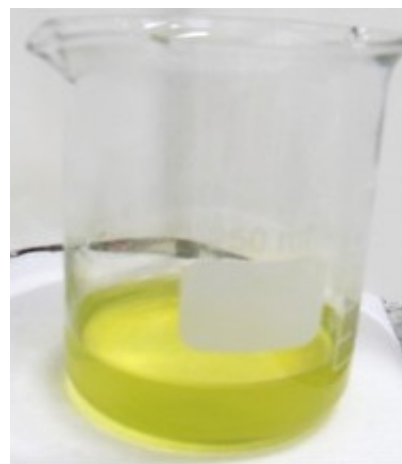
pH = 1,5



pH = 7,0



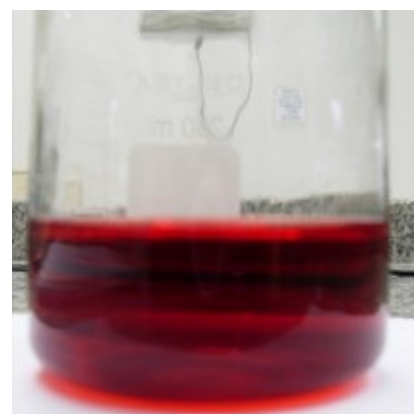
pH = 9,0



pH = 1,5



pH = 7,0



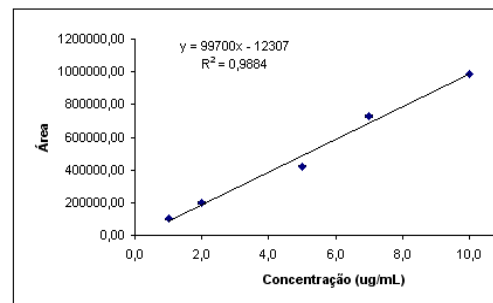
pH = 9,0

**Figura 33:** Coloração do composto **1** em diferentes valores de pH, após titulação.

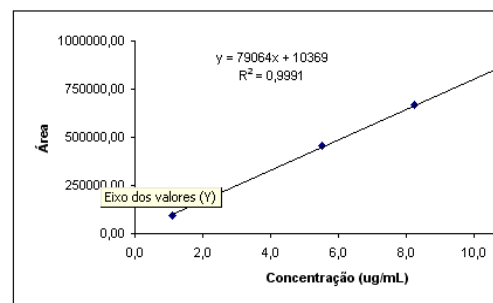
### 8.3 Planilhas dos cálculos realizados pelo excel

curva DM1 HPLC			
área	conc.	media	dp
97579	1		
101118	1	99981	2081,177
101246	1		
193279	2		
197320	2	197922,7	4972,467
203169	2		
416873	5		
422402	5	420866,3	3488,919
423324	5		
723568	7		
725213	7	727824,3	6004,177
734692	7		
985060	10		
984079	10	984366	604,0091
983959	10		
curva HB1 HPLC			
área	conc.	media	dp
93260	1,1		
93272	1,1	93271,33	11,01514
93282	1,1		
179080	2,2		
178990	2,2	178756,3	484,758
178199	2,2		
456060	5,5		
457858	5,5	457326	1101,03
458060	5,5		
670651	8,25		
671028	8,25	670840,3	188,5055
670842	8,25		
869328	11		
868910	11	869385,7	506,9658
869919	11		

conc.	media	dp
1	99981,00	2081,18
2	197922,67	4972,47
5	420866,33	3488,92
7	727824,33	6004,18
10	984366,00	604,01



conc.	media	dp
1,1	93271,33	11,02
2,2	178756,33	484,76
5,5	457326,00	1101,03
8,25	670840,33	188,51
11	869385,67	506,97



Área	media	dp	CV (%)
DM1 6 dia			
411602			
411294	412256,3	1408,5	0,34
413873			
DM1 7 dia			
409684			
400529	404633,0	4650,4	1,15
403686			
DM1 8 dia			
407278			
399368	400175,0	6735,9	1,68
393879			
DM19 dia			
417061			
406774	410335,0	5828,3	1,42
407170			
DM1 10 dia			
408590			
407574	405790,7	4001,1	0,99
401208			
Área			
HB1 6 dia			
442684			
445319	443607,7	1483,6	0,33
442820			
HB1 7 dia			
443788			
448963	445777,7	2787,0	0,63
444582			
HB1 8 dia			
453366			
459316	458060,0	4209,0	0,92
461498			
HB1 9 dia			
443271			
440522	442072,0	1407,7	0,32
442423			
HB1 10 dia			
448324			
446629	447196,3	976,6	0,22
446636			

Abs	media	dp	CV (%)
DM1 1 dia			
0,417			
0,417	0,4	0,0	0,01
0,4171			
DM1 2 dia			
0,413			
0,4129	0,4	0,0	0,01
0,4129			
DM1 3 dia			
0,413			
0,413	0,4	0,0	0,00
0,413			
DM1 4 dia			
0,4132			
0,4133	0,4	0,0	0,01
0,4133			
DM1 5 dia			
0,4126			
0,4126	0,4	0,0	0,00
0,4126			
Abs.			
HB1 1 dia			
0,4401			
0,4402	0,4	0,0	0,02
0,4403			
HB1 2 dia			
0,442			
0,4427	0,4	0,0	0,09
0,4427			
HB1 3 dia			
0,4413			
0,4413	0,4	0,0	0,01
0,4412			
HB1 4 dia			
0,441			
0,4412	0,4	0,0	0,03
0,4412			
HB1 5 dia			
0,4515			
0,4515	0,5	0,0	0,00
0,4515			

Abs	media	dp	CV (%)
DM1 6 dia			
0,4118			
0,412	0,4	0,0	0,05
0,4122			
DM1 7 dia			
0,4118			
0,4118	0,4	0,0	0,00
0,4118			
DM1 8 dia			
0,4112			
0,4112	0,4	0,0	0,01
0,4113			
DM19 dia			
0,4127			
0,4126	0,4	0,0	0,01
0,4126			
DM1 10 dia			
0,413			
0,4132	0,4	0,0	0,03
0,4132			
Abs.			
HB1 6 dia			
0,443			
0,4428	0,4	0,0	0,03
0,4428			
HB1 7 dia			
0,441			
0,4408	0,4	0,0	0,03
0,4407			
HB1 8 dia			
0,453			
0,4529	0,5	0,0	0,01
0,4529			
HB1 9 dia			
0,4408			
0,4409	0,4	0,0	0,01
0,4408			
HB1 10 dia			
0,4418			
0,4419	0,4	0,0	0,02
0,442			

HB1-tempo zero

443960

HB1 -20C 30 dias	media	dp	CV (%)
443080			
445060	443703,3	1176,2	0,27
442970			

	lt-130	media/dp	CV(%)
443080	900,0		
445060	1030,0	996,7	9,10
442970	1010,0	90,7	

HB1 -20C 60 dias

444440  
445070  
446090

	lt-160	media/dp	CV(%)
444440	460,0		
445070	1060,0	1216,7	69,00
446090	2100,0	827,3	

HB1 -20C 90 dias

451932  
453248  
455108

	lt-190	media/dp	CV(%)
451932	7962,0		
453248	9268,0	9449,3	16,89
455108	11126,0	1696,7	

HB1 -20C 180 dias

453761  
459806  
452407

	lt-1180	media/dp	CV(%)
453761	9791,0		
459806	15828,0	11345,3	34,73
452407	8427,0	3940,7	

HB1 bancada 30 dias

450787  
455234  
452119

	lt-130	media/dp	CV(%)
450787	6807,0		
455234	11264,0	8733,3	26,13
452119	8139,0	2382,3	

HB1 bancada 60 dias

452281  
450119  
453638

	lt-160	media/dp	CV(%)
452281	6301,0		
450119	6136,0	8032,3	22,10
453638	9668,0	1775,3	

HB1 bancada 90 dias

459941  
456260  
452119

	lt-190	media/dp	CV(%)
459941	15961,0		
456260	11290,0	11793,3	33,38
452119	6139,0	3936,2	

HB1 bancada 180 dias

452633  
450120  
453438

	lt-1180	media/dp	CV(%)
452633	8953,0		
450120	6140,0	8060,3	21,31
453438	9466,0	1715,2	

HB1 40C 30 dias

414567  
414510  
413418

	lt-130	media/dp	CV(%)
414567	29413,0		
414510	29470,0	29616,0	2,17
413418	30662,0	647,5	

HB1 40C 60 dias

410134  
413940  
416239

	lt-160	media/dp	CV(%)
410134	33646,0		
413940	30040,0	30542,3	10,10
416239	27741,0	3063,3	

HB1 40C 90 dias

419876  
415048  
412222

	lt-190	media/dp	CV(%)
419876	24104,0		
415048	28932,0	26264,7	13,69
412222	31758,0	3670,4	

HB1 40C 180 dias

416346  
411012  
413384

	lt-1180	media/dp	CV(%)
419876	24104,0		
415048	28932,0	26264,7	13,69
412222	31758,0	3670,4	

HB1 6C 30 dias

446789  
444410  
446680

	lt-130	media/dp	CV(%)
419876	24104,0		
415048	28932,0	26264,7	13,69
412222	31758,0	3670,4	

HB1 6C 60 dias

446937  
446060  
444160

	lt-160	media/dp	CV(%)
419876	24104,0		
415048	28932,0	26264,7	13,69
412222	31758,0	3670,4	

HB1 6C 90 dias

438765  
431006  
436351

	lt-190	media/dp	CV(%)
419876	24104,0		
415048	28932,0	26264,7	13,69
412222	31758,0	3670,4	

HB1 6C 180 dias

436689  
430110  
432311

	lt-1180	media/dp	CV(%)
419876	24104,0		
415048	28932,0	26264,7	13,69
412222	31758,0	3670,4	

0,4470

	lt-130	media/dp	CV(%)
0,4455			
0,4454	0,4455	0,0001	0,0130
0,4455			

	lt-130	media/dp	CV(%)
0,4455	0,0015		
0,4454	0,0016	0,0015	3,7653
0,4455	0,0015	0,0001	

0,4437

	lt-160	media/dp	CV(%)
0,4437			
0,4437	0,0033		
0,4437	0,0033	0,0033	0,0000
0,4437			

	lt-160	media/dp	CV(%)
0,4437	0,0033		
0,4437	0,0033	0,0000	
0,4437	0,0033	0,0000	

0,4575

	lt-190	media/dp	CV(%)
0,4575			
0,4575			
0,4574	0,0104	0,0105	0,5516

	lt-190	media/dp	CV(%)
0,4575	0,0105		
0,4575	0,0105	0,0105	0,5516
0,4574	0,0104	0,0001	

0,4532

	lt-1180	media/dp	CV(%)
0,4532			
0,4532			
0,4532	0,0062	0,0062	0,0000

	lt-1180	media/dp	CV(%)
0,4532	0,0062		
0,4532	0,0062	0,0062	0,0000
0,4532	0,0062	0,0000	

0,4565

	lt-130	media/dp	CV(%)
0,4565			
0,4564			
0,4565	0,0095	0,0095	0,0099

	lt-130	media/dp	CV(%)
0,4565	0,0095		
0,4564	0,0094	0,0095	0,0099
0,4565	0,0095	0,0001	

0,4590

	lt-160	media/dp	CV(%)
0,4590			
0,4591			
0,4590	0,0120	0,0120	0,4798

	lt-160	media/dp	CV(%)
0,4590	0,0120		
0,4591	0,0121	0,0120	0,4798
0,4590	0,0120	0,0001	

0,4447

	lt-190	media/dp	CV(%)
0,4447			
0,4447			
0,4446	0,0024	0,0023	2,4744

	lt-190	media/dp	CV(%)
0,4447	0,0023		
0,4447	0,0023	0,0023	2,4744
0,4446	0,0024	0,0001	

0,4603

	lt-1180	media/dp	CV(%)
0,4603			
0,4603			
0,4604	0,0134	0,0133	0,4330

	lt-1180	media/dp	CV(%)
0,4603	0,0133		
0,4603	0,0133	0,0133	0,4330
0,4604	0,0134	0,0001	

0,4100

	lt-130	media/dp	CV(%)
0,4100			
0,4101			
0,4100	0,0370	0,0370	0,1562

	lt-130	media/dp	CV(%)
0,4100	0,0370		
0,4101	0,0369	0,0370	0,1562
0,4100	0,0370	0,0001	

0,4119

	lt-160	media/dp	CV(%)
0,4119			
0,4119			
0,4119	0,0351	0,0351	0,0000

	lt-160	media/dp	CV(%)
0,4119	0,0351		
0,4119	0,0351	0,0351	0,0000
0,4119	0,0351	0,0001	

0,4187

	lt-190	media/dp	CV(%)
0,4187			
0,4187			
0,4186	0,0283	0,0283	0,2038

	lt-190	media/dp	CV(%)
0,4187	0,0283		
0,4187	0,0283	0,0283	0,2038
0,4186	0,0284	0,0001	

0,4133

	lt-1180	media/dp	CV(%)
0,4133			
0,4132			
0,4133	0,0283	0,0283	0,2038

	lt-1180	media/dp	CV(%)
0,4187	0,0283		
0,4187	0,0283	0,0283	0,2038
0,4186	0,0284	0,0001	

0,4454

	lt-130	media/dp	CV(%)
0,4454			
0,4454			
0,4454	0,0283	0,0283	0,2038

	lt-130	media/dp	CV(%)
0,4454	0,0283		
0,4454	0,0283	0,0283	0,2038
0,4454	0,0284	0,0001	

0,4466

	lt-160	media/dp	CV(%)
0,4466			
0,4467			
0,4467	0,0283	0,0283	0,2038

	lt-160	media/dp	CV(%)
0,4466	0,0283		
0,4467	0,0283	0,0283	0,2038
0,4466	0,0284	0,0001	

0,4378

	lt-190	media/dp	CV(%)
0,4378			
0,4378			
0,4378	0,0283	0,0318	18,9535

	lt-190	media/dp	CV(%)
0,4187	0,0283		
0,4187	0,0283	0,0318	18,9535
0,4186	0,0284	0,0001	

0,4365

	lt-1180	media/dp	CV(%)
0,4365			
0,4364			
0,4364	0,0283	0,0283	0,2038

	lt-1180	media/dp	CV(%)
0,4187	0,0283		
0,4187	0,0283	0,0318	18,9535
0,4186	0,0284	0,0001	

DM1-tempo zero

416873

DM1 -20C	media	dp	CV
417898			
415001	415306,0	3000,5	0,72
412019			

	lt-130	media/dp	CV(%)
417898	1026,0		
415001	872,0	948,5	11,41
412019	108,2		

DM1 -20C 60 dias

375230  
370120  
3760

## 9 REFERÊNCIAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Estabilidade de Produtos Farmacêuticos**. Brasília: ANVISA, 2004.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: ANVISA, 2003.
3. ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC DRAFT 02/12/2002**. AOAC requirements for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and other materials. Disponível em: <http://www.aoac.org>.
4. BRASIL. **Diário Oficial da União**. Resolução RDC n. 10, de 2 de Janeiro de 2001, Brasília, n.6-E, 9 jan. 2001. Seção 1, p.21, 23.
5. BRESSOLLE, F; BROMET, Petiti; AUDRAN, M. J. **Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.** Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. Amsterdam, 1996.
6. CHASIN, A. et al. Validação de métodos em análise toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11, p.1-6, 1998.
7. COLLINS Carol; BRAGA Gilberto; BONATO, Pierina. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7ªed. Campinas: Unicamp, 1997.

8. DAGAR, V. Factors affecting the stability of pharmaceutical products. **East. Pharm.**, New Delhi, n.6, p.41-42, 1990.
9. GIL, E.S., **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2ªed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.
10. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION Q2b. **Text on validation of analytical produce methodology**, 2006. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: jun. 2008.
11. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Stability testing of new drug substances and products**, 2006 . Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 2 jun. 2008.
12. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Stability testing of Phtostability testing of new substances and products**, 1996 . Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 2 jun. 2008.
13. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**: DOQ – CGCRE-008. S.I.: INMETRO, 2003. 36p. Disponível em: [http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao\\_inmetro.pdf](http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf). Acesso em: 22 jun. 2008.
14. JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** New York, v.19, n.5, p.737-757, 1996.

15. JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. Part II. Guidelines for primary validation parameters. **Instrumentation Science & Technology**. New York, v.26, n.1, p.1-18, 1998.

16. LANÇAS, Fernando. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, São Carlos: Rima, 2004.

17. LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: ACTA, 1993. p.185-203.

18. LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M.J. **Teoria e prática na Indústria Farmacêutica**. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.2, 2001. p. 1278.

19. MASUDA, A. Jitoe, J. Isobe. N. Nakatani, S. Yonemori, **Phytchemistry**. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Curcumin-related Phenolics from Rhizomes of *Curcuma Domestica*, 1993, Vol. 32, N° 6, 1557-1560.

20. POPE, D.G. Accelerated stability testing for prediction of drug product stability. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.127, n.5, p.54-62, 1980.

21. QUINCOCES, José et al. **New Method for the Preparation of 1,5-Bis(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)-penta-1,4-dien-3-one and Derivatives with Antitumoral Properties**. *Patente brasileira número: PI 0207141-0 (PCT/Br 2003/00177); 28.11.2003. USA N° 10/536,667; Japan N° 2004-554088; Europa N° 03773364.9.*



22. QUINCOES José. **Composição farmacêutica e uso e composição farmacêutica para o tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas em humanos e animais.** Patente N° PI0902039-0 09/06/09.

23. REMOLO Ciola, **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho: HPLC.** São Paulo: Edgard Bluchetr, 2003, p.150.

24. RIBANI, M. **Conceitos de validação em métodos cromatográficos, aplicados na determinação de omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos.** 2004. 96f.Tese (Mestrado em Química) – Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

25. SHALAEV, E. Y.; ZOGRAFI, G. How does residual water affect the solidstate degradation of drugs in the amorphous state? **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.85, n.11, p.1137-1141, 1996.

26. SINDICATO DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO. Resolução GMC n.53/96: estabilidade de produtos farmacêuticos. In: **Mercosul: legislação para a indústria farmacêutica.** São Paulo: SINDUSFARMA, 2000. p.141-148.

27. SKOOG, Nielman. **Análise Instrumental**, 5°ed.Rio de Janeiro: Bookman, 2002.

28. UNITED STATES. Departament of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Reviewer guidance: validation of chromatographic methods.** Rockville: Food and Drug administration, 1994. 30p.

29. UNITED States Pharmacopeia, 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial convention, 2000. p.1920-1924, 2149-2151.

30. VADAS, E. B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A.R. **Remington's: The science and practice of pharmacy**. 20. ed. Easton Pennsylvania: Mack publishing Company, 2000. p. 986-994.