

ESTUDO DE ESTABILIDADE DO FOSFATO DISSÓDICO DE PREDNISOLONA EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO E TÉRMICO, EM FORMULAÇÃO ORAL

Cleber Antonio Lindino^{1}, Marcia Lina Mitsui², Rodolfo Ortiguara², Daiane Felin²,
Mauricio Ferreira da Rosa¹, Reinaldo Aparecido Bariccatti¹*

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Rua da Faculdade, 645 Jardim La Salle. CEP 85903-000 Toledo – PR.

*e-mail: cleberlindino@yahoo.com.br

²Prati, Donaduzzi & Cia Ltda – Rua Mitsugoro Tanaka, 145. Centro Industrial Nilton Arruda. CEP 85903-630 Toledo - PR

Resumo: Este trabalho consistiu em investigar o processo de degradação do fármaco Fosfato Sódico de Prednisolona (FSP) na forma farmacêutica de solução oral por meio de ensaios de degradação, avaliando-se os parâmetros de acordo com a Resolução n.º 899/2003 da ANVISA e o processo de degradação do fármaco. O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) desenvolvido para o doseamento do fármaco foi validado a fim de comprovar sua aplicabilidade como indicativo de estabilidade, assegurando a confiabilidade do mesmo. Após o método ser validado no estudo da degradação do fármaco, comprovou-se que em condições drásticas de estresse oxidativo (H₂O₂ 30%) e temperatura a 60°C, a degradação do fármaco é dependente de sua concentração (cinética de primeira ordem). Os resultados apresentaram-se satisfatórios, demonstrando que este método é adequado para investigação da formação de produtos de degradação na forma farmacêutica solução oral.

Palavras-chave: fosfato sódico de prednisolona, método indicativo de estabilidade, degradação.

Introdução

O estudo de produtos de degradação de um medicamento faz-se necessário para atender aos requisitos de órgãos regulamentadores no Brasil, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e guias internacionais, tais como os guias do International Conference Harmonization (ICH) recomendados nos Estados Unidos, Japão e Comunidade Européia, que preconizam a quantificação do princípio ativo e dos produtos de degradação para assegurar a qualidade do medicamento [1,2].

De acordo com a Resolução n.º 01, de 29 de Julho de 2005 da ANVISA, deve-se apresentar no estudo de estabilidade do medicamento a justificativa de ausência ou a quantificação de produtos de

degradação assim como o método analítico correspondente. Desta forma, é imprescindível para a indústria farmacêutica o conhecimento de métodos indicativos de estabilidade, análise crítica de resultados de degradação de amostras submetidas a determinadas condições de estresse e a cinética da degradação do produto em questão [3].

O Guia de Estabilidade determinado pela United States-Food and Drug Administration (US-FDA) define métodos indicativos de estabilidade como métodos analíticos quantitativos validados que podem detectar as alterações das propriedades físicas, químicas e microbiológicas do fármaco e do produto, em relação ao tempo, e que são específicos, de forma que o conteúdo do ativo, dos produtos de degradação e outros componentes de interesse possam ser exatamente medidos sem interferência [4].

De acordo com a Resolução nº. 899/2003 da ANVISA é necessário validar os métodos analíticos que não estão descritos em farmacopéias ou compêndios oficiais devidamente reconhecidos pela ANVISA preconizando também que para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, compara-se os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopeica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse, como, por exemplo, luz, temperatura, umidade, hidrólise ácida ou básica e oxidação [5].

O Fosfato sódico de Prednisolona (FSP) com designação química 11,17-dihidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13-dimetil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidrociclopenta[a]fenantreno-3-uno disódio fosfato pertence à classe dos glicocorticóides [6]. É um esteróide, derivado do núcleo ciclopentanoperidrofenantreno e possui potentes efeitos antiinflamatórios, sendo amplamente utilizado em tratamento de insuficiência adrenocortical aguda, crônica ou secundária, em distúrbios alérgicos, em inflamação não reumática, dentre outras indicações [7].

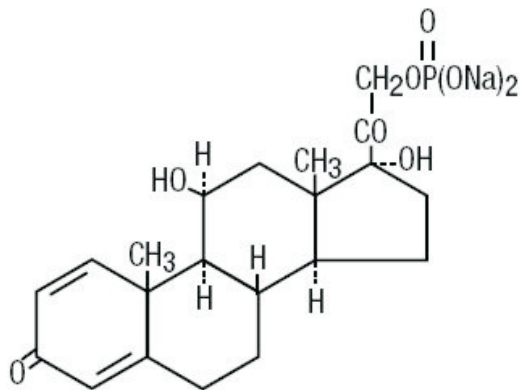


Figura 1. Estrutura molecular do fosfato sódico de prednisolona.

O presente trabalho teve como objetivo investigar o processo de degradação do medicamento Fosfato Sódico de Prednisolona na forma farmacêutica de solução oral por meio de ensaios de degradação forçada, utilizando a metodologia analítica para a quantificação do fármaco (validada para tal finalidade), avaliando-se para isso, os parâmetros pertinentes à classe II, de acordo com a Resolução nº. 899/2003 da ANVISA, que se refere à classificação do teste conforme a finalidade, ou seja, para análises de ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas, visando também o delineamento da cinética de degradação do fármaco por meio de determinações em tempos pré-determinados até obtenção da degradação máxima.

Materiais e Métodos

Os reagentes utilizados foram de pureza grau analítico ou grau cromatográfico e a água foi purificada pelo sistema Milli-Q® (resistência da água maior que $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu Prominense. As condições cromatográficas estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Condições dos parâmetros cromatográficos de análise.

Fase móvel	Metanol: Tampão Acetato de Amônio $20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0:Ácido acético glacial
Fluxo	$1,00 \text{ mL min}^{-1}$
Detector	UV-DAD
Comprimento de onda	254 nm
Volume injetado	20 μL
Temperatura do forno	30°C
Coluna	C18 150x4, 6 mm, 5 μm

Solução amostra controle

Transferiu-se 1,0 mL da solução FSP (1,34 mg mL^{-1} na forma farmacêutica solução oral) para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com água destilada e homogeneizou-se. Filtrou-se em membrana hidrofílica de $0,45 \mu\text{m}$ (concentração final de $0,134 \text{ mg mL}^{-1}$ ou $0,2766 \text{ mol L}^{-1}$).

Preparo do padrão

Pesou-se exatamente 13,4 mg de padrão de trabalho de FSP em balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água destilada. Transferiu-se volumetricamente 1 mL em um balão de 10 mL e completou-se com água destilada, homogeneizando. Filtrou-se em membrana hidrofílica de 0,45 µm.

Especificidade/Degradação induzida

As amostras foram preparadas pipetando-se 1,0 mL da amostra e transferindo-se para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 2,0 mL de cada agente indutor de degradação e completou-se o volume, conforme mostrado na tabela 2.

Após determinado período na condição de degradação, determinou-se a concentração do fosfato de prednisona.

análise da amostra submetida à degradação induzida, para verificar se o pico correspondente ao produto de degradação apresenta boa separação em relação ao pico de interesse, FSP, comparando-se ao resultado obtido no método sem alteração.

As alterações arbitrárias realizadas no método para avaliação deste parâmetro foram: lote da coluna cromatográfica, fluxo da fase móvel e temperatura do forno da coluna.

Resultados e Discussão

Para a avaliação de possíveis produtos de degradação, analisou-se as amostras preparadas com ácido (HCl 0,1 mol L⁻¹), base (NaOH 0,1 mol L⁻¹), oxidação (H₂O₂ 30%) e temperatura (45°C). A formação de um produto de degradação pode ser observada na condição do estresse oxidativo com solução de H₂O₂ 30% de acordo com as figuras 2, 3 e 4.

Tabela 2. Preparo das amostras para ensaio de degradação induzida.

Id	Condição de degradação	Agente indutor	Volume da amostra (mL)	Volume do agente indutor (mL)	Diluyente
1	Hidrólise ácida	HCl 0,1mol L	1,0	2,0	Água
2	Hidrólise básica	NaOH 0,1mol L ⁻¹	1,0	2,0	Água
3	Oxidação	H ₂ O ₂ 3%	1,0	2,0	Água
4	Oxidação	H ₂ O ₂ 10%	1,0	2,0	Água
5	Oxidação	H ₂ O ₂ 30%	1,0	2,0	Água
6	Temperatura	45°C por 60 min.	1,0	-	Água

Limite de detecção e quantificação

As estimativas do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram obtidas a partir dos dados das regressões lineares da curva de calibração considerando-se o desvio padrão do intercepto com o eixo y (s) e a inclinação da curva (S). Para o LD considerou-se o fator de multiplicação 3 e para o LQ o fator de multiplicação foi 10.

Robustez

Avaliou-se o parâmetro robustez por meio da

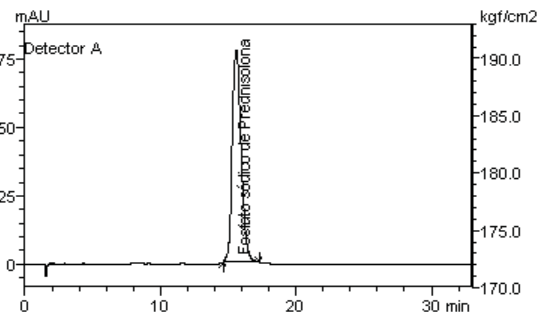


Figura 2. Cromatograma da solução padrão de fosfato sódico de prednisona.

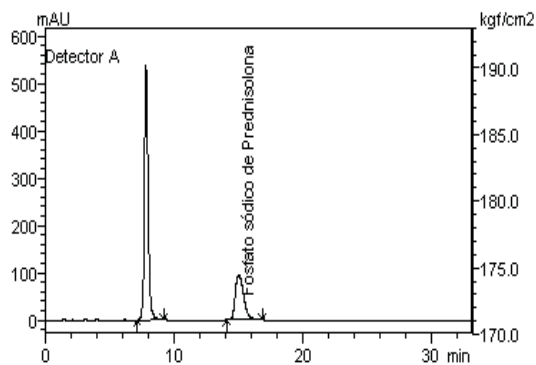


Figura 3. Cromatograma da solução amostra de fosfato sódico de prednisolona. O pico em tempo de retenção de oito minutos refere-se ao componente da formulação (excipiente).

Avaliou-se se o método já previamente validado para a quantificação do fármaco também é adequado para o estudo de produtos de degradação, ou seja, se o método é indicativo de estabilidade, avaliando-se os parâmetros de limite de detecção, especificidade e robustez.

Especificidade

A figura 4 apresenta o cromatograma obtido na análise de especificidade, apresentando a amostra submetida à degradação oxidativa.

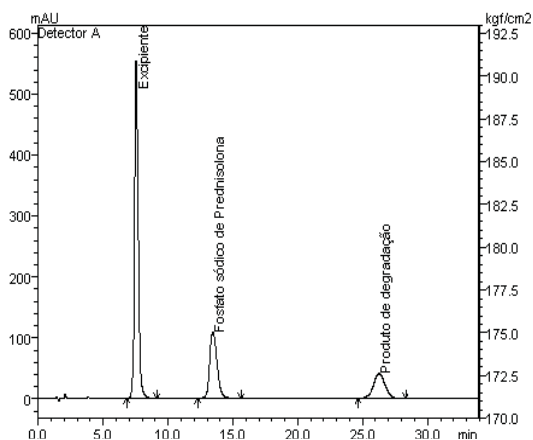


Figura 4. Solução amostra submetida ao estresse oxidativo.

Os picos de FSP e do excipiente (componente da formulação da solução oral) e do produto de degradação observados no cromatograma da solução amostra após degradação induzida apresentaram boa resolução cromatográfica com assimetria adequada (Tabela 3). A pureza dos mesmos foi observada utilizando-se detector com arranjo de fotodiodo (PDA), onde se observaram os espectros de ultravioleta dos picos do FSP (Figura 5a) e do seu produto de degradação (Figura 5b) na solução amostra stressada.

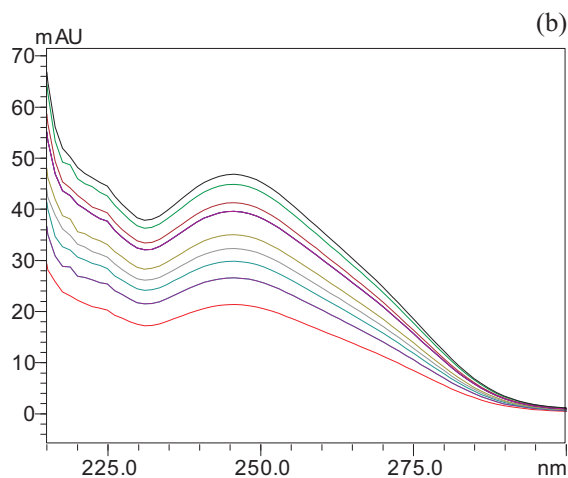
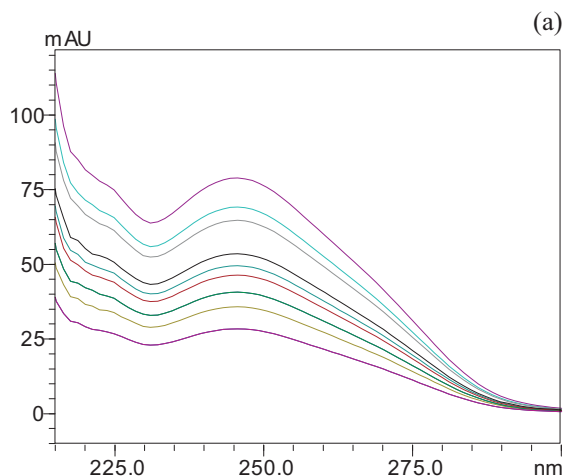


Figura 5. Espectros de absorção na região do UV para o pico de fosfato sódico de prednisolona (a) e para o pico de degradação de fosfato sódico de prednisolona (b).

Os espectros de UV em diferentes tempos de eluição dos picos avaliados apresentaram mesmas bandas máximas e mínimas de absorção, demonstrando pureza adequada, ou seja, que os picos se referem apenas aos seus respectivos compostos. Também demonstra que ambas as estruturas são semelhantes, em relação aos seus grupos cromóforos.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e quantificação para FSP foi calculado a partir da curva de calibração obtendo-se a concentração de 48 ng mL⁻¹ para o limite de detecção e 161 ng mL⁻¹ para o limite de quantificação.

Robustez

A robustez foi avaliada por meio da análise da amostra submetida à degradação induzida, na qual obteve-se a formação de um pico correspondente ao

produto de degradação. Esta amostra foi analisada nas condições cromatográficas com suas pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

A Tabela 3 apresenta os valores da resolução entre os picos do excipiente, do FSP e de seu produto de degradação observados na solução amostra sob degradação induzida.

Estudo da degradação do fármaco

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para determinação da condição mais drástica, com a variação na concentração de peróxido de hidrogênio e temperatura.

As Figuras 6 e 7 apresentam os resultados obtidos na análise da amostra submetida à degradação oxidativa (H₂O₂ 30%) e temperatura (60°C) para análise da cinética da degradação do fármaco FSP. Foram obtidos os gráficos da degradação do FSP em meio oxidativo, concentração normalizada do fármaco (mol L⁻¹) em relação ao tempo (h) (Figura 6)

Tabela 3. Resolução (Rs) entre os picos do excipiente (Pico 1) e fosfato sódico de prednisolona (Pico 2) e o seu produto de degradação (Pico 3).

Parâmetro	Rs – Picos 1 e 2	Rs – Picos 2 e 3
Método sem alteração	7,85	9,71
Robustez fluxo da fase móvel – 1,0 mL min ⁻¹ para 0,9 mL min ⁻¹	8,45	9,47
Robustez temperatura do forno de colunas – 30°C para 40°C	8,59	9,48
Robustez - diferentes lotes de coluna	7,91	9,96

Tabela 4. Degradação do fosfato sódico de prednisolona (%), com diferentes concentrações de H₂O₂ e temperatura.

Identificação	0h	6 h		18 h	
		60°C	45°C	60°C	45°C
Amostra controle	97,17	-	-	-	-
Amostra H ₂ O ₂ 3%	98,77	82,70	94,10	52,96	85,07
Amostra H ₂ O ₂ 10%	97,61	57,85	84,23	16,82	65,12
Amostra H ₂ O ₂ 30%	95,22	17,25	62,20	4,38	33,99

e do logaritmo natural (\ln) da concentração em relação ao tempo (Figura 7).

Observam-se duas velocidades de degradação do FSP de acordo com o tempo e o gráfico da figura 7 indica uma cinética de primeira ordem. A equação da reta para a primeira etapa de degradação é

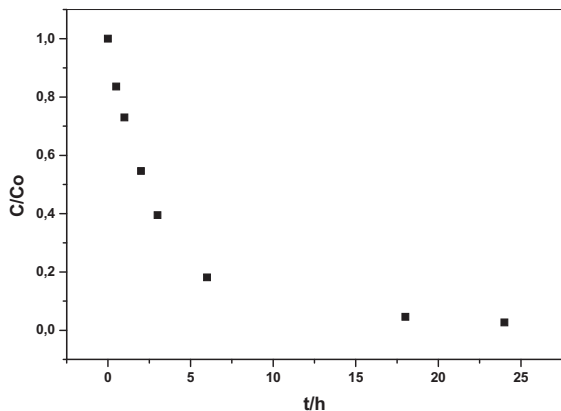


Figura 6. Cinética de degradação do fosfato de prednisolona em meio oxidativo (H_2O_2 30%) e temperatura de 60°C . C_0 é a concentração inicial em mol L^{-1} e C as concentrações ao longo do tempo.

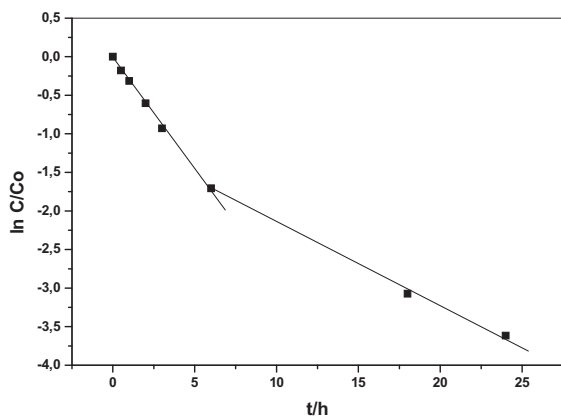


Figura 7. Cinética de degradação do fosfato de prednisolona em meio oxidativo (H_2O_2 30%) e temperatura de 60°C , utilizando-se o logaritmo da concentração. C_0 é a concentração inicial em mol L^{-1} e C as concentrações ao longo do tempo.

igual a: $y = -0,03194 - 0,28353x$ com $r = -0,9990$ e para a segunda etapa de degradação é igual a: $y = -1,08412 - 0,10719x$ com $r = -0,9986$.

No tempo até 6 horas da degradação, a constante k , obtida da inclinação da reta, é de $0,28353 \text{ h}^{-1}$ e para o tempo acima de 6 horas, a constante cinética é de $0,10719 \text{ h}^{-1}$. O valor do tempo de meia vida, $t_{1/2}$, para a cinética de primeira ordem, é de 2,44 horas para a primeira etapa de degradação e 6,46 horas para a segunda etapa.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve a prednisolona com resistente a degradação em estudos realizados por 30 dias em condições de 100 % de umidade a 50°C , na ausência de luz [8]. Na literatura encontram-se também trabalhos que mostram que a estabilidade deste fármaco tem alta dependência da concentração da solução tampão e que metais traço presentes atuam como catalisadores da degradação, indicando que a adição de agentes sequestrantes elimina esta dependência [9]. Já o acetato de prednisolona na formulação de suspensão oral apresenta degradação à temperaturas acima de 50°C e em pH acima de 6,00 [10].

Este estudo é importante para conhecer o mecanismo de degradação do princípio ativo estudado, a velocidade com que este forma produtos indesejáveis que possibilitam determinar o tempo de análise para prevenir interferentes.

Conclusão

O estudo foi realizado de acordo com o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, analisando-se todos os parâmetros pertinentes à classe II, para análises de ensaio limite.

Por meio dos resultados demonstrados no presente estudo pode-se avaliar que o método proposto para estudo do processo de degradação de Fosfato sódico de Prednisolona solução oral é específico e robusto, atendendo às exigências das aplicações analíticas e assegurando a confiabilidade do mesmo.

O estudo da degradação do fármaco comprovou que em condição mais drástica de indução oxidativa (H_2O_2 30%) e temperatura a 60°C , a degradação é dependente de sua concentração, em uma cinética de primeira ordem, permitindo prever a velocidade de degradação do mesmo.

Desta forma, pode-se considerar este método adequado para investigação da formação de produtos de degradação na forma farmacêutica solução oral.

Abstract: This work was to investigate the process of degradation of the drug Prednisolone Sodium Phosphate (FSP) in oral solution dosage form through the degradation experiments, evaluating the parameters in accordance with Resolution 899/2003 ANVISA and the degradation process of the drug. The method by high performance liquid chromatography (HPLC) developed for the determination of the drug was validated to demonstrate its applicability as an indicator of stability, ensuring reliability. After the method be validated to study the degradation of the drug, it was shown that drastic conditions of oxidative stress (H_2O_2 30%) and temperature $60^\circ C$, the degradation of the drug is dependent on its concentration (first order kinetics). The results were satisfactory, showing that this method is suitable to investigate the formation of degradation products in oral dosage form solution.

Keywords: prednisolone sodium phosphate, stability study method, degradation.

Referências

- [1] ICH, Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference harmonization, IFPMA, Geneva, 1993.
- [2] FDA, Guidance for Industry: Stability Testing of Drug Substances and Drug Products (Draft Guidance), Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1998.
- [3] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE N° 01 de 29 de Julho de 2005 – Guia para a realização de estudos de estabilidade.
- [4] M. Bakshi, S. Singh. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28 (2002) 1011-1040.
- [5] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anexo da Resolução – RE n°. 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.
- [6] THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA XXX edition. United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, 2007.
- [7] A. Korolkovas. Dicionário terapêutico Guanabara. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, Edição 2001/2002.
- [8] WHO. Accelerated Stability Studies of Widely Used Pharmaceutical Substances Under Simulated Tropical Conditions, 1986. 119 p.
- [9] T.O Oesterling, D. E. Guttman. Journal of Pharmaceutical Sciences, 53 (10) (1964) 1189-1192.
- [10] S. Asotra, S. Gao, A. Yacobi. US Patent 7799331 (2010).

