

ESTUDO COMPARATIVO DE DEGRADAÇÃO OXIDATIVA ENTRE OS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR DA CICLOBENZAPRINA ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA

Ivaldo de Souza Marinho¹; Lucas de Oliveira Monte²; Steno Lacerda de Oliveira³

¹Graduando em Farmácia pela Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba

²Co-Orientador, Farmacêutico da Universidade Federal de Campina Grande

³Docente e Orientador da Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba

Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba, ivaldodesouza@farmacia.com.br

Resumo: A dor muscular está relacionada com os nociceptores que são terminações nervosas conectadas ao sistema nervoso central. Quando o indivíduo apresenta dor aguda que seja ocasionada por espasmos musculares ou por desordem inflamatória, a terapia com medicamentos às vezes pode desempenhar um papel muito importante no processo de tratamento, para isso, são utilizados medicamentos relaxantes musculares que podem ser de ação central, ação periférica ou de atuação direta no músculo. Um dos medicamentos mais utilizados para o tratamento da dor muscular é o cloridrato de ciclobenzaprina, que é um fármaco de ação central, cujo mecanismo de ação ainda não está bem elucidado, mas acredita-se que sua ação se dá pelo bloqueio do sistema serotoninérgico. A realização do estudo de degradação forçada avalia a estabilidade intrínseca bem como verifica os produtos de degradação, sendo considerado, um estudo primordial para as indústrias farmacêuticas para que desta forma se consiga estabelecer formulações com qualidade e estáveis, para tanto, este trabalho tem como objetivo realizar um estudo comparativo da degradação oxidativa entre os comprimidos de referência, genérico e similar da ciclobenzaprina. Para o teste de degradação oxidativa foi triturado um comprimido de cada apresentação do medicamento de referência, genérico e similar, após a trituração os mesmos foram solubilizados em 2 mL de etanol e em seguida foram completados o volume de 100 mL com solução estressante de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. Seis amostras foram preparadas, onde três amostras contendo as respectivas apresentações referência, genérico e similar ficaram reservadas em temperatura ambiente e protegidas da luz e outras três amostras foram submetidas a aquecimento em banho-maria em temperatura de 60° C por um período de 24 horas. Após esse período retirou-se uma alíquota de cada amostra, tanto da temperatura ambiente quanto das amostras submetidas a temperatura de 60° C e aplicou na placa cromatográfica, após secagem da placa foi analisado o perfil cromatográfico por meio da câmara de ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm, com as revelações das manchas foi possível observar a degradação do fármaco em suas respectivas apresentações quando comparado com a placa cromatográfica padrão. Assim pode-se concluir que dentre os métodos analíticos, a CCDA mostrou-se ser uma técnica de baixo custo, rápida e sensível na determinação do Rf.

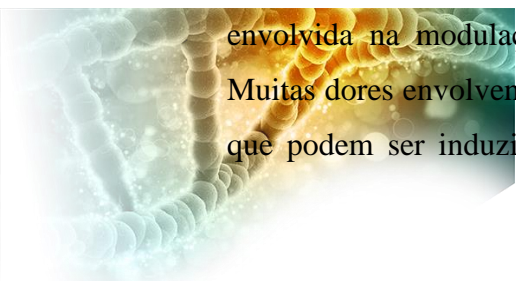
Palavras-chave: Degradação forçada, ciclobenzaprina, cromatografia.

Introdução: A dor muscular está relacionada com os nociceptores que são terminações nervosas conectadas ao sistema nervoso central. É fato que a dor muscular está diretamente envolvida na modulação e sustentação das fibras aferentes após a inflamação muscular. Muitas dores envolvendo a musculatura parecem ter início a partir de processos inflamatórios que podem ser induzidos por exercícios ou esforços

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br



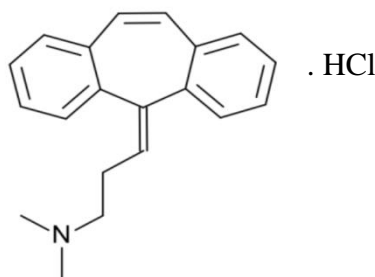


físicos, durante esse processo há uma liberação de citocinas que medeiam essa resposta de dor muscular (FREITAS, 2012).

Quando o indivíduo apresenta dor aguda que seja ocasionada por espasmos musculares ou por uma desordem inflamatória, a terapia com medicamentos muitas vezes pode desempenhar um papel muito importante no processo de tratamento, para este tratamento farmacológico são utilizados os relaxantes musculares que podem ser de ação central, ação periférica ou de atuação direta no músculo (LISBOA, 2008).

O cloridrato de ciclobenzaprina é um medicamento muito utilizado para o tratamento da dor muscular, é um fármaco de ação central, seu mecanismo de ação ainda não está bem elucidado, mas acredita-se que ele age por meio do bloqueio dos sistemas serotoninérgicos (BRIOSCHI, 2006). É um fármaco comercializado na forma de comprimidos nas concentrações de 5 mg e 10 mg (BRASIL, 2012). Apresenta-se na forma de sal, sendo um sal amino tricíclico (Figura 1), possui peso molecular 311,9 g/mol, é apresentado sob um pó cristalino branco, solúvel em etanol, ligeiramente solúvel em clorofórmio e praticamente insolúvel em hidrocarbonetos, possui pK_a 8,47 (BRIOSCHI, 2006).

Figura 1. Estrutura molecular do cloridrato de ciclobenzaprina.

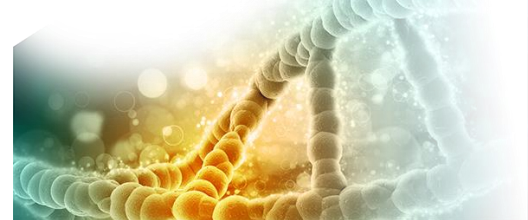


Fonte: BRIOSCHI (2006).

Por ser um fármaco indicado e bastante utilizado para o tratamento de dores musculares, faz-se necessário que as indústrias farmacêuticas realizem testes de qualidade de medicamentos como finalidade de comprovar sua segurança, qualidade e eficácia e desta forma, cheguem ao consumidor de forma inalterada para que não comprometa a terapia (ROCHA; GALENDE, 2014).

A realização do estudo de degradação forçada avalia a estabilidade intrínseca bem como verifica os produtos de degradação, sendo considerado, um estudo primordial para as indústrias farmacêuticas para que desta forma se consiga estabelecer formulações com





qualidade e para que se obtenha o registro dos medicamentos no órgão competente (SILVA et al., 2009).

Para os testes de degradação forçada os modelos do estudo necessitam ser variadas para que assim consiga obter um perfil de degradação aceitável. Os parâmetros para obter esse perfil são variáveis, tais como: tempo de exposição do produto ao meio, temperatura e concentração do agente degradante (BRASIL, 2015).

As condições de estresse que são recomendados para medicamentos segundo MEIRELLES (2014), são mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Condições de estresse para realização do teste de degradação forçada

Parâmetros	Condições
Temperatura	70° C
Luminosidade	Luz ultravioleta ou fluorescente
Oxidação	H ₂ O ₂ 3%
Hidrólise ácida	HCl 0,1 mol.L ⁻¹
Hidrólise básica	NaOH 0,1 mol.L ⁻¹

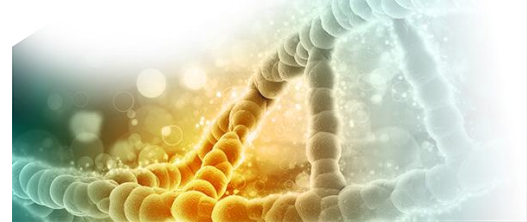
Fonte: MEIRELES (2014).

O guia da Conferência Internacional de Harmonização (ICH), determina que para os testes de estabilidade de medicamentos, esses devem ser realizados sob distintas condições de estresse e posteriormente deverá validar o método indicativo de estabilidade para poder ser utilizado nas análises dos medicamentos. Essas condições deverão exceder seus valores de pH, oxidação, hidrólise ácida, hidrólise básica, luminosidade e temperatura para que dessa forma consiga atingir os objetivos (CARNEIRO, 2010).

Hidrólise

A reação de hidrólise é considerada como uma das reações comumente realizadas para o estudo de estabilidade de medicamentos. Este mecanismo de reação acontece por meio da presença de água que por sua vez vai ter a capacidade de atuar como um promotor de interações. Essas reações ditas hidrolíticas vão acontecer por meio de ataques do tipo nucleofílicos e vão promover a degradação de um medicamento ou de uma formulação em estudo. Esta estabilidade poderá ser influenciada por meio de absorção ou perda de água em





condições de umidade que fora proposta no período de estudo (MATOS, 2013).

ROLIM (2010), em seu estudo descreve que em estudos de estresse sob condição de hidrólise ácida, é empregado comumente o ácido clorídrico e no caso da hidrólise básica é empregado o hidróxido de sódio, onde suas concentrações vão variar de acordo com o tempo e temperatura em que cada fármaco vai ser exposto.

Termólise

O estudo da termólise, ou degradação térmica tem por finalidade degradar um determinado produto farmacêutico expondo-o em temperaturas elevadas e suficientes para que possa proporcionar a quebra de ligações, é um mecanismo conhecido também como pirólise (SOUZA, 2015). A temperatura é considerada um fator importante que tem grande influência na velocidade de reações, no entanto ela vem sendo empregada nos estudos de estabilidade de medicamentos. Por meio da termodegradação a estrutura química de uma determinada molécula pode sofrer diversas reações desde a descarboxilação até rearranjos (GONÇALVES, 2014).

Oxidação

A maioria dos casos de instabilidades de fármacos é causada pela degradação oxidativa. O mecanismo de oxidação ocorre por meio da retirada de um átomo eletropositivo ou pela inserção de um átomo eletronegativo. Muitas das reações de oxidação ocorrem por meio da influência do oxigênio molecular. Geralmente é utilizado o peróxido de hidrogênio para favorecer condições de estresse que são empregadas nos estudos de degradação forçada e estabilidade (ROLIM, 2010).

Fotólise

O mecanismo que envolve a fotólise inicia-se a partir da absorção de radiação eletromagnética e a maioria dos medicamentos apresenta princípio ativo com máxima absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético. Acredita-se que a radiação ultravioleta tem um grau muito energético e desta forma consegue oferecer condições de clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo então à degradação molecular. No entanto, é extremamente importante saber a fotoestabilidade dos fármacos e os produtos gerados a partir da degradação pela luz, porque alguns fármacos podem gerar produtos tóxicos quando são degradados tanto pela luz como por outros fatores (DIAS, 2014).





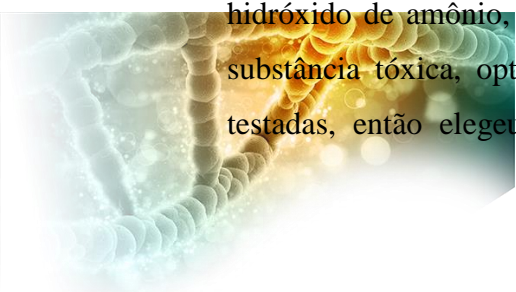
Seguindo esses critérios as indústrias farmacêuticas realizam distintas metodologias analíticas que são voltadas ao controle de qualidade de medicamentos, como cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar, mas uma das desvantagens desses métodos é o seu elevado custo. No entanto, a cromatografia em camada delgada é uma ferramenta analítica de fácil execução, baixo custo e bastante sensível, podendo esta ser utilizada pelas indústrias farmacêuticas para avaliar a qualidade dos seus produtos (TÓTOLI, 2013). Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo realizar um estudo comparativo do perfil do Rf (Fator de retenção), por cromatografia em camada delgada analítica, entre os medicamentos genérico e similar da ciclobenzaprina submetidos a testes de degradação oxidativa.

Metodologia: Tratou-se de uma pesquisa de natureza experimental, o qual foi abordado de forma qualitativa, tratando-se de um estudo de degradação forçada entre os medicamentos referência, genérico e similar do cloridrato de ciclobenzaprina. Para tanto, foi utilizado a cromatografia em camada delgada analítica para averiguar o Rf dos produtos de degradação dos fármacos quando os mesmos foram submetidos ao teste de degradação por oxidação.

Preparo das amostras: Para este teste foi triturado um comprimido de cada apresentação do medicamento de referência, genérico e similar, o pó resultante da trituração foi solubilizado em 2 mL de etanol e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, em seguida cada amostra foi completado o volume com a solução estressante de H₂O₂ a 3%.

Teste de degradação oxidativa: O total de amostras preparadas foi seis, onde três amostras foram vedadas com papel alumínio para serem protegidas da luminosidade as mesmas foram reservadas em temperatura ambiente e mais três amostras foram levadas ao banho-maria em temperatura de 60° C, todas as amostras foram submetidas ao estresse por um período de 24 horas. Com o intuito de comparar a degradação, a matéria-prima não foi submetida ao estresse oxidativo.

Avaliação por CCDA: A migração cromatográfica foi realizada em placas de sílica-gel e continham dimensões de 5x5 cm. Para a análise da ciclobenzaprina por CCD a farmacopeia Brasileira preconiza a mistura de solvente para fase móvel constituída por acetona, tolueno e hidróxido de amônio, porém devido os estudos descritos na literatura que o tolueno é uma substância tóxica, optou-se por outra fase móvel, diante disso várias fases móveis foram testadas, então elegeu-se a melhor fase móvel que

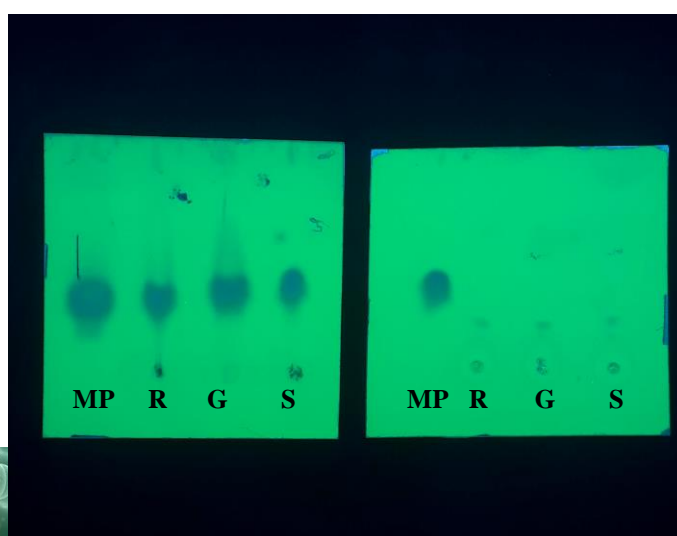




apresentou bons resultados na revelação das manchas, tal fase móvel fora constituída por uma mistura de solventes clorofórmio, acetado de etila e metanol na proporção de 6:2:1 (v/v/v) respectivamente. Com o auxílio de capilares de vidro foram coletadas pequenas alíquotas de cada amostra. As amostras foram aplicadas cerca de 1 cm da borda inferior, posteriormente as placas foram imergidas em uma cuba saturada com a fase móvel e esperou-se a eluição da mistura dos solventes percorrer toda a placa com a finalidade de calcular o Rf. Após a eluição completa as placas foram retiradas e postas para serem secadas em temperatura ambiente e em seguida foram analisadas em câmara de UV de comprimento de onda de 254 nm para visualização das manchas.

Resultados e Discussão: Após a análise dos resultados obtidos, foi possível averiguar por cromatografia em camada delgada analítica que os comprimidos de referência, genérico e similar obtiveram a mesma semelhança, ou seja, não houve diferença entre eles, apresentando-se degradação quando foram submetidos ao teste de degradação forçada por condições de estresse oxidativo. A degradação dos fármacos pôde ser comparada quando visualizadas o tamanho das manchas e o Rf das amostras tanto em temperatura ambiente quanto aos submetidos ao banho-maria a temperatura de 60° C. Os perfis cromatográficos das amostras após visualização em câmara de UV a 254 nm em temperatura ambiente e em temperatura de 60° C podem ser observadas na figura 1 e 2.

Figura 1. Perfil cromatográfico das amostras MP (matéria prima), R (referência), G (genérico) e S (similar). Antes (à esquerda) e depois (à direita) do teste de degradação oxidativa em temperatura ambiente por 24 horas.



Fonte: IVALDO (2018).

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

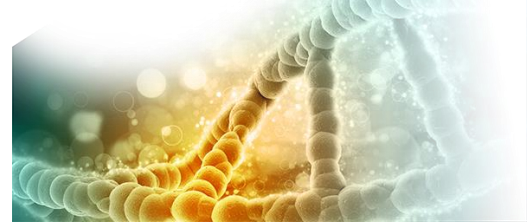
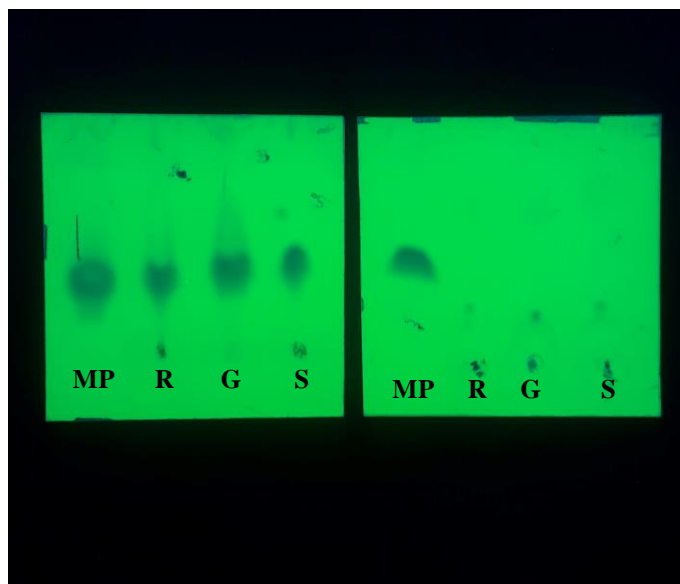


Figura 2. Perfil cromatográfico das amostras MP (matéria prima), R (referência), G (genérico) e S (similar). Antes (à esquerda) e depois (à direita) do teste de degradação oxidativa em banho-maria com temperatura de 60° C por 24 horas.



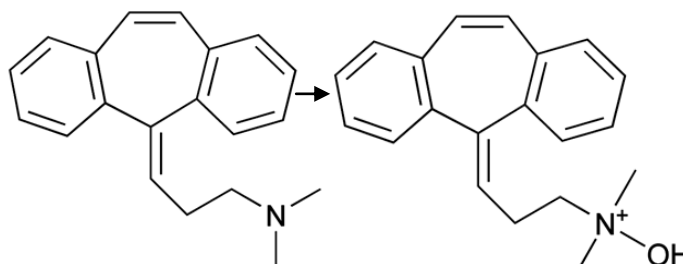
Fonte: IVALDO (2018).

O teste de degradação forçada para fármacos e medicamentos acaba se tornando uma ferramenta útil e de extrema importância para o desenvolvimento e produção de fórmulas farmacêuticas estáveis. Diante deste cenário, todas as etapas são importantes inclusive os testes por degradação oxidativa. Sendo assim o cloridrato de ciclobenzaprina mostrou-se ser um fármaco bastante susceptível a degradação por oxidação. Corroborando com os estudos realizados por LIU et al., (2014), em seu trabalho realizado por espectroscopia de massas o mesmo conseguiu identificar um produto gerado por degradação forçada em estresse oxidativo mostrado na figura 3.





Figura 3. Produto de degradação da ciclobenzaprina por degradação oxidativa em H₂O₂ a 3%, identificado por espectroscopia de massas.

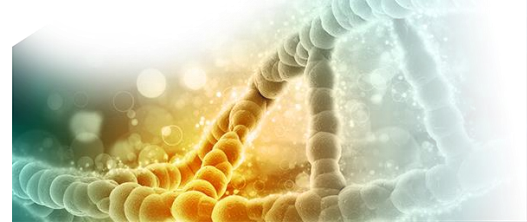


Fonte: LIU et al., (2014)

Nessa condição de estresse foi mostrado que as ligações duplas da ciclobenzaprina permaneceram estáveis, o sítio de modificação provavelmente ocorreu na amina terciária sendo identificada por um padrão de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por meio da peroxidação da ciclobenzaprina em condições de pH neutras (LIU et al., 2014). A degradação oxidativa do fármaco utilizando H₂O₂ a 3% favorece a um mecanismo de transferência de elétrons sendo possível a formação de ânions e cátions. Aminas, sulfetos e fenóis são susceptíveis a oxidação para formar N-óxidos, hidroxilamina e sulfóxidos (BLESSY et al., 2013).

O mecanismo de reação por oxidação envolve vários processos, podendo ser pela remoção de um átomo carregado positivamente ou pela adição de um átomo eletronegativo. O H₂O₂ na maioria das vezes é utilizado para gerar condições favoráveis para o estudo de oxidação podendo sua concentração variar entre 1 a 30%. Esta reação em muitos casos tem seu comportamento esperado, um fato em que alguns fármacos são vulneráveis a oxidação, enquanto outros fármacos mesmo quando submetidos em altas temperaturas e em concentrações de H₂O₂ a 30% não sofrem degradação (ORTAMANN, 2013). Um fato descrito no trabalho realizado por BAKSHI e SINGH (2004), ao realizar um estudo de degradação por oxidação com o fármaco tinidazol utilizando peróxido de hidrogênio a 3% percebeu-se que o fármaco não se degradou, ao aumentar a concentração do H₂O₂ para 30% houve uma degradação significativa do fármaco.

Desta forma percebe-se que a cromatografia em camada delgada analítica mostrou manchas disformes quando comparadas a placa padrão sugerindo então possível produto de degradação.



Conclusões: Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o cloridrato de ciclobenzaprina em suas apresentações degradou-se quando foi submetida nessas condições experimentais.

Essa degradação foi observada pelo perfil cromatográfico das manchas tornando a cromatografia em camada delgada analítica uma técnica bastante sensível, útil, de baixo custo e de fácil execução quando comparada aos métodos mais sofisticados existentes na atualidade, podendo ser empregada como método analítico de triagem para averiguar possíveis produtos de degradação gerados pelos testes de degradação forçada.

No entanto, são necessários outros métodos mais sofisticados para identificar tais produtos o que torna a cromatografia em camada delgada analítica um método de análise qualitativa.

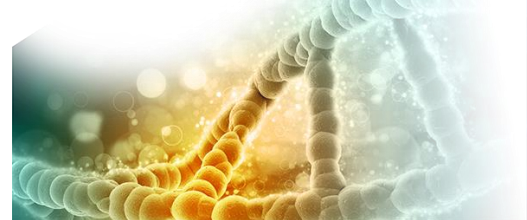




Referências

- BAKSHI, M.; SINGH, S. **HPLC and LC–MS studies on stress degradation behavior of tinidazole and development of a validated specific stability-indicating HPLC assay method.** Jour. Of pharm. And biom. Analy. v. 34, n. 3: p. 11-18. 2004.
- BLESSY, M.; RUCHI, D. P.; PARAJESH, N. P.; AGRAWAL, Y. K. **Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review.** Journ. of pharma. analys. v. 4, n. 3: p. 159-165. 2014.
- Brasil. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário Nacional da farmacopéia brasileira. 2 ed. Revisão 2; 2012; p. 224.
- Brasil. Ministério da saúde. Consultoria Jurídica/Advocacia Geral da União nota técnica nº 180/2012. Princípio Ativo: Ciclobenzaprina. Brasília, 2012 mai. p. 1-8.
- BRIOSCHI, T.; M.; L.; S. **Avaliação da bioequivalência de comprimidos contendo 10 mg de cloridrato de ciclobenzaprina** [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.
- CARNEIRO, W.; J. **Bioconversão e degradação da venlafaxina em seu metabólito ativo** [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás: 2010.
- DIAS, F.; L. **Desenvolvimento de validação de método indicador de estabilidade de formulações farmacêuticas de uso tópico contendo peróxido de benzoíla** [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo: 2014.
- FREITAS, N.; C.; C.; NASCIMENTO, A.; P. **Estudo de degradação forçada e avaliação da especificidade do método analítico para determinação de teor em atenolol comprimidos.** Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. v. 35, n. 2: p. 285-291. 2014.
- GONÇALVES, K.; H.; E. **Estudos de degradação forçada de fármaco fluoroquinolônicos assistidos por irradiação micro-ondas** [dissertação]. Anápolis: Universidade Estadual de Goiás: 2014.
- LISBOA, M.; V. **Laserterapia e farmacoterapia com relaxante muscular em masseter de ratos submetidos a desgaste oclusal: análise comparativa através de met e espectroscopia de raman** [tese]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2008.
- LIU, Y.; ZHAO, D.; ZHAO, Z. **Study of degradation mechanisms of ciclobenzapryne by LC- MS/MS.** The Roy. Soci. v.6, n. 1: p. 2320-2330. 2014.
- MATOS, A.; P.; S. **Estudos de compatibilidade fármaco-excipiente e sua importância no desenvolvimento de formulações farmacêuticas** [monografia]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz Farmanguinhos; 2013.
- MEIRELLES, L.; M.; A. **Estabilidade de medicamentos: Estado da arte.** Rev. Eletrônica farm. v. 11, n. 4: p. 06-26. 2014.
- ORTMANN, C.; F. **Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoide c-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii*** [Tese]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2013.
- ROCHA, T.; G.; GALENDE, S.; B. **A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica.** Rev. UNINGÁ. v. 20, n. 2: p. 97-103. 2014.





ROLIM, L.; A. **Estudo de degradação do fármaco benznidazol utilizado no combate a doença de chagas por hidrólise, oxidação, fotólise e termodegradação** [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2010.

SILVA, K.; E.; R.; ALVES, L.; D.; S.; SOARES, M.; F.; R.; PASSOS, R.; C.; S.; FARIA, A.; R.; ROLIM NETO, P.; J. **Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica**. Rev. Ciênc. Farma. Básica Apl. v. 30, n.2: p. 129-135. 2009.

SOUZA, A. **Desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade para medicamentos utilizados como diuréticos** [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2015.

TÓTOLI, E.; G. **Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis de ampicilina sódica**. [Dissertação]. Araraquara-São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2013.

