



Degradação forçada e análise fatorial para caracterização da estabilidade de formulações líquidas de carbocisteína

Emeline Karol Marin^{1,*}; Cristina Peretti Farina²; Deisi Christianetti²; Diogo Miron¹

¹Curso de Farmácia da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil.

²Laboratório Farmacêutico Vitamed, Caxias do Sul, RS, Brasil

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade de xaropes contendo carbocisteína, submetidos à degradação forçada, utilizando Desenho Experimental Fatorial (DEF). Os fatores avaliados foram pH (5,0; 6,5; 8,0), presença ou ausência de EDTA dissódico e metabissulfito de sódio (0,1%). Para o estudo de degradação forçada, as formulações foram submetidas a estresse térmico (50 °C e 75% UR) e oxidação com peróxido de hidrogênio a 3%. Posteriormente, as formulações foram analisadas quanto ao pH, propriedades organolépticas e teor de fármaco por CLAE-UV, nos tempos 0, 15 e 35 dias. Os resultados mostraram que as formulações submetidas à degradação forçada sofreram uma diminuição no teor do fármaco, enquanto que o pH se manteve relativamente estável. Em relação a cor, apenas as formulações que não possuíam antioxidantes mostraram-se mais escuras. A análise dos resultados do DEF mostrou interação significativa ($p < 0,05$) para os fatores pH/metabissulfito e EDTA/metabissulfito. As formulações contendo metabissulfito em pH 5,0 apresentaram maior degradação e as formulações com metabissulfito sem EDTA também não foram eficientes para impedir a degradação da carbocisteína.

Palavras-chave: Carbocisteína. Estabilidade. Degradação forçada. CLAE. Desenho experimental fatorial.

INTRODUÇÃO

A carbocisteína é comercializada principalmente na forma de xarope e foi primeiramente sintetizada próximo ao ano de 1930 a partir do aminoácido cisteína. Tornou-se disponível na década de 1960 para uso no tratamento de distúrbios do trato respiratório através da normalização da viscosidade do muco, facilitando a sua eliminação pelo movimento ciliar da expectoração (Ishibashi et al., 2010; Hooper & Calvert, 2008). Quimicamente, a carbocisteína

(Figura 1.a), corresponde ao ácido (2-R)-2-amino-3-[(carboximetil)sulfanil]propanóico que é solúvel em soluções de ácidos e álcalis diluídos, porém é praticamente insolúvel em água (European Pharmacopoeia, 2008; Manfio et al., 2007). O grupamento sulfeto (R-S-R') presente na carbocisteína é muito reativo e facilmente oxidado a sulfóxido (Figura 1.b) e a sulfona (Figura 1.c). Assim, destaca-se a importância deste grupamento na estabilidade do fármaco (Yoshioka & Stella, 2002; Smith & March, 2001).

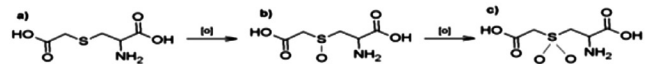


Figura 1. Estruturas químicas. a) carbocisteína; b) derivado sulfóxido e c) derivado sulfona.

A oxidação é uma rota de degradação de medicamentos bem conhecida. Os mecanismos de oxidação dependem da estrutura química do fármaco e da presença de espécies reativas de oxigênio ou outros oxidantes. O oxigênio participa na maioria das reações de oxidação e é abundante no ambiente que os medicamentos são expostos, do processamento ao armazenamento de longa duração (Zhou et al., 2009; Yoshioka & Stella, 2002).

O desenvolvimento de uma formulação farmacêutica deve considerar as potenciais reações químicas que o fármaco encontra-se sujeito e, assim, selecionar os adjuvantes farmacêuticos e materiais de acondicionamento que irão fornecer a estabilidade adequada ao medicamento. Dentre os adjuvantes que melhoram o produto, destacam-se os antioxidantes e quelantes. Os antioxidantes fornecem elétrons, que são aceitos mais prontamente pelos radicais livres enquanto que os agentes quelantes complexam-se com os íons metálicos que catalisam reações de oxidação, tornando estes indisponíveis. O metabissulfito de sódio, em concentrações adequadas, apresenta excelente atividade antioxidante favorecendo a estabilidade de medicamentos (Hondrum & Ezell, 1996; Lavoie et al., 1994). O EDTA é um dos quelantes mais utilizados em medicamentos, além de minimizar problemas de oxidação através da quelação de íons metálicos como ferro e cobre (Lachman, 1968), também pode potencializar a atividade de alguns antimicrobianos (Lambert et al., 2004).

A degradação forçada pode ser utilizada com o objetivo de reduzir o tempo gasto nos estudos de

Autor correspondente: Emeline Karol Marin - Centro de Ciências da Saúde Curso de Farmácia - Universidade de Caxias do Sul (UCS) - Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - CEP:95070-560 - Caxias do Sul - RS - Tel. (54) 9153-0062 - e-mail:emeline.marin@yahoo.com.br

desenvolvimento de formulações farmacêuticas. As condições de *stress* comumente aplicadas incluem: temperaturas elevadas (acima de 40 °C em incrementos de 10 °C), diferentes faixas de pH incluindo valores extremos, exposição à luz UV e/ou visível, exposição à umidade relativa (acima de 75%) e adição de agentes oxidantes. Estes estudos fazem parte da estratégia de desenvolvimento de medicamentos, pois proporcionam um prognóstico rápido e simples da estabilidade do fármaco e do produto (Reynolds et al., 2002; Singh & Bakshi, 2000).

A associação de técnicas estatísticas, como desenho experimental fatorial (DEF), aos estudos de formulações permite a avaliação de diversos fatores e suas interações em estudos relativamente fáceis de elaborar e interpretar com a ajuda de *softwares* específicos (Montgomery, 2005). O DEF é uma ferramenta que permite avaliar a influência de dois ou mais fatores em reações ou processos simultaneamente com a possibilidade de estimar a importância relativa de cada fator. Além disso, este tipo de abordagem permite a mensuração das interações entre fatores, sendo assim, de extrema relevância na avaliação de formulações, pois a atividade de antioxidantes, por exemplo, pode ser influenciada pelo pH da solução (Armstrong, 2006). Assim, o DEF, empregado em estudos de degradação forçada, auxilia e permite a escolha das formulações com melhor estabilidade através da definição da presença ou ausência ou ainda a determinação da concentração de um adjuvante específico e definição do pH e/ou viscosidade da formulação, por exemplo.

O teor de carbocisteína tem sido determinado por um número relativamente pequeno de técnicas analíticas, sendo muito comum o emprego da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção no UV (CLAE-UV) (Rele & Patil, 2010; Orlovic et al., 2004; Argekar et al., 1997). Esta técnica é reconhecida como uma das técnicas mais versáteis e poderosas na análise farmacêutica, sendo um dos métodos de escolha para os estudos de estabilidade de medicamentos.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a estabilidade de pré-formulações de carbocisteína, que foram submetidas à degradação forçada, utilizando o DEF como ferramenta auxiliar para a caracterização da influência dos diferentes fatores (pH, antioxidante e quelante) considerados nas formulações.

MATERIAL E MÉTODOS

Na preparação das formulações utilizou-se carbocisteína, produzida pela Ningbo Haishuo Biotechnology Co. LTD. (China), lote 081001, teor 99,5%. Como adjuvantes farmacêuticos foram utilizados: sorbitol, carbonato de sódio, metilparabeno, metabissulfito de sódio, EDTA dissódico, solução de HCl a 10%, corante caramelo P212 e aroma de amêndoas amargas. Foi utilizado padrão secundário de carbocisteína (teor 100,6%) padronizado a partir de padrão oficial produzido pela Farmacopeia Europeia. Foi utilizada solução de peróxido de hidrogênio a 3% como agente oxidante no estudo de degradação forçada.

Validação do Método Analítico

Método por CLAE-UV foi desenvolvido e validado para quantificação da carbocisteína nos estudos de

desenvolvimento de formulação/degradação forçada. As seguintes condições cromatográficas foram empregadas: cromatógrafo a líquido LaChrom (MERCCK®), coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈-Lichrospher® 100 RP-18 (250x4 mm, 5 µm). Como fase móvel foi empregado tampão fosfato de sódio 20 mM pH 2,4, fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. A detecção foi realizada em 215 nm.

Amostras de xarope, placebo e carbocisteína foram preparadas exclusivamente para avaliação dos parâmetros analíticos. O placebo foi preparado com as substâncias e quantidades definidas na Formulação 1.2 – Tabela 2, diferenciando-se apenas pela ausência do fármaco. A seletividade foi avaliada através da pureza de pico dos cromatogramas obtidos com a análise das amostras do placebo, agente oxidante (peróxido de hidrogênio) e carbocisteína. A robustez foi avaliada através de variações deliberadas no fluxo (0,8 ± 0,1 mL.min⁻¹), pH (2,4 ± 0,2) e de troca de coluna (ACE® C18 (250 mm X 4 mm, 5 µm)). A linearidade do método foi estabelecida na faixa de 50 – 150% com concentração teórica de 80 µg.mL⁻¹ (100%). A exatidão foi verificada através da recuperação da carbocisteína padrão em preparações contendo placebo na faixa linear (40 – 120 µg.mL⁻¹). A precisão do método foi determinada através da variabilidade verificada na análise de seis réplicas da amostra de xarope (preparado com as substâncias e quantidades definidas na Formulação 1.2 – Tabela 2, que incluem o fármaco e todos os adjuvantes farmacêuticos utilizados neste estudo) realizada em três diferentes dias por dois analistas.

Para análise da precisão do método, as amostras foram preparadas pesando-se, aproximadamente, 1,5 g do xarope em balão volumétrico (BV) de 100 mL e o volume foi completado com água ultrapura (MilliQ®). Desta solução, 4 mL foram diluídos em BV de 25 mL com fase móvel. Esta solução foi então filtrada através de filtro de Fluoreto Polivinidileno (PVDF) de 13mm x 0,45 µm e posteriormente analisadas por CLAE. As amostras pesadas foram convertidas para volume (mL) com uso da densidade relativa de cada formulação, para se obter os resultados de carbocisteína em mg.mL⁻¹. O padrão foi preparado pesando-se 50 mg de carbocisteína em BV 100 mL, que foi solubilizado com um mL de NaOH 0,1 M e o volume foi completado com água ultrapura. Esta solução foi diluída com fase móvel para obtenção de concentração de fármaco de 80 µg.mL⁻¹.

Preparo das formulações

Considerando que a carbocisteína é suscetível à oxidação em solução aquosa (neste estudo foram preparados xaropes contendo sorbitol como agente de viscosidade), foram definidos como fatores críticos para a estabilidade do fármaco: pH, presença de íons que possam catalisar reações e presença de antioxidante. A influência destes fatores na degradação da carbocisteína foi avaliada com auxílio de DEF considerando: pH (em três níveis), presença ou ausência de quelante (EDTA dissódico) e presença ou ausência de antioxidante (metabissulfito de sódio). Desta forma, foram desenvolvidas quatro formulações com e sem metabissulfito (0 e 0,1%) e EDTA (0 e 0,1%). Cada formulação foi ajustada a um valor de pH, totalizando doze formulações diferentes (Tabela 1).

Tabela 1 – Desenho Experimental Fatorial (DEF) indicando os fatores considerados críticos para estabilidade da carbocisteína apresentada na forma de xarope.

Formulação	pH	EDTA (%)	Metabissulfito (%)
1.1	8,0	0,1	0,1
1.2	6,5	0,1	0,1
1.3	5,0	0,1	0,1
2.1	8,0	0,0	0,1
2.2	6,5	0,0	0,1
2.3	5,0	0,0	0,1
3.1	8,0	0,1	0,0
3.2	6,5	0,1	0,0
3.3	5,0	0,1	0,0
4.1	8,0	0,0	0,0
4.2	6,5	0,0	0,0
4.3	5,0	0,0	0,0

Os xaropes foram obtidos através da dispersão da carbocisteína (concentração final 50 mg.mL⁻¹) em sorbitol (70%). A carbocisteína dispersa foi posteriormente solubilizada com a adição de solução de carbonato de sódio (2%) e agitação por aproximadamente uma hora. Em todas as formulações foram adicionados metilparabeno, corante caramelo P212 e aroma de amêndoas amargas, previamente dissolvidos em água. Em algumas formulações foram adicionados EDTA e/ou metabissulfito (ver Tabela 1). O pH das formulações foi ajustado com solução de HCl a 10%. As formulações foram acondicionadas em frascos PET (Polietileno Teuftalato) de 100 mL, cor âmbar, protegendo o fármaco da luz, conforme recomenda a Farmacopeia Europeia (European Pharmacopoeia, 2008).

O DEF completo foi elaborado com o auxílio do Programa *MiniTab16*[®] que foi utilizado para análise dos dados, obtenção da Análise de Variância (ANOVA) e gráficos dos fatores principais e interações.

Degradação forçada

Oxidação

Um frasco de cada formulação foi submetido à oxidação, adicionando-se 1 mL de solução de peróxido de hidrogênio a 3%. As amostras foram posteriormente armazenadas em câmara climática (Mecalor[®]) nas condições de 30 °C ± 2 °C / 75% ± 5% UR (Umidade Relativa), por 24 horas. As formulações foram avaliadas nos tempos 0 e 24 horas.

Estabilidade Térmica

Paralelamente, dois frascos de cada formulação contendo carbocisteína foram armazenados em dessecador de vidro isento de sílica, em estufa a 50 °C. Na base do dessecador, foi adicionado 500 mL de solução supersaturada de NaCl (40%) obtendo-se ambiente em torno de 75% UR (Greenspan, 1977). A base de porcelana

presente no dessecador evitou o contato da solução de NaCl com os frascos. A temperatura e UR foram monitoradas com auxílio de termohigrômetro. As formulações foram avaliadas quanto ao teor de carbocisteína por CLAE-UV nos tempos 0, 15 e 35 dias.

Análise das Formulações

As formulações foram analisadas quanto ao teor de carbocisteína, pH e propriedades organolépticas (cor e odor). O pH das formulações foi medido diretamente nos frascos em duplicata.

O teor de carbocisteína, nas formulações avaliadas ao longo do tempo, foi determinado pelo método de CLAE-UV validado e as amostras foram preparadas de forma similar as amostras empregadas no teste de precisão.

RESULTADOS

Validação do Método Analítico

Método para determinação de carbocisteína em xarope foi desenvolvido e validado conforme Resolução Específica 899/03 da ANVISA (Brasil, 2003). Em relação à especificidade não se verificou ombro ou aumento da assimetria no pico da carbocisteína, na análise visual dos cromatogramas da carbocisteína e oxidante + placebo + carbocisteína (Figura 2.a). Não houve sobreposição dos picos do fármaco e do degradado (Resolução > 2,00). Não foi detectada impureza na análise de pureza do pico da carbocisteína mostrando que o método foi seletivo (Figura 2.c).

Resultados satisfatórios foram obtidos para os parâmetros analíticos: robustez, linearidade, exatidão e precisão (Tabela 2). Desta forma, pode-se considerar o método analítico para determinação da carbocisteína em xarope por CLAE-UV validado e indicativo de estabilidade para as condições estabelecidas (oxidação com peróxido de hidrogênio).

Tabela 2. Resultados dos parâmetros analíticos avaliados na validação da determinação de carbocisteína por CLAE-UV.

Parâmetro Analítico	Resultados
Especificidade	Pureza de pico: faixa 200-250 nm; compensação da linha de base 0,2-1,0 min; Índice de Pureza 1,000
Robustez	DPR = 0,97% (n = 6)
Linearidade	Faixa 40-120 µg.mL ⁻¹ ; Equação y=596242x+31254; r=0,9998; Resíduos normalmente distribuídos sem presença de valor atípico (n = 15)
Exatidão	Recuperação de 99,9%; IC _{95%} 99,3-100,5% (n = 9)
Precisão	Repetibilidade DPR=0,84% (n=6); Precisão Intermediária DPR=1,12% (n=18)

DPR – Desvio Padrão Relativo; n – número de amostras analisadas; IC_{95%} – intervalo de confiança 95%.

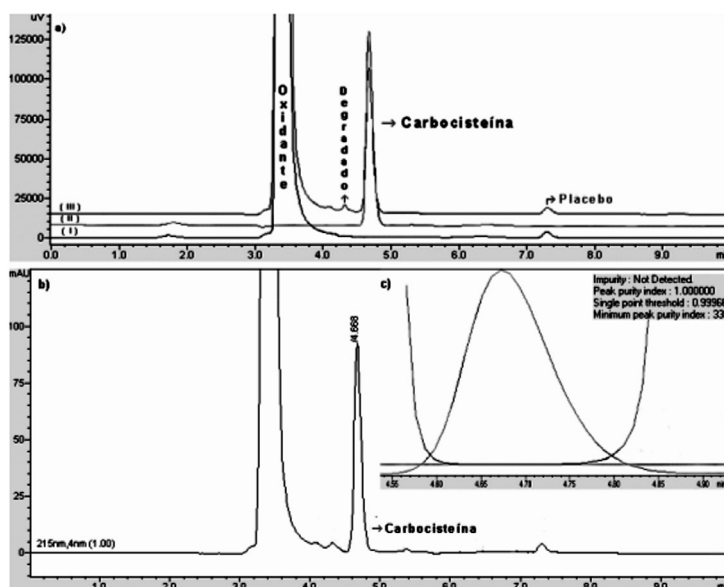


Figura 2. Especificidade do método por CLAE-UV para Carbocisteína. a) Sobreposição de cromatogramas em 215 nm (I) Oxidante+placebo; (II) Carbocisteína; (III) Oxidante+placebo+Carbocisteína (acondicionados por 7 dias a 50°C). b) Cromatograma da oxidante+placebo+carbocisteína. c) Pureza do pico da carbocisteína obtido com detector de arranjo de diodos.

Teor de Carbocisteína nas Formulações e Análise Fatorial

Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam que o fármaco quando submetido à oxidação com peróxido de hidrogênio e à elevada temperatura e umidade sofreu redução no seu teor.

Tabela 3 – Resultados do teor de carbocisteína determinado por CLAE-UV nas formulações de xarope submetidas à degradação forçada.

Formulação	Teor (%)		
	t = 0 ^a	H2O2 ^a	t = 15 dias ^b
1.1	102,8 ± 1,20	83,8±0,99	100,6±0,68
1.2	103,3 ± 0,93	82,5± 1,29	101,6± 3,05
1.3	104,1 ± 0,64	81,5±0,60	95,0±0,54
2.1	98,4 ± 0,24	77,4±0,59	92,6±3,96
2.2	96,7 ± 0,51	76,1±0,06	92,0±1,73
2.3	99,7 ± 0,29	76,5±0,07	90,6±2,78
3.1	97,4 ± 0,58	79,7± 1,56	90,8± 0,26
3.2	98,1 ± 0,68	75,4±0,29	94,8±2,11
3.3	97,8 ± 0,80	80,5±1,43	96,6±2,80
4.1	100,2 ± 0,27	83,5±0,42	97,2±0,84
4.2	96,0 ± 0,06	80,9±0,92	95,2±2,82
4.3	97,8 ± 0,31	81,7±0,32	94,7±0,32

^a Teor medido após adição de peróxido e armazenamento em 30°C / 75% UR por 24 horas.

^b Armazenamento a 50°C / 75% UR.

^c Média ± desvio padrão relativo para n = 2.

O DEF deve levar em consideração ações para reduzir o acaso, enfatizar o efeito dos fatores, além da utilização de amostras com réplicas para estimativa do erro e determinação da significância estatística dos fatores principais e suas interações. Desta forma, os estudos ficam sujeitos à preparação e análise de muitas réplicas, sendo que rapidamente o estudo torna-se inviável. Contudo, é interessante que os estudos de desenvolvimento de medicamentos sejam rápidos e práticos, alcançando resultados satisfatórios em um curto período de tempo para, então, submeter a formulação selecionada imediatamente à produção e sucessiva avaliação da estabilidade nas condições determinadas pela ANVISA (Brasil, 2005).

Neste estudo, em vez de se utilizar réplicas das formulações, preferiu-se utilizar a análise das mesmas formulações em diferentes dias. Porém, por se tratar de um estudo de estabilidade, as amostras apresentavam diferentes teores em função do tempo (Tabela 3 e Figura 3.a). Isto inviabiliza a utilização dos resultados dos diferentes dias como réplicas na análise dos resultados do DEF, pois claramente os dados dos diferentes dias possuem diferentes medidas de tendência central e dispersão. Porém, a padronização dos resultados (Eq. 1) torna os dados homogêneos, permitindo assumir os dois tempos de análise como sendo duplicatas, pois a mediana e a amplitude, após padronização, ficaram muito semelhantes (Figura 3.b). Para esta padronização foram aplicados os resultados de % de fármaco dos tempos 15 e 35 dias na seguinte fórmula:

$$Z_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}$$

Equação 1. Onde: Z_{ij} é o teor padronizado de fármaco na formulação i do dia j ; x_{ij} é a % de fármaco na formulação i do dia j ; \bar{x}_j é a média das % de fármaco no dia j ; s_j é o desvio padrão das % de fármaco do dia j .

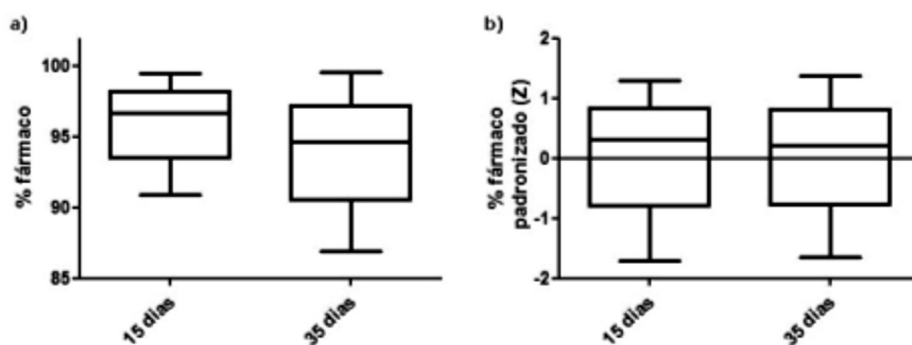


Figura 3. *Box-Plot* do teor de carbocisteína das doze formulações de xarope em diferentes dias. a) resultados originais sem padronização; b) resultados padronizados.

Os resultados do percentual de carbocisteína das formulações submetidas à estabilidade térmica foram padronizados e utilizados na análise estatística do DEF, de forma que cada formulação passou a ter dois resultados de teor de fármaco (um para cada dia de análise). A obtenção de duplicatas de análise para cada formulação permitiu que o erro experimental fosse estimado e a significância estatística dos fatores principais e interações pudesse ser testada através da Análise de Variância (ANOVA) (Tabela 4).

Tabela 4. ANOVA dos resultados padronizados do teor de carbocisteína no estudo de estabilidade térmico.

Fontes de Variação	SQ	gl	QM	F	p
pH	5,932	2	2,966	7,86	0,007*
EDTA	0,595	1	0,595	1,58	0,233
Metabissulfito	1,949	1	1,949	5,16	0,042*
pH.EDTA	0,536	2	0,268	0,71	0,511
pH.Metabissulfito	5,597	2	2,798	7,41	0,008*
EDTA.Metabissulfito	2,319	1	2,319	6,14	0,029*
pH.EDTA.Metabissulfito	0,535	2	0,268	0,71	0,512
Erro Experimental	4,529	12	0,377		

* Fatores e interações considerados significativos ($p < 0,05$).

SQ: Soma dos quadrados; gl: graus de liberdade; QM: quadrado médio ou variância; F: Valor do *Teste F*; p: valor de probabilidade.

Os fatores pH, EDTA e Metabissulfito de Sódio não foram avaliados/interpretados isoladamente, pois apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) em suas interações. A análise gráfica da interação entre pH e metabissulfito permite determinar que a maior degradação de carbocisteína ocorreu quando a formulação continha metabissulfito (antioxidante) e o valor de pH foi ajustado a 5,0 (Figura 4.a). A interação observada entre EDTA e o metabissulfito mostra que, na presença de metabissulfito e ausência de EDTA, houve uma maior degradação do fármaco (Figura 4.b).

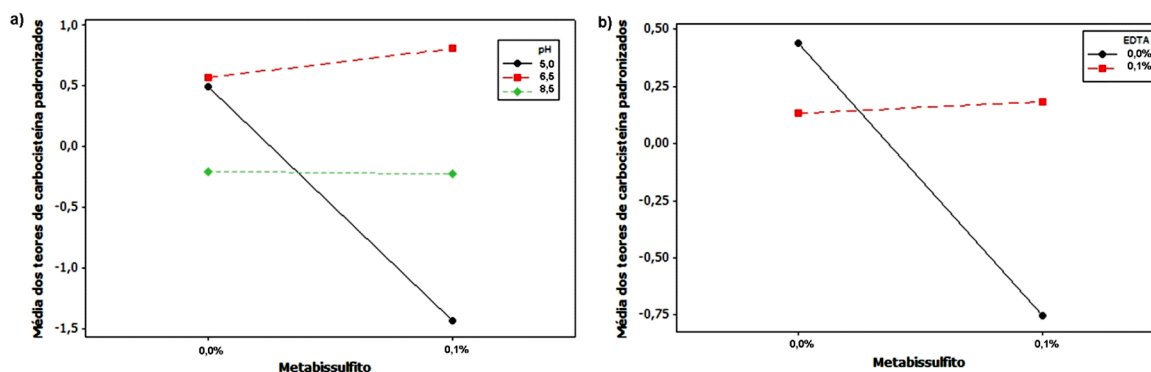


Figura 4. Gráficos das interações significativas obtidos dos resultados padronizados de teor de carbocisteína em xarope no estudo de estabilidade térmico. a) Interação entre pH e Metabissulfito; b) EDTA e Metabissulfito.

Na condição de oxidação com peróxido de hidrogênio, novamente a interação entre EDTA e metabissulfito foi significativa (Figura 5) com resultado similar ao observado no estudo de estabilidade térmica - na ausência de EDTA e presença do metabissulfito ocorre maior degradação do fármaco.

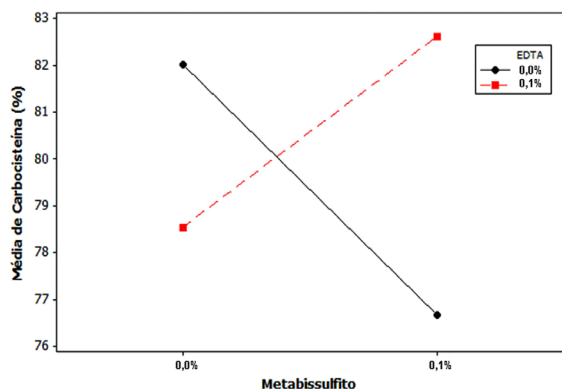


Figura 5. Interação entre EDTA e Metabissulfito no estudo de degradação forçada com peróxido de hidrogênio.

pH

Com relação aos resultados da determinação do pH, os valores (Tabela 5) não apresentaram alterações significativas em relação ao tempo zero, sugerindo comportamento relativamente estável de pH frente às condições testadas.

Tabela 5 – Valores de pH em função do tempo das formulações submetidas ao estudo de estabilidade térmico.

Formulação	pH	
	t = 0 *	t = 15 dias a*
1.1	7,80 ± 0,02	7,80 ± 0,00
1.2	6,55 ± 0,00	6,81 ± 0,00
1.3	5,03 ± 0,01	5,05 ± 0,00
2.1	7,89 ± 0,05	8,00 ± 0,00
2.2	6,59 ± 0,01	6,87 ± 0,01
2.3	4,89 ± 0,01	5,04 ± 0,01
3.1	7,80 ± 0,04	7,82 ± 0,01
3.2	6,72 ± 0,01	7,09 ± 0,02
3.3	5,00 ± 0,01	5,12 ± 0,01
4.1	7,93 ± 0,02	7,98 ± 0,01
4.2	6,64 ± 0,01	6,98 ± 0,00
4.3	5,24 ± 0,01	5,51 ± 0,03

* Armazenamento a 50 °C / 75% UR.

* Média ± desvio padrão para n=2.

Propriedades organolépticas

As soluções foram analisadas em todos os tempos quanto às propriedades organolépticas, e o odor

característico de enxofre se acentuou ao longo do tempo, em todas as formulações. Em relação ao aspecto foi observada uma coloração mais escura nas formulações 3.1, 3.2, 3.3, 4.1, 4.2, 4.3 no tempo 35 dias. Para o restante das formulações não se verificou alteração na coloração da formulação nos tempos analisados (0, 15 e 35 dias).

DISCUSSÃO

O metabissulfito de sódio em contato com a água é imediatamente convertido em cátion sódio e ânion bissulfito e, em meio ácido, forma dióxido de enxofre molecular gasoso (Ando, 2009; Kibbe, 2000). Segundo Ando (2009), o dióxido de enxofre por se comportar como uma espécie aceptora de elétrons pode formar complexos com aminas primárias. Deste modo sugere-se que esta reação esteja ocorrendo com a amina primária presente na carbocisteína, causando a diminuição do teor nas formulações onde o metabissulfito está presente, e encontra condições favoráveis (pH 5,0) para a formação de SO₂.

A interação entre EDTA e metabissulfito foi verificada tanto na degradação forçada com peróxido de hidrogênio quanto na térmica. A ausência de EDTA e presença de metabissulfito aumentaram a degradação do fármaco, possivelmente devido à presença de íons metálicos não quelados que catalisam a degradação do metabissulfito que, por sua vez, degrada o fármaco.

Os melhores resultados de estabilidade térmica foram observados com as formulações 1.1 e 1.2 (com EDTA e com metabissulfito, nos pH 8,0 e 6,5, respectivamente). A formulação 1.2 apresentou resultados satisfatórios com degradação mínima, após 35 dias de estudo. Sendo que se sugere o emprego de EDTA e metabissulfito com pH ajustado a 6,5 para formulações líquidas do tipo xarope que contenham a carbocisteína.

A análise das propriedades organolépticas permitiu determinar que as formulações que mais escureceram no tempo 35 dias foram as que não possuíam metabissulfito (agente antioxidante que previne a oxidação). Porém, deve-se notar que resultados com grande degradação de fármaco foram observados mesmo na presença de metabissulfito, especialmente quando o pH da formulação foi 5,0. Isto pode estar associado à reação do grupamento amina primária da carbocisteína com SO₂ formado a partir do metabissulfito, sem que houvesse alteração na coloração da formulação. Desta forma, conclui-se que o metabissulfito protege a carbocisteína da oxidação, contudo o pH da formulação deve ser cuidadosamente ajustado para que reações secundárias do antioxidante não prejudiquem a estabilidade da formulação em termos de teor de fármaco.

Além disso, a utilização do DEF na fase de desenvolvimento minimizou o número de experimentos, pois todos os fatores e interações envolvidos foram considerados em um único experimento com doze formulações, sem o desgaste da avaliação individual de cada fator. Assim, se obteve resultados significativos, economizando tempo e recursos. A utilização da padronização dos resultados de teor de carbocisteína de diferentes dias de análise mostrou-se como uma boa alternativa para execução e interpretação dos resultados obtidos pelas formulações preparadas segundo DEF, possibilitando a identificação dos fatores e interações significativas para estabilidade do fármaco.

É importante ressaltar que os testes de degradação forçada auxiliam os estudos de desenvolvimento de medicamentos, porém os resultados devem ser apenas uma guia, pois, para fins de registro, novos estudos de estabilidade devem ser realizados empregando as condições e critérios estabelecidos pelo órgão regulador.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Farmacêutico Vitamed que viabilizou a realização do estudo, assim como todos os profissionais que estiveram envolvidos, em especial à técnica Rosângela Camargo Golfetto pela receptividade e importante colaboração.

ABSTRACT

Forced Degradation and Factorial Analysis of Stability of Liquid Formulations containing Carbocisteine

The aim of this study was to use Factorial Design (FD) to assess the stability of carbocisteine syrups subjected to forced degradation. The factors assessed were pH (5.0; 6.5; 8.0), presence or absence of disodium EDTA and sodium metabisulfite (0.1%). For the study of forced degradation, the formulations were subjected to thermal stress (50°C and 75% RH) and oxidation with 3% hydrogen peroxide. The formulations were analyzed for pH, organoleptic properties and drug content by HPLC-UV, at 0, 15 and 35 days. The results showed that the formulations exposed to forced degradation suffered a fall in drug content, while the pH remained relatively stable. Regarding the color, only the formulations without antioxidant exhibited a darker coloration. The results of FD revealed significant interactions ($p < 0.05$) for pH/metabisulfite and EDTA / metabisulfite. Formulations containing metabisulfite at pH 5.0 showed the greatest degradation and those with metabisulfite and without EDTA were also not effective in preventing the degradation of carbocisteine.

Keywords: Carbocisteine. Stability. Forced degradation. HPLC. Factorial design.

REFERÊNCIAS

- Ando AR. Interação de SO_2 com espécies iônicas e moleculares: espectroscopia Raman e cálculos teóricos. [Tese]. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2009.
- Argekar AP, Raja SV, Kapadia SU. Simultaneous Determination of Cephalexin and Carbocisteine from Capsules by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP - HPLC). *Anal Lett*. 1997;30(4):821-31.
- Armstrong NA. *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis; 2006.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 01, de 29 de julho de 2005. Dispõe sobre Guia para a realização de estudos de estabilidade. *Diário Oficial da União*, nº 146, 1 de agosto de 2005. Seção 1. p. 119.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, nº 104, 02 de junho de 2003. Seção 1. p. 56.
- European Pharmacopoeia. 6th ed. Vol. 2. Strasbourg: Council of Europe; 2008.
- Greenspan L. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *J Res Natl Bur Stand A, Phys Chem*. 1977;81A(1):89-96.
- Hondrum SO, Ezell JH. The Relationship Between pH and Concentrations of Antioxidants and Vasoconstrictors in Local Anesthetic Solutions. *Anesth Prog*. 1996;43(3):85-91.
- Hooper C, Calvert J. Review: the role for S-carboxymethylcysteine (carbocisteine) in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008;3(4):659-69.
- Ishibashi Y, Takayama G, Inouye Y, Taniguchi A. Carbocisteine normalizes the viscous property of mucus through regulation of fucosylated and sialylated sugar chain on airway mucins. *Eur J Pharmacol*. 2010;641(2-3):226-28
- Kibbe AH. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 3rd ed. London: Apha; 2000.
- Lavoie JC, Lachance C, Chessex P. Antiperoxide activity of sodium metabisulfite: a double-edged sword. *Biochem Pharmacol*. 1994;47(5):871-76.
- Lachman L. Antioxidants and chelating agents as stabilizers in liquid dosage forms. *Drug Cosmet Ind*. 1968;102(2):43-45,146-149.
- Lambert RJW, Hanlon GW, Denyer SP. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*. 2004;96(2):244-53.
- Manfio JL, Dal'Maso A, Pugens AM, Brum LJ, Steppe M. Determinação do prazo de validade do medicamento carbocisteína xarope através do método de Arrhenius. *Rev Ciênc Farm*. 2007;43(4):563-70.
- Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments*. 6th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2005.
- Orlovic D, Radulovic D, Vujic Z. Determination of S Carboxymethyl-LCysteine, Methylparaben and their Degradation Products in Syrup Preparations. *Chromatographia*. 2004; 60 (5-6):329-333.
- Rele RV, Patil SP. Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography Technique for Determination of Carbocisteine from Pharmaceutical Formulation. *J Chem Pharm Research*. 2010;2(4):24-30.
- Reynolds DW, Fachine KL, Mullaney JF, Alsante KM, Hatajik TD, Motto MG. Available Guidance and Best

Practices for Conducting Forced Degradation Studies. Pharm Technol. 2002;26(2):48-56.

Singh S, Bakshi M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. Pharm Technol. 2000:1-14.

Smith M, March J. March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure. 5th ed. New York: Wiley; 2001.

Yoshioka S, Stella VJ. Stability of Drugs and Dosage Forms. New York: Kluwer Academic Publishers; 2002.

Zhou D, Porter WR, Zhang GGZ. Drug Stability and Degradation Studies. In: Chu Y, Chen Y, Zhang GGZ. Developing Solid Oral Dosage Form. London: Elsevier; 2009. p. 87-124.

Recebido em 18 de julho de 2011

Aceito para publicação em 22 de outubro de 2012