

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O CONTROLE DE  
QUALIDADE DO ADAPALENO MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO ACABADO**

LAURA ALEGRIA MARTINS

Porto Alegre, 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O CONTROLE DE  
QUALIDADE DO ADAPALENO MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO ACABADO**

*Dissertação apresentada por **Laura Alegria Martins**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas*

*Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Maria Bergold*

Porto Alegre, 2009

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 15.05.2009, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Inara Staub

Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Froehlich

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

M386d Martins, Laura Alegria

Desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade do adapaleno matéria-prima e produto acabado / Laura Alegria Martins. – Porto Alegre : UFRGS, 2009. – xxxi, 147 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Adapaleno. 2. Validação: métodos de análise de fármacos. 3. Controle de qualidade de medicamentos. I. Bergold, Ana Maria. II. Título.

CDU: 615.2.074

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio da Central Analítica do Instituto de Química (UFRGS), do Centro de Microscopia Eletrônica (UFRGS) e do Instituto de Geociências (UFRGS).



*À meus pais, Norvaldo e Miriam, por incentivarem meus sonhos,  
meu crescimento profissional e por serem a base para minhas conquistas,  
à meus irmãos Norvaldo e Manuela pela amizade  
e união familiar.*

*À Fabiano Kraemer pelo amor e companheirismo.*





## AGRADECIMENTOS

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Bergold, agradeço pela amizade, confiança e esclarecimentos prestados na orientação deste trabalho.

À meus pais pelo amor, apoio e incentivo diários e fundamentais em todas as etapas de minha vida.

À meus irmãos pelo companheirismo, amizade, e pela torcida...

Ao meu namorado Fabiano Kraemer pelo amor, paciência e auxílio na formatação deste trabalho.

À família Kraemer pela convivência e carinho a mim dispensados.

À toda família e amigos pelo incentivo ao estudo.

Aos demais professores do Laboratório de Química Farmacêutica e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pelo ensino de qualidade, pela convivência e esclarecimentos prestados.

Ao Laboratório de Química Farmacêutica que disponibilizou os equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vítor Pereira e ao Laboratório de Análises de Difração de Raios X do Departamento de Mineralogia do Instituto de Geociências (UFRGS) pela atenção e auxílio na realização e esclarecimentos das análises de difração de raios-X.

Ao Prof. Dr. César Petzold do Instituto de Química da UFRGS, pelo auxílio na interpretação das análises térmicas.

À mestranda e amiga Katiane Santin do Centro de Microscopia Eletrônica (CME/UFRGS), pelo auxílio e esclarecimentos nas análises de MEV.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química Farmacêutica (atuais e antigos): Leonardo, Eliane, Andréa Adams, Letícia Flores, Andréa Pereira,

Rochele, Carolina, Lisiane, Sirlei, Luiz, Marquinho, César, Marcele Giacomini, Graziela, Mônica e Natália, pela ótima convivência, apoio e amizade sincera.

Às amigas Danieli Ceni, Deise Barpp, Fernanda Bruxel, e Luciana dos Santos, pela amizade, apoio e cooperação.

À farmacêutica Adriana Klein Herwig, da farmácia Calabash, pelo apoio profissional e auxílio na aquisição das matérias-primas, utilizadas neste trabalho e às demais estagiárias e amigas conquistadas na farmácia, pelo apoio e incentivo diários.

Aos grandes amigos que mesmo de longe acompanharam e incentivaram esta caminhada: Clarissa Antunes Gomes e Tiago Weber.

À Deus por guiar e permitir que tantas pessoas maravilhosas cruzassem o meu caminho hoje e sempre.

*“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”*

*(Albert Einstein)*

*Cada um que passa em nossa vida passa sozinho...  
Porque cada pessoa é única para nós, e nenhuma substitui a  
outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só...Levam um  
pouco de nós mesmos e nos deixam um pouco de  
si mesmos. Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada. Há os que  
deixam muito, mas não há os que não deixam  
nada. Esta é a mais bela realidade da vida... A prova tremenda de que cada um é  
importante e que ninguém se aproxima do outro por acaso...”*

*(Saint Exupéry)*



## RESUMO

### **Desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade do adapaleno matéria-prima e produto acabado**

O adapaleno é um potente retinoide análogo à vitamina A introduzido no mercado em 1995 para o tratamento tópico da acne. É um derivado sintético do ácido naftoico, apresentando todos os benefícios terapêuticos da tretinoína, porém com baixa irritação e melhor tolerabilidade. O adapaleno apresenta-se atualmente sob a forma farmacêutica de creme e gel, além de estar disponível comercialmente para aquisição como matéria-prima para utilização no setor magistral. Levando-se em consideração que não existem métodos analíticos oficiais para identificação e determinação de seu teor, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para assegurar a qualidade do produto tanto na matéria-prima como em seu produto acabado. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi a validação de métodos analíticos para o controle qualitativo e quantitativo do adapaleno matéria-prima e forma farmacêutica gel. A identificação e caracterização da SQR e da matéria-prima foi realizada através da determinação do ponto de fusão, calorimetria exploratória diferencial (DSC), métodos espectrofotométricos na região do infravermelho (IV) e do ultravioleta (UV), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), microscopia eletrônica de varredura (MEV) além da difração de raios-X. Para a determinação quantitativa foram validados os métodos de volumetria em meio aquoso (VMA), espectrofotometria na região do UV ordem-zero e CLAE para matéria-prima e espectrofotometria na região do UV em primeira derivada (UV-D<sup>1</sup>) e CLAE para o produto farmacêutico. A análise estatística demonstrou equivalência entre os métodos VMA / UV / CLAE para a determinação do teor da matéria-prima e entre os métodos CLAE / UV-D<sup>1</sup> para a determinação do adapaleno em sua forma farmacêutica gel.

**Palavras chave:** adapaleno, validação de métodos analíticos, controle de qualidade, CLAE, UV, UV-D.



## ABSTRACT

### Development of analytical methods for quality control of adapalene substance and pharmaceutical form

Adapalene is a potent retinoid analog of vitamin A on the market since 1995 developed for the topical treatment of acne. It is a synthetic derivative of the naphthoic acid, with the benefits of tretinoin therapy, but with low irritation and better tolerability. The adapalene is presented as pharmaceutical cream and gel it is also commercially available for purchase as bulk substance, for use in the compounding pharmacies. Considering that no official analytical methods to identify and quantify adapalene are available, the development and validation of methods to ensure the quality of pharmaceutical formulations is necessary. The objective of this work was the validation of these analytical methods to identify and quantify adapalene as bulk substance and pharmaceutical gel form. The identification and characterization of Chemical Reference Substance and the bulk substance was performed by: melting point, differential scanning calorimetry (DSC), infrared (IR) and ultraviolet (UV) spectrophotometric methods, thin-layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction. For the quantitative determination aqueous volumetric neutralization (AVN), UV spectrophotometry (in the zero-order) and HPLC for the bulk substance and UV spectrophotometry in the first derivative (UV-D<sup>1</sup>) and HPLC for the pharmaceutical formulations were validated. Statistical analysis showed equivalence between the methods AVN / UV / HPLC for determining the content of the bulk substance and the methods of HPLC / UV-D<sup>1</sup> for the determination of adapalene in pharmaceutical gel form.

**Key words:** adapalene, validation of analytical methods, quality control, HPLC, UV, UV-D.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Folículo Pilosebáceo .....	11
<b>Figura 2:</b> Esquema proposto para patogênese da acne.....	14
<b>Figura 3:</b> Estágios de formação da acne.....	15
<b>Figura 4:</b> Indicações para terapia tópica, sistêmica e combinada .....	18
<b>Figura 5:</b> Mecanismo de ação dos retinoides.....	23
<b>Figura 6:</b> Estrutura química do ácido retinoico (AR).....	24
<b>Figura 7:</b> Estrutura química do adapaleno. ....	25
<b>Figura 8:</b> Termograma do adapaleno SQR. ....	41
<b>Figura 9:</b> Termograma de ADAP-1.....	41
<b>Figura 10:</b> Espectro de absorção na região do IV para o adapaleno SQR em KBr .....	43
<b>Figura 11:</b> Espectro de absorção da sobreposição SQR e ADAP-1 na região do IV em KBr (4000 a 400 cm <sup>-1</sup> ).....	43
<b>Figura 12:</b> Espectros de absorção na região do UV referente à solução de adapaleno SQR em etanol (12 µg/mL).....	46
<b>Figura 13:</b> Espectros de absorção na região do UV referente à solução de adapaleno SQR e ADAP-1 em etanol (12 µg/mL).....	46
<b>Figura 14:</b> Espectros de absorção na região do UV (ordem zero) referentes às soluções de adapaleno SQR e gel em etanol (12 µg/mL).....	48
<b>Figura 15:</b> Espectros de absorção na região do UV-D <sup>1</sup> referentes às soluções de adapaleno SQR e gel em etanol (12 µg/mL).....	48
<b>Figura 16:</b> Cromatograma (1) obtido com a solução de adapaleno SQR, na concentração de 12 µg/mL. Espectro (2) da solução de adapaleno SQR, na concentração de 12 µg/mL, obtido por DAD.....	50
<b>Figura 17:</b> Cromatogramas das soluções de adapaleno amostra ADAP-1 (A) e gel (B) em etanol (12 µg/mL).....	51
<b>Figura 18:</b> CCD: (SQR) adapaleno SQR, (Am) amostra ADAP-1, (Tret) tretinoína padrão comparativo, (F.F) forma farmacêutica gel, (Adj) solução simulada de adjuvantes. ....	54

<b>Figura 19:</b> CCD: (F.F.) forma farmacêutica gel, (SQR) adapaleno SQR, (MetP) metilparabeno e (Phenx) fenoxietanol. ....	54
<b>Figura 20:</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos cristais de adapaleno SQR (A) e amostra ADAP-1 (B). ....	58
<b>Figura 21:</b> Difratoograma da forma cristalina $\alpha$ (EP, 2006). ....	62
<b>Figura 22:</b> Difratoograma da SQR. ....	62
<b>Figura 23:</b> Difratoograma de ADAP-1. ....	62
<b>Figura 24:</b> Espectros das soluções de adapaleno SQR nas concentrações de 8 a 16 $\mu\text{g/mL}$ em etanol. ....	73
<b>Figura 25:</b> Representação gráfica da curva padrão média do adapaleno para UV. ....	74
<b>Figura 26:</b> Cromatograma obtido com a solução de adapaleno SQR e amostra ADAP-1, na concentração de 12 $\mu\text{g/mL}$ . ....	83
<b>Figura 27:</b> Cromatogramas dos estudos de degradação forçada. ....	85
<b>Figura 28:</b> Representação gráfica da curva padrão média do adapaleno por CLAE. ....	88
<b>Figura 29:</b> Avaliação da robustez do método CLAE para matéria-prima. ....	90
<b>Figura 30:</b> Sobreposição de espectros na região do UV na ordem zero. ....	100
<b>Figura 31:</b> Espectros na região do UV ordem zero (ampliado). ....	101
<b>Figura 32:</b> Espectros de absorção de primeira (A), segunda (B), terceira (C) e quarta derivada (D) do adapaleno 12 $\mu\text{g/mL}$ em etanol. ....	102
<b>Figura 33:</b> Espectro de absorção com diferentes proporções da SQR e ASA. ....	103
<b>Figura 34:</b> Espectros de absorção de primeira derivada do adapaleno 12 $\mu\text{g/mL}$ em etanol. ....	104
<b>Figura 35:</b> Estrutura química do metilparabeno (A) e fenoxietanol (B). ....	104
<b>Figura 36:</b> (A) Espectro UV-Ordem Zero. (B) Espectro UV-D <sup>1</sup> . FF (forma farmacêutica gel), SQR, MP (metilparabeno), FN (fenoxietanol). ....	105
<b>Figura 37:</b> Espectros das soluções de adapaleno SQR nas concentrações de 8 a 16 $\mu\text{g/mL}$ referentes a curva padrão em etanol ....	106
<b>Figura 38:</b> Representação da curva padrão média do adapaleno para UV-D <sup>1</sup> ( $\lambda=305,0$ nm). ....	107

<b>Figura 39:</b> Cromatograma obtido com a solução de amostra de adapaleno FF gel (A), e SQR (B) na concentração de 12 µg/mL.....	114
<b>Figura 40:</b> Sobreposição dos cromatogramas obtidos através de análise por CLAE das soluções de adapaleno (A), amostra simulada de adjuvantes (ASA) e etanol (C).....	115
<b>Figura 41:</b> Especificidade (CLAE) para o adapaleno FF: cromatogramas dos estudos de degradação forçada. ....	117
<b>Figura 42:</b> Avaliação da robustez do método CLAE para FF gel.....	121
<b>Figura 43:</b> Espectro de absorção na região do IV para o adapaleno ADAP-1 em KBr (4000 a 400 cm <sup>-1</sup> ). ....	145
<b>Figura 44:</b> Difratoograma da forma amorfa, fornecido pela patente europeia (EP, 2006). ....	145



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Descrição e propriedades físico-químicas do adapaleno. ....	26
<b>Quadro 2:</b> Solubilidade do adapaleno SQR e ADAP-1 nos solventes testados.....	36
<b>Quadro 3:</b> Especificação dos parâmetros experimentais utilizados na calorimetria exploratória diferencial.....	39
<b>Quadro 4:</b> Condições cromatográficas utilizadas para caracterização da SQR, ADAP-1 e forma farmacêutica gel por CLAE.....	49
<b>Quadro 5:</b> Parâmetros cromatográficos observados na adequabilidade do sistema.....	84
<b>Quadro 6:</b> Teores de ADAP-1 frente às modificações realizadas pelo teste de robustez.....	91
<b>Quadro 7:</b> Concentrações percentuais médias descritas para cada adjuvante.....	95
<b>Quadro 8:</b> Parâmetros cromatográficos observados para a solução de amostra de adapaleno FF gel (A) e SQR (B) na concentração de 12 µg/mL.....	114
<b>Quadro 9:</b> Teores de adapaleno na FF gel frente às modificações realizadas pelo teste de robustez.....	120



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação da acne quanto ao tipo de lesão.....	16
<b>Tabela 2:</b> Classificação da acne quanto a severidade.....	17
<b>Tabela 3 :</b> Espectro de ação dos agentes de uso tópico .....	20
<b>Tabela 4:</b> Resumo de ensaios utilizados para a determinação do adapaleno por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	29
<b>Tabela 5:</b> Valores obtidos para o ponto de fusão da SQR.....	38
<b>Tabela 6:</b> Valores obtidos para o ponto de fusão de ADAP-1.....	38
<b>Tabela 7:</b> Dados obtidos por DSC para o adapaleno SQR e ADAP-1.....	42
<b>Tabela 8:</b> Frequências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para SQR e ADAP-1.....	44
<b>Tabela 9:</b> Teor de água do adapaleno SQR e ADAP-1 determinados por gravimetria. ....	56
<b>Tabela 10:</b> Teor de água do adapaleno SQR e ADAP-1 determinados por Karl-Fischer.....	57
<b>Tabela 11:</b> Teor obtido para SQR e ADAP-1 por volumetria de retorno. ....	69
<b>Tabela 12:</b> Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do adapaleno por UV. ....	73
<b>Tabela 13:</b> Resultados dos limites de detecção e quantificação, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta. ....	74
<b>Tabela 14:</b> Avaliação da precisão intra e interdias das amostras de adapaleno matéria-prima por espectrofotometria UV.....	75
<b>Tabela 15:</b> Estudo da especificidade : Percentual médio de degradação e pureza dos picos cromatográficos do adapaleno. ....	86
<b>Tabela 16:</b> Valores de área absoluta obtidos para a curva padrão do adapaleno SQR por CLAE. ....	87
<b>Tabela 17:</b> Resultados dos limites de detecção e quantificação, obtidos por CLAE.....	88
<b>Tabela 18:</b> Resultados obtidos em três diferentes dias na quantificação das amostras de adapaleno matéria-prima por CLAE para avaliação da precisão intra e interdias. ....	89

<b>Tabela 19:</b> Avaliação da robustez do método de CLAE para determinação do adapaleno SQR e amostra ADAP-1 em solução a 12 µg/mL.....	92
<b>Tabela 20:</b> Resultados obtidos na determinação do adapaleno amostra (ADAP-1) por VMA, UV e CLAE.....	93
<b>Tabela 21:</b> Teste de recuperação por espectrofotometria UV-D <sup>1</sup> , λ=305,0 nm. ....	98
<b>Tabela 22:</b> Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do adapaleno por UV-D <sup>1</sup> , λ=305,0 nm. ....	106
<b>Tabela 23:</b> Resultados dos limites de detecção e quantificação, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada.....	107
<b>Tabela 24:</b> Precisão intra e interdias das amostras de adapaleno forma farmacêutica (FF) gel por espectrofotometria UV-D <sup>1</sup> . ....	108
<b>Tabela 25:</b> Resultados obtidos para o teste de recuperação do adapaleno SQR por espectrofotometria UV-D <sup>1</sup> , λ= 305,0 nm.....	109
<b>Tabela 26:</b> Soluções para o teste de recuperação por CLAE.....	112
<b>Tabela 27:</b> Percentual médio de degradação e pureza dos picos cromatográficos do adapaleno FF.....	118
<b>Tabela 28:</b> Resultados obtidos em três diferentes dias na quantificação das amostras de adapaleno forma farmacêutica (FF) gel por CLAE para avaliação da precisão intra e interdias. ....	119
<b>Tabela 29:</b> Resultados obtidos para o teste de recuperação do adapaleno SQR por CLAE, detecção UV (λ= 321,0 nm). ....	120
<b>Tabela 30:</b> Avaliação da robustez do método de CLAE para determinação do adapaleno na FF em solução a 12 µg/mL.....	122
<b>Tabela 31:</b> Resultados obtidos na determinação do adapaleno FF gel por UV-D <sup>1</sup> e CLAE.....	123
<b>Tabela 32:</b> ANOVA das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão do adapaleno por UV.....	145
<b>Tabela 33:</b> ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do adapaleno por CLAE. ....	146
<b>Tabela 34:</b> Teste de ANOVA para os valores obtidos na determinação do adapaleno por VMA, UV e CLAE. ....	146
<b>Tabela 35:</b> ANOVA para a obtenção da curva padrão do adapaleno por espectrofotometria UV-D <sup>1</sup> .....	146



**Tabela 36:** Teste t de Student , presumindo variâncias equivalentes, para os valores obtidos na determinação do adapaleno FF gel por UV-D<sup>1</sup> e CLAE.....147



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>9cRA</b>	Ácido 9-cis-retinoico
<b>ADAP-1</b>	Amostra de adapaleno (matéria-prima)
<b>AR</b>	Ácido retinoico
<b>ASA</b>	Amostra simulada de adjuvantes
<b>atRA</b>	Ácido all-trans-retinoico
<b>CRABP</b>	Proteínas citosólicas ligantes de ácido retinoico
<b>CRBP</b>	Proteínas citosólicas ligantes de retinoides
<b>DAD</b>	Detector de arranjo de fotodiodos
<b>DSC</b>	Calorimetria exploratória diferencial
<b>FF</b>	Forma farmacêutica
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>RAR</b>	Receptores de ácido retinoico
<b>RARE</b>	Elementos de resposta do ácido retinoico
<b>Rf<sub>a</sub></b>	Fator de retenção da amostra
<b>Rf<sub>x</sub></b>	Fator de retenção relativo da amostra
<b>RXR</b>	Receptores de retinoides X
<b>SHBG</b>	Globulina carreadora dos hormônios sexuais
<b>UV-D</b>	Ultravioleta derivada



## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>XIX</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XXI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XXV</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>XXVII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
3.1 ACNE.....	11
3.1.1 <u>Etiopatogenia</u> .....	11
3.1.2 <u>Tipos de Acne</u> .....	14
3.1.3 <u>Tratamento</u> .....	17
3.1.4 <u>Retinoides</u> .....	20
3.1.5 <u>Mecanismo de ação dos retinoides</u> .....	22
3.1.6 <u>Ácido retinoico (AR)</u> .....	23
<b>3.2 ADAPALENO.....</b>	<b>24</b>
3.2.1 <u>Descrição e propriedades físico-químicas</u> .....	25
3.2.2 <u>Mecanismo de ação</u> .....	27

3.2.3	<u>Forma farmacêutica e apresentação</u> .....	27
3.2.4	<u>Posologia</u> .....	28
3.2.5	<u>Interações medicamentosas, precauções e reações adversas</u> .....	28
3.2.6	<u>Farmacocinética</u> .....	28
3.2.7	<u>Determinação do Adapaleno</u> .....	29
 <b><u>4. CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) E ANÁLISE QUALITATIVA DA MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO FARMACÊUTICO</u></b> .....		<b>31</b>

<b>4.1. AMOSTRAS</b> .....	<b>34</b>
4.1.1. <u>Substância química de referência (SQR)</u> .....	34
4.1.2. <u>Matéria-prima</u> .....	34
4.1.3. <u>Produto Farmacêutico</u> .....	34
<b>4.2. CARACTERIZAÇÃO DA SQR E ANÁLISE QUALITATIVA DA MATÉRIA-PRIMA E FORMA FARMACÊUTICA GEL</b> .....	<b>35</b>
4.2.1. <u>Determinação da solubilidade</u> .....	35
4.2.1.1. Material e métodos .....	35
4.2.1.2. Resultados e discussão .....	35
4.2.2. <u>Ponto de fusão</u> .....	37
4.2.2.1. Material e métodos .....	37
4.2.2.2. Resultados e discussão .....	38
4.2.3. <u>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</u> .....	39
4.2.3.1. Material e métodos .....	39
4.2.3.2. Resultados e discussão .....	40
4.2.4. <u>Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)</u> .....	42
4.2.4.1. Material e métodos .....	42
4.2.4.2. Resultados e discussão .....	43
4.2.5. <u>Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)</u> .....	45
4.2.5.1. Material e métodos .....	45
4.2.5.2. Resultados e discussão .....	45
4.2.6. <u>Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)</u> .....	47
4.2.6.1. Material e métodos .....	47
4.2.6.2. Resultados e discussão .....	47

4.2.7. <u>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</u> .....	49
4.2.7.1. Material e métodos .....	49
4.2.7.2. Resultados e discussão .....	49
4.2.8. <u>Cromatografia em camada delgada (CCD)</u> .....	51
4.2.8.1. Material e métodos .....	51
4.2.8.2. Resultados e discussão .....	53
4.2.9. <u>Determinação de umidade</u> .....	55
4.2.9.1. Material e métodos .....	55
4.2.9.2. Resultados e discussão .....	56
4.2.10. <u>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</u> .....	57
4.2.10.1. Material e métodos .....	57
4.2.10.2. Resultados e discussão .....	57
4.2.11. <u>Difração de raios-X</u> .....	59
4.2.11.1. Material e métodos .....	59
4.2.11.2. Resultados e discussão .....	60

## **5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA.....63**

<b>5.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO .....</b>	<b>65</b>
5.1.1. <u>Substância química de referência (SQR) e ADAP-1</u> .....	65
5.1.2. <u>Forma Farmacêutica gel</u> .....	66
5.1.3. <u>Amostra Simulada de Adjuvantes</u> .....	66
<b>5.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DA MATÉRIA-PRIMA .....</b>	<b>67</b>
5.2.1. <u>Volumetria em meio aquoso (VMA)</u> .....	67
5.2.1.1. Material e métodos .....	67
5.2.1.2. Resultados e discussão .....	68
5.2.2. <u>Espectrofotometria na região do ultravioleta</u> .....	70
5.2.2.1. Material e métodos .....	70
5.2.2.1.1. <i>Validação do método UV</i> .....	70
5.2.2.1.1.1. Linearidade .....	70
5.2.2.1.1.2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	71
5.2.2.1.1.3. Precisão.....	71
5.2.2.1.1.4. Exatidão .....	72

5.2.2.1.1.5. Especificidade.....	72
5.2.2.2. Resultados e discussão .....	72
5.2.2.2.1. <i>Linearidade</i> .....	72
5.2.2.2.2. <i>Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)</i> .....	74
5.2.2.2.3. <i>Precisão</i> .....	75
5.2.2.2.4. <i>Exatidão</i> .....	76
5.2.2.2.5. <i>Especificidade</i> .....	76
5.2.3. <u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</u> .....	76
5.2.3.1. Material e métodos .....	76
5.2.3.1.1. <i>Validação do método de CLAE</i> .....	77
5.2.3.1.1.1. Adequabilidade do sistema cromatográfico .....	77
5.2.3.1.1.2. Especificidade.....	77
5.2.3.1.1.3. Linearidade .....	79
5.2.3.1.1.4. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	80
5.2.3.1.1.5. Precisão .....	80
5.2.3.1.1.6. Exatidão.....	81
5.2.3.1.1.7. Robustez.....	82
5.2.3.2. Resultados e discussão .....	82
5.2.3.2.1. <i>Adequabilidade do sistema cromatográfico</i> .....	83
5.2.3.2.2. <i>Especificidade</i> .....	84
5.2.3.2.3. <i>Linearidade</i> .....	87
5.2.3.2.4. <i>Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)</i> .....	88
5.2.3.2.5. <i>Precisão</i> .....	88
5.2.3.2.6. <i>Exatidão</i> .....	89
5.2.3.2.7. <i>Robustez</i> .....	89
5.2.4. <u>Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do adapaleno matéria-prima</u> .....	93
<b>5.3. ANÁLISE QUANTITATIVA DA FORMA FARMACÊUTICA GEL .....</b>	<b>94</b>
5.3.1. <u>Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)</u> .....	94
5.3.1.1. Material e métodos .....	94
5.3.1.1.1. <i>Validação do método UV-D para a forma farmacêutica gel</i> .....	94
5.3.1.1.1.1. Especificidade.....	94
5.3.1.1.1.2. Linearidade .....	96
5.3.1.1.1.3. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	96



5.3.1.1.1.4.	Precisão.....	97
5.3.1.1.1.5.	Exatidão (Teste de recuperação).....	98
5.3.1.2.	Resultados e discussão.....	99
5.3.1.2.1.	<i>Aspectos instrumentais e definição dos parâmetros da UV-D.....</i>	100
5.3.1.2.1.1.	Especificidade.....	104
5.3.1.2.1.2.	Linearidade.....	106
5.3.1.2.1.3.	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	107
5.3.1.2.1.4.	Precisão.....	108
5.3.1.2.1.5.	Exatidão (Teste de recuperação).....	108
5.3.2.	<u>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</u> .....	109
5.3.2.1.	Material e métodos.....	109
5.3.2.1.1.	<i>Validação do método CLAE para a forma farmacêutica gel.....</i>	110
5.3.2.1.1.1.	Especificidade.....	110
5.3.2.1.1.2.	Linearidade.....	111
5.3.2.1.1.3.	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	111
5.3.2.1.1.4.	Precisão.....	111
5.3.2.1.1.5.	Exatidão (Teste de recuperação).....	112
5.3.2.1.1.6.	Robustez.....	113
5.3.2.2.	Resultados e discussão.....	113
5.3.2.2.1.	<i>Validação do método CLAE para a forma farmacêutica gel.....</i>	115
5.3.2.2.1.1.	Especificidade.....	115
5.3.2.2.1.2.	Linearidade.....	118
5.3.2.2.1.3.	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	118
5.3.2.2.1.4.	Precisão.....	118
5.3.2.2.1.5.	Exatidão (Teste de recuperação).....	119
5.3.2.2.1.6.	Robustez.....	120
5.3.3.	<u>Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do adapaleno FF gel</u> .....	123
<b>6.</b>	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b>125</b>
<b>7.</b>	<b><u>CONCLUSÕES.....</u></b>	<b>139</b>
<b>8.</b>	<b><u>ANEXOS.....</u></b>	<b>143</b>



# **1**

***INTRODUÇÃO***

---



A acne é a enfermidade cutânea mais comum na adolescência, atingindo os indivíduos no período da puberdade e prolongando-se por um período variável na fase adulta (WANNMACHER, 2006). Ocorre em todas as raças, embora seja menos intensa em orientais e negros, manifestando-se mais gravemente no sexo masculino em decorrência da atuação dos andrógenos (COSTA *et al.*, 2008). Afeta em média 85% dos adolescentes de ambos os sexos, persistindo na vida adulta em aproximadamente 12% das mulheres com mais de 25 anos e em 3% da população entre 35 e 44 anos (BERSHAD, 2001).

O diagnóstico é definido, principalmente pela análise do quadro clínico, caracterizado pelo polimorfismo, sendo classificada de acordo com o número e tipo de lesões (STEINER *et al.*, 2003). A ausência do tratamento adequado pode levar a lesões cicatriciais e desfigurações que podem causar sérios problemas físicos e emocionais, ocasionando um impacto psicossocial significativo na qualidade de vida dos portadores desta doença (HASSUN, 2000; KAWASHIMA *et al.*, 2008). Para prevenir essas marcas físicas e psicológicas, os pacientes com acne buscam acompanhamento médico, para alívio dos sintomas clínicos, bem como tratamento tópico, sistêmico e cosmético, dependendo da intensidade do quadro, adequado às sequelas causadas pela doença (THIELITZ *et al.*, 2006).

O tratamento tópico apresenta-se indicado para os casos de acne comedoniana ou inflamatória leve. Nas formas moderadas ou severas há indicação de associar-se tratamento sistêmico (STEINER *et al.*, 2003). Um grande avanço no controle da acne, principalmente nas formas inflamatórias, foi, sem dúvida, a antibioticoterapia, pela redução da colonização do *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) e da inflamação local. Entretanto, devido à elevada resistência aos antibióticos, terapias associadas constituem uma importante opção de tratamento (BERSHAD, 2001; THIBOUTOT, 2000).

A terapia hormonal em mulheres com acne associada a distúrbios hormonais deve ser cogitada, principalmente em casos de manifestações do hiperandrogenismo (STEINER, 2002b). As formas graves da acne vulgar, entretanto, representavam sério problema terapêutico.

A introdução da isotretinoína, a partir de 1982, representa a maior conquista já obtida no tratamento sistêmico da acne. No entanto, a ocorrência de reações adversas tem restringido o uso do fármaco às formas de acne nódulo-císticas (SAMPAIO & PIMENTEL, 1985). São descritos os efeitos colaterais envolvendo a pele e as mucosas, os sistemas nervoso central, músculo-esquelético, ocular, linfático e hematopoiético, gastrointestinal, cardiorrespiratório e geniturinário, bem como o potencial de teratogenicidade. A isotretinoína está contraindicada em mulheres grávidas ou em idade fértil, se a contracepção não for plenamente assegurada (FURTADO & SANTOS, 1990).

Nos últimos anos, um grande número de medicamentos de uso tópico tem sido desenvolvido para tratamento da acne (FDA, 2005). O ácido retinoico, um metabólito da vitamina A é um potente modulador da diferenciação e proliferação celular. É efetivo no tratamento da acne, promovendo ação anti-inflamatória comprovada; entretanto apresenta muitos efeitos colaterais documentados (MICHEL *et al.*, 1998).

Em 1995, foi lançada uma nova molécula derivada do ácido naftoico, o adapaleno, com propriedades biológicas similares às do ácido retinoico, entretanto com melhor perfil físico-químico e tolerabilidade (CUNLIFFE, 1998; RÜHL *et al.*, 2001). O adapaleno apresenta-se atualmente sob a forma farmacêutica de creme e gel, além de estar disponível comercialmente para aquisição como matéria-prima para utilização no setor magistral.

Levando-se em consideração que não existem métodos analíticos oficiais (farmacopeicos) para identificação e determinação de seu teor, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para assegurar a qualidade do produto tanto na matéria-prima como em seu produto acabado.

# 2

***OBJETIVOS***





## **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Desenvolver e validar, segundo normas do ICH (International Conference on Harmonisation) (ICH, 2005) e RE 899 (BRASIL, 2003), métodos analíticos para o controle qualitativo e quantitativo do adapaleno como matéria-prima e na forma farmacêutica gel.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar a substância química de referência, através das seguintes análises:

- Testes de solubilidade em diferentes solventes;
- Determinação do ponto ou faixa de fusão por diferentes métodos;
- Determinação de umidade por diferentes métodos;
- Calorimetria exploratória diferencial (*DSC*);
- Espectrofotometria na região do infravermelho (IV);
- Registro da forma cristalina por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raio-X;
- Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV);
- Cromatografia em camada delgada (CCD);
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2. Desenvolver métodos para identificação do adapaleno matéria-prima e forma farmacêutica gel através das seguintes análises qualitativas:

- Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV);
- Cromatografia em camada delgada (CCD);
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3. Desenvolver e validar metodologia analítica quantitativa para o adapaleno matéria-prima, através das seguintes análises:

- Volumetria de neutralização;
- Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV);
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4. Desenvolver e validar metodologia analítica quantitativa para determinação do adapaleno na forma farmacêutica gel, através das seguintes análises:

- Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV);
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

***REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

---

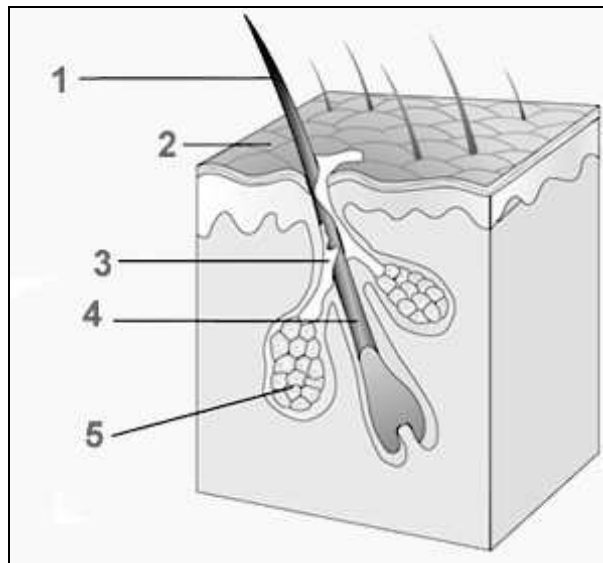




### 3.1 ACNE

#### 3.1.1 Etiopatogenia

A acne é uma doença inflamatória crônica da unidade pilossebácea (Figura 1), a qual é composta por uma glândula sebácea bem desenvolvida e um pelo rudimentar (HASSUN, 2000).



**Figura 1:** Folículo Pilossebáceo

(1) Pelo; (2) Superfície da pele, (3) Sebo, (4) Folículo, (5) Glândula Sebácea

Fonte: ([http://pt.wikipedia.org/wiki/Gl%C3%A2ndula\\_seb%C3%A1cea](http://pt.wikipedia.org/wiki/Gl%C3%A2ndula_seb%C3%A1cea), acesso em janeiro/2009)

Localiza-se comumente na face, peito, ombros e costas (FDA, 2005). Sua etiologia ainda não foi completamente esclarecida, mas sua caracterização é amplamente aceita como sendo multifatorial (ZOUBOULIS *et al.* 2005).

São quatro os principais fatores responsáveis por sua patogênese, todos profundamente inter-relacionados (TALARICO FILHO & HASSUN, 2007):

- Produção de sebo pelas glândulas sebáceas;
- Hiperqueratinização folicular;
- Colonização bacteriana do folículo;
- Liberação de mediadores da inflamação no folículo e na derme adjacente.

A hipersecreção sebácea ocorre pela ação periférica dos andrógenos, o que pode ser determinada por fatores genéticos e/ou constitucionais

(ALCHORNE & PIMENTEL, 2003). A influência dessa ação periférica pode ser determinada pelo estímulo/ativação da glândula pelos hormônios sexuais andrógenos e/ou aumento da disponibilidade de andrógenos livres e/ou diminuição da globulina carreadora dos hormônios sexuais (SHBG) (BAGATIN *et al.*, 2008; THIBOUTOT, 2008; UDA & WANCZINSKI, 2008).

Os hormônios sexuais andrógenos, cujo principal representante é a testosterona, são produzidos pelos ovários, suprarrenais e tecidos periféricos, como a pele e em seus anexos (STEINER, 2002a). Na pele, a testosterona, sob a ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase-1, transforma-se em diidrotestosterona (forma ativa) obtendo melhor ligação com o receptor androgênico da glândula sebácea (PAWIN *et al.*, 2004). Há dois subtipos de 5 $\alpha$ -redutase, a 5 $\alpha$ -redutase-1 e a 5 $\alpha$ -redutase 2, sendo desigual a sua distribuição no organismo. O tipo 1 predomina nas glândulas sebáceas da face e a do tipo 2 é encontrado nas glândulas sebáceas das zonas não afetadas pela acne (UDA & WANCZINSKI, 2008).

A resposta do sebócito (proliferação) ao estímulo pela testosterona e pela diidrotestosterona difere dependendo de sua origem. Os sebócitos localizados na face multiplicam-se muito mais rapidamente do que os localizados em outras partes do corpo. Sua proliferação é dose-dependente. Isto significa que a sensibilidade das glândulas sebáceas aos hormônios depende de sua localização (PAWIN *et al.*, 2004).

O sebo é uma substância continuamente secretada pelas glândulas sebáceas para a superfície da pele, sendo possivelmente regulada por um tipo de variação circadiana. Sua composição corresponde a uma mistura de lipídios, principalmente, colesterol, esqualeno, cera, ésteres esteroides e triglicerídeos. Os ácidos graxos livres, hidrolisados a partir dos triglicerídeos presentes no sebo, acumulam-se no infundíbulo glandular (região entre o epitélio do ducto sebáceo e o epitélio folicular), promovendo a irritação de seu epitélio, o que levaria a hiperqueratinização (estágio inicial da comedogênese) e, por fim, a inflamação (COSTA *et al.*, 2008).

A hiperqueratinização do folículo ou comedogênese corresponde à alteração no processo de descamação que ocorre nos queratinócitos do ducto folicular e é o fator central no desenvolvimento da acne (TALARICO FILHO & HASSUN, 2007). Determina a formação de microcomedões, que, por sua vez, podem evoluir para comedões que podem ser fechados (pontos brancos) ou abertos (pontos pretos) (RUSSELL, 2000).

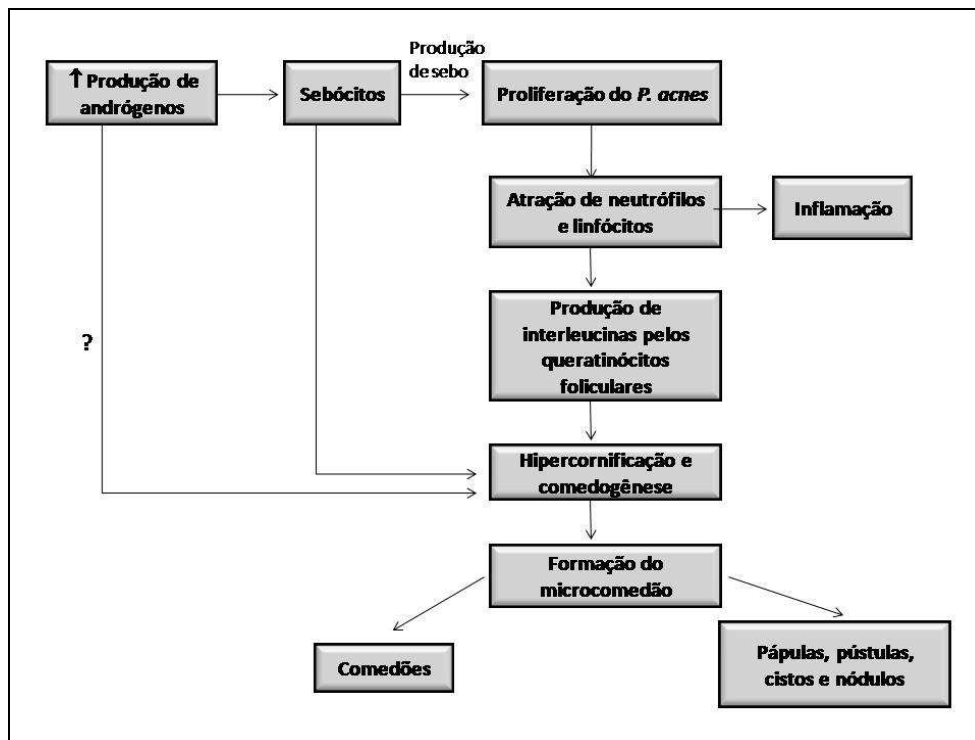
O papel de cada um dos lipídios que compõem o sebo não é totalmente conhecido, mas há evidências de que alterações na composição e/ou na quantidade de sua secreção colaborariam no desenvolvimento da doença por alterar tanto a queratinização do ducto glandular quanto a proliferação bacteriana por *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) (HASSUN, 2000).

Os três principais micro-organismos isolados da superfície da pele e dos ductos das glândulas sebáceas de indivíduos com acne são *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), *Staphylococcus epidermidis* e *Malassezia furfur*, sendo o *P. acnes*, o mais importante. Com o início da adolescência e com o surgimento da seborreia, observa-se significativo aumento na quantidade de *P. acnes* na pele (HASSUN, 2000). O *P. acnes* é uma bactéria anaeróbia gram positiva que se apresenta como sendo fator principal da conversão da acne comedogênica em acne inflamatória (STRAUSS *et al.*, 2007). Secreta enzimas exocelulares como lipases, fosfatases e hialuronidases (ALCHORNE & PIMENTEL, 2003). As lipases produzidas pelo *P. acnes* têm a capacidade de hidrolisar os triglicerídeos, no ducto da glândula, levando à formação de ácidos graxos livres e glicerol (UDA & WANCZINSKI, 2008).

Além das enzimas, o *P. acnes* produz fatores quimiotáticos para neutrófilos e linfócitos, e, por meio de fragmentos de sua parede celular, estimula o macrófago a produzir interleucinas e fator de necrose tumoral alfa, cuja ação conjunta constitui interessante teoria para explicar a presença de células inflamatórias nas paredes dos folículos sebáceos (HASSUN, 2000).

Embora ainda não sejam conhecidos todos os fatores envolvidos na gênese do processo inflamatório, acredita-se que o dano na derme resulte da difusão dos mediadores biologicamente ativos a partir do processo de ruptura

do folículo sebáceo (TALARICO FILHO & HASSUN, 2007). A Figura 2 apresenta o esquema proposto para patogênese da acne.



**Figura 2:** Esquema proposto para patogênese da acne

Fonte: adaptado de LEYDEN, 2003.

Os anticorpos específicos contra o *P. acnes*, presentes nos microcomedões, interagem com as enzimas liberadas pelo micro-organismo, liberando proteases hidrolíticas que atuam no epitélio, fragilizando-o e levando à saída de substâncias irritantes para a derme adjacente, desencadeando o processo inflamatório local (COSTA *et al.*, 2008).

### 3.1.2 Tipos de Acne

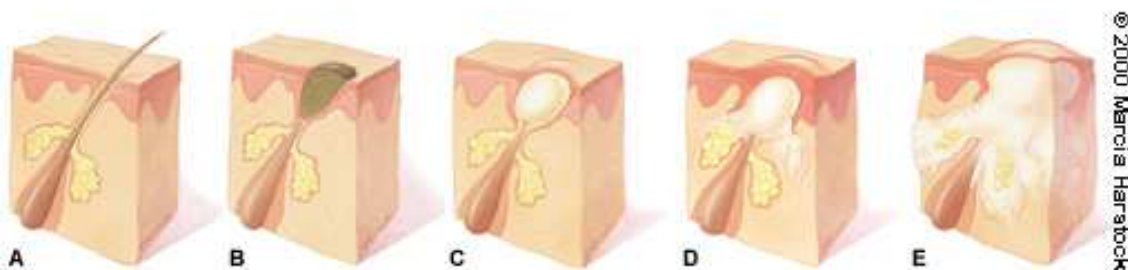
A acne pode ser classificada de acordo com o número e tipo das lesões, definindo-se as formas clínicas ou graus de classificação. Existem dois tipos principais de lesões de acne: as inflamatórias e as não inflamatórias. As não inflamatórias (acne comedogênica) apresentam somente comedões, que podem ser abertos ou fechados, sem sinais inflamatórios (STEINER *et al.*, 2003). A Figura 3 apresenta os tipos de lesões encontradas e a Tabela 1 a classificação da acne.



O comedão é um bloqueio do ducto pilossebáceo por um tampão de queratina, causando assim uma imensa resposta de células inflamatórias neutrófilas. Os comedões fechados (pontos brancos) não se apresentam visíveis a olho nu, mas requerem atenção especial no desenvolvimento de estratégias terapêuticas por representarem os precursores centrais das lesões que envolvem também as lesões inflamatórias (FDA, 2005). Os comedões abertos (pontos pretos) se constituem por acúmulo de corneócitos, sebo e colonização bacteriana. A cor escura da lesão se deve à presença de melanina (STEINER *et al.*, 2003).

As lesões causadas pela acne inflamatória formam as pápulas e pústulas que em casos mais graves podem evoluir para nódulos inflamatórios e cistos, dependendo da gravidade e da localização da inflamação na derme. A forma de apresentação mais incomum da acne (acne fulminante-grau 5) ocorre pela associação de um quadro sistêmico constituído por febre e mal estar geral (MACHADO, 2005).

As pápulas e pústulas são circundadas por halos eritematosos, caracterizando a lesão inflamatória. Os nódulos são lesões inflamatórias semelhantes às pápulas em suas características, porém são maiores e tipicamente eritematosas e dolorosas (GEJER & ARRUDA, 2003). Muito embora a maioria dos medicamentos para acne tenha ampla indicação para acne, alguns produtos têm sido desenvolvidos objetivando exatamente um destes tipos de lesões (FDA, 2005; LAYTON, 2006).



**Figura 3:** Estágios de formação da acne

(A) Folículo normal; (B) Comedão aberto; (C) Comedão fechado; (D) Pápula; (E) Pústula

Fonte: adaptado de RUSSELL, 2000.

**Tabela 1:** Classificação da acne quanto ao tipo de lesão.

Fonte : adaptada de ALCHORNE & PIMENTEL, 2003, BAGATIN *et al.*, 2008; GEJER & ARRUDA, 2003.

Tipo de lesão	Classificação	Tipo de acne	Características
Não-inflamatória	Acne comedogênica	Grau 1	Presença de comedões abertos e/ou fechados, pápulas são raras e pústulas ocasionais
	Acne pápulo-pustulosa	Grau 2 (leve)	Presenças de comedões com predomínio de pápulas e pústulas em número variável
Inflamatória	Acne nódulo-cística	Grau 3 (moderada)	Presença de comedões, pápulas, pústulas, nódulos e cistos inflamatórios
	Acne conglobata	Grau 4 (grave)	Presença de comedões, pápulas, pústulas, nódulos e cistos purulentos em face, tronco e tórax além de cicatrizes queloidianas.
	Acne fulminante	Grau 5	Acne conglobata com repercussão sistêmica, presença de febre, vasculite leucocitária.

A acne androgênica é encontrada em mulheres, podendo associar-se à seborreia, alopecia e hirsutismo. Resulta da produção excessiva de andrógenos cuja causa mais comumente associada é a síndrome dos ovários policísticos (MACHADO, 2005). O tratamento com contraceptivos orais tem sido utilizado com sucesso, por aumentar a quantidade da SHBG e consequentemente diminuir a quantidade de hormônios andrógenos circulantes (BERSHAD, 2001; THIBOUTOT, 2000).

Muitos métodos existem para avaliar a gravidade da acne e a maioria deles utiliza uma escala padronizada de avaliação global da gravidade da doença (Tabela 2) (FDA, 2005; LEHMANN *et al.*, 2002). De acordo com a

classificação, os dermatologistas podem estabelecer um diagnóstico correto além de determinar a terapia adequada ao tratamento da doença, com alta aceitabilidade e adesão dos pacientes (CUNLIFFE, 1998).

**Tabela 2:** Classificação da acne quanto a severidade.

Fonte: adaptado de LEHMANN et al., 2002.

SEVERIDADE	DESCRIÇÃO
LEVE	< 20 comedões, ou < 15 lesões inflamatórias, ou total das lesões contadas < 30;
MODERADA	20-200 comedões, ou 15-50 lesões inflamatórias, ou total das lesões contadas 30-125;
GRAVE	< 5 nódulos inflamatórios, ou total da contagem de comedões < 100, ou total das lesões inflamatórias contadas > 50, ou total das lesões contadas > 125;

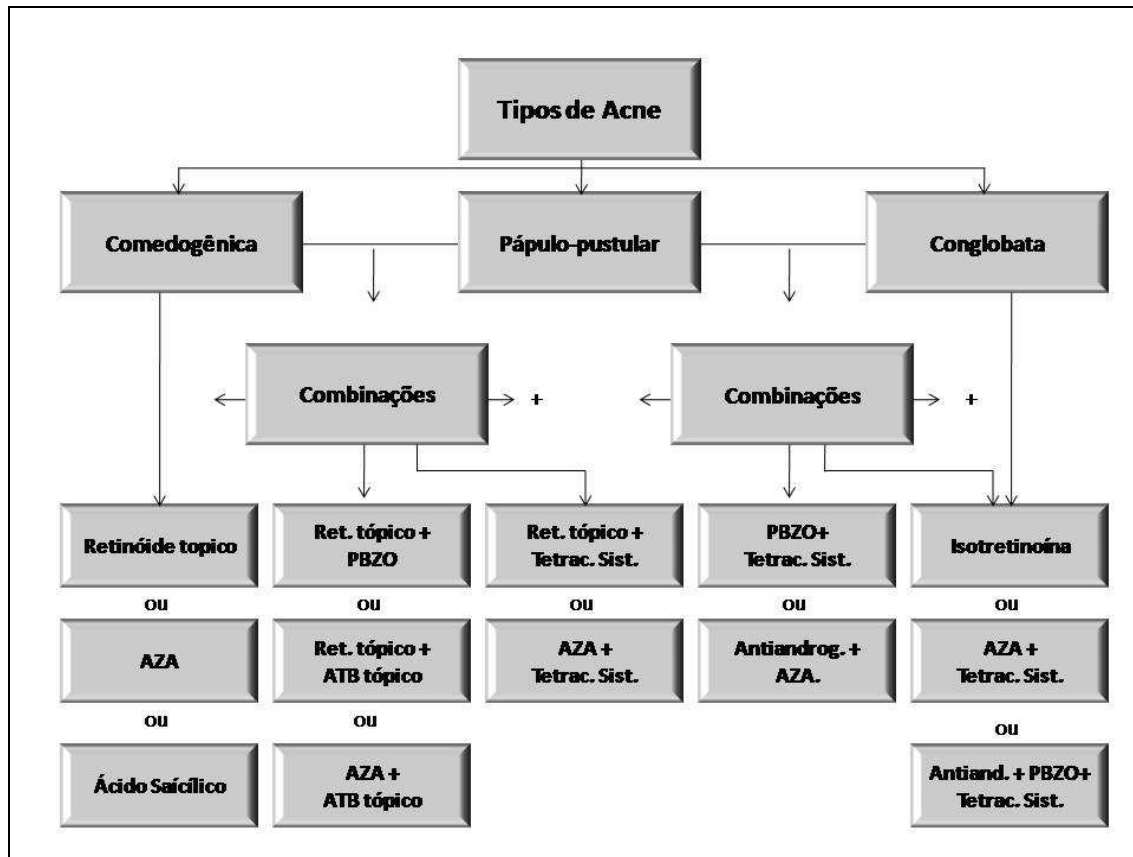
A seleção da terapia adequada para tratamento da acne depende da avaliação da gravidade do quadro que pode variar de acordo com a quantidade das lesões, o tipo de lesão (inflamatórias e não-inflamatórias) e o local envolvido na lesão (FDA, 2005).

### 3.1.3 Tratamento

Um grande número de opções terapêuticas disponíveis, para tratamento tanto tópico quanto oral, dificulta a escolha da terapia adequada, todavia, diretrizes e consensos vêm sendo elaborados a fim de que o tratamento da acne seja norteado por princípios científicos.

Os medicamentos mais utilizados para o tratamento da acne são: os retinoides, os antibióticos, o peróxido de benzoíla, terapia hormonal contraceptiva e antiandrogênica, ácido azeláico, ácido salicílico e derivados (MACHADO, 2005). O tratamento tópico, indicado para as formas leve e moderada da doença, está dividido, basicamente, em agentes queratolíticos (ação sobre o comedão) e antibióticos (ação sobre o *P. acnes*, principalmente) (STEINER, 2007). A Figura 4 apresenta as indicações para terapia tópica, sistêmica e combinada.

Na terapia sistêmica, retinoides como a isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico), isômero sintético da tretinoína, são geralmente utilizados nos casos de acne severa, em pacientes não responsivos a outros tratamentos.



**Figura 4:** Indicações para terapia tópica, sistêmica e combinada

ATB= antibiótico; AZA= ácido Azelaico; PBZO= Peróxido de Benzoíla

Fonte: adaptado de GOLLNICK & SCHRAMM, 1998.

A administração de contraceptivos orais combinados de baixa dosagem é aprovada pelo FDA para tratamento da acne. A associação de estrógeno e progesterona é utilizada nos casos de hiperandrogenismo de leve a moderado (STEINER, 2002b).

Antiandrógenos como a espironolactona também são utilizados para tratamento de mulheres com acne de início tardio na fase adulta. Possui mecanismo de ação multifatorial, principalmente por diminuir a ação da 5 $\alpha$ -redutase e a produção de testosterona (STEINER, 2002a; THIBOUTOT, 2000).

Os retinoides de uso tópico constituem, atualmente, o grupo mais potente de agentes queratolíticos, pois aumentam o *turnover* das células epiteliais foliculares, normalizando a queratinização e acelerando o processo de protusão do comedão (GOLLNICK & SCHRAMM, 1998, STEINER *et al.*, 2003).

A antibioticoterapia tópica é indicada nas formas leve a moderada. Atua reduzindo a colonização microbiana no folículo pilossebáceo, com consequente e indireta atividade anticomedogênica. Os antibióticos mais utilizados são as tetraciclina, eritromicina e clindamicina. O principal efeito adverso apresentado é a indução à resistência bacteriana, o que pode levar à perda da eficácia (TOYODA & MOROHASHI, 1998).

O ácido azeláico é um ácido dicarboxílico, indicado para tratamento tópico da acne comedogênica, pápulo-pustulosa (leve) e nos casos de acne severa, quando combinado ao tratamento sistêmico com tetraciclina ou antiandrógenos. Seu efeito antimicrobiano está baseado na redução da colonização por *P. acnes* na pele e ducto pilossebáceo. Além disso, o ácido azeláico reduz a concentração de ácidos graxos livres, normalizando a hipercornificação do folículo (GOLLNICK & SCHRAMM, 1998).

O peróxido de benzoíla é um potente agente bactericida de uso tópico nas concentrações de 2,5 a 10% em géis, cremes e loções. Nessas concentrações é efetivo na redução do *P. acnes* e ácido graxos livres oriundos da hidrólise do sebo. Há evidências de redução dos comedões, além da melhora nas lesões inflamatórias (BERSHAD, 2001).

O ácido salicílico apresenta propriedades queratolíticas, sendo frequentemente utilizado em pacientes intolerantes ao uso tópico de retinoides. Auxilia no combate aos comedões desobstruindo o folículo e reduzindo a taxa da descamação folicular. É usado em preparações de 5% a 10% e pode ser usado também como adjuvante em outras terapias. Causa eritemas e descamação provocando exacerbação nas lesões de acne inflamatória (LEYDEN, 2003). A Tabela 3 demonstra o espectro de ação dos agentes de uso tópico.

**Tabela 3** : Espectro de ação dos agentes de uso tópico

Fonte: adaptado de GOLLNICK &amp; SCHRAMM, 1998.

	Queratolítica/ Anticomedogênica	Antimicrobiana	Anti-inflamatória
Ac. Retinoico	++	(+)	-
Isotretinoína	++	(+)	(+)
Adapaleno	++	(+)	+
Ácido Azelaico	++	++	+
Eritromicina	-	++	-
Clindamicina	-	++	-
Tetraciclina	-	++	(+)
Peróxido de Benzoíla	(+)	+++	+
Ácido Salicílico	+	(+)	-

+++ = Muito forte    ++ = forte    + = moderada    (+) = leve    - = nenhuma

#### 3.1.4 Retinoides

Retinoide é o termo empregado para designar uma classe de compostos cuja estrutura química consiste da união de quatro grupos isoprenoides unidos. O esqueleto dos retinoides naturais é constituído por um anel não aromático de seis átomos de carbono com uma cadeia lateral poliprenoide que é, com poucas exceções, terminada com um grupo funcional constituído de carbono e oxigênio (DINIZ *et al.*, 2002).

Os retinoides naturais e análogos sintéticos da vitamina A (retinol) fazem parte de um grupo de vitaminas e hormônios que possuem pronunciados

efeitos sobre a pele, controlando a diferenciação e a proliferação celular (CHARPENTIER *et al.*, 1995; SHROOT, 1998). Apesar de serem considerados vitaminas necessárias ao funcionamento do organismo os retinoides não são produzidos endogenamente, devendo ser adquiridos através da dieta, tanto através de alimentos de origem animal, usualmente na forma de ésteres de retinol, como por alimentos de origem vegetal ( $\beta$ -caroteno), sendo posteriormente convertidos pelo intestino delgado em retinol (grupo funcional álcool) (ZAENGLEIN, 2008).

Uma vez absorvido, o retinol pode ser transportado e armazenado no fígado, facilitando funções enzimáticas, ou convertido reversivelmente em retinaldeído, o qual será posteriormente metabolizado irreversivelmente nos isômeros de ácido retinoico (ZAENGLEIN, 2008).

Na maioria dos tecidos, a forma biologicamente ativa do retinol é o ácido retinoico (AR) que apresenta dois estereoisômeros identificados, o ácido all-trans-retinoico (atRA) (tretinoína) e o ácido 9-cis-retinoico (9cRA). Ambos ligam-se a uma superfamília de receptores intranucleares que atuam como fatores de transcrição ligante-dependentes, sendo ativados pelos isômeros e metabólitos do ácido retinoico (FISHER *et al.*, 1994).

Considerando a evolução de cada composto retinoide, surge em 1989 a classificação dos retinoides em três grupos ou gerações. A primeira geração de compostos compreende o retinol (vitamina A) e os compostos derivados de seu metabolismo, como a tretinoína (ácido all-trans-retinoico) e a isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico) (GOLLNICK & SCHRAMM, 1998; ZAENGLEIN, 2008).

A segunda geração compreende os análogos sintéticos da vitamina A com uma parte da molécula modificada para produzir compostos que apresentam somente parte do perfil farmacológico da vitamina A. Os principais representantes desta geração são o etretinato e seu metabólito, a acitretina (DINIZ *et al.*, 2002).

Na terceira geração de compostos a molécula base da vitamina A é modificada com a perspectiva de selecionar uma atividade biológica específica da vitamina A, produzindo um fármaco com atividade biológica seletiva e com

efeitos adversos mínimos. Os retinoides da terceira geração são altamente potentes e possuem dois anéis aromáticos que restringem a flexibilidade da cadeia lateral. Os principais representantes desta geração são o tazaroteno e o adapaleno (DINIZ *et al.*, 2002).

### 3.1.5 Mecanismo de ação dos retinoides

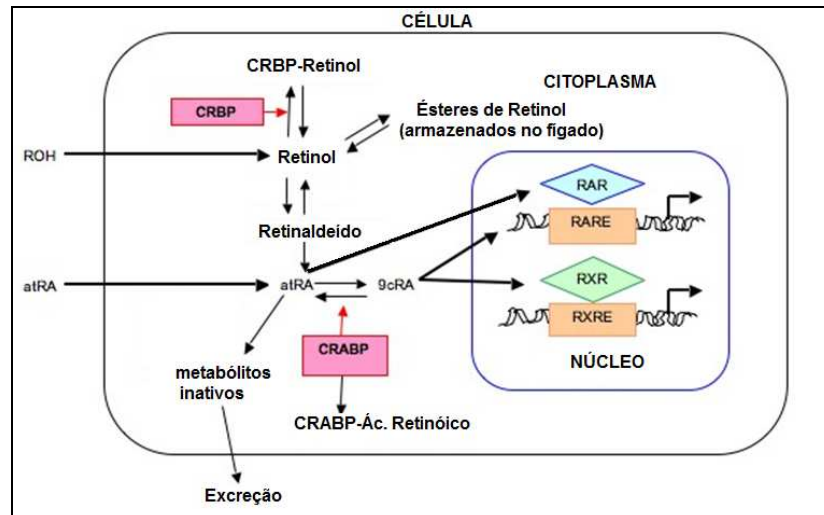
O mecanismo de ação dos retinoides ocorre através da sua ligação com receptores específicos, estrutural e farmacologicamente distintos, com formação de pareamentos heterodiméricos: os receptores de ácido retinoico (RAR) e os receptores de retinoides X (RXR) (CHARPENTIER *et al.*, 1995; KANG & VOORHEES, 1998).

Estes receptores foram classificados em RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  com base na diferença entre os aminoácidos que compõem sua estrutura, resposta frente aos diferentes retinoides e habilidade em modular a expressão de genes específicos (DINIZ *et al.*, 2002; SHROOT *et al.*, 1997). A Figura 5 representa o mecanismo de ação dos retinoides. A existência de vários tipos de receptores significa que os efeitos farmacológicos dos diferentes retinoides variam com a seletividade dos receptores (CHANDRARATNA, 1998).

A modulação destes genes resulta em respostas biológicas RARE e RXRE (elementos de resposta do ácido retinoico e elementos de resposta de retinoides) que podem, além de produzir aumento nos efeitos farmacológicos, desencadear uma série de reações adversas significativas (KANG & VOORHEES, 1998; SHROOT, 1998; ZAENGLEIN, 2008).

Além das superfamílias de receptores nucleares RAR e RXR, os retinoides também apresentam afinidade por outras proteínas como as proteínas citosólicas ligantes de ácido retinoico (CRABP) 1 e 2. Estas proteínas agem como transportadoras de proteínas, bem como tampão no controle das células em exposição ao ácido retinoico (SHROOT, 1998). O tipo predominante de receptor RAR expresso na epiderme humana é o RAR-  $\gamma$ , sugerindo que este seja o principal mediador da ação do ácido retinoico sobre a pele (CHANDRARATNA, 1998).





**Figura 5:** Mecanismo de ação dos retinoides.

\* RAR (receptores de ácido retinoico); RXR (receptores de retinoides X); CRABP (proteínas citosólicas ligantes de ácido retinoico); RARE (elementos de resposta do ácido retinoico); atRA (ácido all-trans-retinoico); 9cRA (ácido 9-cis-retinoico)

Fonte: adaptado de ([http://www.cardiff.ac.uk/phrmy/staffinfo/CS/research\\_cyp26/fig\\_1\\_RA.jpeg](http://www.cardiff.ac.uk/phrmy/staffinfo/CS/research_cyp26/fig_1_RA.jpeg))

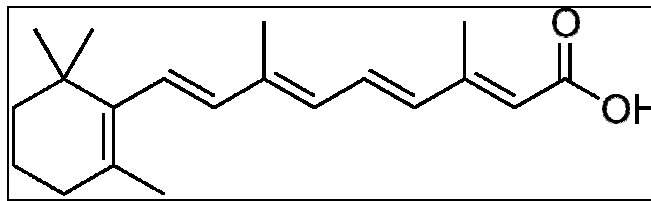
### 3.1.6 Ácido retinoico (AR)

O ácido retinoico ou tretinoína, é o principal representante da família dos retinoides, é útil no manejo da acne inflamatória e comedogênica, pois atua reduzindo a obstrução do folículo pilossebáceo e revertendo a hipercornificação do canal folicular. Com isso, o microclima nos folículos é alterado, prevenindo a formação de um ambiente favorável a *P. acnes* (THIELITZ *et al.*, 2006).

Sua indicação para uso tópico inclui a acne comedogênica e a forma leve da acne pápulo-pustulosa, com múltiplos comedões. Possui forte atividade anticomedogênica e comedolítica, atua modificando o processo anormal de queratinização na acne, entretanto apresenta uma pequena atividade anti-inflamatória e nenhuma atividade sebossupressora (GOLLNICK & SCHRAMM, 1998).

A tretinoína liga-se com afinidade semelhante aos três tipos de receptores RAR, apresentando baixa ou nenhuma afinidade por RXR. Apresenta também afinidade pelas proteínas citosólicas ligantes de ácido retinoico (FISHER *et al.*, 1994, ZAENGLEIN, 2008).

A presença de duplas ligações conjugadas confere ao AR alta instabilidade frente a fatores externos desencadeando uma série de reações químicas que levam à formação de produtos de degradação (Figura 6). Quando exposto à luz natural por 24 horas, o AR apresenta de 60 a 80 % de degradação do seu teor. Agentes oxidantes como o peróxido de benzoíla, usado frequentemente por pacientes com acne, induz a degradação de aproximadamente 80% no seu teor em apenas 4 horas de exposição e quase 100% em 24 horas (CZERNIELEWSKI *et al.*, 2001).



**Figura 6:** Estrutura química do ácido retinoico (AR).

A não-seletividade aos receptores, responsável pela ativação de múltiplas respostas biológicas e a formação dos produtos de degradação podem ser provavelmente alguns dos fatores associados à incidência elevada de efeitos adversos (CHANDRARATNA, 1998; CZERNIELEWSKI *et al.*, 2001; VERSCHOORE *et al.*, 1997).

Os principais efeitos adversos ocasionados pelo AR são eritema, descamação e ressecamento, podendo causar ainda um estreitamento do estrato córneo o que levaria a um aumento da sensibilidade da pele frente à luz (THIBOUTOT, 2000; WOLF, 2001). Os benefícios da tretinoína de uso tópico têm sido, de alguma forma, limitados pela alta prevalência de irritação resultante deste medicamento (CUNLIFFE, 1998).

O metabolismo e o catabolismo do AR provocam o rearranjo das partes estruturais do esqueleto dos retinoides justificando a existência de vários análogos com efeitos biológicos potencialmente diversos (DINIZ *et al.*, 2002).

### **3.2 ADAPALENO**

O adapaleno, também conhecido pela sigla CD271, é um potente retinoide análogo da vitamina A introduzido no mercado em 1995. É um derivado

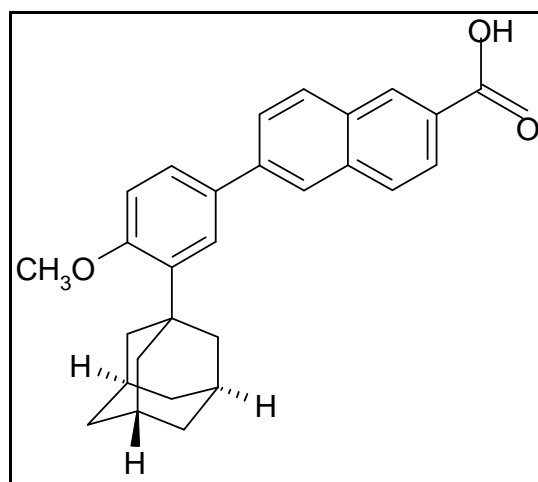
sintético do ácido naftoico, apresentando todos os benefícios terapêuticos da tretinoína, porém com baixa irritação e melhor tolerabilidade. Produz menos eritema, descamação e irritação após aplicação (CZERNIELEWSKI *et al.*, 2001; RÜHL & NAU, 1997).

Foi desenvolvido para o tratamento tópico da acne, mas, ao contrário do que acontece com os outros retinoides, é quimicamente estável, com baixo fluxo e perfil de distribuição diferenciado (SHROOT, 1998). Possui propriedades anti-inflamatórias, afeta a diferenciação celular e a queratinização (THIBOUTOT, 2000; WEISS & SHAVIN, 1998). É efetivo para o tratamento da acne leve a moderada (USP DI, 2005).

Por se tratar de um medicamento retinoide, o adapaleno faz parte da Portaria nº 344 (1998) que aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Dessa forma, o adapaleno enquadra-se na lista C2 (lista de substâncias retinoicas). Os medicamentos de uso tópico contendo as substâncias desta lista ficam sujeitos à venda sob prescrição médica sem a retenção de receita (BRASIL, 1998).

### 3.2.1 Descrição e propriedades físico-químicas

O nome químico do adapaleno é ácido 6- [3- (1-adamantil) - 4-metoxifenil] 2-naftoico. É um pó branco, solúvel em tetraidrofurano, facilmente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água (USP DI, 2005). O adapaleno apresenta a seguinte fórmula estrutural (Figura 7):



**Figura 7:** Estrutura química do adapaleno.

De acordo com dados obtidos no registro da patente europeia do produto, o adapaleno apresenta duas formas polimórficas: o estado amorfo e o estado cristalino, denominado forma alfa ( $\alpha$ ) (EP, 2006).

A dupla ligação instável presente na tretinoína foi substituída no adapaleno por anéis aromáticos do ácido naftoico, que conferem, dessa forma, melhores condições de estabilidade frente à exposição à luz e ao oxigênio (IRBY *et al.*, 2008; SHROOT *et al.*, 1997).

Apresenta-se como uma substância altamente lipofílica, que facilmente penetra na unidade pilosebácea. Em decorrência dessa natureza lipofílica, a absorção sistêmica é mínima, não havendo indícios de teratogenicidade (ZAENGLEIN, 2008). O grupamento adamantil, (ciclo não aromático) que é sabidamente um grupamento químico rígido, reduz a solubilidade e aumenta o ponto de fusão de moléculas a ele ligadas (SHROOT, 1998). O Quadro 1 apresenta a descrição e as propriedades físico-químicas do adapaleno.

**Quadro 1:** Descrição e propriedades físico-químicas do adapaleno.

Fórmula molecular:	$C_{28}H_{28}O_3$
Composição elementar:	C 81,52%, H 6,84%, O 11,64%
Massa molecular:	412,52
DCB nº.:	0027.01-3
Chemical Abstracts Service (CAS):	106685-40-9
Ponto de fusão:	319-322 °C
pK:	4,2
logP:	8,11

\*\* (BUDAVARI, 2001; PARFITT, 1999; USP DI, 2005).

A presença de fluorescência azul, inerente à sua estabilidade, é visualizada em condições especiais, e confere uma vantagem adicional à molécula, facilitando a sua visualização nas formulações e na pele (TRICHARD *et al.*, 2008).

### 3.2.2 Mecanismo de ação

Em nível molecular, o adapaleno tem afinidade por receptores com um perfil diferente dos receptores de ácido retinoico. Apresenta um perfil de afinidade seletivo para os receptores de ácido retinoico (RAR)  $\beta$  e  $\gamma$ , não apresentando nenhuma afinidade pelo RAR  $\alpha$  nem pelas proteínas citosólicas ligantes de ácido retinoico (CRABP's), o que melhora a sua tolerabilidade (SHROOT *et al.*, 1997; USP DI, 2005).

Esse diferenciado mecanismo de ação é uma propriedade importante, pois os receptores (RAR)  $\gamma$  são predominantemente encontrados nas células epidérmicas e epiteliais, o que pode induzir a uma maior inibição da diferenciação celular nos queratinócitos quando comparado à tretinoína. Esta inibição é a principal resposta para seu efeito comedolítico (CUNLIFFE, 1998; IRBY *et al.*, 2008).

O adapaleno liga-se fortemente aos aminoácidos do sítio de ligação dos receptores de ácido retinoico (RAR) e dos receptores de retinoides X (RXR) formando um complexo RAR-adapaleno-RXR. Este novo complexo formado liga-se a sítios específicos do DNA modulando a transcrição. As modificações determinadas pela tradução do DNA acabam por modificar a síntese de proteínas, o que, em última análise, leva a alterações na proliferação e diferenciação celulares (CZERNIELEWSKI *et al.*, 2001).

O adapaleno possui atividade anti-inflamatória direcionada (BERSHAD, 2001). Seu mecanismo de ação está particularmente relacionado com uma modulação imune não específica. Dessa forma, o adapaleno inibe o metabolismo oxidativo do ácido araquidônico, via lipoxigenase, a quimiotaxia dos neutrófilos polimorfos nucleares e a produção de radicais livres (THIELITZ *et al.*, 2006).

### 3.2.3 Forma farmacêutica e apresentação

Adapaleno encontra-se disponível nas seguintes formas farmacêuticas:

- Gel tópico e Creme 0,1 % (bisnagas plásticas de 30 g);

#### 3.2.4 Posologia

O adapaleno gel deve ser aplicado uma vez ao dia nas áreas afetadas antes de deitar (PARFITT, 1999). Uma película fina do gel deve ser aplicada, evitando olhos, lábios e mucosas. Os resultados terapêuticos devem ser observados após oito a doze semanas do tratamento (GALDERMA, 2003).

#### 3.2.5 Interações medicamentosas, precauções e reações adversas

Devido ao seu potencial para produzir irritação local em alguns pacientes, o uso concomitante de outros agentes tópicos potencialmente irritantes (medicamentos, agentes de limpeza ou cosméticos com efeito secativo), pode produzir efeitos adicionais, agravando o quadro (GALDERMA, 2003; USP DI, 2005).

Não há relato de efeitos teratogênicos em estudos em animais. Muito embora problemas relacionados com o uso tópico de adapaleno e o período gestacional não tenham sido relatados, recomenda-se a suspensão do uso durante a gravidez. Estudos de mutagenicidade *in vivo* e *in vitro* concluíram que o adapaleno não apresenta potencial mutagênico nem genotóxico (USP DI, 2005).

As principais reações adversas apresentadas pelo adapaleno de uso tópico são: sensação de queimação e ardência, eritema, prurido, descamação e ressecamento da pele (THIBOUTOT, 2000; USP DI, 2005).

#### 3.2.6 Farmacocinética

Possui baixa absorção através da pele (cerca de 0,01%) sendo que sua excreção ocorre principalmente pelo metabolismo biliar. Penetra rapidamente na unidade pilossebácea, sendo encontrado em quantidades significativas na epiderme e na derme (FRANÇA & KOROLKOVAS, 2005; GALDERMA, 2003; USP DI, 2005).

### 3.2.7 Determinação do Adapaleno

A literatura científica apresenta alguns trabalhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação simultânea do adapaleno e seus metabólitos em plasma e tecido, fluidos biológicos e na forma farmacêutica gel em presença de peróxido de benzoíla, com o objetivo de monitoramento clínico e de quantificação (Tabela 4). Entretanto, métodos para a determinação do adapaleno matéria-prima e nas formas farmacêuticas creme e gel, isoladamente, não foram encontrados.

**Tabela 4:** Resumo de ensaios utilizados para a determinação do adapaleno por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Coluna	Fase móvel*	Detecção	Autores
Adapaleno forma farmacêutica gel em presença de peróxido de benzoíla	250x4 ODS-RP18 (Merck)	ACN:THF:H <sub>2</sub> O:ác. trifluoroacético (43:36:21:0,02)	Ultravioleta 270 nm	MARTIN <i>et al.</i> , 1998
Adapaleno-glicuronídeo	Spherisorb ODS2A	Gradiente solvente A: água deuterada, solvente B (ACN: ác. trifluoroacético 0,2%).	320 nm HPLC-RMN	RÜHL <i>et al.</i> , 2001
Plasma e tecido	Spherisorb ODS2	Gradiente solvente A: (1:1, V/V, solução aquosa com 0,5% de acetato de amônio: metanol-pH 4), solvente B (1:1, metanol: isopropanol).	Fluorescência, com emissão 437nm e excitação 320 nm	RÜHL & NAU, 1997

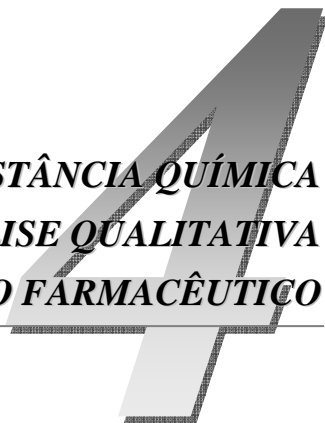
\* ACN: acetonitrila, THF: tetraidrofurano





***CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA  
DE REFERÊNCIA (SQR) E ANÁLISE QUALITATIVA  
DA MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO FARMACÊUTICO***

---





A utilização de substâncias químicas de referência (SQR) visa a assegurar a identidade e a qualidade da substância ativa e do produto acabado. Além disso, auxilia na exatidão e reprodutibilidade dos resultados analíticos exigidos pelos compêndios oficiais e pelo controle de qualidade farmacêutico (WHO, 1999).

Segundo o FDA (2000), existem duas categorias de SQR: as compendiais, as quais são obtidas de fontes oficiais e não necessitam de caracterização posterior e as não compendiais, que são aquelas com elevado teor de pureza, mas que devem ser cuidadosamente caracterizadas para garantir sua identidade, potência e pureza.

Os métodos qualitativos utilizados para estabelecer tanto a caracterização da SQR quanto a identificação de produtos farmacêuticos são baseados nas características intrínsecas de cada fármaco e visam a assegurar a identidade e a qualidade da substância ativa e do produto acabado. Estes métodos, geralmente, são mais fáceis, menos onerosos e mais rápidos que os métodos quantitativos.

Os métodos de identificação, de acordo com o FDA (2000) e a AOAC (2002), são métodos de análise cuja resposta é a presença ou ausência do analito detectado direta ou indiretamente em uma determinada quantidade da amostra devido às suas propriedades físicas e químicas.

Tais métodos analíticos podem incluir análises elementares, estudos cristalográficos de difração de raios-X, espectroscopia de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), análises de grupos funcionais, e espectrofotometria de infravermelho (IV) ou ultravioleta (UV), assim como outros testes complementares necessários para estabelecer a completa identificação e caracterização da substância (FDA, 2000).

Considerando que não foram encontrados dados publicados sobre o controle de qualidade do adapaleno, e por ser a SQR do fármaco em estudo classificada como não compendial, neste trabalho além de caracterização da SQR, realizou-se a análise qualitativa através da identificação do adapaleno

tanto na matéria-prima (amostra) quanto no produto acabado através dos métodos descritos a seguir.

#### **4.1. AMOSTRAS**

##### **4.1.1. Substância química de referência (SQR)**

Utilizou-se como SQR, matéria-prima proveniente da distribuidora de insumos farmacêuticos Deg Importação de Produtos Químicos LTDA. O teor de adapaleno declarado (100,6%), lote (A50017001Z), validade (08/2010) e origem (Índia) encontram-se especificados no certificado de análise fornecido pelo distribuidor.

##### **4.1.2. Matéria-prima**

A amostra de adapaleno denominada como ADAP-1 foi adquirida da distribuidora de insumos farmacêuticos Gerbrás Química Farmacêutica. O teor declarado (99,82%), lote (060214ADAP), validade (02/2008) e origem (China) encontram-se especificados no certificado de análise fornecido pelo distribuidor.

##### **4.1.3. Produto Farmacêutico**

As amostras de produto farmacêutico, utilizadas em todos os testes realizados, apresentam-se na forma farmacêutica gel (0,1%), com apresentação de 30 g acondicionadas em bisnaga plástica e foram adquiridas de empresa distribuidora de medicamentos, identificadas pelo lote 7051054 e com validade até dezembro de 2010.

Cada grama de forma farmacêutica gel contém:

➤ **Adapaleno 1 mg e adjuvantes q.s.p. 1 g.**

Os adjuvantes utilizados, indicados na bula do medicamento são: carbômero, propilenoglicol, poloxâmero, edetato dissódico, metilparabeno, fenoxietanol e hidróxido de sódio.

## **4.2. CARACTERIZAÇÃO DA SQR E ANÁLISE QUALITATIVA DA MATÉRIA-PRIMA E FORMA FARMACÊUTICA GEL**

### **4.2.1. Determinação da solubilidade**

#### **4.2.1.1. Material e métodos**

O ensaio foi realizado conforme descrito na F. Bras. IV (1988). O teste de solubilidade foi conduzido à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C). Foram adicionadas quantidades crescentes dos solventes selecionados para o ensaio e as duas amostras de adapaleno (SQR e ADAP-1), dispersas no solvente, foram agitadas e, quando necessário, submetidas a banho ultrassônico até a completa solubilização.

Os solventes utilizados foram acetato de etila, acetonitrila, ácido clorídrico (0,1 M), água, clorofórmio, diclorometano, dimetilformamida, etanol, hidróxido de sódio (0,1 M), isopropanol e metanol.

#### **4.2.1.2. Resultados e discussão**

Muitas informações sobre a natureza da amostra podem ser obtidas mediante simples testes de solubilidade. A solubilidade dos compostos orgânicos pode ser dividida em duas categorias principais: a solubilidade decorrente de simples miscibilidade e a solubilidade resultante de uma reação química.

De acordo com USP DI (2005) o adapaleno é um pó facilmente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água. Os resultados encontrados indicam que tanto a SQR como a amostra ADAP-1 são muito pouco solúveis em etanol e insolúveis em água, apresentando, portanto, em relação ao etanol, solubilidade 1000 vezes menor que a indicada pela USP DI (2005).

Os resultados obtidos com o teste de solubilidade auxiliaram na escolha do solvente utilizado para o desenvolvimento da metodologia analítica do adapaleno matéria-prima e da forma farmacêutica gel. A escolha do solvente deve levar em consideração além do custo, a sua toxicidade.

Considerando a menor toxicidade do etanol em relação ao acetato de etila, clorofórmio e metanol, optou-se pelo etanol como solvente utilizado para desenvolvimento da metodologia analítica. O pH da solução final em etanol apresentou-se levemente básico (aproximadamente 8). As características de solubilidade das duas amostras podem ser observadas no Quadro 2.

**Quadro 2:** Solubilidade do adapaleno SQR e ADAP-1 nos solventes testados.

<b>Solvente</b>	<b>Termo descritivo</b>
Acetato de etila	Muito pouco solúvel
Acetonitrila	Praticamente Insolúvel
Ácido clorídrico (0,1M)	Praticamente Insolúvel
Água	Insolúvel
Clorofórmio	Muito pouco solúvel
Diclorometano	Praticamente Insolúvel
Dimetilformamida	Pouco solúvel
Etanol	Muito pouco solúvel
Hidróxido de sódio (0,1M)	Praticamente Insolúvel
Isopropanol	Praticamente Insolúvel
Metanol	Muito pouco solúvel

Com relação à solubilidade apresentada pelas duas amostras analisadas em etanol, observou-se uma maior facilidade de solubilização da amostra ADAP-1 em relação à SQR, necessitando de apenas um ciclo de banho ultrassônico durante o teste de solubilidade. Com relação à SQR, foram necessários 2 ciclos de banho ultrassônico para a completa limpidez da solução.

A baixa solubilidade do fármaco associada à existência de polimorfismo relatado por um dos registros da patente do produto, sugere uma investigação mais detalhada de outras propriedades físico-químicas do composto, avaliando-se a relação entre as diferentes formas físicas para o fármaco. Este resultado pode ser explicado pela presença de formações cristalinas diferenciadas nas duas amostras, fato que pode ser investigado por outras

técnicas analíticas de caracterização e identificação como os testes de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-x realizados nos itens 4.2.10 e 4.2.11.

#### 4.2.2. Ponto de fusão

##### 4.2.2.1. Material e métodos

A faixa de fusão do adapaleno SQR e ADAP-1 (previamente dessecado) foi determinada através de dois equipamentos: equipamento automático Mettler Toledo (método do capilar) e equipamento segundo Koffler, através do método do bloco metálico aquecido.

Os procedimentos foram realizados em triplicata para cada equipamento e os resultados, além de comparados entre si, foram comparados com os resultados obtidos pelo experimento de calorimetria exploratória diferencial (DSC), bem como, com os resultados fornecidos pelos laudos do distribuidor.

No equipamento automático marca METTLER TOLEDO FP90 o ponto de fusão foi determinado através da inserção das amostras de adapaleno em tubos capilares com 1 mm de diâmetro e 6 cm de comprimento, introduzidos verticalmente no equipamento. O valor do ponto de fusão foi determinado automaticamente pela variação da transmitância gerada pela fusão do sólido. O equipamento foi previamente calibrado com uma substância, que acompanha o equipamento, com ponto de fusão próximo ao ponto de fusão do adapaleno obtido na literatura consultada.

No equipamento segundo Koffler da marca REICHERT, um bloco metálico de elevada condutividade térmica, resistente e de superfície plana e polida, foi uniformemente aquecido. As amostras, SQR e ADAP-1, previamente dessecadas, foram dispostas, isoladamente, entre lâminas de vidro sobre o bloco aquecido. A temperatura foi regulada através do reostato e a observação da faixa de fusão foi realizada através do microscópio acoplado ao bloco metálico aquecido. Para a calibração foi utilizada a mesma substância utilizada para calibração do equipamento automático.

## 4.2.2.2. Resultados e discussão

Os valores obtidos em três determinações do ponto de fusão das duas amostras em análise são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5:** Valores obtidos para o ponto de fusão da SQR.

<b>Equipamento</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Koffler (Reichert)	320-321°C	321-322°C	321-322°C
Mettler Toledo FP 90	321,5 °C	322,1 °C	322,5 °C

**Tabela 6:** Valores obtidos para o ponto de fusão de ADAP-1.

<b>Equipamento</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Koffler (Reichert)	320-322°C	321-322°C	321-322°C
Mettler Toledo FP 90	321,4°C	321,9°C	322,3°C

Na caracterização de uma substância orgânica a determinação das constantes físicas tal como o ponto de fusão é primordial, pois não só fornece informações úteis para a identificação da amostra como pode ser fundamental na dedução de sua pureza.

Os valores de ponto de fusão obtidos a partir da análise com o equipamento de bloco metálico aquecido (Koffler) e pelo método automático, apresentam-se praticamente equivalentes aos valores descritos na literatura (319-322°C) (BUDAVARI, 2001), e com os dados fornecidos pelo laudo do distribuidor da SQR (321°C).

Um composto orgânico cristalino puro tem, geralmente, um ponto de fusão bem definido, isto é, a diferença entre a temperatura na qual ocorre o início da fusão dos cristais e a temperatura na qual a amostra se torna completamente líquida, não excede de 0,5 a 1°C. A presença de impurezas pode ocasionar um alargamento nesta característica gerando a substituição de um ponto de fusão definido por uma faixa de fusão, que será tanto maior quanto mais impurezas as substâncias contiverem (VOGEL, 1989).



A determinação do ponto de fusão baseada na técnica de microscopia (Koffler) requer pouca quantidade de amostra em comparação com o método por capilar além de incluir a possibilidade de observação de toda a mudança no comportamento dos cristais durante a fusão. Entretanto, o resultado depende da capacidade de visualização e discernimento entre o início e o término da fusão, bem como do tamanho dos cristais.

Levando-se em consideração que os resultados obtidos são praticamente equivalentes aos valores consultados e que, em média, diferenças superiores a 1°C entre as determinações nas duas técnicas não foram observadas, e sendo a determinação do ponto de fusão um teste auxiliar indicativo da pureza do fármaco, seus resultados serão associados, paralelamente, a outras técnicas analíticas de caracterização e identificação.

#### 4.2.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

##### 4.2.3.1. Material e métodos

O experimento de calorimetria exploratória diferencial foi realizado na central analítica do Instituto de Química (UFRGS). O equipamento utilizado foi um calorímetro diferencial de varredura da marca TA Instruments modelo DSC 2910, em cápsulas de alumínio fechadas, contendo 1 mg de adapaleno (SQR e ADAP-1). O equipamento foi acoplado a um controlador de fluxo sob atmosfera de gás inerte. Os parâmetros experimentais utilizados estão apresentados no Quadro 3.

**Quadro 3:** Especificação dos parâmetros experimentais utilizados na calorimetria exploratória diferencial.

Parâmetro	Especificação
Gás de arraste	Nitrogênio
Faixa de aquecimento	200- 350 °C
Vazão do gás de arraste	50 mL/min
Velocidade de aquecimento	10 °C/min

#### 4.2.3.2. Resultados e discussão

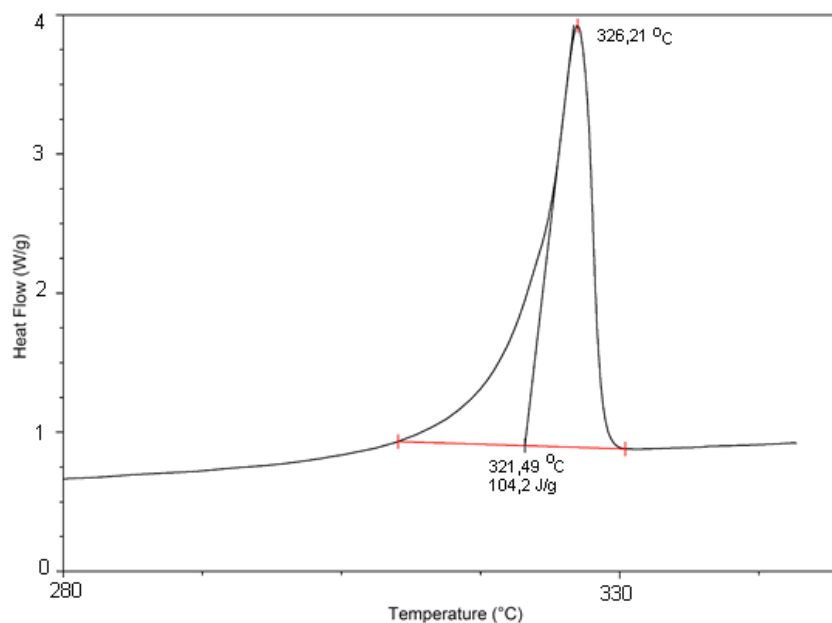
A calorimetria exploratória diferencial (DSC – differential scanning calorimetry) é uma técnica de análise térmica atualmente empregada em pesquisa e controle de qualidade de produtos farmacêuticos para a caracterização de substâncias, excipientes, formas farmacêuticas e para o controle em processo, fornecendo informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância (THOMPSON, 2000).

Esta técnica permite determinar a temperatura de fusão e de decomposição, além de fornecer dados sobre a estabilidade térmica de compostos, determinação do grau de cristalinidade e avaliação da presença de polimorfos e de impurezas (CLAS *et al.*, 1999; IKEDA *et al.*, 2005; USP 31, 2008).

O ensaio de DSC foi realizado a fim de verificar o comportamento térmico da SQR e de ADAP-1, bem como avaliar a presença de polimorfismo nas amostras em análise. As Figuras 8 e 9 ilustram as curvas de DSC da SQR e de ADAP-1. A fusão do fármaco é observada através dos picos endotérmicos apresentados nos termogramas. Os eventos térmicos são apresentados na Tabela 7.

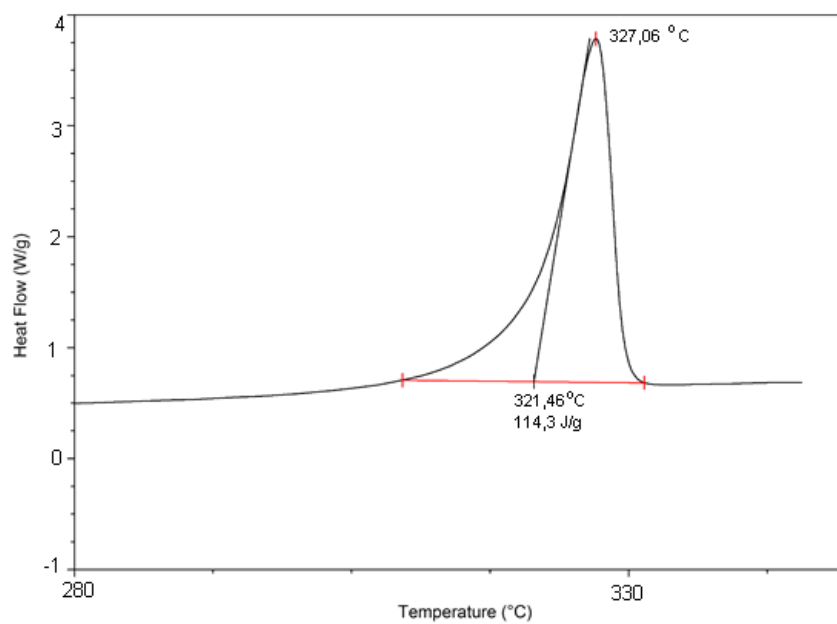
Esta técnica envolve o aquecimento e arrefecimento de uma amostra e de uma substância de referência à mesma velocidade. A variação de temperatura entre a amostra e a substância de referência (variação entálpica) se dá em função da sua natureza e da temperatura em que se encontra o ambiente de aquecimento enquanto ambas são submetidas a um mesmo programa, rigorosamente controlado.

A endoterma de fusão pode ser observada inicialmente pela temperatura do início da fusão (*onset*), temperatura onde a transição começa se afastar da linha de base. Geralmente, o ponto de fusão é definido como a temperatura de onset, embora alguns autores descrevam como sendo a temperatura máxima (final da fusão).



**Figura 8:** Termograma do adapaleno SQR.

Condições termoanalíticas: equipamento TA Instruments modelo DSC 2910 acoplado a um controlador de fluxo sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Velocidade de aquecimento de 10 °C/min.



**Figura 9:** Termograma de ADAP-1.

Condições termoanalíticas: equipamento TA Instruments modelo DSC 2910 acoplado a um controlador de fluxo sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Velocidade de aquecimento de 10 °C/min.

A interpretação dos dados contidos nesta curva leva à identificação de diferentes regiões. Assim, o segmento apresentado no termograma, ilustra um pico endotérmico representando absorção de energia. Neste caso, em particular, representa a temperatura de fusão do material.

**Tabela 7:** Dados obtidos por DSC para o adapaleno SQR e ADAP-1.

	SQR	ADAP-1
<i>Peak</i> (°C) <sup>1</sup>	326,21	327,06
<i>Onset</i> (°C) <sup>2</sup>	321,49	321,46
<i>Heat</i> (J/g) <sup>3</sup>	104,2	114,3

1 – Fim da fusão, 2 – Início da fusão, 3 – Valor de entalpia ( $\Delta H$ ).

Nos termogramas apresentados, observou-se somente um evento endotérmico referente à fusão da matéria-prima iniciando-se aproximadamente em 321 °C. Os valores de *Onset* foram muito próximos tanto para SQR quanto para ADAP-1, sugerindo tratar-se de estruturas cristalinas semelhantes para ambas.

Os resultados obtidos por DSC serão combinados a outras técnicas complementares que permitam avaliar o seu comportamento cristalográfico auxiliando na elucidação dos aspectos apontados por meio da análise térmica. Através de técnicas termoanalíticas como a calorimetria exploratória diferencial é possível obter informações importantes a respeito de características relativas às distintas fases polimórficas nos fármacos (GIRON, 1995).

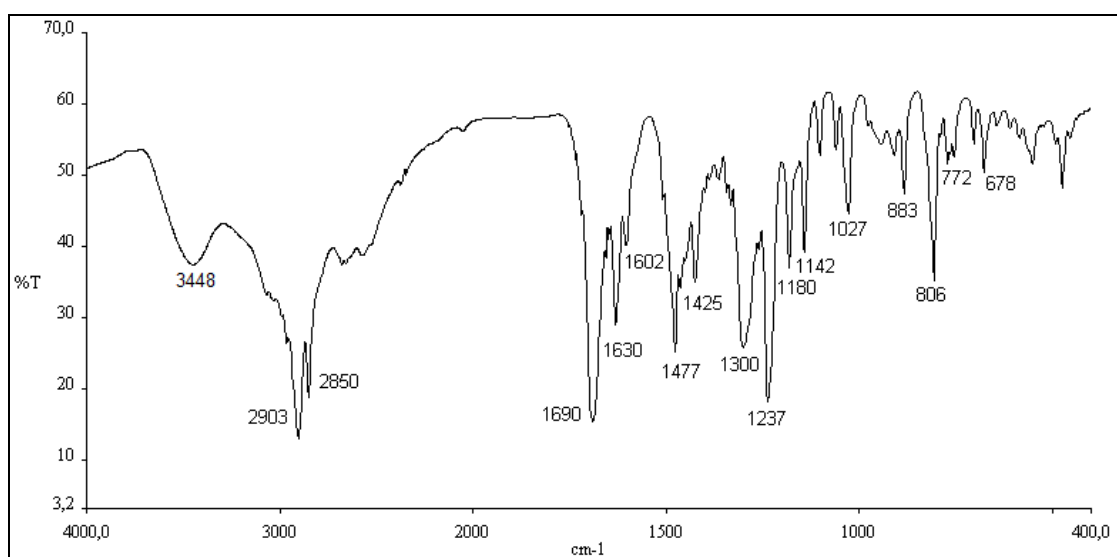
#### 4.2.4. Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

##### 4.2.4.1. Material e métodos

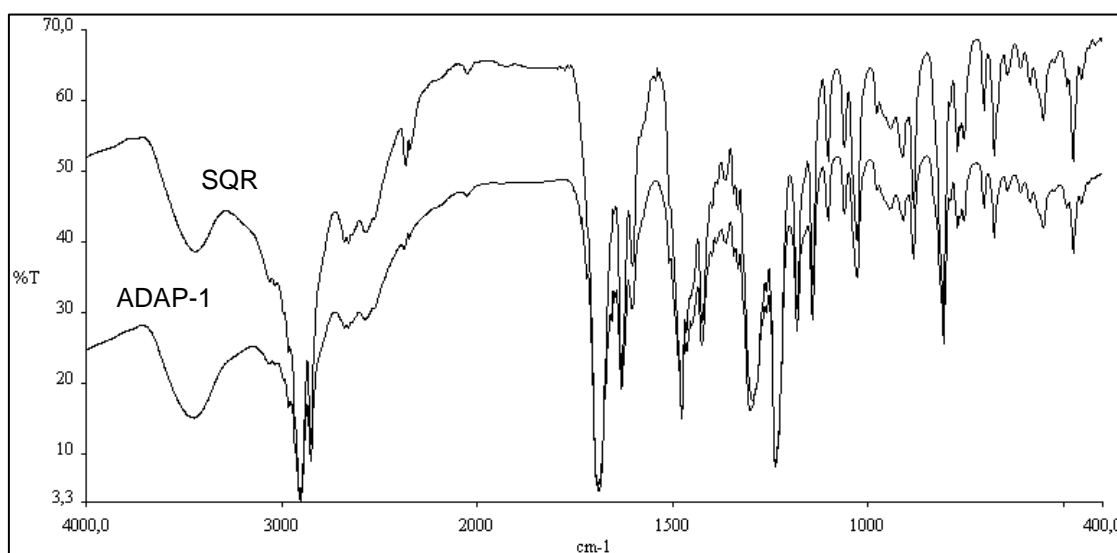
O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido utilizando-se pastilhas de brometo de potássio. Para a preparação das pastilhas, misturou-se 1,5 mg de adapaleno (SQR e ADAP-1), respectivamente, com 150 mg de brometo de potássio, previamente dessecado a 105 °C. As pastilhas foram analisadas em espectrofotômetro PerkinElmer modelo Spectrum BX.

## 4.2.4.2. Resultados e discussão

A espectrofotometria na região do infravermelho (IV) é um método analítico de identificação que fornece resultados rápidos e satisfatórios, possibilitando a realização de análises não destrutivas, com a obtenção de uma grande quantidade de dados. A análise espectrofotométrica da SQR na região do infravermelho, bem como a sobreposição do espectro de ADAP-1 obtido com o espectro da SQR estão ilustrados nas Figuras 10 e 11.



**Figura 10:** Espectro de absorção na região do IV para o adapaleno SQR em KBr (4000 a 400 cm<sup>-1</sup>).



**Figura 11:** Espectro de absorção da sobreposição SQR e ADAP-1 na região do IV em KBr (4000 a 400 cm<sup>-1</sup>).

\*\* Espectro deslocado para facilitar visualização da sobreposição.

O espectro de ADAP-1, analisado individualmente, bem como suas principais bandas de absorção encontram-se na Figura 43 em ANEXO.

As bandas de absorção características do fármaco, e as possíveis atribuições, de acordo com a bibliografia consultada (NAKANISHI e SOLOMON, 1977; PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN *et al.*, 1994), encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8:** Frequências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para SQR e ADAP-1.

Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições **
3448	Deformação axial O-H
2903	Deformação axial C-H de alcano
2850	Ar-O-CH <sub>3</sub> (metoxila ligada a aromático)
1690	Deformação axial C=O da carbonila de ác. Carboxílico
1630 ~ 1602	Deformação axial C=C de aromático
1477	Deformação angular de -(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -
1425	Deformação angular simétrica de (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> adjacente a carbonila
1300 ~ 1180	Acoplamento de deformação angular de O-H e a axial de C-O
1142 ~ 1027	Deformação axial de C-O-
806; 883	Deformações angulares de átomos adjacentes ao anel aromático (aromático trissubstituído -1, 2,4)
772 ~ 678	Deformação angular -CH- do anel aromático

\*\* PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN *et al.*, 1994; NAKANISHI e SOLOMON, 1977.

As análises espectrofotométricas na região do infravermelho juntamente com os demais métodos realizados auxiliaram na identificação da substância química utilizada como referência.

A correlação pico a pico constitui boa prova de identidade, visto ser muito pouco provável que dois compostos diferentes tenham o mesmo espectro no infravermelho. Baseados na similaridade e na correlação entre a estrutura da molécula e seu espectro, a identificação de uma substância torna-se mais simples quando se compara o espectro da amostra em análise com o da substância de referência.

Através da análise comparativa entre os espectros obtidos neste trabalho (SQR e ADAP-1), observa-se que as amostras apresentam similaridade entre as principais bandas de absorção características do fármaco. Os resultados apresentados confirmam ser possível a utilização da espectroscopia no infravermelho como ferramenta analítica rápida e satisfatória na identificação deste fármaco.

O espectro da amostra ADAP-1 confirmou as informações fornecidas pela análise de DSC, demonstrando não haver diferença na estrutura cristalina das duas amostras analisadas. Dessa forma, não foram observados, nas duas amostras analisadas, estruturas polimórficas diferentes, uma vez que estes apresentam diferentes arranjos moleculares que podem causar diferenças nos espectros de IV (ALDRIDGE, *et al.*, 1996).

#### 4.2.5. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

##### 4.2.5.1. Material e métodos

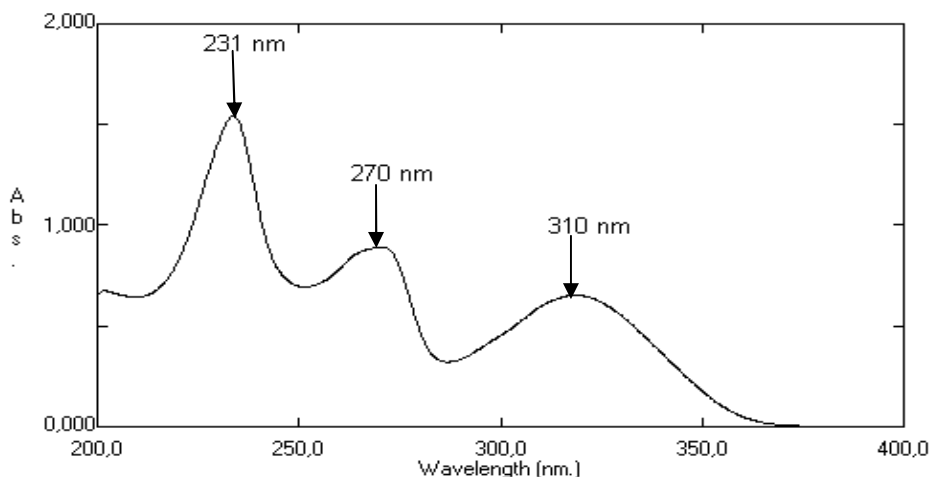
A identificação do adapaleno, SQR, ADAP-1, através da espectrofotometria na região do UV foi realizada com o preparo das soluções em etanol na concentração de 12 µg/mL para obtenção dos espectros UV entre 400 e 200 nm. O solvente utilizado (etanol) foi selecionado a partir dos ensaios preliminares de solubilidade.

Os espectros de UV foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC, em cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico, utilizando-se etanol como branco. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do programa UVPC 39.

##### 4.2.5.2. Resultados e discussão

A Figura 12 ilustra o espectro obtido com a solução de adapaleno SQR (12 µg/mL) em etanol na região do ultravioleta. No espectro de absorção molecular do adapaleno SQR apresentado, observam-se três máximos de absorção em 231 nm, 270 nm e 310 nm, que podem ser atribuídos às transições eletrônicas  $\pi - \pi^*$  aromáticas presentes na molécula do fármaco.

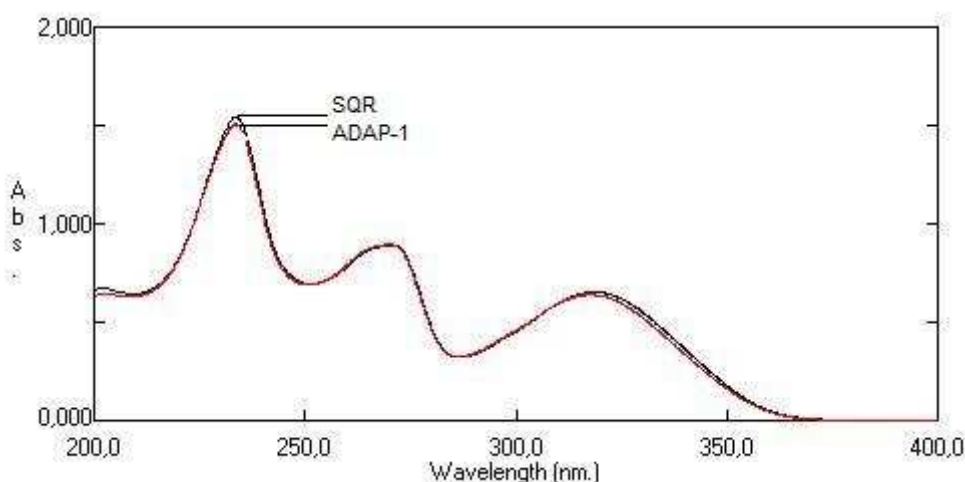
Apesar de ser considerado um método pouco específico de identificação, a espectrofotometria no UV permite, por exemplo, identificar substâncias com base no seu espectro e nas suas características espectrais através da comparação do espectro obtido da amostra com espectros obtidos a partir da SQR.



**Figura 12:** Espectros de absorção na região do UV referente à solução de adapaleno SQR em etanol (12 µg/mL).

A Figura 13 ilustra o espectro obtido a partir da sobreposição das amostras de adapaleno SQR e ADAP-1 (12 µg/mL) em etanol na região do ultravioleta.

Os espectros obtidos para análise do adapaleno SQR e amostra ADAP-1 por espectrofotometria na região do UV apresentam o mesmo perfil, apontando a mesma identidade para ambas as soluções.



**Figura 13:** Espectros de absorção na região do UV referente à solução de adapaleno SQR e ADAP-1 em etanol (12 µg/mL).



#### 4.2.6. Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)

##### 4.2.6.1. Material e métodos

Para a identificação do adapaleno na forma farmacêutica gel foram preparadas soluções da SQR e do gel em etanol na concentração de 12 µg/mL para obtenção dos espectros de UV-D.

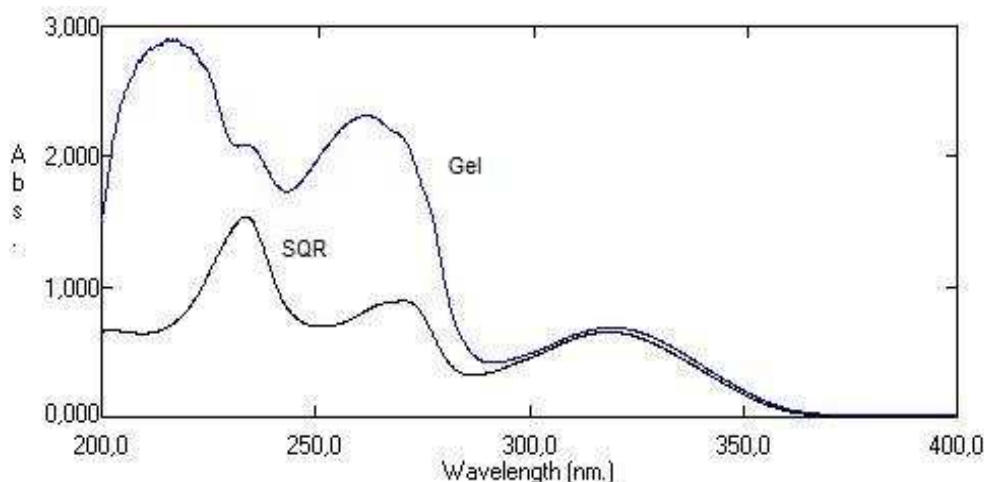
Os espectros de UV-D foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico. As leituras foram realizadas entre 200 e 400 nm. A identificação do adapaleno na forma farmacêutica gel foi realizada utilizando derivada de primeira ordem, delta lambda (4) e fator de escala (FE) 20. Os parâmetros selecionados para análise qualitativa do fármaco presente no gel foram selecionados a partir dos estudos preliminares com as soluções da SQR, da forma farmacêutica gel e dos adjuvantes isoladamente e estão apresentados em Resultados e discussão no item 5.3.1.2.1 (Aspectos instrumentais e definição dos principais parâmetros da UV-D).

A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do programa UVPC 39 que permite a escolha da ordem da derivada, o valor do fator de escala e a variação do delta lambda ( $\Delta\lambda$ ).

##### 4.2.6.2. Resultados e discussão

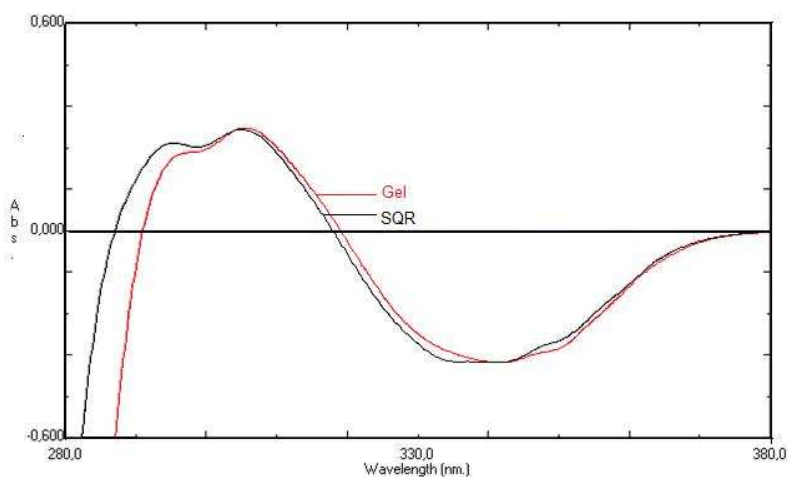
A Figura 14 ilustra os espectros obtidos com as soluções de adapaleno SQR e gel (12 µg/mL) em etanol na região do UV (ordem zero) e mostra, claramente, a interferência na absorvância devido aos excipientes da formulação.

Um dos problemas da espectrofotometria na região do ultravioleta está relacionado com a sobreposição das bandas espectrais de transição eletrônica, impossibilitando a determinação e identificação de fármacos quando ocorrem misturas de componentes, nas presença dos adjuvantes da formulação, produtos de degradação, etc. (PASCOAL *et al.*, 2003).



**Figura 14:** Espectros de absorção na região do UV (ordem zero) referentes às soluções de adapaleno SQR e gel em etanol (12 µg/mL).

A Figura 15 apresenta os espectros na região do UV-D<sup>1</sup> para as soluções de adapaleno SQR e gel (12 µg/mL) em etanol. Os espectros obtidos para análise do adapaleno SQR e FF gel por espectrofotometria na região do UV-D<sup>1</sup> apresentam o mesmo perfil e intensidade de absorção no intervalo de comprimento de onda de interesse, apontando a mesma identidade para ambas as soluções.



**Figura 15:** Espectros de absorção na região do UV-D<sup>1</sup> referentes às soluções de adapaleno SQR e gel em etanol (12 µg/mL).

Na espectrofotometria derivada os espectros são obtidos colocando-se o gráfico em ordens derivadas de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda. Esses gráficos podem revelar detalhes espectrais que não são observados em um espectro normal (SKOOG *et al.*, 2002). Deste modo, pode-se individualizar melhor os constituintes e até eliminar a

interferência de um componente sobre o outro, identificando e medindo a concentração de um componente enquanto há absorção de outro.

#### 4.2.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

##### 4.2.7.1. Material e métodos

A caracterização do adapaleno, SQR, ADAP-1 e produto acabado, foi determinada através de seus respectivos tempos de retenção. As análises por CLAE utilizaram cromatógrafo a líquido SHIMADZU® LC-10ADVP, equipado com detector SPD-M10AVP de arranjo de fotodiodos (DAD), desgaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10AVP e injetor manual RHEODYNE®. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do aplicativo CLASS-VP. Os parâmetros experimentais utilizados estão apresentados no Quadro 4.

**Quadro 4:** Condições cromatográficas utilizadas para caracterização da SQR, ADAP-1 e forma farmacêutica gel por CLAE.

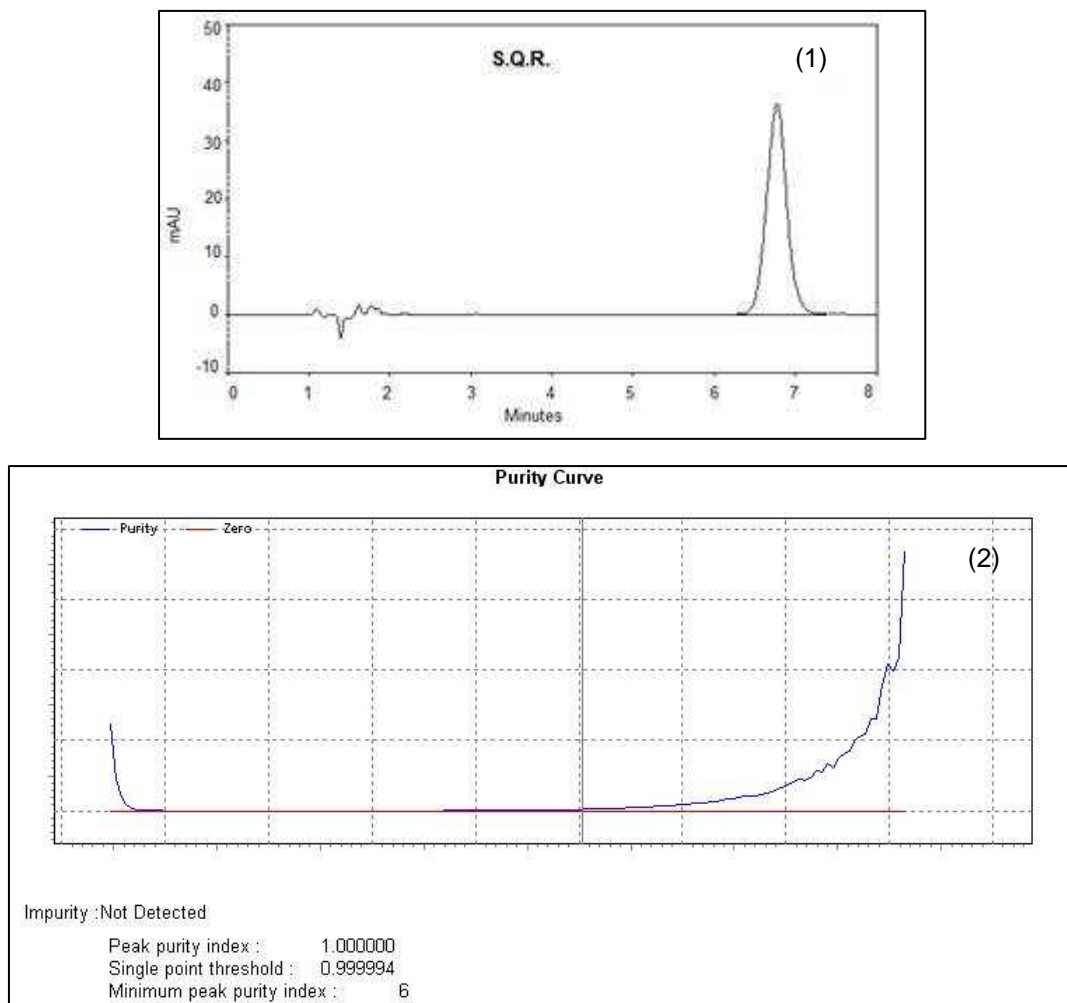
Parâmetro	Especificação
Coluna	C8 fase reversa LiChrocart®/LiChrospher®, Merck®
Fase móvel	Acetonitrila: água (67:33, V/V) * pH =2,5 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
Dimensões da coluna	125 × 4.6 mm
Diâmetro de partícula	5 µm
Fluxo da fase móvel	1,4 mL·min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	20 µL
Detecção	Ultravioleta, λ = 321 nm

\*pH ajustado com ácido fosfórico 20% V/V

##### 4.2.7.2. Resultados e discussão

A Figura 16 apresenta o cromatograma da solução de adapaleno SQR. A análise do espectro de absorção molecular, obtido pela análise da pureza do pico, através do detector com arranjo de fotodiodos (DAD), do pico principal, com tempo de retenção de aproximadamente 6,8 minutos, revelou um

percentual de 99,99% de pureza, demonstrando não haver a presença de impurezas.

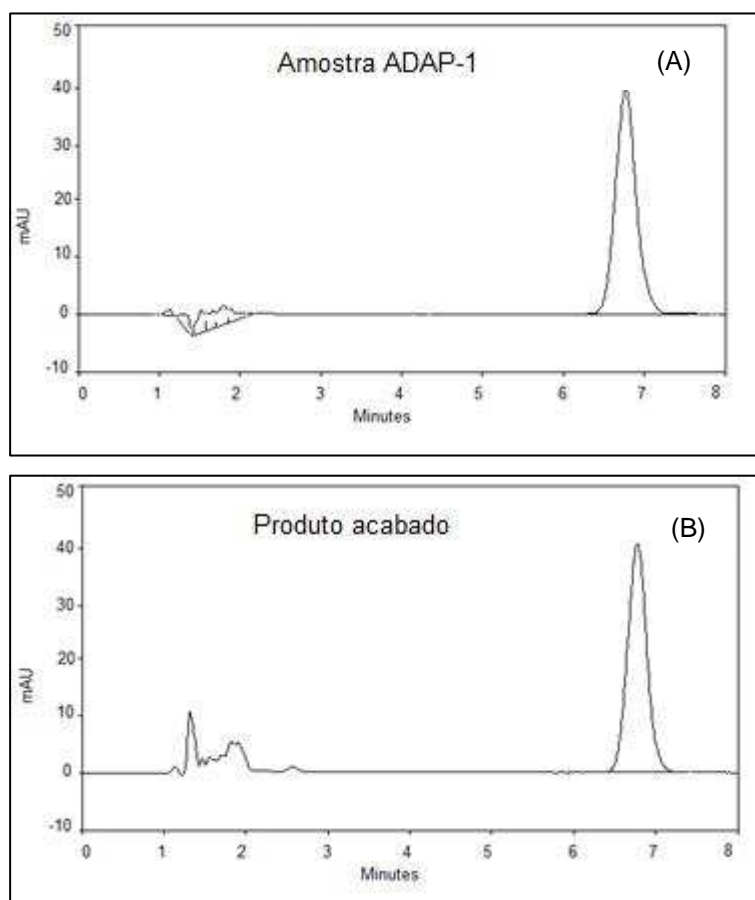


**Figura 16:** Cromatograma (1) obtido com a solução de adapaleno SQR, na concentração de 12 µg/mL. Espectro (2) da solução de adapaleno SQR, na concentração de 12 µg/mL, obtido por DAD.

\*Condições cromatográficas: coluna C8 fase reversa LiChrocart®/LiChrospher®, Merck® (125 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: acetonitrila / água pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico (67:33) (V:V); temperatura de análise 20-25 °C, vazão: 1,4 mL/ min; volume injetado: 20 µL.

A Figura 17 apresenta os cromatogramas das soluções de adapaleno amostra ADAP-1 e produto acabado (gel), respectivamente. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma das soluções testadas, correspondeu ao do pico principal da solução de referência (adapaleno SQR), de aproximadamente 6,8 minutos, quando submetidas às mesmas condições cromatográficas.

Os cromatogramas revelaram igualmente um percentual de 99,99% de pureza, demonstrando não haver a presença de impurezas.



**Figura 17:** Cromatogramas das soluções de adapaleno amostra ADAP-1 (A) e gel (B) em etanol (12 µg/mL).

\*Condições cromatográficas: coluna C8 fase reversa LiChrocart®/LiChrospher®, Merck® (125 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: acetonitrila / água pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico (67:33) (V/V); temperatura de análise 20-25 °C, vazão: 1,4 mL/min; volume injetado: 20 µL.

#### 4.2.8. Cromatografia em camada delgada (CCD)

##### 4.2.8.1. Material e métodos

O sistema eluente empregado para o desenvolvimento do método de identificação do adapaleno por CCD é composto por mistura de hexano: acetato de etila (7:3 V/V). As soluções de adapaleno, (SQR, ADAP-1 e forma farmacêutica gel), bem como a de tretinoína (padrão comparativo) e a amostra simulada de adjuvantes, foram preparadas na concentração final de 100 µg/mL, utilizando-se etanol como solvente e foram aplicadas na fase estacionária.

Os cromatogramas foram desenvolvidos em um sistema estacionário composto de cromatofolhas plásticas recobertas com gel de sílica 60 F254

(MERCK®) com 9 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de camada adsorvente.

A aplicação foi realizada à distância de 1 cm da borda inferior da cromatoplaça, utilizando-se capilares calibrados. Após a aplicação de 6 µL da solução, as placas cromatográficas foram dispostas em cubas previamente saturadas com o eluente escolhido e a migração estendeu-se até 7 cm ( $d_{FM}$ ) após o ponto de aplicação.

Após a evaporação do solvente, manchas de coloração azul fluorescentes, compatíveis com as características de fluorescência apresentadas pelo fármaco, foram visualizadas com o auxílio de lâmpada ultravioleta a 254 nm, determinando-se os respectivos valores dos fatores de retenção ( $R_f$ ) para SQR, ADAP-1, FF, bem como para o seu padrão comparativo, tretinoína (tret).

A análise foi realizada em triplicata a fim de verificar a repetibilidade dos resultados obtidos. Foram calculados, para cada amostra, o valor do fator de retenção ( $R_{fA}$ ), através da seguinte equação, onde  $d_A$  é a distância percorrida pela amostra e  $d_{FM}$  é a distância percorrida pela fase móvel.

$$R_{fA} = \frac{d_A}{d_{FM}}$$

Foi calculado também o fator de retenção relativo ( $R_x$ ) entre o fármaco e seu padrão comparativo (tretinoína), através da seguinte equação, onde  $R_{f_{adap}}$  é o fator de retenção do adapaleno e  $R_{f_{tret}}$  é o fator de retenção da tretinoína (TOCHSTONE & DOBBINS, 1983).

$$R_x = \frac{R_{f_{adap}}}{R_{f_{tret}}}$$

#### 4.2.8.2. Resultados e discussão

A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura, através de sua migração diferencial entre duas fases uma fixa (fase estacionária) e outra móvel (fase móvel). Mostra-se extremamente útil para o isolamento, purificação e identificação de componentes de uma mistura. O processo de separação fundamenta-se principalmente no fenômeno de adsorção (COLLINS *et al.*, 1990).

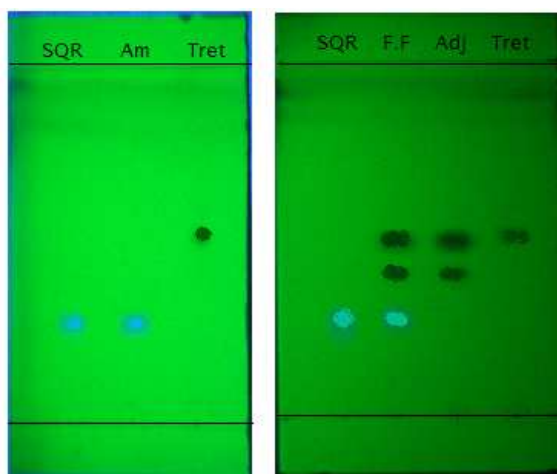
A natureza e a composição química da fase móvel é determinada pelo tipo de substância a ser separada. Uma vez que, a fase estacionária mais utilizada é extremamente polar (sílica), os melhores resultados serão obtidos com misturas de solventes, de modo a se obter uma polaridade média em relação à polaridade dos componentes do analito (TOCHSTONE & DOBBINS, 1983).

A análise qualitativa baseia-se na coloração azul fluorescente apresentada pelo adapaleno e na comparação dos valores do  $R_f$  da amostra com o do padrão, visto que, sob as mesmas condições cromatográficas, substâncias de mesma composição percorrerão distâncias fixas em relação às distâncias percorridas pelo solvente.

O perfil cromatográfico do adapaleno SQR, amostra ADAP-1 e forma farmacêutica gel, está apresentado na Figura 18 de acordo com as condições especificadas. A semelhança das manchas e dos valores do  $R_f$  obtidos para o fármaco ( $R_{f_{SQR}} = R_{f_{ADAP-1}} = R_{f_{FF}} = 0,29$ ) comprovam a seletividade do método para identificação do adapaleno, visto que, além de reprodutibilidade ( $n=3$ ), houve significativa diferença em relação aos valores de  $R_f$  de seu padrão comparativo ( $R_{f_{tret}}=0,57$ ). Da mesma forma comprovou-se também boa diferenciação do  $R_f$  do fármaco em relação ao  $R_f$  de seu padrão comparativo (tretinoína), através dos resultados de seu fator de retenção relativo ( $R_x= 0,51$ ).

Observou-se que a revelação sob lâmpada UV (254 nm), mostrou-se eficiente, visto que a fluorescência azul (característica do fármaco) pode ser comprovada além de auxiliar na sua identificação. O método proposto demonstrou repetibilidade nas três análises realizadas.

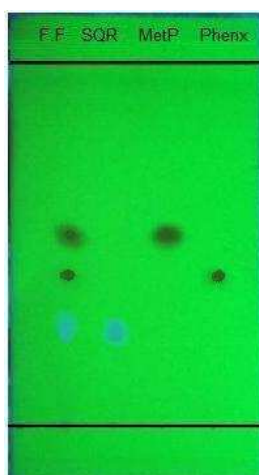
Após a análise da placa contendo a forma farmacêutica, foi realizado um *screening* dos adjuvantes, para atribuição das duas manchas que eluíram próximas ao fármaco presente no gel.



**Figura 18:** CCD: (SQR) adapaleno SQR, (Am) amostra ADAP-1, (Tret) tretinoína padrão comparativo, (F.F) forma farmacêutica gel, (Adj) solução simulada de adjuvantes.

\*Condições cromatográficas: cromatofolhas plásticas recobertas com sílica gel 60 F254 (MERCK®) com 9 X 5 cm e 0,25 mm de camada adsorvente. Fase móvel composta por mistura de hexano e acetato de etila (7:3, V/V) como eluente, revelação por UV (254 nm).

De acordo com a lista dos adjuvantes fornecidos pela bula do medicamento, apenas dois apresentaram manchas após a revelação por UV (254 nm), os conservantes da formulação, metilparabeno e fenoxietanol. A Figura 19 apresenta a cromatoplaça das soluções de adjuvantes responsáveis pelas duas manchas apresentadas na separação cromatográfica da forma farmacêutica.



**Figura 19:** CCD: (F.F.) forma farmacêutica gel, (SQR) adapaleno SQR, (MetP) metilparabeno e (Phenx) fenoxietanol.

\*Condições cromatográficas: cromatofolhas plásticas recobertas com sílica gel 60 F254 (MERCK®) com 9 X 5 cm de largura e 0,25 mm de camada adsorvente. Fase móvel composta por mistura de hexano e acetato de etila (7:3, V/V) como eluente, revelação por UV (254 nm).



A primeira, com  $R_f=0,43$  equivale ao conservante metilparabeno, e a segunda, com  $R_f=0,36$  ao fenoxietanol. Os valores de  $R_f$  obtidos confirmam a seletividade do método para identificação do adapaleno na sua forma farmacêutica, visto que houve adequada separação das manchas dos conservantes em relação a da substância ativa, assim como, boa diferenciação devido à coloração azul apresentada pelo fármaco.

Os resultados revelaram que o sistema eluente utilizado mostrou-se seletivo e adequado para separação e identificação do adapaleno tanto em sua matéria-prima quanto na sua forma farmacêutica. Os valores relativamente baixos de  $R_f$  atribuído ao adapaleno, não comprometem o resultado da análise, visto que o fármaco possui a propriedade de fluorescência diferenciando-o das demais manchas apresentadas.

#### 4.2.9. Determinação de umidade

##### 4.2.9.1. Material e métodos

A determinação de umidade foi realizada através de dois métodos: o método volumétrico e o método gravimétrico.

No método volumétrico foi realizado pelo processo de Karl-Fischer. O equipamento é o DL 37 METTLER TOLEDO com detecção coulométrica do ponto final. As análises foram realizadas em triplicata. Foram pesados aproximadamente 20 mg de SQR e de ADAP-1. Paralelamente, procedeu-se um ensaio em branco, com a finalidade de descontar o volume de titulante correspondente a umidade presente no ar do ambiente de análise. Para o cálculo do percentual de umidade utilizou-se a seguinte equação:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{[ QR (\mu\text{g}) - QA (\mu\text{g}) ] \times 100}{Q S (\mu\text{g})}$$

Onde:

QR = Quantidade gasta do reagente de Karl-Fisher para titular SQR e ADAP-1;

QA = Quantidade gasta do reagente de Karl-Fisher para titular a água do ar do ambiente de análise;

QS= Quantidade de SQR e ADAP-1, exatamente pesada.

A determinação de umidade pelo método gravimétrico foi realizada pesando-se exatamente 1 grama de SQR e de ADAP-1, respectivamente, que foram transferidos para pesa-filtros previamente dessecados durante trinta minutos.

As amostras foram dessecadas a 105°C, por aproximadamente 2 horas até peso constante. O percentual de umidade foi calculado em relação à substância anidra.

#### 4.2.9.2. Resultados e discussão

Este ensaio visa a determinar a quantidade de substância volátil eliminada da amostra, identificando, dessa forma impurezas que porventura estejam presentes no fármaco (F. Bras IV, 1988).

A determinação gravimétrica avalia a quantidade de substância volátil presente na amostra. Os resultados obtidos para o adapaleno tanto para a SQR quanto para a amostra ADAP-1, para o método gravimétrico encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9:** Teor de água do adapaleno SQR e ADAP-1 determinados por gravimetria.

Gravimetria	Teor de água (%)			Média
	1	2	3	
SQR	0,17	0,08	0,21	0,15
ADAP-1	0,36	0,28	0,31	0,32

O método de Karl-Fischer é seletivo para determinação de água. Os resultados obtidos para o adapaleno tanto para a SQR quanto para a amostra ADAP-1, para o método de Karl-Fischer encontram-se na Tabela 10.

**Tabela 10:** Teor de água do adapaleno SQR e ADAP-1 determinados por Karl-Fischer.

Karl Fischer	Teor de água (%)			Média
	1	2	3	
SQR	0,09	0,05	0,13	0,09
ADAP-1	0,29	0,25	0,27	0,27

Os resultados obtidos demonstram que o adapaleno SQR e amostra ADAP-1 apresentaram um percentual inferior a 1% de umidade. Os teores médios apresentados pelo método de Karl-Fischer apresentaram-se inferiores aos resultados apresentados pelo método de perda por dessecação, entretanto não diferiram significativamente dos resultados fornecidos pelo laudo do distribuidor SQR (0,11 %) e ADAP-1 (0,31 %).

#### 4.2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

##### 4.2.10.1. Material e métodos

As análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (UFRGS) utilizando um microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL / JSM 6060.

A preparação do experimento envolve o processo de metalização das amostras a serem visualizadas no microscópio. Nesta etapa, uma pequena quantidade de SQR e de ADAP-1, foram uniformemente pulverizadas sobre fita condutora de carbono (dupla face), presa a um suporte metálico.

Na etapa de metalização o material torna-se condutivo por meio de deposição de metal sobre as amostras. O metal utilizado foi a platina e o tempo de metalização foi de aproximadamente 24 horas. A magnitude do aumento utilizado nas imagens varia de acordo com a necessidade da visualização e com a qualidade da imagem.

##### 4.2.10.2. Resultados e discussão

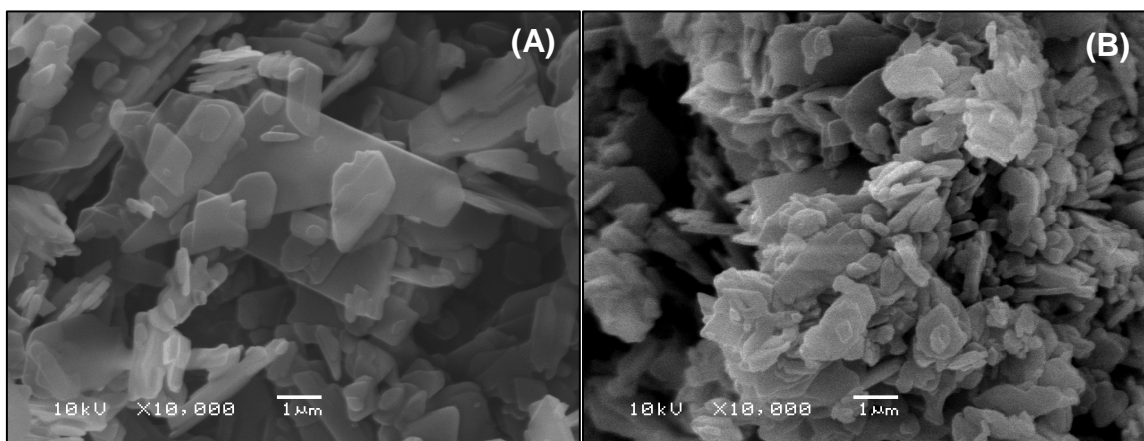
O Microscópio Eletrônico de Varredura, MEV (Scanning Electron Microscope, SEM) é um equipamento que permite a obtenção de informações

estruturais de diversas amostras. Um feixe de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra que, quando refletida, é coletada por um detector que converte este sinal em imagem.

A estrutura física de materiais sólidos depende fundamentalmente do arranjo estrutural de seus átomos, íons ou moléculas. A grande maioria dos fármacos exibe um arranjo geométrico bem definido de seus átomos, constituindo uma estrutura cristalina. A forma de um cristal é estabelecida de acordo com a velocidade relativa de crescimento cristalino, e do sistema cristalino ao qual pertence (BERKOVITCH-YELLIN, 1985).

A microscopia eletrônica fornece informações a respeito da morfologia destes cristais. Em alguns casos, este método pode ser usado também para diferenciar materiais cristalinos de formas amorfas. Dentre as suas vantagens está a utilização de pequenas quantidades de amostra, sendo uma técnica valiosa nos estágios adiantados de desenvolvimento de novas formulações.

A Figura 20 (A e B) ilustra como os cristais da SQR e da amostra ADAP-1 encontram-se arranjados respectivamente. Analisando as imagens obtidas por MEV para a SQR (Figura 20-A) podemos observar que a superfície de suas partículas apresenta uma tendência ao arranjo cristalino no formato de placas irregulares.



**Figura 20:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos cristais de adapaleno SQR (A) e amostra ADAP-1 (B).

\* Condições de análise: microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL / JSM 6060, (10kV x 10,000 1µm).

Na figura 20-B, características similares são encontradas na superfície das partículas da amostra ADAP-1. De acordo com a figura pode-se observar

igualmente a presença de uma tendência ao arranjo cristalino placoide, entretanto a imagem permite diferenciar algumas formações irregulares adicionais formando um emaranhado de partículas menores, unidas coesivamente.

Devido à ocorrência de partículas de menor tamanho na amostra ADAP-1, pode-se deduzir uma maior superfície de contato da amostra, o que pode resultar, em um melhor perfil de solubilidade da matéria-prima em relação à SQR, visto que há uma correspondência entre a velocidade de dissolução e o tamanho das partículas observadas ao MEV, confirmando, portanto, os resultados apresentados no teste de solubilidade realizados no item 4.2.1 deste trabalho.

#### 4.2.11. Difração de raios-X

##### 4.2.11.1. Material e métodos

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Difração de Raios X do Instituto de Geociências (UFRGS). A difração por raios X da SQR e de ADAP-1 foram realizadas em Difratorômetro D5000, Siemens, ânodo de cobre, energia de 25 mA e 40 Kv. O intervalo de varredura foi de  $2^\circ$  a  $72^\circ 2\theta$ , com passo de  $0,02^\circ 2\theta$  por segundo. A obtenção e análise dos dados foram efetuadas pelo programa Diffrac Plus.

Os valores de d foram calculados com base no ângulo  $2\theta$ , utilizando a equação de Bragg.

$$n\lambda = 2d\text{sen}\theta$$

Onde:

n = ordem de difração

d = distância entre os planos atômicos

$\theta$  = ângulo onde há interferência construtiva das ondas espalhadas, que resulta em um pico no difratograma

$\lambda$  = comprimento de onda da radiação cobre  $K\alpha$  (1,54056 Å)

#### 4.2.11.2. Resultados e discussão

Os compostos orgânicos e inorgânicos de relevância farmacêutica podem existir sob várias formas cristalinas. Quando aplicado a sólidos, o adjetivo cristalino, implica um cristal ideal em que as unidades estruturais, denominadas células unitárias, que repetem-se regular e indefinidamente no espaço. Um cristal completo é então constituído por várias células unitárias acopladas tridimensionalmente. A difração de raios X é a metodologia mais amplamente utilizada para identificação e diferenciação de substâncias cristalinas, quantificação de polimorfos, avaliação do grau de cristalinidade e transição de fases. É um dos métodos mais completos na detecção da presença de polimorfos, entretanto, técnicas auxiliares como a espectrofotometria na região do infravermelho, análise térmica e microscopia óptica, também são utilizadas (VIPAGUNTA *et al.*, 2001).

Esta técnica está fundamentada na lei de Bragg, que descreve a difração de um feixe de raios X monocromático (frequência única), que incide sobre um cristal em um plano de átomos. O ângulo formado entre o raio incidente e o raio difratado é denominado de  $\theta$  (*theta*). Elétrons do mesmo plano são excitados e, ao vibrarem com a mesma frequência do feixe incidente, propagam a radiação em todas as direções com a mesma frequência do feixe incidente. Dessa forma, a cada plano de átomos o raio será sucessivamente refletido pelos planos de átomos que compõem a estrutura cristalina.

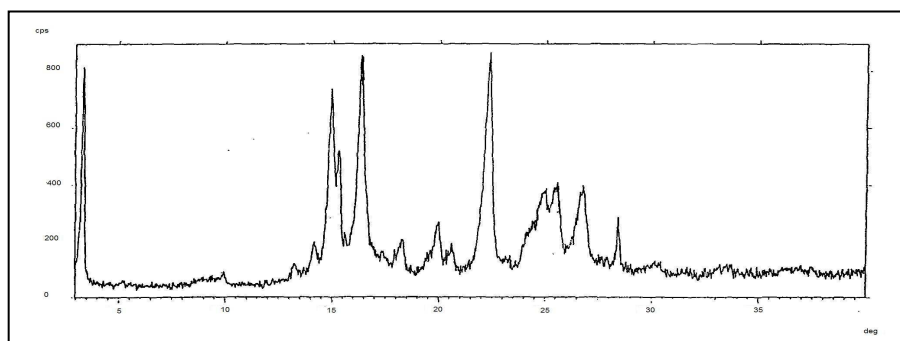
O caminho percorrido pela radiação apresentará a mesma distância observada entre os planos de átomos. Se feixe incidente monocromático apresentar comprimento de onda com valor semelhante aos espaçamentos entre os átomos do retículo cristalino, ocorrerá, então, interferência construtiva, gerando picos no difratograma que satisfazem à lei de Bragg. Caso a incidência ocorra sobre material amorfo, o qual não possui plano ordenado de átomos, ondas em diferentes direções serão formadas ocorrendo, então, interferências destrutivas.

Dessa forma, a análise por difração de raios X possibilita construir difratogramas, cuja identificação está baseada na posição angular das linhas, suas intensidades relativas e as distâncias interplanares. A intensidade das linhas depende do número e do tipo de átomos em cada conjunto de planos (SKOOG *et al.*, 2002).

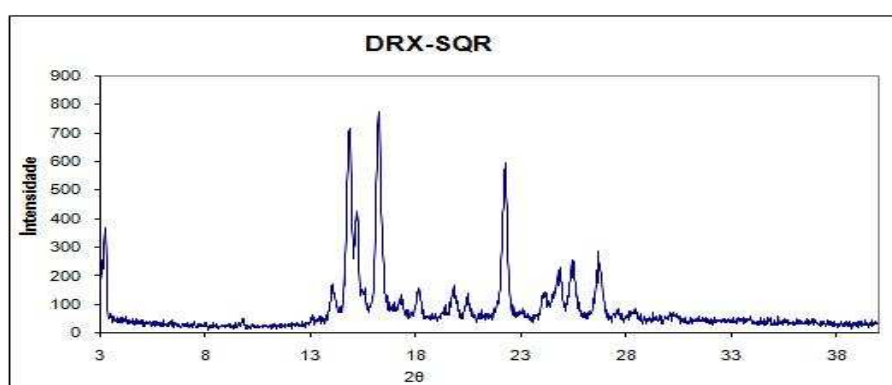
Não foram encontrados na literatura ou no Joint Committee on Powder Diffraction Standards, que é a instituição responsável pelo registro dos padrões de difração das substâncias cristalinas, difratogramas do adapaleno. Entretanto, dados fornecidos pela patente europeia (EP, 2006), apresentam os difratogramas das formas amorfa e forma cristalina  $\alpha$ , sendo possível, portanto, determinar, de modo comparativo, as formas cristalinas da SQR e da amostra ADAP-1. O difratograma da forma amorfa é ilustrado na Figuras 44 em ANEXO.

De acordo com os resultados apresentados pelo difratograma da SQR apresentado na Figura 22 e da amostra ADAP-1, apresentado na Figura 23, pode ser observado que se apresentam exatamente sobrepostos (em todos os picos, diferindo apenas na intensidade) ao difratograma da forma cristalina  $\alpha$  obtido pela *European Patent Application* (Figura 21). Conclui-se, então, que ambas apresentam a estrutura cristalina  $\alpha$ .

O difratograma da amostra ADAP-1 (Figura 23) tem picos com valores de  $2\theta$  maiores do que o da SQR (Figura 22). Isso significa que os valores das distâncias interplanares ( $d$ ), calculados com base na equação de Bragg são menores. Menores valores de ( $d$ ) fazem com que a célula unitária da amostra ADAP-1 seja menor do que a célula unitária da SQR. Dessa forma podemos inferir que a solubilidade da amostra ADAP-1 é maior que a solubilidade da SQR, fato este que confirma os resultados apresentados pela microscopia eletrônica de varredura, bem como, os resultados apresentados pelo teste de solubilidade.

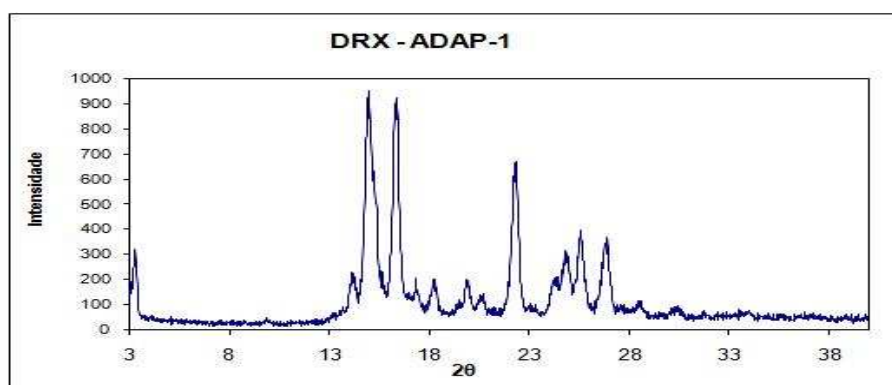


**Figura 21:** Difratograma da forma cristalina  $\alpha$  (EP, 2006).



**Figura 22:** Difratograma da SQR.

\*Condições de análise: difratômetro de raios X modelo D 5000 SIEMENS com tubo de cobre, condições de varredura 2-72° (2θ), 0,02 °s, temp. 25 °C.



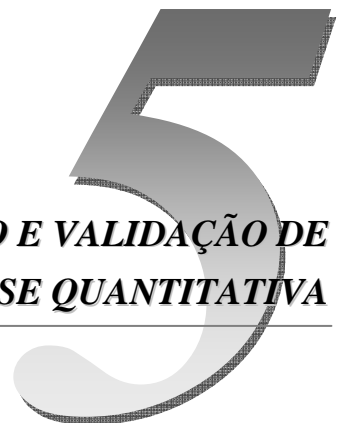
**Figura 23:** Difratograma de ADAP-1

\*Condições de análise: difratômetro de raios X modelo D 5000 SIEMENS com tubo de cobre, condições de varredura 2-72° (2θ), 0,02 °s, temp. 25 °C.



***DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA***

---





A demonstração da capacidade de determinação de um método analítico quantitativo é um fator essencial para assegurar a qualidade, a segurança e a eficácia dos medicamentos. Conseqüentemente, antes de empregá-lo rotineiramente, deve-se primeiramente assegurar que o método proposto é apropriado para sua finalidade, assegurando, assim, a confiabilidade dos resultados obtidos.

A escolha do método depende, por sua vez, de fatores tais como natureza do fármaco, a complexidade da amostra e uso pretendido. O método ideal deverá ser baseado, de acordo com as exigências, em uma técnica usual e pouco complexa (MEHTA, 1997). Além disso a escolha do procedimento analítico final depende da adequação aos critérios avaliados e da interpretação estatística dos resultados subseqüentemente obtidos (ROZET *et al.*, 2007).

Desta forma, um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver e validar um método seletivo, específico, preciso e exato para determinação do teor de adapaleno tanto na matéria-prima como em seu produto acabado.

## **5.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO**

### **5.1.1. Substância química de referência (SQR) e ADAP-1**

Todas as soluções padrão (estoque), tanto da SQR quanto da amostra ADAP-1, para determinação quantitativa por CLAE e por espectrofotometria na região do ultravioleta, foram preparadas analiticamente, utilizando etanol P.A. como solvente. Foram pesadas exatamente cerca de 10 mg do fármaco que foi transferido quantitativamente, com o auxílio de aproximadamente 50 mL de etanol, para balão volumétrico de 100 mL. As soluções foram homogeneizadas e submetidas a dois ciclos de banho ultrassônico até a completa solubilização, aferindo-se o volume com o mesmo solvente.

As soluções finais de trabalho (SQR e ADAP-1) foram preparadas a partir de diluições da solução estoque e aferidas com etanol ou com a respectiva fase móvel, de acordo com a técnica utilizada. Tanto a solução estoque quanto as soluções de trabalho foram armazenadas em vidro âmbar à temperatura ambiente.

### 5.1.2. Forma Farmacêutica gel

A solução estoque da forma farmacêutica (FF) foi preparada pesando-se exatamente cerca de 10 g do gel que possui 0,1% de substância ativa, o que representa aproximadamente 1mg de adapaleno por grama de gel. A amostra foi transferida quantitativamente, com o auxílio de aproximadamente 50 mL de etanol, para balão volumétrico de 100 mL. A solução foi homogeneizada e submetida a dois ciclos de banho ultrassônico até a completa dispersão da matriz (gel), aferindo-se o volume com o mesmo solvente.

### 5.1.3. Amostra Simulada de Adjuvantes

A amostra simulada de adjuvantes (ASA) utilizada na análise quantitativa da forma farmacêutica gel foi preparada analiticamente utilizando a mesma técnica descrita para o preparo da solução padrão estoque da forma farmacêutica. A composição básica da ASA, está descrita no item 5.3.1.1.1 (validação do método UV-D para a forma farmacêutica gel). A quantidade utilizada dos adjuvantes foi calculada com base a representar o equivalente a 10 g de produto acabado (gel), de acordo com as quantidades pesadas para preparação da solução estoque da forma farmacêutica.

As soluções finais de trabalho FF e ASA foram preparadas a partir de diluições da solução estoque e aferidas com etanol ou com a respectiva fase móvel, de acordo com a técnica utilizada. Antes de serem analisadas pelas respectivas determinações por UV ou CLAE, as soluções foram centrifugadas por 5 minutos em centrífuga Janetzki modelo T31A a 6500 R.P.M., sendo os tubos de centrífuga lacrados na extremidade para evitar evaporação do solvente.

## 5.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DA MATÉRIA-PRIMA

### 5.2.1. Volumetria em meio aquoso (VMA)

#### 5.2.1.1. Material e métodos

O teor de adapaleno na matéria-prima ADAP-1 e SQR foi determinado em triplicata através do método de volumetria em meio aquoso por titulação de retorno.

Foi pesado exata e respectivamente, em erlenmeyer de 100 mL, cerca de 200 mg das amostras da SQR e de ADAP-1, previamente dessecados. Ao erlenmeyer foram adicionados 25,0 mL de solução volumétrica (SV) de hidróxido de sódio 0,1 M. A mistura foi aquecida a 80 °C e manteve-se sob agitação mecânica por 30 minutos. Após resfriamento até temperatura ambiente foram adicionadas à solução 3 gotas de solução indicadora de fenolftaleína. O excesso de hidróxido de sódio foi titulado com ácido clorídrico 0,1 M (SV). O ponto final da reação foi determinado visualmente pela mudança da coloração de rósea para incolor.

Foi realizado um ensaio em branco que consiste em repetir uma determinação em condições idênticas e com quantidades idênticas de reagentes, omitindo-se, apenas, a substância em exame (F. Bras IV, 1988). O volume gasto no ensaio em branco foi descontado do volume encontrado ao final da análise. Cada mL de NaOH 0,1 M equivale a 41,25 mg de adapaleno.

Cada solução da amostra ou da substância química de referência foi titulada, no mínimo seis vezes, obtendo-se um DPR inferior a 1%. Através de análise estatística, os resultados encontrados foram comparados com os teores obtidos pelos métodos de espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência.

Foi calculado, para cada amostra, o valor do teor encontrado, através das seguintes equações:

$$NM_{\text{NaOH}} - NM_{\text{HCl}} = NM_{\text{ADAP}}$$

$$NM_{\text{ADAP}} \times MM_{\text{ADAP}} = M_{\text{ADAP}}$$

$$\text{Teor percentual} = m / (M_{\text{ADAP}} \times 100)$$

Onde:

$m$  = Massa da amostra exatamente pesada;

$M_{\text{ADAP}}$  = Massa de adapaleno encontrada;

$MM_{\text{ADAP}}$  = Massa molecular de adapaleno que reage com NaOH 0,1M;

$NM_{\text{NaOH}}$  = N<sup>o</sup> mols de NaOH adicionados;

$NM_{\text{HCl}}$  = N<sup>o</sup> mols de HCl que reagiram com o excesso de NaOH;

$NM_{\text{ADAP}}$  = N<sup>o</sup> mols de adapaleno que reagiram com NaOH 0,1 M;

#### 5.2.1.2. Resultados e discussão

A titulação é uma técnica analítica, que tem como finalidade determinar a concentração exata de uma substância em solução. Na análise volumétrica, a solução de concentração conhecida é designada por titulante e aquela cuja concentração se pretende determinar é designada por titulado.

Na titulação de retorno, uma solução padrão, rigorosamente medida, é utilizada para reagir com o analito. A quantidade em excesso é posteriormente titulada diretamente utilizando uma segunda solução padrão. É uma técnica frequentemente requerida quando a velocidade de reação entre o analito e o reagente é vagarosa ou quando há falta de estabilidade da solução padrão. Permite determinar a concentração de uma substância reagindo-a com um volume adicional de um outro reagente de concentração conhecida.

Levando-se em consideração que a massa molecular do fármaco equivale a 412,52 e que a carboxila presente na molécula reagirá com a hidroxila presente na solução a ser titulada, então o excesso de hidróxido de sódio presente na solução será titulado pelo ácido clorídrico presente na bureta.

Podemos inferir que cada mL de hidróxido de sódio 0,1 M corresponde a 41,252 mg de adapaleno (massa molecular de adapaleno que reage com NaOH 0,1 M).

Os resultados obtidos no doseamento do adapaleno SQR e ADAP-1 estão apresentados na Tabela 11. Desenvolveu-se e validou-se um método de doseamento via cromatografia líquida de alta eficiência, para fins de comparação de resultados.

**Tabela 11:** Teor obtido para SQR e ADAP-1 por volumetria de retorno.

Amostra	Teor declarado no laudo (%)	Teor encontrado * (%)						Média	DPR%
		1°	2°	3°	4°	5°	6°		
		<b>SQR</b>	<b>100,6 (CLAE)</b>	101,3	99,2	100,4	100,8		
<b>ADAP-1</b>	<b>99,82</b>	99,1	99,3	99,6	99,8	99,7	99,7	99,5	0,3

\*Solução indicadora fenolftaleína, aquecimento a 80 °C, tempo de agitação de 30 minutos.

A detecção do ponto final da titulação foi verificada pela passagem da coloração rósea para incolor. Calculou-se o teor de fármaco pela média verificada nas seis determinações. O teor calculado foi de 100,5% em média para SQR e de 99,5% para matéria-prima ADAP-1. De acordo com os teores declarados pelos fornecedores, o fármaco apresentou conformidade no doseamento.

Os primeiros experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente (25°C) e revelaram cinética reacional lenta, pois o teor observado apresentava-se muito baixo. Aumentando-se a temperatura para 60 °C a velocidade da reação aumentou, entretanto valores equivalentes ao teor declarado só foram atingidos com a temperatura de 80 °C com agitação constante, por aproximadamente 30 minutos.

De acordo com os resultados obtidos pela técnica instrumental, pode-se concluir que o método de titulação de retorno em meio aquoso pode ser uma

técnica alternativa e precisa, para aplicação em laboratórios de controle de qualidade.

### 5.2.2. Espectrofotometria na região do ultravioleta

#### 5.2.2.1. Material e métodos

As soluções do adapaleno SQR e amostra (ADAP-1) foram preparadas em etanol e submetidas à análise. Os espectros de UV foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico. Todas as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 270 nm, na ordem zero, utilizando-se etanol como branco. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do programa UVPC 39.

##### 5.2.2.1.1. *Validação do método UV*

###### 5.2.2.1.1.1. Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção de três curvas padrão desenvolvidas a partir da solução da SQR com cinco níveis de concentração cada uma, que foram avaliados em três diferentes dias. A partir das três curvas a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados.

A partir de solução de adapaleno SQR em etanol na concentração de 100 µg/mL, alíquotas de 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mL foram transferidas, com o auxílio de bureta, para balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com etanol e obtendo-se concentrações de 8,0, 10,0, 12,0, 14,0 e 16,0 µg/mL, respectivamente.

Foram realizadas três leituras para cada solução. A curva padrão foi obtida a partir dos valores das médias das absorvâncias *versus* concentração da SQR de adapaleno nas soluções correspondentes, obtendo-se o coeficiente de correlação e a equação da reta, através da regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).



## 5.2.2.1.1.2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram determinados a partir dos dados da curva de calibração, utilizando a seguinte equação (ICH, 2005):

$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC}$	$LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$
------------------------------	-----------------------------

Onde:

$\sigma$ : Desvio padrão médio do intercepto;

IC: Inclinação da curva de calibração.

## 5.2.2.1.1.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada através de seis ensaios, realizados em três diferentes dias. As seis soluções da amostra ADAP-1 foram preparadas em concentrações equivalentes a 12,0  $\mu\text{g/mL}$ , em balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com etanol. A solução de adapaleno SQR foi preparada em etanol na mesma concentração de 12  $\mu\text{g/mL}$ .

Foram realizadas três determinações para cada solução de análise. A concentração ( $C_a$ ), em  $\mu\text{g/mL}$ , das soluções da amostra ADAP-1, foi determinada a partir da equação:

$$C_a = (A_a \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

$A_a$  = absorvância da solução amostra ADAP-1;

$C_{SQR}$  = concentração da solução SQR;

$A_{SQR}$  = absorvância da solução SQR;

O teor (C%) de adapaleno na amostra ADAP-1 foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

$C_a$  = concentração da solução amostra ADAP-1

$C_t$  = concentração teórica da solução amostra ADAP-1

A determinação do teor de adapaleno na amostra ADAP-1 foi realizada a partir da avaliação dos dados obtidos através da repetibilidade do método (precisão intradia) e do desvio padrão relativo (DPR) entre as médias das seis determinações. A precisão interdias (precisão intermediária) foi avaliada através do DPR obtido entre as médias das determinações, em três diferentes dias de análise.

#### 5.2.2.1.1.4. Exatidão

A exatidão do método UV para determinação quantitativa do teor da matéria-prima do adapaleno foi inferida uma vez que precisão, linearidade e especificidade foram determinadas, bem como, a partir da comparação de seus resultados com os de um segundo método bem caracterizado baseado em um princípio diferente (técnica ortogonal), neste caso pelo método de CLAE (BRASIL, 2003, ICH, 2005, LANÇAS, 2004).

#### 5.2.2.1.1.5. Especificidade

O ensaio foi realizado através de testes de degradação forçada em que soluções de adapaleno foram expostas à degradação térmica, fotólise, oxidação, condições ácida e alcalina por 72 horas, utilizando-se a mesma técnica apresentada no item 5.2.3.1.1.2 (especificidade para o método de CLAE). Os resultados foram comparados com os da solução do branco e da matéria-prima não submetida às degradações nas condições especificadas.

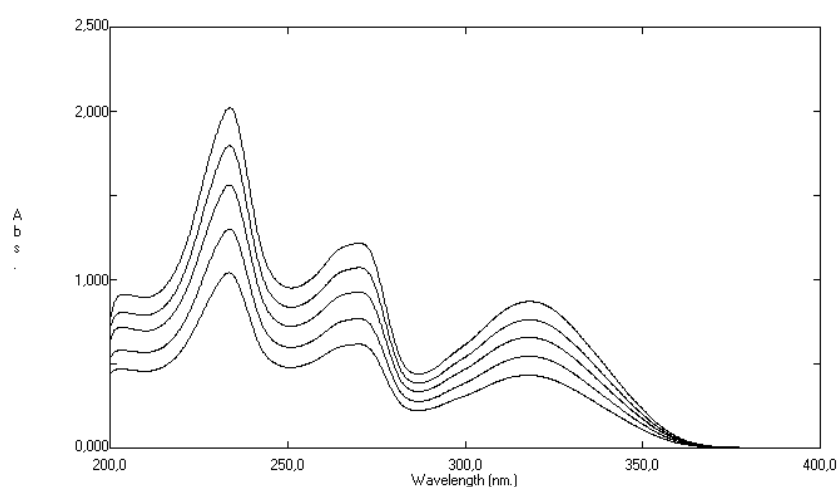
### 5.2.2.2. Resultados e discussão

#### 5.2.2.2.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 31, 2008). Este

parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico ( $r$ ) sendo, o método considerado linear à medida que seu valor se aproxima da unidade, indicando menor dispersão do conjunto de pontos experimentais, bem como um ajuste ideal dos pontos para a linha de regressão (BARROS, 2002).

Na Tabela 12 encontram-se os valores das absorvâncias médias correspondentes ao adapaleno, obtidas na curva padrão, referentes a cada diluição da SQR. Os espectros obtidos das soluções de adapaleno SQR nas concentrações de 8 a 16  $\mu\text{g/mL}$  em etanol, são apresentados na Figura 24.



**Figura 24:** Espectros das soluções de adapaleno SQR nas concentrações de 8 a 16  $\mu\text{g/mL}$  em etanol.

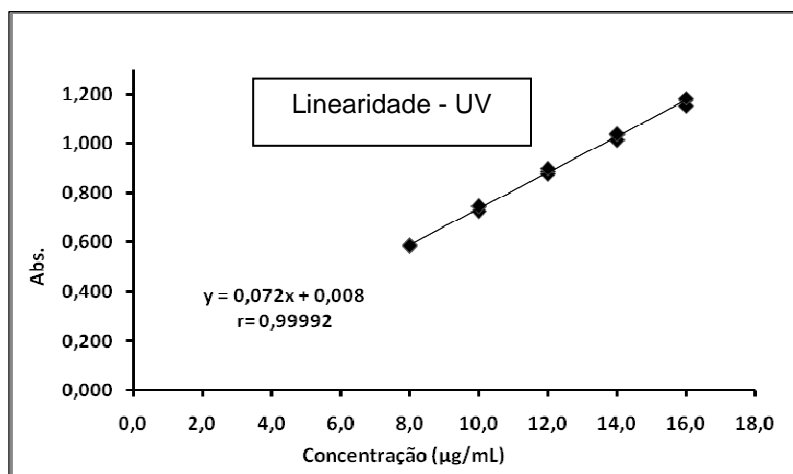
A partir de soluções de adapaleno SQR em 5 níveis com concentrações de 8,0 a 16,0  $\mu\text{g/mL}$  foram construídas três curvas padrão analisadas em três diferentes dias. A curva está representada na Figura 25 juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ).

**Tabela 12:** Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do adapaleno por UV.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvâncias*			Média $\pm$ e.p.m	DPR%
	1º dia	2º dia	3º dia		
8,0	0,593	0,584	0,588	0,588 $\pm$ 0,002	0,48
10,0	0,743	0,727	0,747	0,739 $\pm$ 0,01	1,43
12,0	0,889	0,877	0,900	0,889 $\pm$ 0,01	1,29
14,0	1,037	1,014	1,040	1,030 $\pm$ 0,01	1,38
16,0	1,177	1,153	1,186	1,170 $\pm$ 0,02	1,45

\* Média de três determinações, e.p.m. – erro padrão da média, DPR – desvio padrão relativo

Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa efetuou-se o teste de análise de variância (ANOVA). A Tabela 32 em ANEXO apresenta os valores dos tratamentos estatísticos dos valores experimentais obtidos para as curvas padrão, em etanol, através de análise de variância.



**Figura 25:** Representação gráfica da curva padrão média do adapaleno para UV.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por UV indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ( $r = 0,99992$ ) está de acordo com as especificações e apresenta a correlação entre as absorvâncias e a concentração do fármaco, indicando que o método é linear na faixa de concentração de 8,0 a 16,0 µg/mL.

#### 5.2.2.2.2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os valores referentes à análise dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), encontram-se na Tabela 13.

**Tabela 13:** Resultados dos limites de detecção e quantificação, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	8,0 – 16,0 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0729x + 0,008$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,0729 \pm 0,0085$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$0,008 \pm 0,0727$
Coeficiente de correlação (r)	0,99992
<b>Limite de detecção (LD)</b>	<b>0,39 µg/mL</b>
<b>Limite de quantificação (LQ)</b>	<b>1,18 µg/mL</b>

## 5.2.2.2.3. Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância entre os resultados de medidas independentes em torno de um valor central, sob condições estabelecidas. É usualmente expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR) ou também chamado coeficiente de variação (CV). Pode ser avaliada em três diferentes níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade ou precisão intradia avalia a concordância entre os resultados sucessivos, em um curto período de tempo efetuados sob as mesmas condições. A precisão intermediária ou precisão interdias expressa a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, obtido em dias diferentes e a reprodutibilidade expressa a concordância entre os resultados obtidos em diferentes laboratórios (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 31, 2008).

A precisão do método foi avaliada através dos DPR's intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 14.

**Tabela 14:** Avaliação da precisão intra e interdias das amostras de adapaleno matéria-prima por espectrofotometria UV.

Amostras	Teor (%) das soluções de ADAP-1 (12,0 µg/mL)		
	1º dia	2º dia	3º dia
1	101,7	99,9	99,9
2	101,2	100,3	99,5
3	100,2	100,5	99,7
4	100,9	100,3	99,6
5	99,8	100,3	98,9
6	100,0	99,5	98,9
<b>Teor Médio intradia (%)</b>	100,6	100,1	99,4
<b>e.p.m (±)</b>	0,27	0,17	0,17
<b>DPR intradia %</b>	0,73	0,37	0,42
<b>Média Interdias</b>		100,1	
<b>DPR interdias %</b>		0,61	

e.p.m. – erro padrão da média; DPR – desvio padrão relativo

Os valores de DPR apresentados pelo ensaio de repetibilidade e precisão intermediária indicam que o método proposto é preciso quando executado em um curto período de tempo, efetuado sob as mesmas condições e em um mesmo laboratório, obtido em dias diferentes.

#### 5.2.2.2.4. *Exatidão*

A exatidão do método espectrofotométrico na região do UV para determinação quantitativa do teor da matéria-prima foi inferida na faixa de 8,0 a 16,0 µg/mL, a partir da determinação da precisão, linearidade e especificidade, de acordo com a citação no item 5.2.2.1.1.4.

#### 5.2.2.2.5. *Especificidade*

A especificidade do método foi avaliada submetendo-se o fármaco a diferentes condições de estresse, a fim de forçar a formação de produtos de degradação, com o objetivo de verificar a possível interferência dos mesmos na determinação quantitativa do adapaleno, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta.

A validação do método quantitativo proposto foi complementada com a investigação de sua especificidade frente aos potenciais produtos de degradação. Entretanto, devido às limitações de sensibilidade da metodologia (espectrofotometria na região do UV), os resultados obtidos através do método não diferenciaram as soluções submetidas às degradações da solução de adapaleno não degradada.

### 5.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

#### 5.2.3.1. Material e métodos

Para quantificação de ADAP-1 foi utilizado um cromatógrafo a líquido SHIMADZU® LC-10ADVP, equipado com detector SPD-M10AVP de arranjo de fotodiodos (DAD), desgaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10AVP e injetor manual RHEODYNE®. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do aplicativo CLASS-VP versão 6,1.

Após ensaios preliminares para a determinação do adapaleno foram selecionados os melhores parâmetros para a validação do método:

- Coluna: C8 fase reversa LiChrocart®/LiChrospher®, Merck®;
- Fase móvel: acetonitrila: água (67:33, V/V), eluída em sistema isocrático;
- Dimensões da coluna: 125 x 4,6 mm;
- Diâmetro de partícula: 5 µm;
- Fluxo da fase móvel: 1,4 mL.min<sup>-1</sup>;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Detecção: Ultravioleta,  $\lambda = 321$  nm;

Foram utilizados acetonitrila grau CLAE (Scientific®). A água ultra pura foi obtida por sistema Milli-Q Plus, Millipore® com pH ajustado a 2,5 com ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) durante a preparação da fase móvel.

#### 5.2.3.1.1. Validação do método de CLAE

##### 5.2.3.1.1.1. Adequabilidade do sistema cromatográfico

A adequabilidade do sistema cromatográfico foi avaliada através de cinco injeções da SQR, preparada a partir da solução estoque, na concentração de 12 µg/mL. Foram avaliados os parâmetros de DPR entre os tempos de retenção (TR), eficiência da coluna (N), assimetria (TF) e fator de capacidade (k') (ICH, 2005).

##### 5.2.3.1.1.2. Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da interferência de potenciais produtos de degradação, através dos testes de degradação forçada. Soluções de adapaleno SQR foram submetidas a condições de estresse com o objetivo de forçar a formação de produtos de degradação. As soluções foram expostas à hidrólise ácida e alcalina, degradação térmica, fotólise e estresse

oxidativo, sendo todas as soluções, submetidas à exposição por um período não inferior a 72 horas.

Três soluções foram preparadas para realização da análise, sendo uma mantida sob condições normais e as outras duas (amostra e branco) submetidas aos diferentes tipos de degradação. As amostras com a presença do analito foram preparadas de forma a apresentarem, ao final do ensaio, concentrações equivalentes a 12,0 µg/mL. A solução branco foi preparada apenas com o solvente (etanol) ou com o solvente em presença das diferentes soluções de tratamento para degradação. A pureza do pico cromatográfico foi verificada através do detector de arranjo de fotodiodos (DAD). O tempo de análise foi ampliado de 8 para 16 minutos, a fim de se acompanhar a formação de picos adicionais, provenientes de degradação com tempo de retenção inferior ou superior ao TR do analito.

Todas as soluções finais obtidas foram filtradas antes de serem injetadas no cromatógrafo. Os resultados foram comparados com os da solução branco e da amostra não submetida às degradações a fim de se detectar possíveis interferentes na especificidade do método. As condições de estresse, bem como o preparo de cada uma das soluções estão descritos a seguir:

a) Hidrólise ácida

A solução amostra e o branco, foram expostos ao ácido clorídrico (HCl 1M), separadamente, na proporção de 1:1 (V/V). Após o período de exposição (72 horas), as soluções foram neutralizadas com NaOH 1M, aferindo-se os volumes, em balões de 25,0 mL, com a respectiva fase móvel. A concentração final apresentada pelo analito foi equivalente a 12,0 µg/mL.

b) Hidrólise alcalina

A solução amostra e o branco, foram expostos ao hidróxido de sódio (NaOH 1 M), separadamente, na proporção de 1:1 (V/V). Após o período de exposição (72 horas), as soluções foram neutralizadas com HCl 1M, aferindo-se os volumes, em balões de 25,0 mL, com a respectiva fase móvel. A concentração final apresentada pelo analito foi equivalente a 12,0 µg/mL.



c) Degradação térmica:

A solução amostra e o branco, foram expostos ao aquecimento em estufa a 80°C por 72 horas. Após este período completou-se o volume do balão volumétrico (25,0 mL) com a respectiva fase móvel. A concentração final apresentada pelo analito foi equivalente a 12,0 µg/mL.

d) Fotólise:

A solução amostra e o branco, foram expostos à lâmpada de radiação UV (352 nm) em cubetas descartáveis em câmara horizontal espelhada (100x16x 16 cm), equipada com lâmpada Blacklight Blue (Orion UV-A, 30 W, 130 V, 1,26 x 10<sup>-3</sup> watts/cm<sup>2</sup>). As cubetas com solução amostra e branco foram envoltas em papel alumínio com o objetivo de avaliar a interferência da elevação da temperatura. Após o período de exposição, o conteúdo das cubetas foi transferido para balão volumétrico de 25,0 mL, sendo o volume completado com a respectiva fase móvel. A concentração final apresentada pelo analito foi equivalente a 12,0 µg/mL.

e) Oxidação:

A solução amostra e o branco, foram expostos ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, V/V) na proporção de 1:1 (V/V) por 72 horas. Após este período completou-se o volume do balão volumétrico (25 mL) com a respectiva fase móvel. A concentração final apresentada pelo analito foi equivalente a 12,0 µg/mL.

Todas as soluções finais obtidas foram filtradas antes de serem injetadas no cromatógrafo. Os resultados foram comparados com os da solução branco e da amostra não submetida às degradações a fim de se detectar possíveis interferentes na especificidade do método.

#### 5.2.3.1.1.3. Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção de três curvas padrão desenvolvidas a partir da solução da SQR com cinco níveis de concentração

cada, que foram avaliados em três diferentes dias. A partir das três curvas a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados.

A partir de uma solução de adapaleno SQR em etanol na concentração de 100,0 mg/mL, alíquotas de 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mL foram transferidas, com o auxílio de bureta, para balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com fase móvel e obtendo-se, respectivamente, concentrações finais de 8,0, 10,0, 12,0, 14,0 e 16,0 µg/mL.

Foram realizadas três determinações para cada solução. A curva padrão foi obtida a partir dos valores das áreas dos picos do adapaleno *versus* concentração da SQR nas soluções correspondentes, obtendo-se o coeficiente de correlação e a equação da reta, através da regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

#### 5.2.3.1.1.4. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram determinados a partir dos dados da curva de calibração, utilizando a seguinte equação (ICH, 2005):

$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC}$	$LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$
------------------------------	-----------------------------

Onde:

$\sigma$ : Desvio padrão médio do intercepto;

IC: Inclinação da curva de calibração.

#### 5.2.3.1.1.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada através de seis ensaios, realizados em três diferentes dias. As seis soluções de amostra ADAP-1 foram preparadas em concentrações equivalentes a 12,0 µg/mL, em balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com a respectiva fase móvel. A solução de adapaleno SQR foi preparada da mesma maneira em concentração

equivalente a 12 µg/mL. Foram realizadas três injeções para cada solução de análise.

A concentração ( $C_a$ ), em µg/mL, das soluções amostra ADAP-1, foi determinada de acordo com a equação a seguir:

$$C_a = (A_a \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

$A_a$  = área absoluta do pico para a solução amostra ADAP-1;

$C_{SQR}$  = concentração da solução SQR;

$A_{SQR}$  = área absoluta do pico para a solução SQR;

O teor (C%) de adapaleno foi calculado a partir da seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

$C_a$  = concentração da solução amostra ADAP-1 ;

$C_t$  = concentração teórica da solução amostra ADAP-1;

A repetibilidade do método (precisão intradia) foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) entre as médias das áreas obtidas pelo cromatógrafo através das seis injeções. A precisão interdias (precisão intermediária) foi avaliada através do DPR obtido entre as médias das áreas obtidas, em três diferentes dias de análise.

#### 5.2.3.1.1.6. Exatidão

A exatidão do método CLAE para amostra ADAP-1 foi inferida pelos resultados obtidos através dos parâmetros de linearidade, precisão e especificidade, conforme metodologia comparativa descrita pelo ICH (2005) e RE 899 (2003) para a validação de métodos de doseamento de matérias-primas.

#### 5.2.3.1.1.7. Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de variações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: utilização de coluna de tamanho diferente (de 12,5 cm para 12,0 cm), mudança na proporção de fase móvel (de 67% de ACN para 66 e 68%), fluxo diferenciado (de 1,4 mL/min<sup>-1</sup> para 1,3 e 1,5 mL/min<sup>-1</sup>) e equipamento (SHIMADZU<sup>®</sup> LC-10ADVP). Para este teste foram preparadas soluções adapaleno SQR e matéria-prima ADAP-1, na concentração de 12 µg/mL, de acordo com a técnica descrita no item 5.2.1 (Preparo das soluções de trabalho).

Cada parâmetro foi modificado individualmente para avaliar seu efeito. Em cada condição, amostras foram injetadas em triplicata (n = 3) e analisadas frente a uma solução padrão de trabalho em condições normais.

#### 5.2.3.2. Resultados e discussão

Na literatura consultada, foram encontrados trabalhos relatando a aplicação de CLAE para análise de adapaleno em fluidos biológicos e em forma farmacêutica combinada, conforme mencionado na revisão bibliográfica, sendo documentada a detecção do fármaco por CLAE a 270 e 320 nm. Entretanto, decidiu-se trabalhar a 320 nm, por se tratar do comprimento de onda onde foi possível assegurar a não interferência dos excipientes presentes na formulação e conseqüentemente onde os melhores resultados em relação ao sinal analítico foram apresentados. Com a finalidade de otimizar o método para análise quantitativa foram avaliadas algumas modificações nos sistemas cromatográficos propostos.

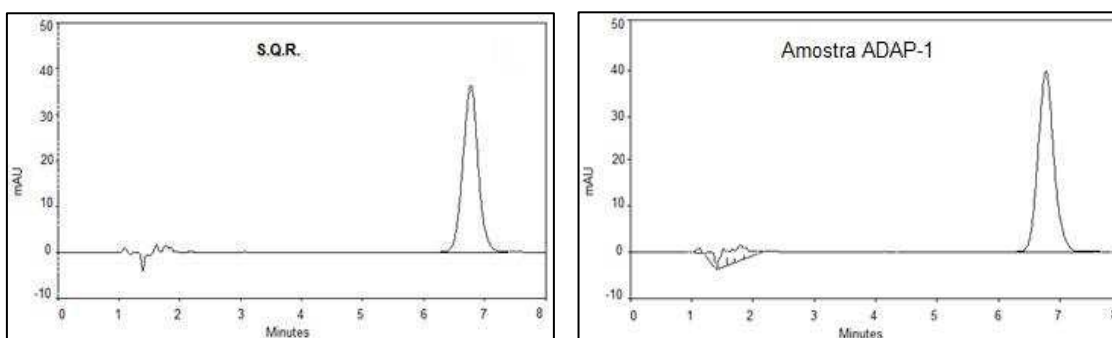
Na etapa de desenvolvimento do método por CLAE foram efetuados ensaios preliminares utilizando variações no sistema a fim de otimizar as condições cromatográficas. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- ✓ Influência da composição de solventes orgânicos na fase móvel (ACN e MeOH);
- ✓ Influência da proporção dos constituintes orgânicos na fase móvel;

- ✓ pH da fase móvel (pH da fase aquosa ajustado com ácido fosfórico 20% (V/V) );
- ✓ Diferentes comprimentos de onda;
- ✓ Diferentes tipos de coluna cromatográfica.

Após selecionar as melhores condições cromatográficas, com base no desempenho da coluna analítica e nos parâmetros cromatográficos (assimetria, fator de capacidade, pratos teóricos e tempo de retenção do pico, foram definidas as condições para a validação do método.

Os cromatogramas obtidos das soluções de adapaleno SQR e amostra da ADAP-1 a 12 µg/mL em etanol, são apresentados na figura 26.



**Figura 26:** Cromatograma obtido com a solução de adapaleno SQR e amostra ADAP-1, na concentração de 12 µg/mL.

\* Condições cromatográficas: coluna C8 fase reversa LiChrocart<sup>®</sup>/Li Chrospher<sup>®</sup>, Merck<sup>®</sup> (125 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: acetonitrila / água pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico (67:33) (V:V); temperatura de análise 20-25 °C, vazão: 1,4 mL/ min; volume injetado: 20 µL, detecção (UV/λ= 321 nm).

#### 5.2.3.2.1. Adequabilidade do sistema cromatográfico

Antes de validar o método, deve-se avaliar se o sistema utilizado para análise é capaz de fornecer dados de qualidade aceitáveis. Esta avaliação é realizada pela adequabilidade do sistema cromatográfico e pode ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados com exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI et al, 2004).

No quadro 5 encontram-se os valores médios dos parâmetros cromatográficos obtidos após 5 injeções da solução padrão e amostra ADAP-1 (12 µg/mL) a partir das condições cromatográficas selecionadas.

**Quadro 5:** Parâmetros cromatográficos observados na adequabilidade do sistema.

Parâmetros cromatográficos	Valores recomendados ICH (2005)	Valores médios observados*	
		SQR	ADAP-1
Tempo de retenção (minutos)	-	6,92	6,88
Fator de capacidade (K')	K'>2	3,61	3,59
Assimetria ou Fator de cauda (TF)	TF<2	1,19	1,20
Número de pratos teóricos (N)	N>2000	7154	7061
Repetibilidade (DPR)	≤ 1% (n≥5)	0,41	0,54

\*n=5

#### 5.2.3.2.2. Especificidade

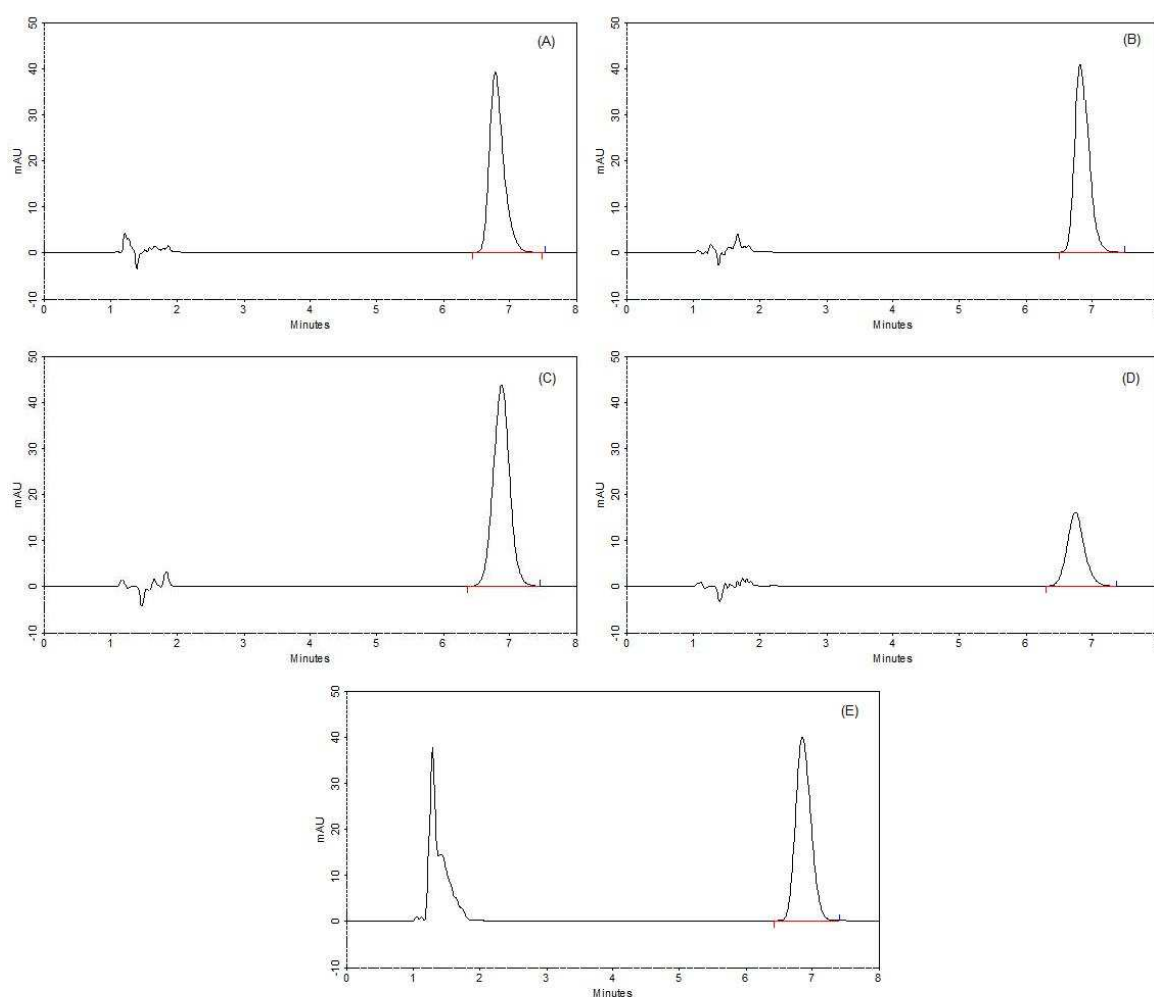
A especificidade do método analítico refere-se à capacidade de medir com exatidão o analito de interesse em presença de outros componentes ou interferentes que possam estar presentes na matriz da amostra, tais como produtos de degradação, impurezas e componentes da matriz (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 31, 2008).

Com o objetivo de investigar potenciais produtos de degradação a avaliação do método por CLAE para especificidade do adapaleno foi realizada frente à hidrólise ácida e alcalina, degradação térmica, fotólise e estresse oxidativo. Os cromatogramas obtidos para cada condição testada são apresentados na Figura 27 (A-E).

O acompanhamento da degradação forçada da SQR foi realizado pela análise do teor, pela metodologia desenvolvida neste trabalho. Com o auxílio de detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foi verificada a pureza do pico cromatográfico.

A solução de adapaleno SQR submetida ao tratamento com HCl 1M (Figura 27-A), apresentou decréscimo de aproximadamente 10,6% no seu teor, entretanto não se observou formação de picos adicionais, bem como não houve diminuição da pureza do pico, o que pode indicar que a degradação do adapaleno apresenta-se como um composto não interferente na análise quantitativa do fármaco.

Nas soluções submetidas à degradação básica (NaOH 1M) (Figura 27-B) e térmica (80 °C) (Figura 27-C) não houve aparecimento de potenciais produtos de degradação uma vez que não houve presença de picos adicionais, bem como não houve alteração significativa nos teores de adapaleno observados, nem na pureza do pico cromatográfico. O teste de fotólise (352 nm) (Figura 27-D), apresentou redução significativa no teor (48,2% do teor inicial), entretanto igualmente não houve aparecimento de picos secundários, provavelmente confirmando a hipótese de formação de composto não interferente na análise do fármaco.



**Figura 27:** Cromatogramas dos estudos de degradação forçada.

(A) hidrólise ácida (HCl 1M) (B) hidrólise básica (NaOH 1M), (C) degradação térmica (80 °C), (D) fotólise (UV  $\lambda=352$  nm) e (E) teste de oxidação ( $H_2O_2$  30%, V/V).

\*Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (67:33, V/V), fluxo de 1,4 mL/minuto, coluna LiChrocart<sup>®</sup>/LiChrospher<sup>®</sup> C<sub>8</sub> Merck (125x4,6 mm, 5  $\mu$ m), temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 321nm, volume de injeção 20 $\mu$ l.

\* Os cromatogramas, que originalmente apresentam TR de 16 minutos, foram otimizados (8 minutos) para facilitar a sua visualização.

Na solução de adapaleno SQR submetida ao tratamento com peróxido de hidrogênio (Figura 27-E) o cromatograma apresentou um pico extra, possivelmente devido ao próprio peróxido de hidrogênio, em aproximadamente 1,2 minutos, pois este pico também aparece quando uma solução branco com peróxido de hidrogênio é injetada nas mesmas condições experimentais. Não houve alteração significativa nos teores de adapaleno observados, nem na pureza do pico cromatográfico.

Como pode ser observado nos cromatogramas obtidos no estudo de degradação forçada não ocorreu a formação de picos adicionais em relação ao adapaleno. Considerando a estrutura apresentada pelo fármaco, seus produtos de degradação, provavelmente apresentarão estruturas mais simples e conseqüentemente mais polares que o adapaleno, o que indicaria, em última análise, que sua presença deveria ser detectada em um tempo de retenção inferior a 8 minutos. Utilizando o detector de diodos, pode-se verificar que o pico referente ao adapaleno SQR manteve sua pureza em todas as determinações.

Não foram verificadas também alterações significativas nos tempos de retenção ou interferência de solventes ou impurezas nos cromatogramas. A Tabela 15 mostra os percentuais médios de degradação e a pureza dos picos cromatográficos adapaleno após ter sido submetido aos testes de estresse.

**Tabela 15:** Estudo da especificidade : Percentual médio de degradação e pureza dos picos cromatográficos do adapaleno.

Condições de estresse	ADAPALENO SQR	
	Teor degradado (%)	Pureza do pico
HCl 1,0 M	10,6	1,0000
NaOH 1,0 M	0,2	1,0000
Temperatura (80 °C)	0	1,0000
UV 254 nm	48,2	0,9999
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% V/V	0,4	1,0000

Os índices de pureza, obtidos pelo DAD, situaram-se no intervalo de 0,9999 - 1,0000, indicando a homogeneidade do pico. Dessa forma, o método desenvolvido pode ser utilizado para a determinação do adapaleno na



presença de seus produtos de degradação, nas condições experimentais apresentadas.

#### 5.2.3.2.3. Linearidade

Na Tabela 16 encontram-se os valores das áreas médias correspondentes ao adapaleno, obtidas na curva padrão, referentes a cada diluição da SQR.

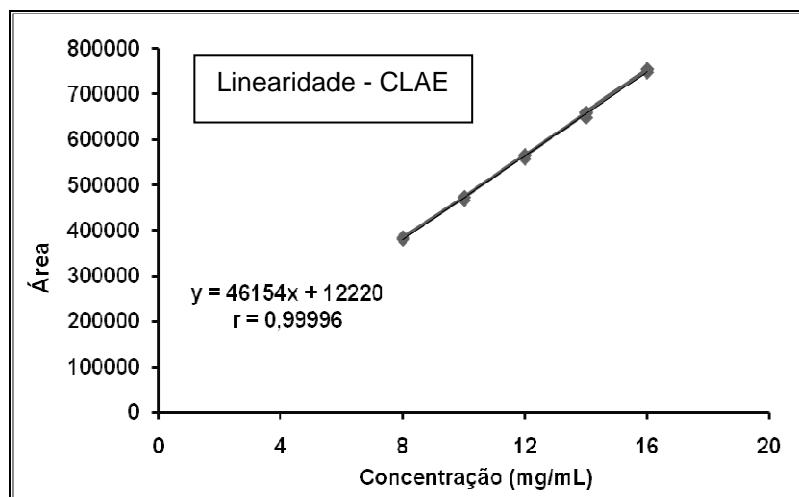
A partir de soluções de adapaleno SQR com 5 níveis de concentrações de 8,0 a 16,0 µg/mL foram construídas três curvas padrão analisadas em três diferentes dias. Cada área apresentada refere-se à média de três determinações. A curva está representada na Figura 28 juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

**Tabela 16:** Valores de área absoluta obtidos para a curva padrão do adapaleno SQR por CLAE.

Concentração (µg/mL)	Área*	Média das Áreas ± e.p.m.	DPR
8,0	383934	383904 ± 1301,2	0,52
	381636		
	386143		
10,0	473925	472213 ± 2199,3	0,71
	467848		
	474866		
12,0	567928	564364 ± 2937,5	0,78
	558537		
	566628		
14,0	658664	656651 ± 3865,6	0,89
	649180		
	662108		
16,0	754615	753229 ± 2093,4	0,45
	749115		
	755958		

\* Resultado de três determinações; e.p.m. – erro padrão da média; DPR – desvio padrão relativo

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 33 em ANEXO) dos resultados obtidos por CLAE indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ( $r = 0,99996$ ) está de acordo com as especificações e apresenta a correlação entre as áreas e a concentração do fármaco, indicando que o método é linear na faixa de concentração de 8,0 a 16,0 µg/mL.



**Figura 28:** Representação gráfica da curva padrão média do adapaleno por CLAE.

#### 5.2.3.2.4. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os valores referentes à análise dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculados através das equações descritas no item 5.2.3.1.1.4, encontram-se na Tabela 17.

**Tabela 17:** Resultados dos limites de detecção e quantificação, obtidos por CLAE.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	8,0 – 16,0 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 46154x - 12220$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$46154 \pm 294,7$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$12220 \pm 661,9$
Coeficiente de correlação (r)	0,99996
<b>Limite de detecção (LD)</b>	<b>0,04 µg/mL</b>
<b>Limite de quantificação (LQ)</b>	<b>0,14 µg/mL</b>

#### 5.2.3.2.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos DPR's intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 18.

**Tabela 18:** Resultados obtidos em três diferentes dias na quantificação das amostras de adapaleno matéria-prima por CLAE para avaliação da precisão intra e interdias.

Amostras	Teor (%) das soluções de ADAP-1 (12,0 µg/mL)		
	1º dia	2º dia	3º dia
1	101,0	100,1	100,0
2	100,4	100,3	99,5
3	99,7	100,3	99,5
4	100,8	100,3	99,3
5	100,0	100,1	98,8
6	99,7	98,9	98,7
<b>Teor Médio intradia (%)</b>	100,3	100,0	99,3
<b>e.p.m (±)</b>	0,22	0,23	0,20
<b>DPR intradia %</b>	0,54	0,56	0,50
<b>Média Interdias</b>		99,9	
<b>DPR interdias %</b>		0,50	

e.p.m. – erro padrão da média; DPR – desvio padrão relativo

Os valores de DPR apresentados pelo ensaio de repetibilidade e precisão intermediária indicam que o método proposto é preciso quando executado em um curto período de tempo, efetuado sob as mesmas condições e em um mesmo laboratório, obtido em dias diferentes.

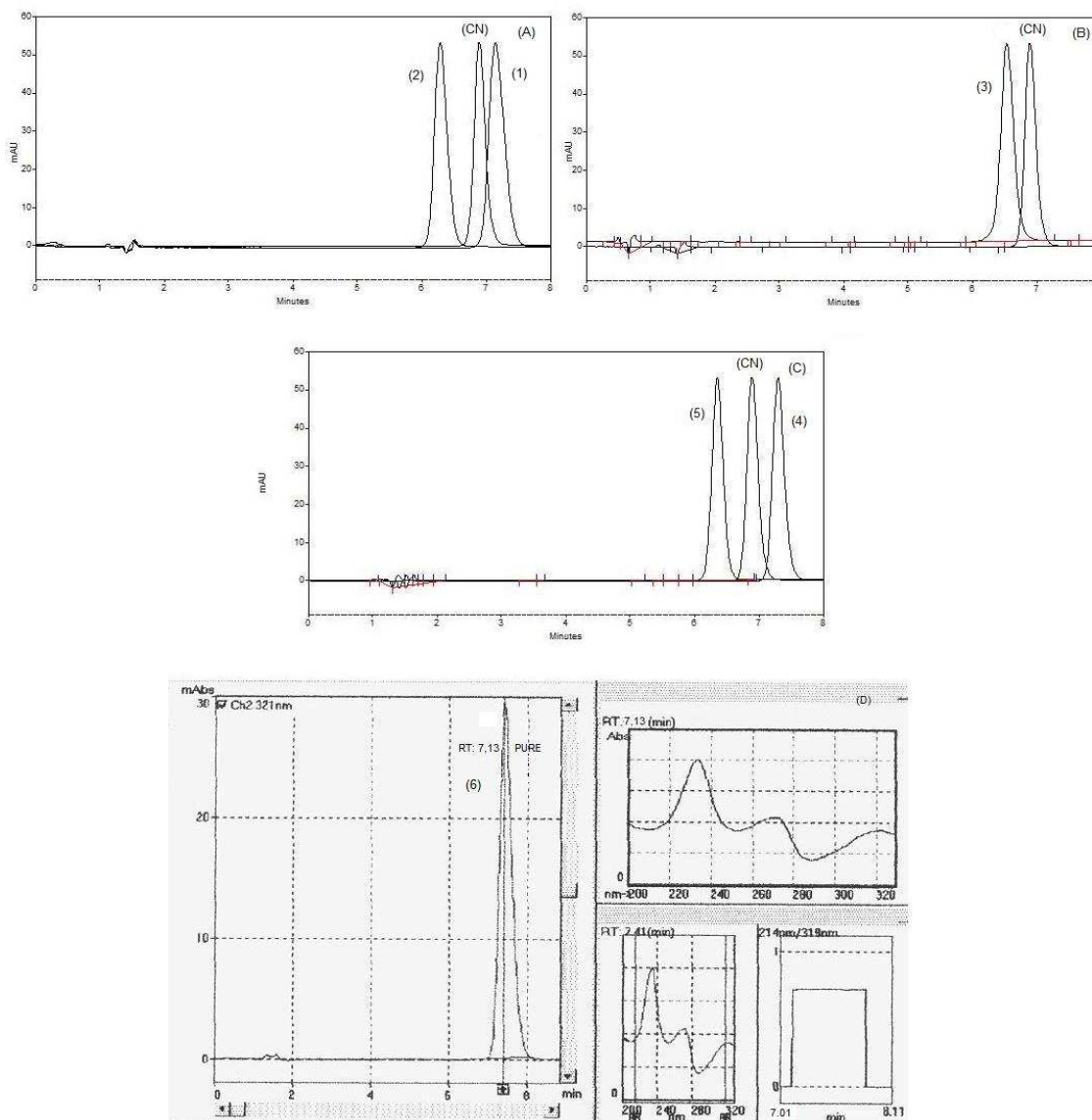
#### 5.2.3.2.6. Exatidão

A exatidão do método CLAE para a determinação quantitativa do teor da matéria-prima do adapaleno foi inferida na faixa de 8,0 a 16,0 µg/mL, a partir da determinação da precisão, linearidade e especificidade, de acordo com a citação no item 5.2.3.1.1.6.

#### 5.2.3.2.7. Robustez

Segundo a International Conference on Harmonisation (ICH) (2005), a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas variações nos parâmetros do método proposto. Em geral, servem para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método em estudo.

A robustez do método foi testada através de pequenas modificações nas condições cromatográficas propostas. Os cromatogramas obtidos a partir das modificações no sistema cromatográfico podem ser observados na Figura 29 (A, B, C, D).



**Figura 29:** Avaliação da robustez do método CLAE para matéria-prima.

(A) proporção de FM; (B) coluna; (C) fluxo; (D) equipamento 4.

(1): ACN:água (66:34, V/V); (2): ACN:água (68:32, V/V); (3): coluna Merck (120x4,6mm); (4): fluxo 1,3 mL.minuto<sup>-1</sup>; (5) fluxo 1,5 mL.minuto<sup>-1</sup>; (6) equipamento 4 (SHIMADZU<sup>®</sup> LC-10AD)

As alterações realizadas no método, a fim de avaliar sua suscetibilidade a mudanças nos parâmetros analíticos durante a determinação do adapaleno, muito embora tenham ocasionado alterações em relação ao tempo de retenção, número de pratos teóricos, assimetria e fator de capacidade obtidas

em comparação com as condições normais de análise, não alteraram significativamente os parâmetros cromatográficos de análise, estando estes ainda em conformidade com aqueles preconizados pelo ICH (2005).

O Quadro 6 apresenta o valor da determinação do teor apresentado pela amostra ADAP-1 durante a realização do teste de robustez.

**Quadro 6:** Teores de ADAP-1 frente às modificações realizadas pelo teste de robustez.

Amostra ADAP-1		Proporção FM		Dimensões 120X4,6 mm	Fluxo		Equipamento	DPR (%)
		ACN:H <sub>2</sub> O (66:34) V/V	ACN: H <sub>2</sub> O (68:32) V/V		1,3	1,5		
**Condições normais	Teor * (%)	99,7 %	99,9	99,7	100,0	100,3	101,5	0,65

\*Teores relativos ao teor encontrado pelo doseamento da amostra adapaleno ADAP-1 em condições normais, considerando-se este como 100%.\*\* Condições cromatográficas normais (CN): fase móvel ACN:água (67:33, V/V), fluxo de 1,4 mL.min<sup>-1</sup>, coluna Merck (125x4,6 mm, 5 µm), equipamento 1 (SHIMADZU<sup>®</sup> LC-10ADVP), temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 321 nm, volume de injeção 20µl.

Os resultados obtidos na determinação do adapaleno SQR e amostra ADAP-1, através de pequenas alterações nas condições cromatográficas, podem ser observados na Tabela 19.

A influência da variação de pH da fase móvel foi um parâmetro estudado na otimização desta metodologia de análise. Modificando o pH da fase móvel, além de um melhor tempo de retenção, diferenças na seletividade podem ser observadas para compostos ionizáveis. Desta forma, o pH da fase móvel foi um parâmetro não modificado, para fim de avaliação da robustez do método por ter sido parâmetro anteriormente otimizado durante a seleção das condições cromatográficas.

Em todas as condições testadas o DPR na determinação quantitativa foi inferior a 2% (0,73%). A partir de variações na composição da fase móvel, constatou-se que volumes inferiores a 67% de acetonitrila resultam em um aumento no tempo de retenção em relação ao observado nas condições otimizadas, assim como redução na assimetria do pico. O aumento na proporção de acetonitrila conseqüentemente reduziu o tempo de retenção, entretanto, manteve a assimetria apresentada pelas condições normais.

**Tabela 19:** Avaliação da robustez do método de CLAE para determinação do adapaleno SQR e amostra ADAP-1 em solução a 12 µg/mL.

Condições Normais		T Retenção (min.) (TR)	Pratos teóricos (N)	Assimetria (TF)	Fator Capacidade (K')	
SQR		6,92	7154	1,19	3,61	
ADAP-1		6,88	7061	1,20	3,59	
Coluna: C8 Merck® (125 × 4.6 mm); Fase móvel: ACN: H <sub>2</sub> O (67:33, V/V) * pH 2,5 (ajustado com ác. Fosfórico 20%); Fluxo da fase móvel: 1,4 mL.min <sup>-1</sup> ; Equipamento 1 (SHIMADZU® LC-10ADVP)						
Modificações		T R (min.)	N	TF	K'	
Proporção da Fase Móvel	ACN: H <sub>2</sub> O (66:34) V/V	SQR	7,12	3889	1,25	3,75
		ADAP-1	7,13	3788	1,26	3,76
	ACN: H <sub>2</sub> O (68:32) V/V	SQR	6,27	4537	1,19	3,18
		ADAP-1	6,27	4466	1,20	3,18
Dimensões da coluna	120X4,6 mm	SQR	6,54	4826	1,07	3,36
		ADAP-1	6,53	4811	1,07	3,36
Fluxo	1,3	SQR	7,26	7339	1,19	3,84
		ADAP-1	7,29	7288	1,20	3,86
	1,5	SQR	6,44	5509	1,10	3,96
		ADAP-1	6,45	5682	1,10	3,96
Equipamento Número 4	SQR	7,13	2985	1,29	3,60	
	ADAP-1	7,13	2903	1,30	3,62	

O número de pratos teóricos apresentou redução em ambas as condições testadas. Modificações nas dimensões da coluna diminuiram a assimetria, entretanto observou-se redução em todos os outros parâmetros. A redução no

fluxo somente ocasionou aumento no tempo de retenção e a modificação no equipamento apenas melhorou o fator de capacidade.

De acordo com os resultados apresentados é possível afirmar que o método proposto é robusto quando sujeito a pequenas variações.

#### 5.2.4. Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do adapaleno matéria-prima

Quando diferentes métodos de análise são desenvolvidos, torna-se importante compará-los estatisticamente, a fim de verificar se são equivalentes. Na Tabela 20 estão apresentados os resultados obtidos na determinação do adapaleno matéria-prima (ADAP-1) através dos métodos desenvolvidos por VMA, UV e CLAE.

**Tabela 20:** Resultados obtidos na determinação do adapaleno amostra (ADAP-1) por VMA, UV e CLAE.

	<b>VMA</b>	<b>UV</b>	<b>CLAE</b>
	<b>(n = 6)</b>	<b>(n = 18)</b>	<b>(n = 18)</b>
<b>Teor médio (%)</b>	99,5	99,9	100,1
<b>DPR</b>	0,30	0,61	0,50

Os métodos propostos foram analisados comparativamente, através do teste de análise de variância (ANOVA), considerando diferentes números de repetições por tratamento. Dessa forma, os dados serão analisados presumindo-se a inexistência de diferenças significativas entre os métodos desenvolvidos por VMA, UV e CLAE. Os valores utilizados para a comparação entre os métodos foram os valores obtidos nos respectivos testes de precisão, apresentados nos itens 5.2.1.2 (Tabela 11), 5.2.2.2.3 (Tabela 14) e 5.2.3.2.5 (Tabela 18).

A avaliação estatística, através da ANOVA, das determinações do adapaleno através dos métodos desenvolvidos por VMA, UV e CLAE está demonstrada na Tabela 34 em ANEXO.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) demonstraram não haver diferença significativa entre os teores obtidos com os diferentes métodos

desenvolvidos, já que o F calculado é menor que o F crítico ( $F$  calculado = 1,55609 <  $F$  crítico = 3,23810). Deste modo, os métodos VMA, UV e CLAE podem ser considerados equivalentes na determinação quantitativa do teor de adapaleno e adequados para análise de rotina em controle de qualidade, sendo portanto intercambiáveis.

### **5.3. ANÁLISE QUANTITATIVA DA FORMA FARMACÊUTICA GEL**

#### **5.3.1. Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)**

##### **5.3.1.1. Material e métodos**

Os espectros de ordem zero e suas respectivas derivadas foram obtidos na região do ultravioleta, entre 200 a 400 nm, utilizando espectrofotômetro de varredura Shimadzu modelo UV1601 PC, duplo feixe, banda espectral de 2 nm e cubetas de quartzo de um centímetro de caminho óptico. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do programa UVPC 39.

A SQR bem como a amostra de gel foram dissolvidas em etanol, separadamente, de forma a se obter solução contendo 12 µg/mL. Também foram preparadas soluções etanólicas dos excipientes, separadamente, cujas quantidades foram baseadas na literatura.

Os parâmetros para quantificação por espectrofotometria derivada na região do ultravioleta foram selecionados a partir de testes preliminares utilizando soluções de adapaleno SQR (12 µg/mL) e mistura dos excipientes do gel.

##### **5.3.1.1.1. *Validação do método UV-D para a forma farmacêutica gel***

###### **5.3.1.1.1.1. Especificidade**

A especificidade do método espectrofotométrico foi avaliada pela sobreposição entre os espectros de absorção obtidos entre a substância de referência e as soluções contendo os excipientes presentes no gel avaliados individualmente e em conjunto, a partir da amostra simulada dos adjuvantes



(ASA), o que permite avaliar a possível interferência dos adjuvantes na determinação do adapaleno.

A concentração dos adjuvantes da formulação foi baseada na literatura (KIBBE *et al*, 2000) e estão apresentados no Quadro 7. A partir do peso total de produto do conteúdo das bisnagas e das concentrações percentuais médias descritas para cada adjuvante determinou-se o peso do conteúdo referente aos adjuvantes. Foram preparadas soluções da SQR e do gel nas concentrações finais de 12 µg/mL, utilizando-se etanol como solvente.

A solução da ASA foi preparada calculando-se as quantidades de adjuvantes referentes a 10 g de gel (quantidade exatamente pesada para preparação da solução estoque de gel). As soluções de trabalho tanto da amostra (gel) como da ASA foram preparadas de acordo com a técnica descrita no item 5.1 (Preparo das soluções de trabalho).

**Quadro 7:** Concentrações percentuais médias descritas para cada adjuvante.

<b>Excipiente</b>	<b>Concentração (%) *</b>
Carbômero (agente gelificante)	1,5
EDTA (agente sequestrante)	0,05
Fenoxietanol (conservante)	0,8
Hidróxido de sódio (ajuste de pH $\cong$ 6,5)	q.s.p.
Metilparabeno (conservante)	0,2
Poloxâmero (agente gelificante)	30,0
Propilenoglicol (umectante)	25,0

\* Concentrações percentuais médias (KIBBE, 2000).

Os parâmetros selecionados para determinação da especificidade por espectrofotometria derivada na região do ultravioleta foram avaliados de acordo com a capacidade de quantificação sem a presença dos interferentes da formulação: Derivada de primeira ordem (UV-D<sup>1</sup>), comprimento de onda (305,0 nm), o delta lambda (4) e fator de escala (FE) 20. A seleção dos

parâmetros foi realizada de acordo com o item 5.3.1.2.1 (Aspectos instrumentais e definição dos principais parâmetros da UVD).

#### 5.3.1.1.1.2. Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção de três curvas padrão desenvolvidas a partir da solução da SQR com cinco níveis de concentração cada, que foram avaliados em três diferentes dias por espectrofotometria derivada na região do ultravioleta derivada em primeira ordem (UV-D<sup>1</sup>). A partir das três curvas a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados.

A partir de solução da SQR em etanol na concentração de 100 µg/mL, alíquotas de 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mL foram transferidas, com o auxílio de bureta, para balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com etanol e obtendo-se concentrações de 8,0, 10,0, 12,0, 14,0 e 16,0 µg/mL, respectivamente.

Foram realizadas três leituras para cada solução. A curva padrão foi obtida a partir dos valores das médias das absorvâncias por espectrofotometria derivada na região do ultravioleta derivada *versus* concentração da SQR nas soluções correspondentes, obtendo-se o coeficiente de correlação e a equação da reta, através da regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

#### 5.3.1.1.1.3. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram determinados a partir dos dados da curva de calibração, utilizando a seguinte equação (ICH, 2005):

$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC}$	$LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$
------------------------------	-----------------------------

Onde:

$\sigma$ : Desvio padrão médio do intercepto;

IC: Inclinação da curva de calibração.

#### 5.3.1.1.1.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada através de seis ensaios, realizados em três diferentes dias. As seis soluções de adapaleno gel foram preparadas em concentrações equivalentes a 12,0  $\mu\text{g/mL}$ , em balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com etanol. A solução de adapaleno SQR foi preparada em etanol na mesma concentração de 12  $\mu\text{g/mL}$ .

Foram realizadas três determinações por espectrofotometria na região do UV-D para cada solução de análise. A concentração ( $C_a$ ) em  $\mu\text{g/mL}$  das soluções de gel, foi determinada a partir da equação a seguir:

$$C_a = (A_a \cdot C_{\text{SQR}}) / A_{\text{SQR}}$$

Onde:

$A_a$  = absorvância da solução amostra de adapaleno gel

$C_{\text{SQR}}$  = concentração da solução de SQR

$A_{\text{SQR}}$  = absorvância da solução de SQR

O teor (C%) de adapaleno na amostra de gel foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

$C_a$  = concentração da solução amostra de adapaleno gel

$C_t$  = concentração teórica da solução amostra de adapaleno gel

A determinação do teor de adapaleno no gel foi realizada a partir da avaliação dos dados obtidos através da repetibilidade do método (precisão intradia) e do desvio padrão relativo (DPR) entre as médias das seis determinações. A precisão interdias (precisão intermediária) foi avaliada

através do DPR obtido entre as médias das determinações, em três diferentes dias de análise.

#### 5.3.1.1.1.5. Exatidão (Teste de recuperação)

Preparou-se a solução de adapaleno SQR e amostra de gel (FF) a 100 µg/mL em etanol de acordo com a técnica descrita no item 5.1 (Preparo das soluções de trabalho). Alíquotas de cada uma das soluções foram transferidas com o auxílio de bureta para balão volumétrico de 25 mL, de acordo com os volumes e concentrações finais descritos na Tabela 21.

Soluções de adapaleno SQR e da amostra de gel (A) na concentração final de 8,0 µg/mL foram preparadas, separadamente, em balões volumétricos de 25 mL. Todas as soluções finais de trabalho foram aferidas em seu volume final com etanol P.A.

**Tabela 21:** Teste de recuperação por espectrofotometria UV-D<sup>1</sup>, λ=305,0 nm.

	Volume da solução amostra de adapaleno FF (mL)*	Volume da solução de adapaleno SQR (mL)*	Concentração final em balão vol. 25 mL (µg/mL)
<b>SQR</b>	–	2,0	8,0
<b>A</b>	2,0	–	8,0
<b>R1</b>	2,0	0,5	10,0
<b>R2</b>	2,0	1,0	12,0
<b>R3</b>	2,0	1,5	14,0

\* Solução a 100 µg/mL

O teor recuperado de adapaleno SQR foi calculado a partir da equação que segue.

$$R\% = [(CR^* - CA) / CSQR] \cdot 100$$

Onde:

CR\* = Concentração de adapaleno encontrada na amostra de gel adicionada de SQR (µg/mL); Sendo R\* = R1, R2 ou R3;

CA = concentração da solução amostra de adapaleno gel (µg/mL);

CSQR = concentração da solução de adapaleno SQR ( $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 5.3.1.2. Resultados e discussão

A espectrofotometria derivada consiste na diferenciação de um espectro baseada na transformação matemática do espectro normal (ordem zero) em um espectro derivado, eliminando a influência da linha de base ou da matriz na representação da derivada da absorvância em função do comprimento de onda.

A diferenciação da lei Lambert-Beer permite obter as equações apresentadas, que demonstram que as derivadas  $d^n A/d\lambda^n$  são sempre proporcionais às concentrações do analito (OJEDA & ROJAS, 2004; ROCHA & TEIXEIRA, 2004).

$$dA/d\lambda = c \cdot b \cdot (d\varepsilon/d\lambda)$$

$$d^2A/d\lambda^2 = c \cdot b \cdot (d^2\varepsilon/d\lambda^2)$$

$$d^n A/d\lambda^n = c \cdot b \cdot (d^n \varepsilon/d\lambda^n)$$

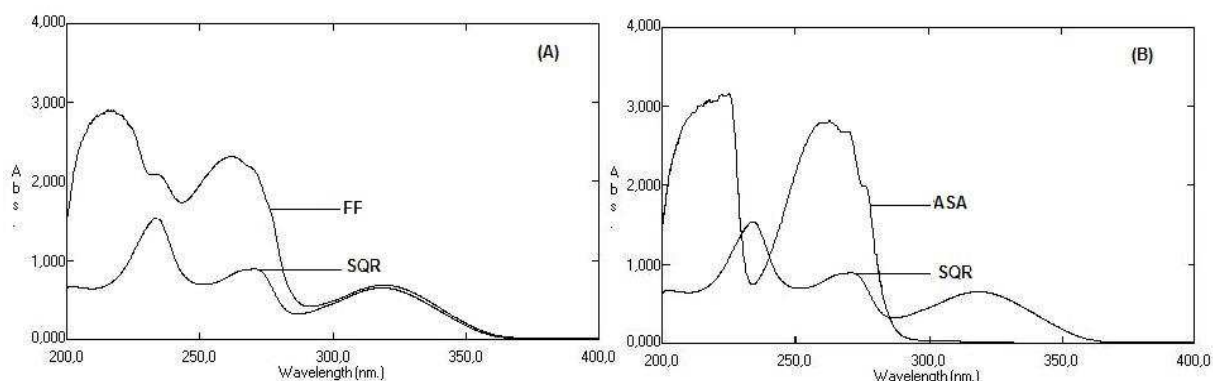
É útil para melhorar a resolução em espectros de misturas ou compostos contaminados por produtos de degradação, pois aumenta a detecção de características espectrais menos evidentes, reduzindo o efeito de interferências espectrais de fundo. É uma técnica analítica de grande utilidade para apresentar informações quali e quantitativas dos espectros de compostos que apresentam sobreposição de bandas, utilizando a primeira derivada ou derivadas mais elevadas (OJEDA & ROJAS, 2004).

Esta técnica oferece uma alternativa para aumentar a sensibilidade e a especificidade na análise espectrofotométrica. A derivada não aumenta o conteúdo de informação de um espectro, mas permite a discriminação das interferências de bandas largas, geradas pela turbidez ou absorção não específica da matriz (KAZEMIPOUR *et al.*, 2002). A espectrofotometria derivada foi desenvolvida, como método alternativo ao CLAE, para a quantificação do adapaleno no gel, visando utilizá-la no controle de qualidade desta forma farmacêutica.

### 5.3.1.2.1. Aspectos instrumentais e definição dos parâmetros da UV-D

O aumento de sensibilidade verificado na espectrometria derivativa é baseado na observação de que a ordem da derivação em relação ao comprimento de onda é inversamente proporcional à largura de banda do espectro. Por esta razão, a sensibilidade em métodos derivativos depende não somente dos parâmetros instrumentais como também das características do espectro de absorção (OJEDA & ROJAS, 2004).

Testes preliminares, utilizando soluções de adapaleno SQR e da forma farmacêutica gel na concentração de 12 µg/mL, foram realizados para identificação da interferência dos adjuvantes da FF na quantificação do fármaco (Figura 30-A). A partir dos espectros de ordem zero da amostra simulada dos adjuvantes do gel (ASA), pode-se observar a sobreposição das bandas espectrais, dificultando a utilização da espectrofotometria de UV clássica para a sua quantificação em presença dos adjuvantes do gel (Figura 30-B).



**Figura 30:** Sobreposição de espectros na região do UV na ordem zero

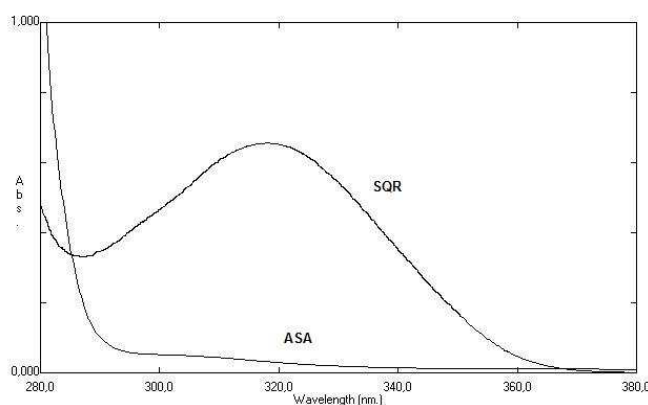
(A): Forma Farmacêutica gel (FF) em etanol (12µg/mL), SQR em etanol (12µg/mL); (B): Amostra Simulada de adjuvantes (ASA), SQR em etanol (12µg/mL).

\*composição da ASA: Carbômero, EDTA, fenoxietanol, NaOH, metilparabeno, poloxâmero e propilenoglicol.

As exigências instrumentais para a espectroscopia derivada são, geralmente, similares àquelas da espectroscopia convencional; entretanto a reprodutibilidade e a relação sinal-ruído são parâmetros muito mais significativos. Pequenos erros do comprimento de onda podem conduzir a erros muito maiores na derivada do que na espectrofotometria normal. Apesar de a relação sinal/ruído tornar-se progressivamente pior com o aumento da ordem

da derivada, geralmente o ruído diminui com o aumento de  $\Delta\lambda$  (KARASEN & ALTINÖZ, 2000; OJEDA *et al.*, 1995).

De acordo com a figura 31 em maior escala, pode-se identificar que mesmo na faixa de comprimento de onda entre 295 a 380 nm (faixa em que aparentemente há redução da influência dos adjuvantes) ainda observa-se a sobreposição das bandas espectrais na quantificação do fármaco, confirmando a hipótese da necessidade da derivação.



**Figura 31:** Espectros na região do UV ordem zero (ampliado).

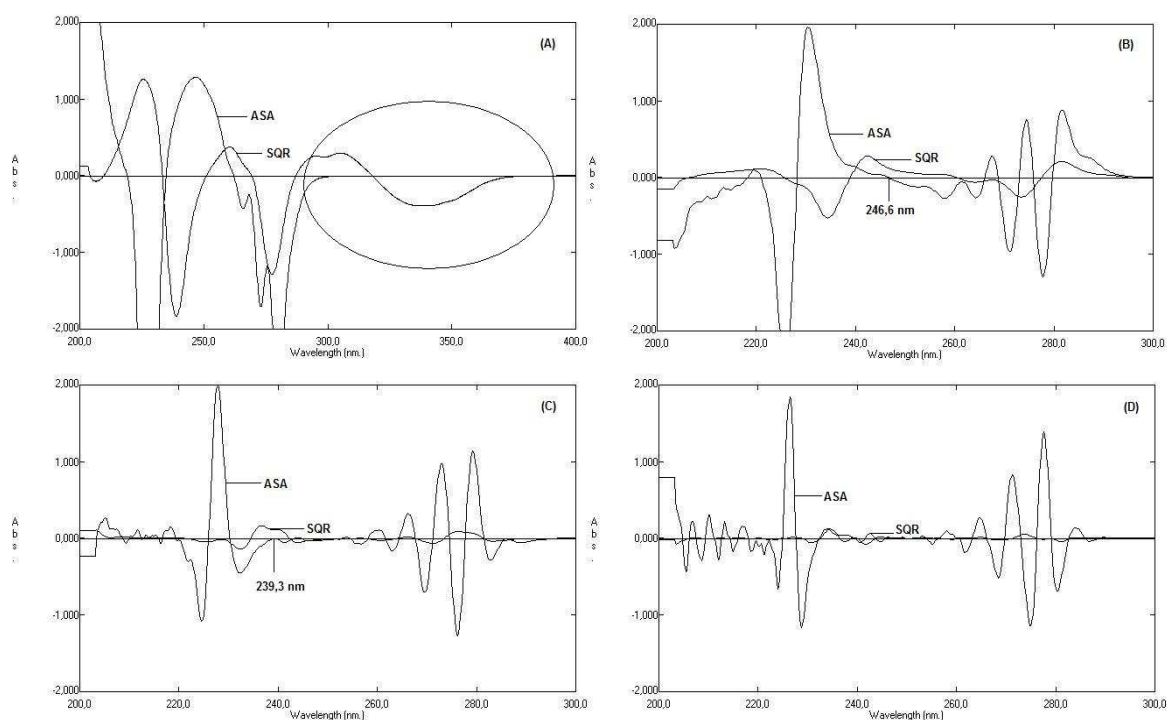
SQR em etanol (12 $\mu$ g/mL); ASA: Amostra Simulada de adjuvantes em etanol.

A escolha da ordem da derivada foi realizada de acordo com as características do espectro, mais especificamente, observou-se em que ordem de derivação o espectro do adapaleno SQR apresentou as melhores intensidades para quantificação do fármaco nos máximos de absorção em que há anulação dos adjuvantes do gel.

Os espectros derivados (SQR e ASA) foram obtidos a partir do espectro de ordem zero e foram traçados no intervalo de 200 a 400 nm nas diferentes ordens de derivada. Devido à interferência dos adjuvantes no método testado, foram traçados espectros derivados de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, e 4<sup>a</sup> ordem, na região do ultravioleta, a fim de se obter condições ideais e selecionar o comprimento de onda adequado para o método. A Figura 32 mostra os espectros de primeira, segunda, terceira e quarta derivadas, indicando as regiões ou pontos de anulação da ASA.

De acordo com os resultados apresentados pelos espectros, inicialmente foram selecionadas a primeira, segunda e terceira ordens para quantificação do

adapaleno em presença dos adjuvantes do gel. A primeira derivada apresentou uma ampla faixa de comprimento de onda de total anulação dos adjuvantes em relação ao fármaco. Os espectros de segunda e terceira ordens (Figura 32-B e 32-C) apresentaram cada um somente um comprimento de onda onde não ocorre interferência dos adjuvantes em 246,6 nm (UV-D<sup>2</sup>) e 239,3 nm (UV-D<sup>3</sup>), respectivamente, nos quais teoricamente, o adapaleno poderia ser determinado. O espectro de quarta ordem foi descartado por não apresentar nenhum comprimento de onda de anulação dos adjuvantes.



**Figura 32:** Espectros de absorção de primeira (A), segunda (B), terceira (C) e quarta derivada (D) do adapaleno 12 µg/mL em etanol.

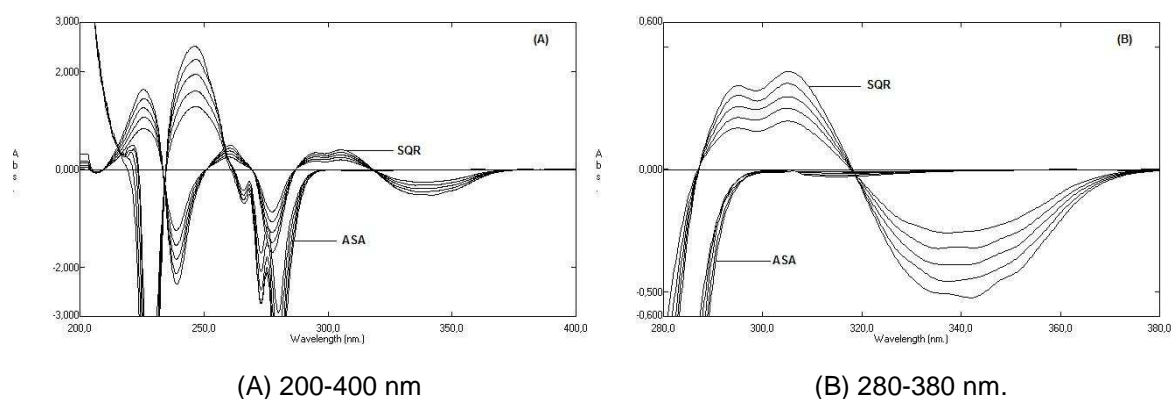
Comprimentos de onda referentes aos pontos de anulação da ASA, para a análise quantitativa.

Entretanto, utilizando o programa UVPC39 e diferentes valores de delta lambda ( $\Delta\lambda$ ) e de fator de escala, para segunda e terceira derivadas, esses espectros foram transformados, buscando definir as melhores condições para a quantificação desta forma farmacêutica, através da técnica do ponto de anulação. Nenhum dos dois comprimentos de onda selecionados para segunda e terceira derivadas manteve anulação nos comprimentos de onda referidos, quando avaliados posteriormente. Dessa forma, a primeira derivada foi a ordem derivativa escolhida para quantificação do adapaleno, pois foi a que apresentou as melhores repostas em relação à intensidade para quantificação do fármaco,



nos testes preliminares, nos máximos de absorção em que há anulação dos adjuvantes do gel. As demais ordens derivativas avaliadas não apresentaram perfis adequados para quantificação do adapaleno em sua forma farmacêutica.

A partir da avaliação dos espectros submetidos a variações de  $\Delta\lambda$  e fator de escala em primeira ordem foram escolhidos os parâmetros utilizados para validação da metodologia analítica para quantificação do adapaleno na forma farmacêutica gel por espectrofotometria derivada na região do ultravioleta: derivada de primeira ordem (UV-D<sup>1</sup>), delta lambda ( $\Delta\lambda$ ) 4 e fator de escala (FE) 20. Para a escolha dos parâmetros foram consideradas a forma do espectro da derivada, a seletividade, a relação sinal-ruído e a largura da banda espectral. O método desenvolvido foi testado em misturas com equivalentes proporções da ASA e de SQR (8,0, 10,0, 12,0, 14,0 e 16,0  $\mu\text{g/mL}$ ) a fim de se confirmar a eliminação da influência da absorção dos adjuvantes na formulação (Figura 33).

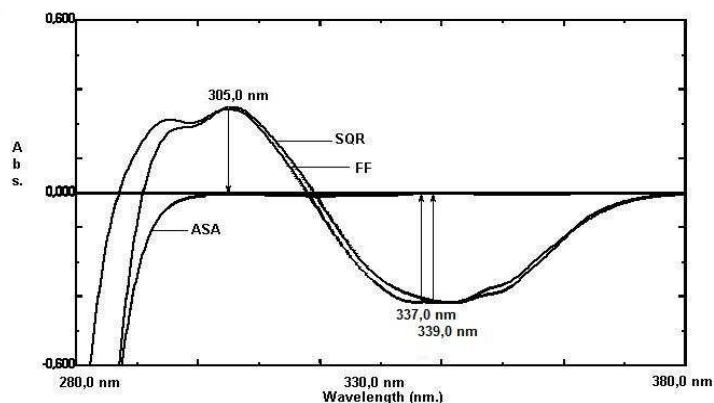


**Figura 33:** Espectro de absorção com diferentes proporções da SQR e ASA

- ✓ Confirma a eliminação da influência da absorção dos adjuvantes na formulação. Parâmetros utilizados para derivação: UV-D<sup>1</sup>,  $\Delta\lambda=4$  e FE 20;

A Figura 34 apresenta o espectro gerado tanto para forma farmacêutica quanto para a SQR e amostra simulada de adjuvantes, a partir dos parâmetros selecionados. Três comprimentos de onda foram inicialmente selecionados (305,0, 337,0 e 339,0 nm), para a determinação do adapaleno no gel e correspondem aos pontos de anulação da ASA, na região entre 280 e 380 nm. A partir dos resultados obtidos por três curvas-padrão geradas a partir dos espectros de primeira ordem, nos três comprimentos de onda utilizados para

determinação do adapaleno na FF, foram analisados os coeficientes de correlação e a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.



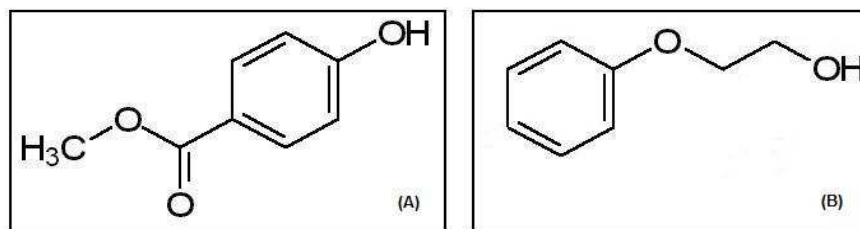
**Figura 34:** Espectros de absorção de primeira derivada do adapaleno 12 µg/mL em etanol.

Comprimentos de onda referentes aos pontos de anulação da ASA, para a determinação do adapaleno (305,0; 337,0 e 339,0 nm);  $\Delta\lambda=4$  e fator de escala de 20.

As três curvas-padrão traçadas nos três comprimentos de onda selecionados apresentaram coeficiente de correlação ( $r$ ) com o critério mínimo aceitável de acordo com a resolução RE 899 (BRASIL, 2003),  $r \geq 0,99$ . Dessa forma, o critério de seleção do comprimento de onda utilizado durante a validação do método analítico foi estabelecido pelo valor de ( $r$ ) que apresentasse valores mais próximos da unidade (1,0). Os resultados obtidos demonstram que em 305,0 nm as soluções avaliadas apresentam as absorvâncias mais adequadas para a realização da análise ( $r=0,99994$ ).

#### 5.3.1.2.1.1. Especificidade

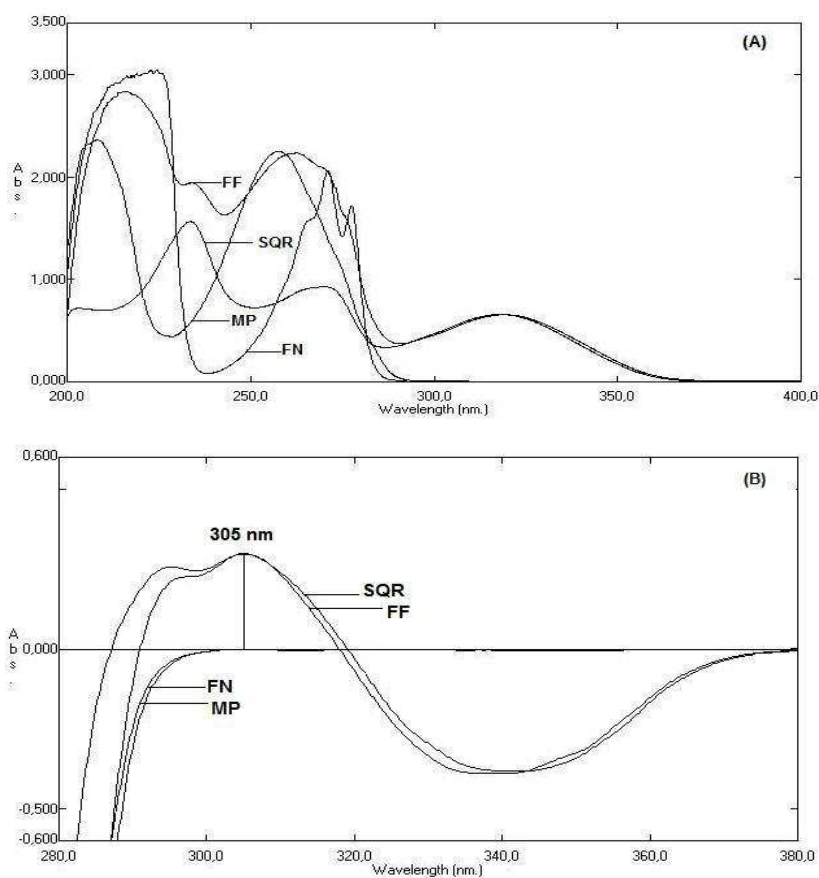
A partir da análise da estrutura química de cada um dos adjuvantes que compõem a forma farmacêutica gel, pode-se observar que apenas os conservantes utilizados na formulação, metilparabeno (MP) e fenoxietanol (FN) (Figura 35), possuem ligas duplas conjugadas com grupamentos cromóforos capazes de serem detectados por espectrofotometria na região do UV.



**Figura 35:** Estrutura química do metilparabeno (A) e fenoxietanol (B).

Desta forma, para determinação da especificidade foram analisados os espectros gerados pela ASA (Figura 36) e por cada um dos adjuvantes individualmente em ordem zero (A) e em primeira derivada (B) de acordo com os parâmetros anteriormente selecionados. Os resultados dos espectros confirmaram que os máximos de absorção detectados pela espectrofotometria na região do UV ocorrem principalmente devido à intensa absorção dos conservantes MP e FN presentes na formulação.

A figura (36-A) apresenta a sobreposição dos espectros adjuvantes (MP e FN) e SQR confirmando a interferência dos adjuvantes na formulação nos espectros de ordem zero. O espectro da FF confirma o perfil do espectro resultante do somatório das bandas espectrais dos interferentes (MP e FN) na quantificação do fármaco. Da mesma forma, observa-se a ausência de interferentes no espectro de primeira derivada, com absorvância nula no comprimento de onda de 305,0 nm, o que permite a determinação quantitativa do adapaleno na presença destes adjuvantes (figura 36-B).

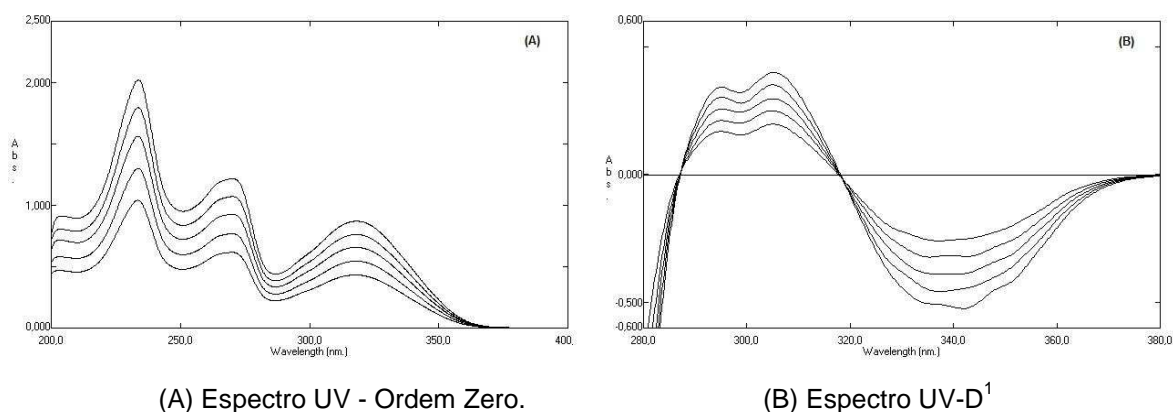


**Figura 36:** (A) Espectro UV-Ordem Zero. (B) Espectro UV-D<sup>1</sup>. FF (forma farmacêutica gel), SQR, MP (metilparabeno), FN (fenoxietanol).

## 5.3.1.2.1.2. Linearidade

A partir de soluções de adapaleno SQR nas concentrações de 8,0 a 16,0  $\mu\text{g/mL}$  em etanol, foram construídas três curvas padrão. Na Tabela 22 encontram-se os valores das absorvâncias derivadas médias correspondentes ao adapaleno, obtidas na curva padrão, referentes a cada diluição da SQR. Os espectros obtidos das soluções de adapaleno SQR nas concentrações de 8 a 16  $\mu\text{g/mL}$  em etanol, em ordem zero e UV-D<sup>1</sup> são apresentados na Figura 37.

A partir de soluções de adapaleno SQR com 5 níveis de concentração de 8,0 a 16,0  $\mu\text{g/mL}$  foram construídas três curvas padrão analisadas em três diferentes dias. A curva está representada na Figura 38 juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ).

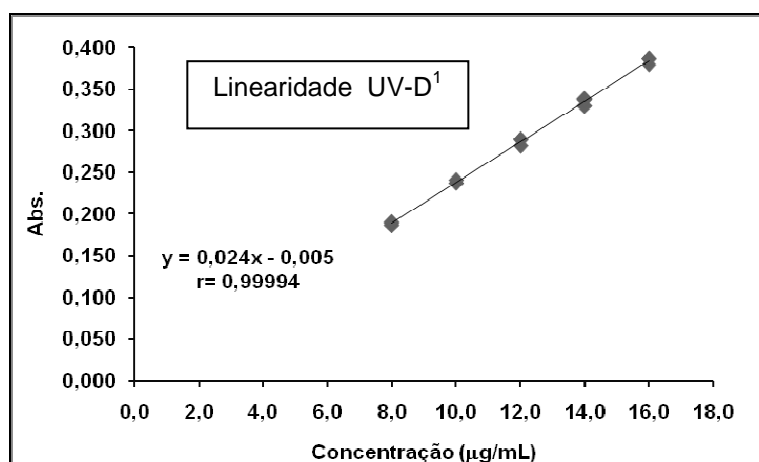


**Figura 37:** Espectros das soluções de adapaleno SQR nas concentrações de 8 a 16  $\mu\text{g/mL}$  referentes a curva padrão em etanol

**Tabela 22:** Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do adapaleno por UV-D<sup>1</sup>,  $\lambda=305,0$  nm.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvâncias*			Média $\pm$ e.p.m	DPR%
	1º dia	2º dia	3º dia		
8,0	0,1897	0,1869	0,1900	0,1889 $\pm$ 0,0005	0,88
10,0	0,2377	0,2368	0,2409	0,2385 $\pm$ 0,0007	0,85
12,0	0,2890	0,2819	0,2904	0,2871 $\pm$ 0,0014	1,40
14,0	0,3380	0,3303	0,3368	0,3350 $\pm$ 0,0014	1,23
16,0	0,3864	0,3792	0,3866	0,3841 $\pm$ 0,0014	1,10

\* Média de três determinações, e.p.m. – erro padrão da média, DPR – desvio padrão relativo



**Figura 38:** Representação da curva padrão média do adapaleno para UV-D<sup>1</sup> ( $\lambda=305,0$  nm).

Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa efetuou-se o teste de análise de variância (ANOVA). A Tabela 35 em ANEXO apresenta os valores dos tratamentos estatísticos dos valores experimentais obtidos para as curvas padrão, em etanol, através de análise de variância .

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por UV-D<sup>1</sup> indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ( $r = 0,99994$ ) está de acordo com as especificações e apresenta a correlação entre as absorvâncias e a concentração do fármaco, indicando que o método é linear na faixa de concentração de 8,0 a 16,0  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 5.3.1.2.1.3. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os valores referentes à análise dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados encontram-se na Tabela 23.

**Tabela 23:** Resultados dos limites de detecção e quantificação, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	8 – 16 $\mu\text{g/mL}$
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0243x + 0,005$
Inclinação (b) $\pm$ desvio padrão	$0,0243 \pm 0,0006$
Intercepto (a) $\pm$ desvio padrão	$0,005 \pm 0,0026$
Coeficiente de correlação (r)	0,99994
<b>Limite de detecção (LD)</b>	<b>0,37 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>
<b>Limite de quantificação (LQ)</b>	<b>1,12 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>

## 5.3.1.2.1.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos DPR's intradia (repetibilidade) e interdias (precisão intermediária). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 24.

Os valores de DPR apresentados pelo ensaio de repetibilidade e precisão intermediária indicam que o método proposto é preciso quando executado em um curto período de tempo, efetuados sob as mesmas condições e em um mesmo laboratório, obtido em dias diferentes.

**Tabela 24:** Precisão intra e interdias das amostras de adapaleno forma farmacêutica (FF) gel por espectrofotometria UV-D<sup>1</sup>.

Amostras	Teor (%) das soluções de ADAP-1 (12,0 µg/mL)		
	1º dia	2º dia	3º dia
1	100,5	102,5	100,7
2	100,8	100,6	102,4
3	101,1	101,9	102,8
4	101,0	99,6	99,7
5	104,1	98,8	102,6
6	102,6	100,8	101,8
<b>Teor Médio intradia (%)</b>	101,7	100,7	101,7
<b>e.p.m (±)</b>	0,56	0,51	0,57
<b>DPR intradia %</b>	1,36	1,22	1,38
<b>Média Interdias</b>		101,4	
<b>DPR interdias %</b>		0,59	

e.p.m. – erro padrão da média; DPR – desvio padrão relativo

## 5.3.1.2.1.5. Exatidão (Teste de recuperação)

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Para formas farmacêuticas em que as amostras de todos os componentes do medicamento estão disponíveis, utiliza-se o método da adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (SQR) ao medicamento (BRASIL, 2003).

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação do adapaleno SQR. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 25.

**Tabela 25:** Resultados obtidos para o teste de recuperação do adapaleno SQR por espectrofotometria UV-D<sup>1</sup>,  $\lambda = 305,0$  nm.

	Concentração da amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração SQR adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração média de SQR recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DPR (%) (n=3)	Recuperação (%)	Média (%) $\pm$ DPR (%)
R <sub>1</sub>	8,0	2,0	2,04 $\pm$ 0,95	101,9	100,3 $\pm$ 1,77
			2,01 $\pm$ 0,55	100,7	
			1,96 $\pm$ 0,13	98,4	
R <sub>2</sub>	8,0	4,0	4,03 $\pm$ 0,58	100,7	100,9 $\pm$ 0,95
			4,08 $\pm$ 0,57	101,9	
			4,00 $\pm$ 0,37	100,0	
R <sub>3</sub>	8,0	6,0	5,90 $\pm$ 0,34	98,0	99,4 $\pm$ 1,27
			6,00 $\pm$ 0,91	99,9	
			5,86 $\pm$ 0,05	100,4	
Recuperação média (%) = 100,2 (98,0 - 101,9), DPR = 0,72					

Os resultados apresentados comprovam que o método proposto é exato, sendo que a faixa de recuperação obtida variou de 98,0 a 101,9% e o percentual médio de recuperação foi equivalente a 100,2%.

### 5.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

#### 5.3.2.1. Material e métodos

Para quantificação do adapaleno gel foram utilizados os mesmos equipamentos e parâmetros descritos na validação do método CLAE para a matéria-prima de acordo com o item 5.2.3.1.

### 5.3.2.1.1. Validação do método CLAE para a forma farmacêutica gel

#### 5.3.2.1.1.1. Especificidade

##### a) Método frente à ASA

A especificidade do método foi avaliada quanto ao perfil cromatográfico obtido pela SQR e pelas soluções contendo os adjuvantes da forma farmacêutica, avaliados individualmente e em conjunto, a partir da amostra simulada dos adjuvantes (ASA), o que permite avaliar a possível interferência dos adjuvantes na determinação do adapaleno.

A composição e a concentração dos adjuvantes da formulação utilizados na avaliação da especificidade pelo método de CLAE foram os mesmos utilizados na solução da ASA preparada de acordo com a técnica descrita no item 5.3.1.1.1.1 (Especificidade/Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)). Foram preparadas soluções da SQR e da amostra de gel nas concentrações finais de 12 µg/mL, utilizando-se fase móvel como solvente de acordo com a técnica descrita no item 5.1 (Preparo das soluções de trabalho).

##### b) Método frente à degradação forçada

A especificidade do método também foi estabelecida pela determinação da pureza dos picos cromatográficos utilizando detector de arranjo de fotodiodos (DAD), durante a avaliação dos testes de degradação forçada.

Soluções de adapaleno na forma farmacêutica gel foram submetidas a condições de estresse com o objetivo de forçar a formação de produtos de degradação. As soluções foram expostas às mesmas condições estabelecidas para a SQR: hidrólise ácida e alcalina, degradação térmica, fotólise e estresse oxidativo, sendo todas as soluções, submetidas à exposição por um período não inferior a 72 horas.

Três soluções foram preparadas para realização da análise, sendo uma mantida sob condições normais e as outras duas (amostra de gel e ASA) submetidas aos diferentes tipos de degradação. As soluções de amostras de



gel foram preparadas de forma a apresentarem, ao final do ensaio, concentrações equivalentes a 12,0 µg/mL.

As condições de estresse, bem como o preparo de cada uma das soluções estão descritos em 5.2.3.1.1.2 Especificidade (matéria-prima) /Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Todas as soluções finais obtidas foram neutralizadas (quando necessário), e centrifugadas antes de serem injetadas no cromatógrafo. Os resultados foram comparados com os da ASA e da amostra de gel não submetida às degradações a fim de se detectar possíveis interferentes na especificidade do método.

#### 5.3.2.1.1.2. Linearidade

A linearidade do método foi determinada de acordo com a validação por método de CLAE para matéria-prima descrita no item 5.2.3.1.1.3.

#### 5.3.2.1.1.3. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram determinados de acordo com a validação por método de CLAE para matéria-prima descritos no item 5.2.3.1.1.4.

#### 5.3.2.1.1.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada através de seis ensaios, realizados em três diferentes dias. As seis soluções de adapaleno gel foram preparadas em concentrações equivalentes a 12,0 µg/mL, em balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com a respectiva fase móvel. A solução de SQR foi preparada em concentração de 12 µg/mL de acordo com a técnica descrita no item 5.1 (Preparo das soluções de trabalho).

Foram realizadas três injeções para cada solução de análise. A concentração ( $C_a$ ) em µg/mL das soluções de gel, foram determinadas de acordo com a equação abaixo:

$$C_a = (A_a \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

$A_a$  = área absoluta do pico para a solução amostra de gel;

$C_{SQR}$  = concentração da solução SQR;

$A_{SQR}$  = área absoluta do pico para a solução SQR.

O teor (C%) de adapaleno foi calculado a partir da seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

$C_a$  = concentração da solução amostra de gel;

$C_t$  = concentração teórica da solução amostra de gel.

Todas as soluções finais obtidas foram centrifugadas antes de serem injetadas no cromatógrafo. A repetibilidade do método (precisão intradia) foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) entre as médias das áreas obtidas pelo cromatógrafo através das seis injeções. A precisão interdias (precisão intermediária) foi avaliada através do DPR obtido entre as médias das áreas obtidas, em três diferentes dias de análise.

#### 5.3.2.1.1.5. Exatidão (Teste de recuperação)

Preparou-se a solução de adapaleno SQR e amostra de gel a 100 µg/mL em etanol de acordo com a técnica descrita no item 5.1 (Preparo das soluções de trabalho). Alíquotas de cada uma das soluções foram transferidas com o auxílio de bureta para balão volumétrico de 25 mL, de acordo com os volumes e concentrações finais descritos na Tabela 26.

**Tabela 26:** Soluções para o teste de recuperação por CLAE.

	Volume da solução de adapaleno produto acabado (mL)*	Volume da solução de adapaleno SQR (mL)*	Concentração final em balão vol. 25mL (µg/mL)
SQR	–	2,0	8,0
A	2,0	–	8,0
R <sub>1</sub>	2,0	0,5	10,0
R <sub>2</sub>	2,0	1,0	12,0
R <sub>3</sub>	2,0	1,5	14,0

\* Solução a 100 µg/mL

Soluções de adapaleno SQR e da amostra de gel (A) na concentração final de 8,0 µg/mL foram preparadas, separadamente, em balões volumétricos de 25 mL. Todas as soluções finais de trabalho foram aferidas em seu volume final com a respectiva fase móvel tendo sido centrifugadas antes de serem injetadas no cromatógrafo. O teor recuperado de adapaleno SQR foi calculado a partir da equação que segue.

$$R\% = [(CR^* - CA) / CSQR] \cdot 100$$

Onde:

CR\* = Concentração de adapaleno encontrada na amostra de gel adicionada de SQR (µg/mL); Sendo R\* = R1, R2 ou R3;

CA = concentração da solução amostra de adapaleno gel (µg/mL);

CSQR = concentração da solução de adapaleno SQR (µg/mL).

#### 5.3.2.1.1.6. Robustez

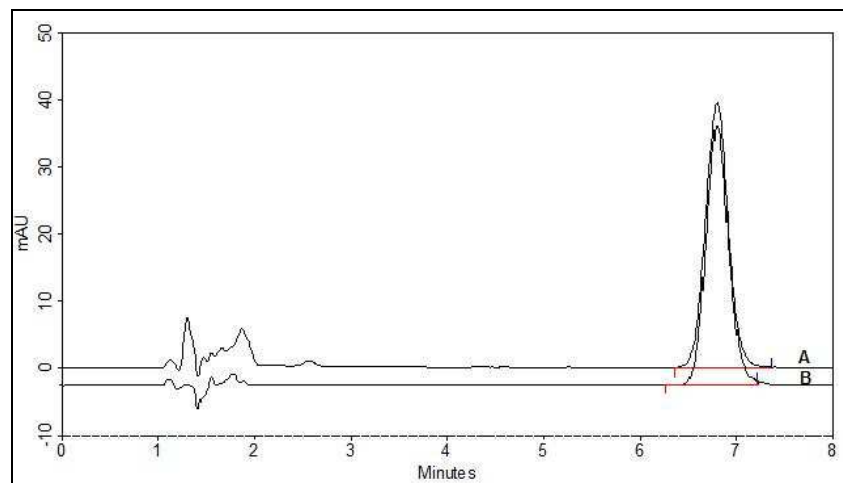
A robustez do método analítico foi avaliada através de variações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: utilização de coluna de tamanho diferente (de 12,5 cm para 12,0 cm), mudança na proporção de fase móvel (de 67% de ACN para 66 e 68%), fluxo diferenciado (de 1,4 mL.min<sup>-1</sup> para 1,3 e 1,5 mL.min<sup>-1</sup>) e equipamento. Para este teste foram preparadas soluções de adapaleno FF gel, na concentração de 12 µg/mL, de acordo com a técnica descrita no item 5.1 (Preparo das soluções de trabalho).

Cada parâmetro foi modificado individualmente para avaliar seu efeito. Em cada condição, amostras foram injetadas em triplicata (n = 3) e analisadas frente a uma solução padrão de trabalho em condições normais.

#### 5.3.2.2. Resultados e discussão

A escolha dos parâmetros utilizados para a determinação do adapaleno na forma gel foi a mesma utilizada na determinação da matéria-prima conforme descrito no item 5.2.3.2.

O tempo de retenção obtido para o adapaleno na FF gel foi de aproximadamente 6,9 minutos. Os cromatogramas obtidos das soluções de adapaleno SQR e do gel em concentração de 12 µg/mL, de acordo com as condições estabelecidas estão apresentados abaixo (Figura 39).



**Figura 39:** Cromatograma obtido com a solução de amostra de adapaleno FF gel (A), e SQR (B) na concentração de 12 µg/mL.

\* Condições cromatográficas: coluna C8 fase reversa LiChrocart®/Li Chrospher®, Merck® (125 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: acetonitrila / água pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico (67:33) (v:v); temperatura de análise 20-25 °C, vazão: 1,4 mL/ min; volume injetado: 20 µL, detecção (UV/λ= 321 nm).

\* Os cromatogramas estão deslocados apenas para melhor visualização de seu perfil.

No Quadro 8 encontram-se os valores médios dos parâmetros cromatográficos obtidos para a solução padrão e amostra de FF gel (12 µg/mL) a partir das condições cromatográficas selecionadas

**Quadro 8:** Parâmetros cromatográficos observados para a solução de amostra de adapaleno FF gel (A) e SQR (B) na concentração de 12 µg/mL.

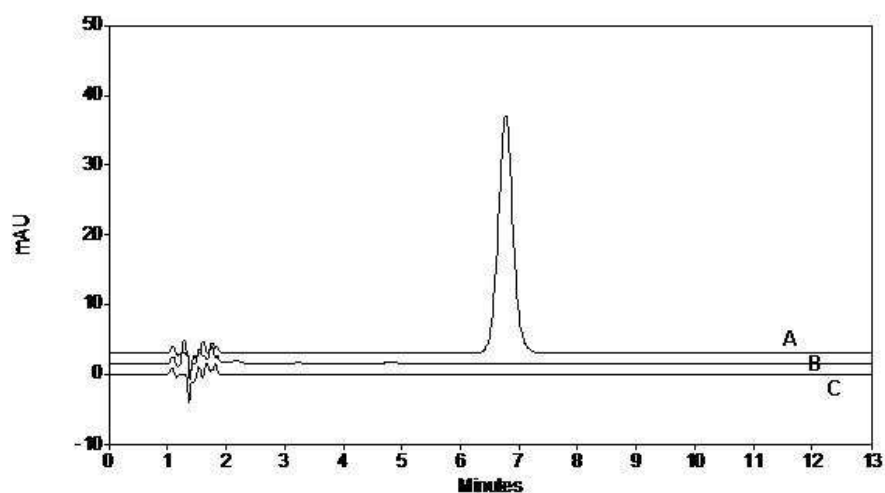
Parâmetros cromatográficos	Valores médios observados	
	SQR	FF gel
Tempo de retenção (minutos)	6,92	6,89
Fator de capacidade (K')	3,61	3,59
Assimetria ou Fator de cauda (TF)	1,19	1,21
Número de pratos teóricos (N)	7154	6996

## 5.3.2.2.1. Validação do método CLAE para a forma farmacêutica gel

## 5.3.2.2.1.1. Especificidade

## a) Método frente à ASA

A especificidade do método foi determinada através da avaliação dos perfis cromatográfico obtidos com as soluções de adapaleno SQR, ASA, e etanol (solvente primário das diluições), a fim de avaliar a possível interferência destes na determinação do analito. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 40.



**Figura 40:** Sobreposição dos cromatogramas obtidos através de análise por CLAE das soluções de adapaleno (A), amostra simulada de adjuvantes (ASA) e etanol (C).

\*Condições cromatográficas: coluna C8 fase reversa LiChrocart<sup>®</sup>/Li Chrospher<sup>®</sup>, Merck<sup>®</sup> (125 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); fase móvel: acetonitrila / água pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico (67:33) (v:v); temperatura de análise 20-25  $^{\circ}$ C, vazão: 1,4 mL/min; volume injetado: 20  $\mu$ L, detecção (UV/ $\lambda$ = 321 nm).

\*Os cromatogramas foram deslocados para facilitar a visualização.

De acordo com os perfis cromatográficos obtidos, foi possível evidenciar que a solução preparada com a ASA não interfere na determinação do adapaleno, visto que não apresenta picos no tempo de retenção do analito em estudo.

## b) Método frente à degradação forçada

As soluções de adapaleno preparadas a partir da amostra da forma farmacêutica gel foram submetidas a condições extremas, com intuito de provocar a formação de potenciais produtos de degradação e avaliar a sua

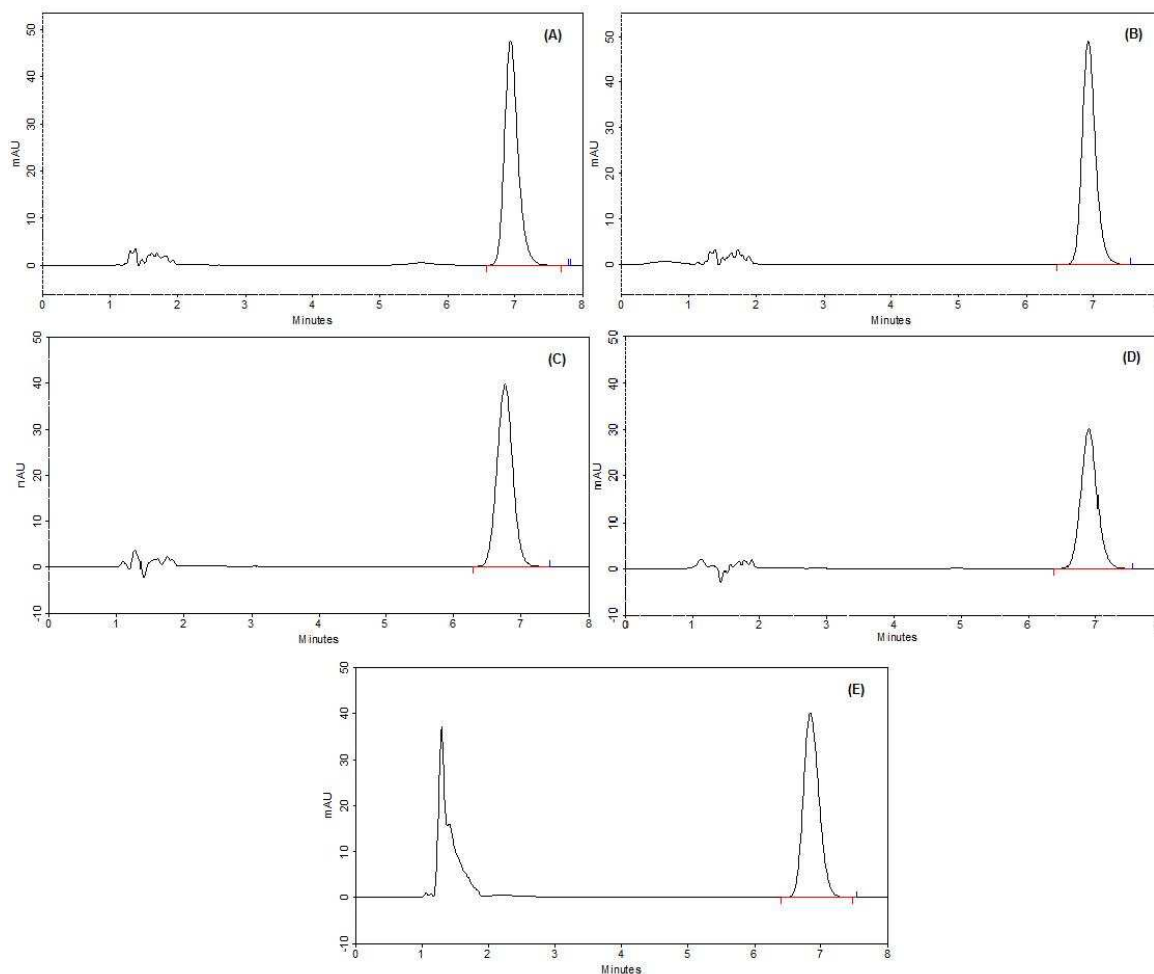
possível interferência na determinação do adapaleno em seu produto acabado. As soluções foram submetidas à hidrólise ácida e alcalina, degradação térmica, fotólise e estresse oxidativo.

A avaliação do método quanto à sua especificidade para o adapaleno FF foi realizada também frente aos adjuvantes da formulação através da amostra simulada de adjuvantes (ASA). O acompanhamento da degradação forçada da SQR foi realizado pela análise do teor, através da metodologia desenvolvida neste trabalho. Com o auxílio de detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foi verificada a pureza do pico cromatográfico.

A solução de FF gel submetida ao tratamento com HCl 1M (Figura 41-A), apresentou decréscimo de aproximadamente 0,8% no seu teor, entretanto não se observou formação de picos adicionais, bem como não houve diminuição da pureza do pico. Nas soluções submetidas à degradação básica (NaOH 1M) e térmica (80 °C) (Figuras 41-B e 41-C) não houve aparecimento de potenciais produtos de degradação uma vez que não houve presença de picos adicionais, bem como não houve alteração significativa nos teores de adapaleno observados, nem na pureza do pico cromatográfico.

O teste de fotólise (352 nm) (Figura 41-D), apresentou redução no teor (22,2% do teor inicial), entretanto igualmente não houve aparecimento de picos secundários, nem redução na pureza do pico cromatográfico. Na solução de adapaleno SQR submetida ao tratamento com peróxido de hidrogênio (Figura 41-E), a análise do teor revelou decréscimo de aproximadamente 1,23% no seu teor, entretanto não houve diminuição da pureza do pico cromatográfico nas condições apresentadas

Não foram verificadas também alterações significativas nos tempos de retenção ou interferência dos solventes, ASA ou impurezas nos cromatogramas. A Tabela 27 mostra os percentuais médios de degradação e a pureza dos picos cromatográficos adapaleno FF após ter sido submetidos aos testes de estresse.



**Figura 41:** Especificidade (CLAE) para o adapaleno FF: cromatogramas dos estudos de degradação forçada.

(A) hidrólise ácida (HCl 1M) (B) hidrólise básica (NaOH 1M), (C) degradação térmica (80 °C), (D) fotólise (UV  $\lambda=352$  nm) e (E) teste de oxidação ( $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, V/V).

\* Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (67:33, V/V), fluxo de 1,4 mL/minuto, coluna LiChrocart<sup>®</sup>/LiChrospher<sup>®</sup> C<sub>8</sub> Merck (125x4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 321nm, volume de injeção 20 $\mu\text{l}$ .

Não houve diminuição da pureza dos picos apresentados, o que pode indicar que a degradação do adapaleno, de acordo com os resultados apresentados nos teste de degradação forçada com a SQR, apresenta-se como um composto de baixa massa molecular e não interfere na análise quantitativa do fármaco.

Todos os índices de pureza, obtidos pelo DAD, foram de 1,0000 indicando a homogeneidade do pico. Dessa forma, o método desenvolvido pode ser utilizado para a determinação do adapaleno FF na presença de seus produtos de degradação, sendo considerado seletivo para o fármaco nas condições experimentais apresentadas.

**Tabela 27:** Percentual médio de degradação e pureza dos picos cromatográficos do adapaleno FF.

Condições de estresse	ADAPALENO FF
	Teor degradado (%)
HCl 1,0 M	0,78
NaOH 1,0 M	0
Temperatura (80 °C)	0
UV 352 nm	22,2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% V/V	1,23

#### 5.3.2.2.1.2. Linearidade

A linearidade do método pertinente à validação do método de CLAE para quantificação do adapaleno, foi comprovada e está descrita no item 5.2.3.2.3. A curva padrão utilizada para quantificação do adapaleno na sua forma farmacêutica, foi a mesma utilizada na validação do método de CLAE para quantificação do adapaleno matéria-prima.

#### 5.3.2.2.1.3. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram determinados de acordo com a curva padrão apresentada na validação por método de CLAE para matéria-prima, sendo, portanto, os mesmos descritos no item 5.2.3.2.4.

#### 5.3.2.2.1.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos DPR's intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 28.



**Tabela 28:** Resultados obtidos em três diferentes dias na quantificação das amostras de adapaleno forma farmacêutica (FF) gel por CLAE para avaliação da precisão intra e interdias.

Amostras	Teor (%) das soluções de gel		
	1º dia	2º dia	3º dia
1	99,9	98,2	101,4
2	101,0	99,6	101,5
3	100,1	99,9	101,5
4	103,4	99,2	101,6
5	100,4	99,2	102,1
6	100,0	100,0	102,4
<b>Teor Médio intradia (%)</b>	100,8	99,4	101,7
<b>e.p.m (±)</b>	0,55	0,26	0,16
<b>DPR intradia %</b>	1,34	0,65	0,38
<b>Média Interdias</b>		100,6	
<b>DPR interdias %</b>		1,19	

e.p.m. – erro padrão da média; DPR – desvio padrão relativo

Os valores de DPR apresentados pelo ensaio de repetibilidade e precisão intermediária indicam que o método proposto é preciso quando executado em um curto período de tempo, efetuados sob as mesmas condições e em um mesmo laboratório, obtido em dias diferentes.

#### 5.3.2.2.1.5. Exatidão (Teste de recuperação)

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação do adapaleno SQR em presença de quantidades conhecidas da solução de FF gel. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 29.

Os resultados apresentados comprovam que o método proposto é exato, sendo que a faixa de recuperação obtida variou de 98,5 a 101,8% e o percentual médio de recuperação foi equivalente a 100,8%.

**Tabela 29:** Resultados obtidos para o teste de recuperação do adapaleno SQR por CLAE, detecção UV ( $\lambda = 321,0$  nm).

	Concentração da amostra de FF ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração SQR adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração média de SQR recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DPR (%) (n=3)	Recuperação (%)	Média (%) $\pm$ DPR (%)
R <sub>1</sub>	8,0	2,0	2,02 $\pm$ 0,07	100,8	99,6 $\pm$ 1,15
			1,97 $\pm$ 0,29	98,5	
			1,99 $\pm$ 0,03	99,6	
R <sub>2</sub>	8,0	4,0	4,07 $\pm$ 0,07	101,8	101,2 $\pm$ 0,60
			4,02 $\pm$ 1,82	100,6	
			4,05 $\pm$ 0,06	101,3	
R <sub>3</sub>	8,0	6,0	6,11 $\pm$ 0,21	101,8	101,7 $\pm$ 0,11
			6,10 $\pm$ 0,21	101,6	
			6,10 $\pm$ 0,25	101,6	
Recuperação média (%) = 100,8 (98,5 - 101,8), DPR = 1,06					

## 5.3.2.2.1.6. Robustez

A robustez do método foi testada através de pequenas modificações nas condições cromatográficas propostas. O Quadro 9 apresenta o valor da determinação do teor apresentado pela amostra de FF gel durante a realização do teste de robustez.

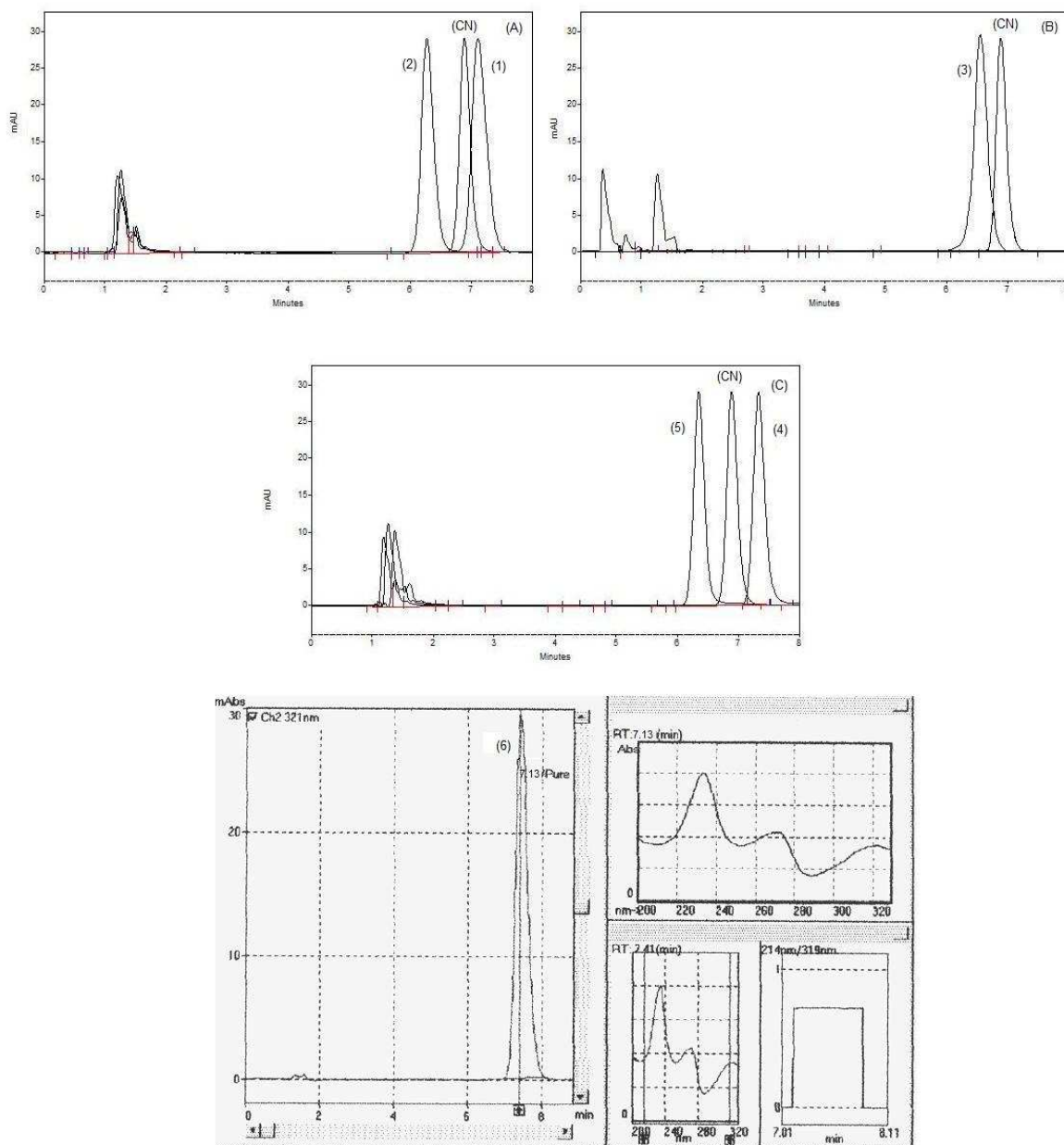
**Quadro 9:** Teores de adapaleno na FF gel frente às modificações realizadas pelo teste de robustez.

Amostra FF gel		Proporção FM		Dimensões 120X4,6 mm	Fluxo		Equipamento	DPR (%)
		ACN:H <sub>2</sub> O (66:34) V/V	ACN: H <sub>2</sub> O (68:32) V/V		1,3	1,5		
**Condições normais	Teor * (%)	99,6	100,4	102,0	100,8	99,6	101,5	0,95

\*Teores relativos ao teor encontrado pelo doseamento da amostra de FF gel em condições normais, considerando-se este como 100%.

\*\* Condições normais: Coluna: C8 Merck<sup>®</sup> (125 x 4.6 mm); Fase móvel: ACN: H<sub>2</sub>O (67:33, V/V) pH 2,5 (ajustado com ác. fosfórico 20%); Fluxo da fase móvel: 1,4 mL.min<sup>-1</sup>; Equipamento 1 (SHIMADZU<sup>®</sup> LC-10ADVP).

Os cromatogramas obtidos a partir das modificações no sistema cromatográfico podem ser observados na Figura 42 (A, B, C, D).



**Figura 42:** Avaliação da robustez do método CLAE para FF gel.

(A) proporção de FM; (B) coluna; (C) fluxo; (D) equipamento 4.

\*\*\* (1): ACN:água (66:34, V/V); (2): ACN:água (68:32, V/V); (3): coluna Merck (120x4,6mm); (4): fluxo 1,3 mL.minuto<sup>-1</sup>; (5) fluxo 1,5 mL.minuto<sup>-1</sup>; (6) equipamento 4 (SHIMADZU<sup>®</sup> LC-10AD).

\*\* Condições cromatográficas normais (CN): fase móvel ACN:água (67:33, V/V), fluxo de 1,4 mL.minuto<sup>-1</sup>, coluna Merck (125x4,6 mm, 5 µm), equipamento 1 (SHIMADZU<sup>®</sup> LC-10ADVP), temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 321 nm, volume de injeção 20µl.

Os resultados obtidos na determinação do adapaleno SQR e amostra ADAP-1, através de pequenas alterações nas condições cromatográficas, podem ser observados na Tabela 30.

**Tabela 30:** Avaliação da robustez do método de CLAE para determinação do adapaleno na FF em solução a 12 µg/mL.

Condições Normais		T Retenção (min.) (TR)	Pratos teóricos (N)	Assimetria (TF)	Fator Capacidade (K')
FF gel		6,89	6996	1,21	3,59
Coluna: C8 Merck® (125 × 4.6 mm); Fase móvel: ACN: H <sub>2</sub> O (67:33, V/V) * pH 2,5 (ajustado com ác. Fosfórico 20%); Fluxo da fase móvel: 1,4 mL/min <sup>-1</sup> ; Equipamento 1 (SHIMADZU® LC-10ADVP)					
Modificações		T R (min.)	N	TF	K'
Proporção da Fase Móvel	ACN: H <sub>2</sub> O (66:34) V/V	7,12	3755	1,26	3,74
	ACN: H <sub>2</sub> O (68:32) V/V	6,27	4241	1,21	3,18
Dimensões da coluna	120X4,6 mm	6,55	4662	1,08	3,37
Fluxo	1,3	7,33	7148	1,24	3,89
	1,5	6,43	5212	1,12	3,95
Equipamento Número 4		7,13	2939	1,31	3,70

Os resultados obtidos, nas diversas variáveis realizadas para avaliar a robustez do método, demonstraram ser semelhantes aos verificados para matéria-prima ADAP-1 no item 5.2.3.2.7.

De acordo com os resultados apresentados é possível afirmar que o método proposto é robusto quando sujeito a pequenas variações.

### 5.3.3. Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do adapaleno FF gel

Na Tabela 31 estão apresentados os resultados obtidos na determinação do adapaleno FF gel através dos métodos desenvolvidos por UV-D<sup>1</sup> e CLAE.

**Tabela 31:** Resultados obtidos na determinação do adapaleno FF gel por UV-D<sup>1</sup> e CLAE.

	UV-D <sup>1</sup>	CLAE
	(n = 18)	(n = 18)
<b>Teor médio (%)</b>	101,4	100,6
<b>DPR</b>	0,59	1,19

Os métodos propostos foram analisados comparativamente, através do teste t de *Student*, presumindo variâncias equivalentes, ou seja presume-se a inexistência de diferenças significativas entre os métodos desenvolvidos por UV-D<sup>1</sup> e CLAE. Os valores utilizados para a comparação entre os métodos foram os valores obtidos nos respectivos testes de precisão, apresentados nos itens 5.3.1.2.1.4 (Tabela 24) e 5.3.2.2.1.4 (Tabela 28).

A avaliação estatística, através do teste t de *Student*, das determinações do adapaleno através dos métodos desenvolvidos por UV-D<sup>1</sup> e CLAE está demonstrada na Tabela 36 em ANEXO.

Os resultados da análise comparativa através do Teste t de *Student* demonstraram não haver diferença significativa entre os teores obtidos com os diferentes métodos desenvolvidos, já que o t calculado (*Stat t*) é menor que o t crítico ( $t \text{ calculado} = 1,6197 < t \text{ crítico} = 2,0322$ ). Deste modo, os métodos UV-D<sup>1</sup> e CLAE podem ser considerados equivalentes na determinação quantitativa do teor de adapaleno na FF gel e adequados para análise de rotina em controle de qualidade, sendo portanto intercambiáveis.



# *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---







ALDRIDGE, P.K.; EVANS, C.L.; WARD, H.W.; II, COLGAN, S.T.; BOYER, N.; GEMPERLINE, P.J. Near-IR Detection of Polymorphism and Process-Related Substances. *Anal.Chem.*, v.68, p.997-1002, 1996.

ALCHORNE, M. M. A.; PIMENTEL, D. R. N. *Acne. Rev. Bras. Med.*, Rio de Janeiro, v.60, n.12, p. 165-172, dez. 2003.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. OMA Program manual, apêndice X, Maio, Disponível em:

<[http://www.aoac.org/vmeth/Manual\\_App\\_X.pdf](http://www.aoac.org/vmeth/Manual_App_X.pdf)> Acesso em jan. 2002.

BAGATIN, E.; LEÃO, C. L.; HASSUN, K. M. *Acne. Rev. Bras. Med.*, Rio de Janeiro, v.65, n.especial, p. 06-10, ago. 2008.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. *Biológico, São Paulo*, v. 64, n. 2, p. 175-177, dez, 2002.

BERKOVITCH-YELLIN, Z. Toward an ab Initio Derivation of Crystal Morphology. *Journal of American Chemical Society*, v.107, p. 8239-8253, 1985.

BERSHAD, S.V. The modern age of acne therapy: A review of current treatment options. *The Mount Sinai Journal of Medicine*. v. 68. Nº 4 & 5, p. 279-286, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. *Diário Oficial da União, Brasília*, 02 fev 1999, Brasília.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.

BUDAVARI, S. The Merck Index. 13 ed. Rahway: Merck Research Laboratories, 2001.

CARDIFF UNIVERSITY. Welsh School of Pharmacy. Research retinoic acid. Disponível em: <[http://www.cardiff.ac.uk/phrmy/staffinfo/CS/research\\_cyp26/Fig\\_1\\_RA.jpeg](http://www.cardiff.ac.uk/phrmy/staffinfo/CS/research_cyp26/Fig_1_RA.jpeg)> acesso em dez. 2008.

CHANDRARATNA, R., A. S. Rational design of receptor-selective retinoids. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 39, n. 4, parte 2, p. S 124-S128, out, 1998.

CHARPENTIER, B.; BERNARDON, J. M.; EUSTACHE, J.; MILLOIS, C.; MARTIN, B.; MICHEL, S.; SHROOT, B. Synthesis, Structure-Affinity Relationships, and Biological Activities of Ligands Binding to Retinoic Acid Receptor Subtypes. J. Med. Chem., v. 38, n. 26, p. 4993-5006, nov. 1995.

CLAS, S.D.; DALTON, C.R.; HANCOCK, B.C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. Pharmaceutical Science & Technology Today, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. 4ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 79 p., 1990.

COSTA, A.; ALCHORNE, M. M. A.; GOLDSCHMIDT, M. C. B. Fatores etiopatogênicos da acne vulgar. An Bras Dermatol, Rio de Janeiro, v.83, n. 5, p. 451-459, abr 2008.

CUNLIFFE, W.J. A new topical retinoid: why a new topical acne therapy? *British Journal of Dermatology*. v. 139, (Suppl. 52), p. 1-2, 1998.

CZERNIELEWSKI, J.; MICHEL, S.; BOUCLIER, M.; BAKER, M.; HENSBY, C. Adapalene biochemistry and evolution of a new topical retinoid for treatment of acne. *Journal European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 15 (Suplem. 3), p. 5-12, 2001.

DINIZ, D. G. A., LIMA, E. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Isotretinoína: perfis farmacológico, farmacocinético e analítico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 4, p. 415-430, out./dez., 2002.

EP (European Patent Office). Adapalene polymorphic forms. *European Patent Application*, 2006.

F.BRAS IV. *Farmacopeia Brasileira*. 4ª. Ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FDA. Guidance for Industry. Acne Vulgaris: Developing Drugs for Treatment. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Setembro/2005. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.html>> Acesso em fev. 2009.

FDA. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Agosto/2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/2396dft.pdf>> Acesso em fev. 2009.

FISHER, G. J.; TALWAR, H. S.; XIAO, J. H.; DATTA, S. C.; REDDY, A. P.; GAUB, M. P.; EGLY, C. R.; CHAMBON, P.; VOORHEES. Immunological Identification and Functional Quantitation of Retinoic Acid and Retinoid X Receptor Proteins in Human Skin. *The Journal Biological Chemistry*. v. 269, n. 32, p.20629-20635, ago 1994.

FRANÇA, F. F. A. C.; KOROLKOVAS, A. Dicionário Terapêutico Guanabara. 15ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008/2009.

FURTADO, T.; SANTOS, S. N. M. B. Tratamento da acne pela isotretinoína – Contra-indicações e argumentos contrários. An bras Dermatol., Rio de Janeiro, v. 65, n.5, p. 221-223, 1990.

GALDERMA Laboratories. DIFFERIN® (adapalene gel) Gel, 0.1%. North Chicago. September, 2003. Disponível em: <[http://www.differin.com/AboutDifferin/ProductInsert\\_Gel.aspx](http://www.differin.com/AboutDifferin/ProductInsert_Gel.aspx)> Acesso em jan 2009.

GEJER, D.; ARRUDA, A. C. M. Acne Juvenil. Rev. Bras. Med., Rio de Janeiro, v.39, n.09, p. 309-314, set. 2003.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. Thermochemica acta. v.248, p. 1-59, 1995.

GOLLNICK, H.; SCHRAMM, M. Topical drug treatment in acne. Dermatology, v. 196, n.1, p. 119-125, 1998.

HASSUN, K. M. Acne: etiopatogenia. An bras Dermatol, Rio de Janeiro, v.75, n.1, 7-15, jan/fev 2000.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonization, 2005.

IKEDA, Y.; HIRAYAMA, T.; TERADA, K. Application of thermally stimulated current measurement to the polymorphic characterization of drug substances. Thermochemica Acta, v. 431, p. 195-199, 2005.

IRBY, A. E.; YENTZER, B. A.; FELDMAN, S. R. A review of Adapalene in the Treatment of Acne Vulgaris, *Journal of Adolescent Health*, v. 43 p. 421-424, jun. 2008.

KANG, S.; VOORHEES, J.J. Photoaging therapy with topical tretinoin: an evidence-based analysis, *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 39, n. 2, parte 3, p. S55-S61, ago. 1998.

KARASEN, N.; ALTINÖZ, S. Determination of mirtazapine in tablets by UV spectrophotometric and derivative spectrophotometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 11-17, 2000.

KAWASHIMA, M.; HARADA, S.; LOESCHE, C.; MIYACHI, Y. Adapalene gel 0.1% is effective and safe for Japanese patients with acne vulgaris: A randomized, multicenter, investigator-blinded, controlled study. *Journal of Dermatological Science*, v. 49, p. 241-248, 2008

KAZEMIPOUR, M.; NOROOZIAN, E.; TEHRANI, M. S.; MAHMOUDIAN, M. A new second-derivative spectrophotometric method for the determination of permethrin in shampoo. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 30, p. 1379-1384, 2002.

KIBBE, A.H.; WADE, A.; WELLER, P.J. (eds) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3<sup>rd</sup> ed, Washington London: American Pharmaceutical Association: Pharmaceutical Press, 2000, 665p.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. Volume 6. São Carlos: RiMa Editora, 2004. 62 p.

LAYTON, A. M. A review on treatment of acne vulgaris. *International Journal of Clinical Practice*, v. 60, n.1, p. 64-72, 2006.

LEHMANN, H. P.; ROBINSON, K. A.; ANDREWS, J. S. Acne Therapy: A methodological review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 47, p. 231-240, 2002.

LEYDEN, J. J. A review of the use of combination therapies for the treatment of acne vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.; 49, n. 3, p. S200-S210, set 2003.

MACHADO, M. C. M. R. Acne. *Rev. Bras. Med.*, Rio de Janeiro, v.62, n.12, p. 171-180, dez. 2005.

MARTIN, B.; MEUNIER, C.; MONTELS, D.; WATTS, O. Chemical stability of adapalene and tretinoin when combined with benzoyl peroxide in presence and absence of visible light and ultraviolet radiation, *British Journal of Dermatology*, v. 139, (suppl. 52), p. 8-11, 1998.

MEHTA, A. C. Quality management in drug analysis. *Analyst*, v. 122, p. 83R – 88R, 1997.

MICHEL, S.; JOMARD, A.; DÉMARCHEZ, M. Pharmacology of adapalene. *British Journal of Dermatology*, v. 139, (Suppl. 52), p. 3-7, 1998.

NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. *Infrared absorption spectroscopy*. 2nd ed. San Francisco: Holden-Day, 287 p.,1977.

OJEDA, C. B.; ROJAS, S.; PAVON, J. M. C. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Talanta* , v. 42, p. 1195-1214, 1995.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 518, p 1-24, 2004.

PARFITT, K. (Ed.) Martindale: The Complete drug reference. 32 th London: ed. Pharmaceutical Press, 1999, 2315 p.

PASCHOAL, L. R.; FERREIRA, W. A.; PRADO, M. R. D.; VILELA, A. P. O. Aplicação da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 39, n.1, p. 105-113, 2003.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry. 3rd ed. Melbourne: Brooks/Cole, 2001.

PAWIN, H.; BEYLOT, C.; CHIVOT, M.; FAURE, M.; POLI, F.; REVUZ, J.; DRÉNO, B. Physiopathology of acne vulgaris: recent data, new understanding of treatments. Eur. J. Dermatol., v. 14, n. 1, p. 4-12, jan./fev. 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, H. C.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, F. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 807-814, 2004.

ROZET, E. A.; CECCATO, A. B.; HUBERT C. A.; ZIEMONS E. A.; OPREAN, R. C.; RUDAZ, S. D.; BOULANGER, B. B.; HUBERT, P. A. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation, Journal of Chromatography A, v.1158 , p. 111–125, 2007.

RÜHL, R.; NAU, H. Determination of Adapalene (CD271/Differin) and Retinol in Plasma and Tissue by On-Line Solid-Phase Extraction and HPLC Analysis. Chromatographia, v.45, p.269-274, 1997.

RÜHL, R.; THIEL, R.; LACKER, T.S.; STROHSCHHEIN, S.; ALBERT, K.; NAU, H. Synthesis, high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance characterization and pharmacokinetics in mice of CD271 glucuronide. *Journal of Chromatography B*. v. 757, p. 101-109, 2001.

RUSSELL, J. J.; Topical Therapy for Acne. *American Academy of Family Physician*, v. 61, 357-365, 2000.

SAMPAIO, S. A. P.; PIMENTEL, E. R. A. Isotretinoína no tratamento da acne vulgar, *An bras Dermatol*, v. 60, n.5, 349-352, 1985.

SHROOT, B. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of topical adapalene. *Journal of the American Academy of Dermatology*, V. 39, S 17 –S 24, 1998.

SHROOT, B.; MICHEL, S.; ANTIPOLIS, S. Pharmacology and chemistry of adapalene. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 36, n.6, part 2, S 96 –S 103, 1997.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. ALENCASTRO, R. B.; WIRCKER, L. F. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1994, 387.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 836 p., 2002.

STEINER, D. Acne na mulher. *Rev. Bras. Med.*, Rio de Janeiro, v.59, n.03, p. 135-139, mar. 2002a.

STEINER, D. Acne. *Rev. Bras. Med.*, Rio de Janeiro, v.64, n.12, p. 82-85, dez. 2007.



STEINER, D. Hiperandrogenismo e a repercussão na pele. *An Bras Dermatol.*, Rio de Janeiro, v.77, n.2, p. 129-142, mar/abr 2002b.

STEINER, D.; BEDIN, V.; MELO, J. S. J. Acne Vulgar. *Rev. Bras. Med.*, Rio de Janeiro, v.60, n.07, p. 489-96, jul. 2003.

STRAUSS, J. S.; KROWCHUK, D. P.; LEYDEN, J. J.; LUCKY, A. W.; SHALITA, A. R.; SIEGFRIED, E. C.; THIBOUTOT, D. M.; VOORHEES, A. S.; BEUTER, K. A.; SIECK, C. K.; BHUSHAN, R. Guidelines of care for acne vulgaris management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 56, p. 651-653, abr 2007.

TALARICO FILHO, S.; HASSUN, K. M. Acne. *Rev. Bras. Med.*, Rio de Janeiro, v.64, n.12, p. 82-85, dez. 2007.

THIBOUTOT, D. New treatments and therapeutics strategies for acne. *Arch Fam Med.*, v.9, p.179-187, 2000.

THIBOUTOT, D. Overview of acne and its treatment *Cutis*. V. 81, n. 1, p. 3-7, jan. 2008.

THIELITZ, A.; KRAUTHEIM, A.; GOLLNICK, H. Update in retinoid therapy of acne. *Dermatologic Therapy*, v. 19, p. 272-279, 2006.

THOMPSON, K. C. Pharmaceutical applications of calorimetric measurements in the new millennium. *Thermochimica Acta*, v. 355, p. 83-87, 2000.

TOCHSTONE, J. C.; DOBBINS, M. F. *Practice of Thin Layer Chromatography*. 2ª ed. Nova York: John Wiley & Sons, 405 p., 1983.

TOYODA, M.; MOROHASHI, M. An Overview of Topical Antibiotics for acne treatment. *Dermatology*, v. 196, n.1, p. 130-134, 1998.

TRICHARD, L.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H.; FATTAL, E.; BOCHOT, A. Novel Beads Made of Alpha-cyclodextrin and Oil for Topical Delivery of a Lipophilic Drug, v. 25, n. 2, p. 435-440, fev. 2008.

UDA, C. F.; WANCZINKI, B. J. Principais Ativos Empregados na Farmácia Magistral para Tratamento Tópico da Acne. *Infarma*, v. 20, n. 9/10, 2008.

USP 31. The United States Pharmacopoeia. 31<sup>th</sup> ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2008.

USP-DI. Drug Information for the Health Care Professional. 25<sup>th</sup> ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, v. I. p. 30-31, 2005.

VERSCHOORE, M.; PONCET, M.; CZERNIELEWSKI, J.;SORBA, V.; CLUCAS, A. Adapalene 0.1% gel has low skin-irritation potential, *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 36, n. 6, parte 2, p. S 105-S109, jun, 1997.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H. G. GRANDT, D. J. W. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 3-26, 2001.

VOGEL, A. I. VOGUEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY. 5a Ed. Nova York: Ed. Longman Scientific & Technical, 1514 p., 1989.

WANNMACHER, L. Uso Racional de Medicamentos: Antimicrobianos em dermatologia. Boletim Uso Racional de Medicamentos: Temas selecionados. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, v. 3, n. 12, p. 1-6, Brasília, novembro de 2006. Disponível em:

<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/v3n12\\_antimicrobianos\\_em\\_dermatologia.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/v3n12_antimicrobianos_em_dermatologia.pdf)> Acesso em dez 2008.

WEISS, J. S.; SHAVIN, J. S. Adapalene for the treatment of acne vulgaris, Journal of the American Academy of Dermatology, v. 39, n. 2, parte 3, p. S50-S54, ago. 1998.

WHO. World Health Organization. Reference Substances and Infrared reference Spectra for Pharmacopoeial Analysis (WHO Technical Report Series), n. 885, (Annex 3), 1999. Disponível em:

<<http://www.who.int/medicinedocs/en/d/Jwhozip21e/>> Acesso em fev. 2009.

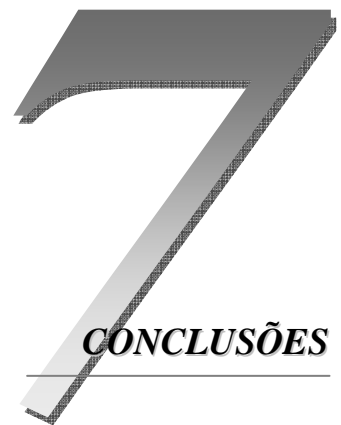
WIKIPÉDIA, A ENCICLOPÉDIA LIVRE. Glândula sebácea. Brasil. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Gl%C3%A2ndula\\_seb%C3%A1cea](http://pt.wikipedia.org/wiki/Gl%C3%A2ndula_seb%C3%A1cea)> acesso em jan. 2009.

WOLF, J. E. An update of recent clinical trials examining adapalene and acne. Journal European Academy of Dermatology and Venereology, v. 15, (Suplem. 3), p. 23-29, 2001.

ZAENGLEIN, A. L. Topical Retinoids in the Treatment of Acne Vulgaris. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery, v. 27, p. 177-182, 2008.

ZOUBOULIS, C. C.; PHILPOTT, E. A. M.; GOLDSMITH, L. A.; ORFANOS, C.; CUNLIFFE, W. C.; ROSENFELD, R. What is the pathogenesis of acne? Experimental Dermatology, V. 14, p. 143-152, 2005



A large, stylized, grey number '7' with a 3D effect, positioned in the lower right quadrant of the page. The number is composed of a horizontal top bar and a diagonal stem that tapers towards the bottom left.

# *CONCLUSÕES*



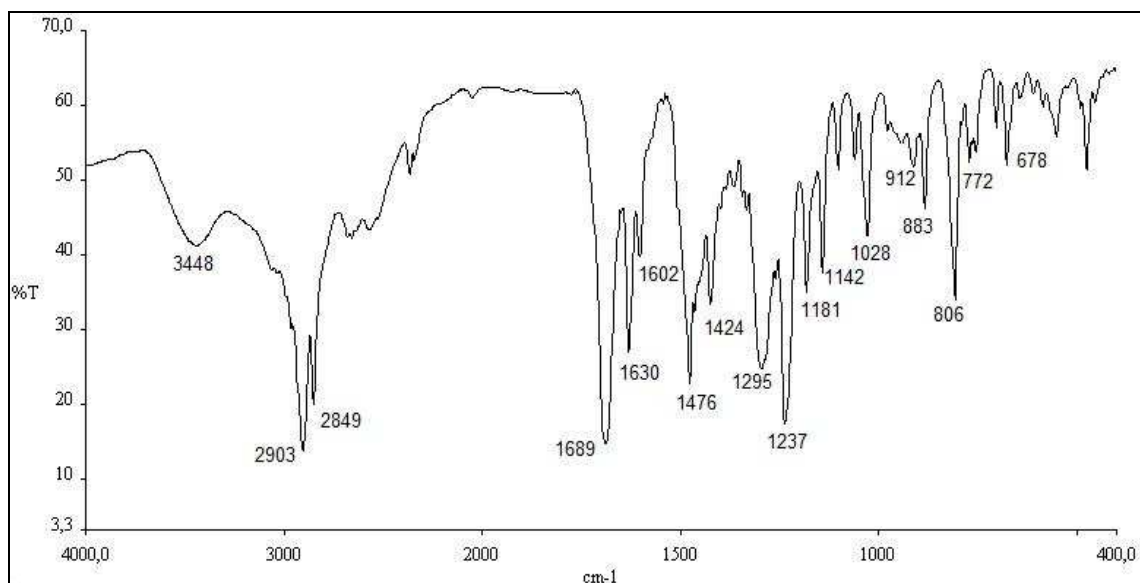
- ✓ A avaliação dos caracteres físicos, solubilidade, determinação do ponto de fusão, termoanálise, análises espectrofotométricas (IV e UV), e a análise cromatográfica por CLAE permitiram a caracterização da substância química utilizada como referência no presente estudo.
- ✓ O sistema de eluição ([hexano: acetato de etila] (7: 3)) utilizado na CCD, foi adequado para identificação do adapaleno SQR e amostras da matéria-prima ADAP-1 e forma farmacêutica gel.
- ✓ A identificação da matéria-prima ADAP-1 foi realizada através da determinação do ponto de fusão, termoanálise, análises espectrofotométricas (IV e UV) e da análise cromatográfica por CLAE.
- ✓ Nos termogramas apresentados, tanto para SQR quanto para ADAP-1 observou-se somente um evento endotérmico referente à fusão do fármaco.
- ✓ Os difratogramas de raios-x da SQR e da matéria-prima ADAP-1 confirmaram a identidade da amostra de adapaleno, que apresenta padrão de difração idêntico ao fornecidos pela patente do produto, revelando a presença da estrutura cristalina  $\alpha$ .
- ✓ As fotomicrografias por MEV tornaram possível a observação do arranjo cristalino para o adapaleno. A SQR apresenta tendência ao arranjo cristalino no formato de placas irregulares de maior tamanho. A amostra ADAP-1 apresentou cristais de menor tamanho e maior superfície de contato, o que resultou em um melhor perfil de solubilidade da matéria-prima em relação à SQR.
- ✓ O método proposto para determinação do adapaleno matéria-prima por VMA, com titulação de retorno, demonstrou ser uma técnica alternativa e precisa, para aplicação em laboratórios de controle de qualidade.
- ✓ O método desenvolvido para determinação da matéria-prima, através da espectrofotometria na região do ultravioleta em 270 nm, utilizando etanol como diluente, mostrou-se linear, sensível, preciso e exato para análise quantitativa do adapaleno na matéria-prima.

- ✓ O método desenvolvido por espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D<sup>1</sup>) em 305 nm para determinação do adapaleno na forma farmacêutica gel foi validado dentro das condições estabelecidas, demonstrando ser linear, específico, preciso e exato para a análise quantitativa do adapaleno na forma farmacêutica gel.
- ✓ O método desenvolvido por CLAE para a determinação quantitativa do adapaleno matéria-prima e na forma farmacêutica gel foi validado, demonstrando ser linear, específico, preciso, exato e robusto.
- ✓ A análise comparativa entre os métodos propostos CLAE / UV / VMA não demonstrou haver diferença estatística significativa entre eles, indicando a equivalência entre os mesmos para a determinação quantitativa da matéria-prima do adapaleno, nas condições estabelecidas.
- ✓ A análise comparativa entre os métodos propostos CLAE / UV-D<sup>1</sup> não demonstrou haver diferença estatística significativa entre eles, indicando a equivalência entre os mesmos para a determinação quantitativa do adapaleno na forma farmacêutica gel, nas condições estabelecidas.

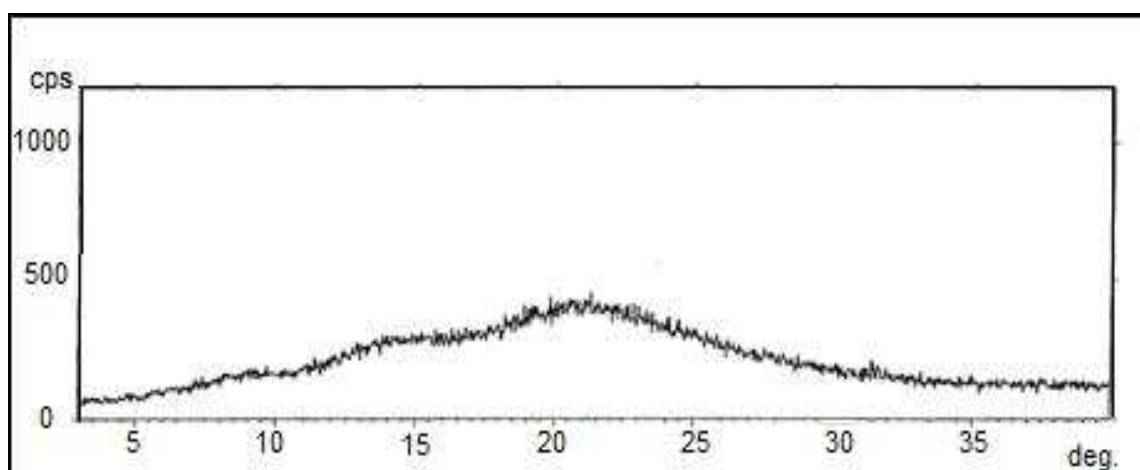








**Figura 43:** Espectro de absorção na região do IV para o adapaleno ADAP-1 em KBr (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 44:** Difratograma da forma amorfa, fornecido pela patente europeia (EP, 2006).

**Tabela 32:** ANOVA das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão do adapaleno por UV.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	0,6385	0,15962	1052,881*	3,48
regressão linear	1	0,6386	0,63831	4210,505*	4,96
desvio da linearidade	3	0,0002	0,00005	0,3404	3,71
DENTRO (resíduo)	10	0,0015	0,00015		
Total	14				

\* Significativo para  $p < 0,05$ .

**Tabela 33:** ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do adapaleno por CLAE.

Fontes de variação	Gl	Soma dos Quadrados	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	255689260114	63922315029	3089,419*	3,48
regressão linear	1	255626968460	256000000000	12354,666*	4,96
desvio da linearidade	3	62291654	20763885	1,004	3,71
DENTRO (resíduo)	10	206907225	20690723		
Total	14				

\* Significativo para  $p < 0,05$ .

**Tabela 34:** Teste de ANOVA para os valores obtidos na determinação do adapaleno por VMA, UV e CLAE.**ANOVA: fator único****RESUMO**

Grupos	Nº de Repetições	Soma	Média	Variância
VMA	6	597,20	99,5	0,07072
UV	18	1797,40	99,9	0,42497
CLAE	18	1801,10	100,1	0,52134

**ANOVA**

Fonte de variação	Gl	SQ	MQ	F (calculado)	valor P	F (crítico)
Entre grupos	2	1,31196	0,65598	1,55609*	0,22377*	3,23810
Dentro de grupos	39	16,44080	0,42156			
Total	41	17,75276				

\* Significativo para  $p < 0,05$ .

**Tabela 35:** ANOVA para a obtenção da curva padrão do adapaleno por espectrofotometria UV-D<sup>1</sup>.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	0,0711	0,0178	1401,888*	3,48
regressão linear	1	0,0711	0,0711	5607,388*	4,96
desvio da linearidade	3	$2,07 \times 10^{-6}$	$6,91 \times 10^{-7}$	0,054	3,71
DENTRO (resíduo)	10	0,0001	$1,27 \times 10^{-5}$		
Total	14				

\* Significativo para  $p < 0,05$ .

**Tabela 36:** Teste t de Student , presumindo variâncias equivalentes, para os valores obtidos na determinação do adapaleno FF gel por UV-D<sup>1</sup> e CLAE.

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	101,4	100,6
Variância	1,7944	1,7294
Observações	18	18
Variância agrupada	1,7619	
Hipótese de diferença de média	0	
GI	34	
Stat t	1,6197	
P(T<=t) bi-caudal	0,1145	
t crítico bi-caudal	2,0322	