

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL**

ISADORA SELISTRE MACHADO

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE TAMANHO DE
SÓLIDOS PARTICULADOS DA MATÉRIA-PRIMA CLORIDRATO DE
VENLAFAXINA POR DIFRAÇÃO A *LASER***

MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO

TOLEDO
2019

ISADORA SELISTRE MACHADO

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE TAMANHO DE
SÓLIDOS PARTICULADOS DA MATÉRIA-PRIMA CLORIDRATO DE
VENLAFAXINA POR DIFRAÇÃO A *LASER***

Monografia de Especialização apresentada à
Diretoria de Pesquisa e Pós-graduação, da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
como requisito parcial para obtenção do título
de “Especialista em Análise Instrumental”.
Orientador: Prof. Dr. Rafael A. Bini.
Co-orientador: Dr^a.Cláudia F. B. Coutinho.

TOLEDO
2019



TERMO DE APROVAÇÃO

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE TAMANHO DE SÓLIDOS PARTICULADOS DA MATÉRIA-PRIMA CLORIDRATO DE VENLAFAXINA POR DIFRAÇÃO A *LASER*

Por

Isadora Selistre Machado

Monografia apresentada às 10:00, do dia 27 de maio de 2019, como requisito parcial para obtenção do título de “Especialista em Análise Instrumental”, da Diretoria de Pesquisa e Pós-graduação, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após a deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Rafael Bini, Dr. (UTFPR)
(Presidente/Orientador)

Cláudia Flávia Breda Coutinho, Dr^a.
(Co-orientador)

Ricardo Schneider, Dr. (UTFPR)

Antonio Cesar Godoy, Msc. (UTFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prati Donaduzzi e Cia Ltda pelo suporte financeiro e laboratorial. Agradeço também o compartilhamento de resultados analíticos e a realização das análises.

Agradeço a Jéssika Janning e Geisla Tomaz por compartilhar seus conhecimentos e pelo auxílio nas análises de distribuição granulométrica. Agradeço, também, a Aline Flora pelo auxílio nas análises.

Agradeço a Cristiane Joana Bresolin Cavalcante pelo incentivo e apoio.

Agradeço a Claudia Coutinho pela inspiração e contribuição com o trabalho.

Agradeço ao Prof. Rafael Bini pela dedicação, orientação e considerações ao trabalho.

RESUMO

MACHADO, Isadora Selistre. Validação do método de análise de tamanho de sólidos particulados da matéria-prima Cloridrato de venlafaxina por difração a *laser*. 2019. 36f. Monografia (Especialização em Análise Instrumental). Toledo, 2019.

O tamanho de uma partícula é uma propriedade física dos fármacos que exerce grande influência em diversas etapas do desenvolvimento de novos medicamentos, podendo afetar a biodisponibilidade dos fármacos e os processos produtivos. Neste trabalho, o método de tamanho dos particulados sólidos da matéria-prima Cloridrato de venlafaxina foi validado por difração a *laser* por dois diferentes modelos ópticos, conforme a Teoria de Mie e a Aproximação de Fraunhofer. O índice de refração do ativo Cloridrato de venlafaxina foi determinado pelo método de Savelyn através da variação de concentração de soluções do ativo em água (0,1% até 1,0%), com valor médio obtido de 1,550. A validação do método foi realizada pela comprovação da precisão repetibilidade e intermediária além da exatidão, conforme os critérios de aceitação da Farmacopeia Americana. As distribuições de tamanho para o insumo farmacêutico para seis amostras apresentaram resultados de precisão com desvio padrão relativos abaixo de 5,5% para as médias de D10, D50 e D90, em dois dias diferentes de análise, garantindo a precisão intra e interdía do método. A exatidão do método foi comprovada pela comparação dos resultados com a microscopia óptica do material, a qual se encontra entre a faixa quantificada pela técnica de difração a *laser*. Assim, considerou-se o método validado para finalidade a qual se propõe. Também, foi possível concluir que a escolha do modelo óptico para determinação da distribuição granulométrica tem influência sobre os resultados, uma vez que a Aproximação de Fraunhofer ocasiona desvios nos resultados dos tamanhos de partículas inferiores a 10 μm .

Palavras chave: Índice de refração; Tamanho de partícula; Cloridrato de venlafaxina; Validação.

ABSTRACT

MACHADO, Isadora Selistre. Validation of the solid particulates size analysis method for venlafaxine hydrochloride by laser diffraction. 2019. 36f. Monografia (Especialização em Análise Instrumental). Toledo, 2019.

The particle size is a physical property of the drugs that exerts great influence in several stages of the development of new medicines, and it can affect the bioavailability of drugs and the productive processes. In this work, the method's size of the solid particles of the raw material Venlafaxine hydrochloride was validated by laser diffraction using two different optical models, according to the Mie Theory and Fraunhofer Approximation. The refractive index of the active Venlafaxine hydrochloride was determined by the Savevy's method through the concentration variation of active solutions in water (0.1% up to 1.0%), with an average value found around to 1,550. The validation of the method was performed by proving the repeatability and intermediate precision in addition to the accuracy, according to the acceptance criteria of the American Pharmacopoeia. The size distribution for the pharmaceutical input for six samples presented precision results with relative standard deviation below 5.5% for the means of D10, D50 and D90 on two different days of analysis, ensuring the intra- and inter-method precision of the method. The accuracy of the method was demonstrated by comparing the results with the optical microscopy of the material, which is among the range quantified by the laser diffraction technique. Therefore, it was possible to conclude that the choice of the optical model to determine the particle size distribution influences the results, since the Fraunhofer Approximation results in deviations in the results of the particle sizes of less than 10 μm .

Keywords: Refractive index; Particle size; Venlafaxine hydrochloride; Validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos percentis da distribuição do tamanho da partícula em relação aos dados volumes percentuais da amostra.....	12
Figura 2- Estrutura do Cloridrato de Venlafaxina.	16
Figura 3- Gráficos de regressão linear para os dados no primeiro dia (a), segundo dia (b) e terceiro dia (c) de análise para determinação do índice de refração experimental.....	23
Figura 4 - Imagem da microscopia da amostra de Cloridrato de venlafaxina em duas regiões (Aumento de 10x) (A) e o gráfico do Under Volume (B).	27
Figura 5 - Comparativo da distribuição granulométrica das amostras 1, 2 e 3.	29
Figura 6 - Comparativo da distribuição granulométrica das amostras 4, 5 e 6.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contribuições estruturais e atômicas para refração molar pelo método de Eisenlohr.	20
Tabela 2 - Resultados dos índices de refração realizados em três dias.	23
Tabela 3 - Resultados do tamanho hidrodinâmico (nm) D10, D50 e D90 do primeiro dia da análise de precisão.	25
Tabela 4 - Resultados do tamanho hidrodinâmico (nm) D10, D50 e D90 do segundo dia da análise de precisão.	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1.1	Definições de partícula	11
1.1.2	Aplicações e importância da análise	12
1.1.3	Técnicas de análise	13
1.1.4	Validação do método de partícula	15
1.1.5	Cloridrato de Venlafaxina	16
1.2	OBJETIVO	16
1.3	JUSTIFICATIVA	17
2	METODOLOGIAS.....	18
2.1	REAGENTES/SOLVENTES E MATÉRIA-PRIMA.....	18
2.2	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO	18
2.2.1	Método Experimental de Abbe	18
2.2.2	Método Teórico de Eisenlohr.....	19
2.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTICULADOS SÓLIDOS	21
2.4	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR DIFERENTES MODELOS ÓPTICOS	22
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	22
3.1	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO	22
3.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANALÍTICO.....	24
3.3.	COMPARAÇÃO DOS MODELOS ÓPTICOS	28
4	CONCLUSÃO.....	32
5	PERSPECTIVAS FUTURAS	33
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento de novos medicamentos, as propriedades físico-químicas dos fármacos devem ser consideradas, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento. Atualmente, sabe-se que uma série de fatores ligados aos insumos farmacêuticos ativos (IFA) podem afetar a formulação e estabilidade dos medicamentos. Entre estes fatores, pode-se citar a natureza química, o estado físico, polimorfismo, quiralidade e tamanho de partícula do IFA. O tamanho de uma partícula é uma propriedade física dos princípios ativos que pode influenciar na velocidade de dissolução e na taxa de liberação do medicamento e, conseqüentemente, na biodisponibilidade dos fármacos (STORPIRTIS et al., 1999), podendo também afetar o conteúdo e uniformidade de doses (FIGUEIREDO E LAPORTA, 2003).

Além disso, o tamanho de partícula é um parâmetro crítico do processo produtivo de medicamentos afetando fluxo, mistura e segregação de pós, influenciando nas características de compressibilidade e compactação de formas farmacêuticas sólidas e nas características reológicas de líquidos e semissólidos. Portanto, é um critério que deve ser levado em consideração durante o desenvolvimento das formulações e processos produtivos (SHEKUNOV et al., 2006; YU, 2008).

A determinação da distribuição granulométrica pode ser realizada por diferentes técnicas. Entre as mais comuns, podemos citar a tamisação (peneiramento), microscopia óptica e eletrônica, espalhamento de luz *laser* (difração a *laser*) e espalhamento de luz dinâmica (SHEKUNOV et al., 2006). A difração a *laser* é uma das técnicas mais largamente utilizadas por ser rápida, eficaz e não destrutiva. Resumidamente, este procedimento consiste em incidir um feixe de *laser* sobre uma amostra e quantificar a difração da luz em diferentes ângulos, pois partículas grandes dispersam a luz em pequenos ângulos em relação ao feixe de *laser*, enquanto que partículas pequenas dispersam a luz em ângulos grandes. Para aplicação da difração a *laser* em análises de tamanho de partícula são aceitas dois modelos ópticos: a Teoria de Mie e Aproximação de Fraunhofer. A Aproximação de Fraunhofer leva em consideração apenas a interação da difração entre a luz e a amostra, não considerando o índice de refração. Já a Teoria de Mie leva em consideração a absorção, refração e reflexão podendo ser usada para determinação de partículas não-esféricas e pequenas (MALVERN, 2003; SHEKUNOV et al., 2006), o que acaba trazendo resultados mais próximos da realidade.

Assim, para Teoria de Mie, é necessário conhecer o índice de refração das substâncias em análise (MALVERN, 2003). O índice de refração (IR) é uma propriedade física

facilmente determinada em líquidos com o uso de refratômetros. Porém, em materiais sólidos orgânicos, como IFAs, a determinação acaba sendo difícil através de métodos convencionais e diretos (CAO et al., 2009; MALVERN, 2003). Desta forma, os IFAs apresentam escassez de dados na literatura sobre seus índices de refração práticos, o que acaba dificultando as análises na indústria farmacêutica.

Independentemente da técnica usada, a análise de tamanho de partícula faz parte de um dos critérios de controle de qualidade das matérias-primas usadas na fabricação de medicamentos (MARSON e ROSA, 2011). Assim, durante o desenvolvimento ou no controle lote a lote, deve ser usado um método de determinação da distribuição granulométrica que esteja devidamente validado. Esta solicitação está de acordo com o órgão sanitário brasileiro (Agência Nacional de Vigilância em Saúde - ANVISA) e demais normas internacionais (International Conference on Harmonization – ICH e Farmacopeias), que exigem que métodos de controle de qualidade devem ser validados antes de serem adotados na rotina e/ou quando não estão descritos em farmacopeias ou compêndios oficiais (ANVISA, 2010a).

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

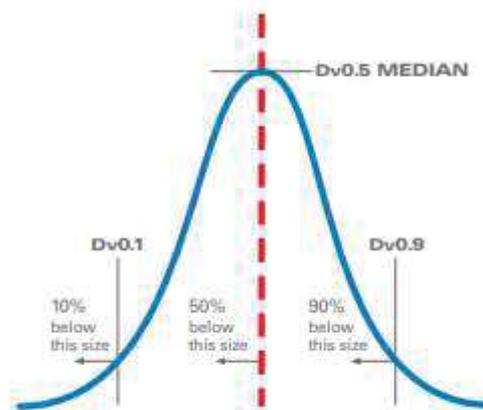
1.1.1 *Definições de partícula*

Uma partícula é definida com uma sub-parcela discreta de uma substância. As partículas incluem partículas sólidas, gotículas e bolhas de ar com tamanho na faixa de milímetros (mm) até nanômetros (nm). As partículas constituem objetos tridimensionais, porém para simplificar a determinação de seus tamanhos, convém utilizar o conceito das esferas equivalentes (RAWLE, 2001).

Este conceito consiste em medir uma propriedade da partícula assumindo que se refere a uma esfera e derivar um único parâmetro para descrever a partícula, como o diâmetro. Entretanto, diferentes técnicas e equipamentos podem apresentar modelos diferentes de esferas equivalentes e acabar apresentando resultados variáveis. Portanto, devem-se comparar resultados somente entre análises que utilizem os mesmos princípios (MALVERN, 2015; RAWLE, 2001). Além disso, partículas irregulares podem apresentar diferentes diâmetros em função das propriedades que estão sendo medidas e, mesmo assim, todos estão corretos (MALVERN, 2015).

Porém, a melhor apresentação dos resultados para tamanho de partículas são os gráficos de distribuição granulométrica através de uma curva de distribuição de frequência (HORIBA, 2012). Nesta abordagem, pode-se definir a largura da distribuição com base no tamanho máximo da partícula para um dado volume percentual da amostra. Normalmente, são usados os três níveis percentuais D10, D50 e D90, conforme exemplificado na figura 1, que correspondem ao diâmetro do décimo, quinquagésimo e nonagésimo percentis, respectivamente (KULKARNI e SHAW, 2016).

Figura 1 - Representação dos percentis da distribuição do tamanho da partícula em relação aos dados volumes percentuais da amostra.



Fonte: HORIBA, 2012.

1.1.2 Aplicações e importância da análise

O tamanho de partícula é uma característica que deve ser considerada em diferentes tipos de indústrias, como por exemplo, em indústrias farmacêuticas, alimentícias, de pigmentos, agroquímicos e cosméticos. A medição deste tamanho é de extrema importância, pois pode influenciar em diversos parâmetros, como a estabilidade de soluções, textura e aparência, solubilidade, velocidade de dissolução, fluidez e compressibilidade (AGIMELEN; MULHOLLAND; SEFEIK, 2017; MALVERN, 2015).

Na indústria cosmética, esta propriedade tem um grande impacto nas características dos produtos. Por exemplo, os protetores solares constituídos de dióxido de titânio ou óxido de zinco devem apresentar partículas com o tamanho adequado (0,8 μm e diâmetro para dióxido de titânio e 0,25 μm para óxido de zinco) a fim de proporcionar a eficácia do produto bem como uma boa aparência para aceitação dos consumidores (ARAUJO e SOUZA, 2008).

Já na indústria farmacêutica, a dimensão de uma partícula é um atributo crítico no desenvolvimento e estabilidades de produtos farmacêuticos, uma vez que possuem diversos impactos, principalmente na dissolução e biodisponibilidade (KULKARNI e SHAW, 2016).

Ao mesmo tempo, o tamanho da partícula tem influência em quase todas as etapas de produção de comprimidos, incluindo mistura, granulação, compressão e revestimento. Porém, o tamanho de partícula não afeta somente formas farmacêuticas sólidas, mas também em formulações tópicas, oftálmicas e parenterais. Assim, o tamanho aceitável varia de acordo com os tipos de formulações e vias de administração (KULKARNI e SHAW, 2016; SHEKUNOV et al., 2006).

Um exemplo disso é o estudo de Zhao e colaboradores (2018) com o IFA Glipizida que demonstrou algumas variações em seu comportamento em função do diâmetro das partículas. Este estudo realizou três formulações do IFA com diferentes tamanhos de partículas e observou que as formulações com tamanho menor (entre 2 e 5 μm) apresentaram uma absorção oral semelhante ao medicamento referência e um perfil de dissolução mais rápido (ZHAO et al., 2018).

1.1.3 Técnicas de análise

Existem diferentes técnicas para determinação de tamanho de partícula, entre elas pode-se citar a tamisação, microscopia e difração a *laser* (espalhamento da luz). A técnica mais utilizada para determinação da distribuição do tamanho é a difração a *laser*. Esta técnica é fundamentada na análise de um padrão de difração quando uma dispersão da amostra é exposta a um feixe de luz monocromática (*laser*). A dispersão de luz pelas partículas em vários ângulos é medida por um detector de múltiplos elementos através da variação na intensidade da luz espalhada. Valores numéricos que representam o padrão de espalhamento são transformados, usando um modelo óptico apropriado e procedimento matemático, para produzir a proporção do volume total para um número discreto de classes de tamanho, formando uma distribuição volumétrica de tamanho de partícula (MALVERN, 2015; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

Entre os modelos ópticos, pode-se citar a Aproximação de Fraunhofer e a Teoria de Mie. A escolha pela utilização de um dos modelos deve levar em consideração algumas características dos materiais em estudo, como número de fases, conhecimento do índice de refração e tamanho médio. A Aproximação de Fraunhofer foi o primeiro modelo utilizado e

consiste em assumir que as partículas são opacas, ou seja, que as partículas absorvem inteiramente a luz, observando-se somente a difração da luz. Além disso, esta teoria é utilizada quando o diâmetro da partícula espalhada pela luz incidente é maior do que o comprimento de onda da radiação. Embora este modelo seja usado em misturas de compostos e seja independente das propriedades dos materiais, ele possui limitações, pois se trata de uma estimativa e pode ocasionar alguns erros, principalmente com partículas muito pequenas (HORIBA, 2012; JILLAVENKATESA; DAPKUNAS; LUM, 2001 e MALVERN, 2003).

A Teoria de Mie é uma solução matemática abrangente para espalhamento da luz incidente assumindo que as partículas são esféricas. Esta teoria requer o conhecimento das propriedades ópticas dos materiais (índice de refração da partícula e do meio dispersante) (JILLAVENKATESA; DAPKUNAS; LUM, 2001) e traz resultados mais próximos ao verdadeiro.

Entretanto, encontrar o índice de refração dos materiais sólidos pode ser um desafio devido à escassez dos valores na literatura. O IR de líquidos pode ser determinado diretamente com o auxílio de um refratômetro, já os materiais sólidos exigem procedimentos mais elaborados (SAVEYN et al., 2002), principalmente para ativos farmacêuticos. Porém, existem maneiras de estimar o IR através da determinação do mesmo em soluções em determinada faixa de concentração e posterior construção de uma equação linear e extrapolação matemática (MALVERN, 2013; SAVEYN et al., 2002).

Dentro do âmbito farmacêutico, pode-se citar a pesquisa de Cao e colaboradores (2009) que conseguiu estimar o índice de refração de 424 insumos farmacêuticos ativos através da microscopia de luz polarizada. Além disso, evidenciaram uma correlação entre os valores medidos experimentalmente e os valores calculados teoricamente, contudo também relataram dificuldades para encontrar estes índices na literatura.

Outra técnica utilizada, principalmente para confirmar resultados, é a microscopia. Esta técnica fornece uma distribuição de tamanho em média numérica e também é útil para entender a morfologia das partículas. Há alguns tipos de técnicas microscópicas que podem ser utilizadas: microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A escolha entre um destes três métodos é feita de acordo com faixa de tamanho do pó em estudo e a resolução desejada (KULKARNI e SHAW, 2016; JILLAVENKATESA; DAPKUNAS; LUM, 2001).

1.1.4 Validação do método de partícula

Após os conhecimentos dos princípios da técnica, é necessário entender quais os requisitos necessários para validar um método de distribuição granulométrica. Conforme já relatado, é exigido pela atual legislação sanitária que os métodos usados em controle de qualidade de medicamentos sejam devidamente validados. A legislação vigente estabelece que os parâmetros de uma validação devem ser a seletividade, a linearidade, a precisão (inter e intradiária), a exatidão, a faixa de trabalho e a robustez (ANVISA, 2017). No entanto, nem todos estes parâmetros são aplicáveis para uma validação de tamanho de partícula.

A seletividade do método não é aplicável, pois a técnica não é capaz de discriminar diferentes componentes. A linearidade também não é um parâmetro a ser considerado neste tipo de análise, porém pode-se associá-la com a faixa de obscuração. A obscuração mede a quantidade de luz difratada e/ou absorvida pela amostra e está correlacionada com a concentração da amostra. A faixa de obscuração é definida como a faixa em que o resultado não varia significativamente (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

O limite de quantificação e faixa de trabalho não são possíveis de determinar em análises deste tipo, porém podem-se correlacionar com a faixa de detecção do próprio equipamento (MALVERN, 2001; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

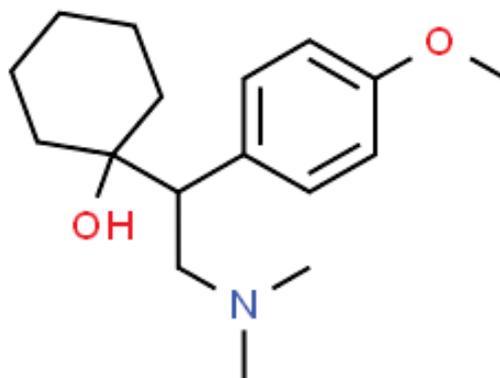
A robustez acaba não sendo avaliada na validação também, pois ela é uma etapa crítica durante o desenvolvimento do método e depois de desenvolvido não pode ocorrer variação durante a análise. Assim, não é um parâmetro aplicado a este trabalho. A robustez avaliada durante o desenvolvimento deve levar em consideração a solubilidade das moléculas, qual é o melhor modo de análise do equipamento (úmido ou seco) e a determinação da melhor rotação e velocidade do ultrassom (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

Portanto, os parâmetros de validação aplicáveis neste tipo de análise são a precisão e exatidão. A precisão é avaliada através da análise de um determinado número de amostras em dois dias diferentes (precisão repetibilidade e precisão intermediária). A Farmacopeia Americana recomenda valores de desvio padrão relativos (DPR) para os valores de D10, D50 e D90. Os critérios de aceitação para precisão são para D10 e D90 um DPR < 15% e D50 um DPR < 10% (para partículas com tamanho D50 > 10 µm) e o dobro do DPR para partículas de tamanho de D50 < 10 µm. Já a exatidão do método pode ser feita através da comparação dos resultados com outra técnica, como a microscopia, e uma apropriada calibração do equipamento analisador de partículas (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

1.1.5 Cloridrato de Venlafaxina

O Cloridrato de Venlafaxina é um sólido branco cuja massa molecular é $277,4 \text{ g mol}^{-1}$ e sua estrutura está representada na figura 2. Este insumo ativo é um antidepressivo pertencente à classe dos inibidores da recaptação neuronal de serotonina, norepinefrina e dopamina e seu objetivo terapêutico está relacionado ao tratamento de depressão, incluindo depressão com ansiedade associada e prevenção de recaídas. Além disso, está indicado também para o tratamento de transtorno de ansiedade generalizada, do transtorno de ansiedade social (fobia social) e do transtorno do pânico (VENLAXIN, 2015; MARSH, 2007).

Figura 2- Estrutura do Cloridrato de Venlafaxina.



. HCl

Fonte: *Royal Society of Chemistry* (2015).

1.2 OBJETIVO

O objetivo geral do trabalho é a validação da análise de tamanho de particulados sólidos do insumo farmacêutico ativo Cloridrato de Venlafaxina, utilizando a técnica de difração a *laser*. Como objetivos específicos, será necessário determinar experimentalmente o índice de refração para o insumo farmacêutico, bem como, validar o método analítico proposto por meio da comprovação da precisão e exatidão do mesmo.

1.3 JUSTIFICATIVA

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige uma série de requisitos de controle de qualidade para os insumos farmacêuticos usados como princípio ativo de medicamentos comercializados no Brasil. Entre estes requisitos, encontra-se o controle de tamanho de partícula, conforme legislação de registro e pós-registro. Esta propriedade é importante, pois pode influenciar o processo de produção dos medicamentos, a solubilidade e biodisponibilidade dos IFAs. Logo, pela legislação, o controle desta característica deve ser feito através de um método devidamente validado. Assim, é necessário validar métodos aplicáveis para controle de qualidade do tamanho de partícula de matérias-primas na rotina de uma indústria farmacêutica.

Além disso, atualmente, para determinação/validação do tamanho de partícula para substâncias orgânicas como IFAs, a difração a *laser* associada à Teoria de Mie acaba tornando-se a forma mais assertiva para esta avaliação. Contudo, para sua utilização, é necessário ter conhecimento do índice de refração real da substância em estudo. A literatura apresenta escassez de índice de refração para produtos ativos farmacêuticos, principalmente, de novos IFAs. Desta maneira, também é necessário realizar pesquisas e elaborar protocolos capazes de determinar o índice de refração de ativos cujos objetivos terapêuticos estejam sendo visados no mercado.

Nesse contexto, devido a elevada eficácia do Cloridrato de venlafaxina dentro de sua classe terapêutica e pelo aumento do uso de antidepressivos nos últimos anos, surge o interesse em estudar o ativo e estabelecer alguns critérios mínimos em seu controle de qualidade.

2 METODOLOGIAS

2.1 REAGENTES/SOLVENTES E MATÉRIA-PRIMA

Os reagentes usados foram água destilada obtida no laboratório de pesquisa e a vaselina líquida comercial (EMCA LTD). Além disso, a matéria-prima de Cloridrato de venlafaxina (fabricante Amoli Organics) foi utilizada pela Prati Donaduzzi e Cia Ltda (Medicamento Genéricos) para o desenvolvimento de suas pesquisas, tomando precauções para que as amostras estivessem armazenadas em frascos limpos e secos. A coleta foi realizada através de uma mistura das amostras da parte de cima, meio e fundo da barrica e posteriormente, homogeneizado para garantir a correta amostragem. Todas as análises foram realizadas pela/na Prati Donaduzzi e Cia Ltda (Medicamento Genéricos) nos laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação e no laboratório de Controle de Qualidade da Prati Donaduzzi. A UTFPR foi responsável pela divulgação do dados e discussões.

2.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

2.2.1 *Método Experimental de Abbe*

Para determinação do índice de refração do IFA Cloridrato de venlafaxina foi usado o método de Saveyn e colaboradores (2002). Assim, prepararam-se soluções em água destilada contendo o IFA em diferentes concentrações entre 0,1% a 1%. Estas soluções tiveram seus índices de refração medidos por um refratômetro Abbe de bancada (Quimis). Após esta determinação, o índice do sólido foi encontrado através da equação da reta obtida pela regressão linear simples, interpolando para a concentração de 100%, conforme a equação 3 (SAVEYN et al., 2002). Este procedimento foi realizado em três dias diferentes e o resultado final expresso pela média dos três dias. Os dados foram tratados pelo software Qtiplot (Data Analysis and Scientific Visualisation - Copyright © 2004 - 2019 Ion Vasilief).

$$IR = (coef. angular) \times 100 + (coef. linear) \quad (eq. 1)$$

2.2.2 Método Teórico de Eisenlohr

O cálculo do índice de refração teórico foi calculado através do método teórico de Eisenlohr, conforme Cao e colaboradores (2009). Assim, a partir da Tabela 1, os grupos da molécula foram classificados e a soma das contribuições R_i foi usada na equação 4 e, posteriormente, usada na equação 5, para predizer o índice de refração teórico.

Tabela 1. Contribuições estruturais e atômicas para refração molar pelo método de Eisenlohr.

Grupo	R_i	Grupo	R_i
— CH ₂ —	4.618	I	13.9
C	2.418	O (hidroxil)	1.525
H	1.1	O (éter)	1.643
S em SH	7.69	O (carbonil)^a	2.211
S em RSR	7.97	OO (éster)^a	3.736
S em RCNS	7.91	N (amina primária)	2.322
S em RSSR	8.11	N (amina secundária)	2.502
F (um F ligado ao C)	0.95	N (amina terciária)	2.84
F (cada F de polifluoretos)	1.1	N (nitrila)^b	5.516
Cl	5.967	Banda dupla	1.733
Br	8.865	Banda tripla	2.398

a = inclui duplas ligações

b= inclui triplas ligações

Fonte: adaptado de Eisenlohr (1910); Gold and Ogle (1969); Nelken, (1990) apud Cao et al. (2009).

$$Rd = \sum_i m_i R_i \quad (eq. 2),$$

onde m_i é o número de determinado átomo ou grupo e R_i é o valor de cada grupo apresentado na tabela 1.

$$n = \sqrt{\frac{M + 2\rho R d}{M - 2\rho R d}} \quad (eq.3),$$

onde n é o índice de refração, M é o peso molecular e ρ é a densidade. A densidade utilizada no cálculo foi teórica ($1,06 \text{ g/cm}^3$).

2.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTICULADOS SÓLIDOS

As distribuições granulométricas foram avaliadas utilizando o analisador de partícula Mastersizer 2000 – Hydro 2000 (modo úmido) e software Mastersizer 2000 v.5.6 da Malvern. Os parâmetros do equipamento para o método validado consistiam em uma agitação de 2000 RPM e ultrassom em 50%. A faixa de obscuração determinada para o método foi de 5-20%. O índice de refração da amostra (Cloridrato de venlafaxina) era o índice de refração médio obtido experimentalmente. Para o preparo da amostra realizou-se a dispersão da amostra em aproximadamente 10 mL do dispersante vaselina líquida, com auxílio de um banho ultrasônico ou sonda ultrasônica por 30 segundos a 1 minuto.

Os parâmetros de validação avaliados foram a precisão e a exatidão. A precisão foi avaliada através da precisão repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada com seis amostras ($n=6$) e o resultado expresso pela média de cinco leituras de 2 segundos cada uma e analisado conforme procedimento operacional do equipamento. Em um segundo dia, este procedimento foi repetido com nova preparação das amostras por outro analista para determinação da precisão intermediária. Os critérios de aceitação para precisão são $D_{10} - DPR \leq 15\%$, $D_{50} - DPR \leq 10\%$ e $D_{90} - DPR \leq 15\%$, de acordo com a Farmacopeia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

Já a exatidão foi avaliada através da comparação dos valores obtidos com a distribuição do tamanho das partículas com o tamanho verificado em um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), conforme a Farmacopeia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

2.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR DIFERENTES MODELOS ÓPTICOS

Para comparação dos dois modelos ópticos aceitos atualmente (Teoria de Mie e Aproximação de Fraunhofer) na avaliação do tamanho dos particulados sólidos, foi plotado um gráfico comparativo de distribuição granulométrica das três condições avaliadas. A primeira condição compreendeu os resultados calculados com a Teoria de Mie - IR referência (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2015), a segunda com Teoria de Mie - IR experimental e a terceira com Aproximação de Fraunhofer. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). O software Microsoft® Office Excel foi utilizado para análise estatística.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

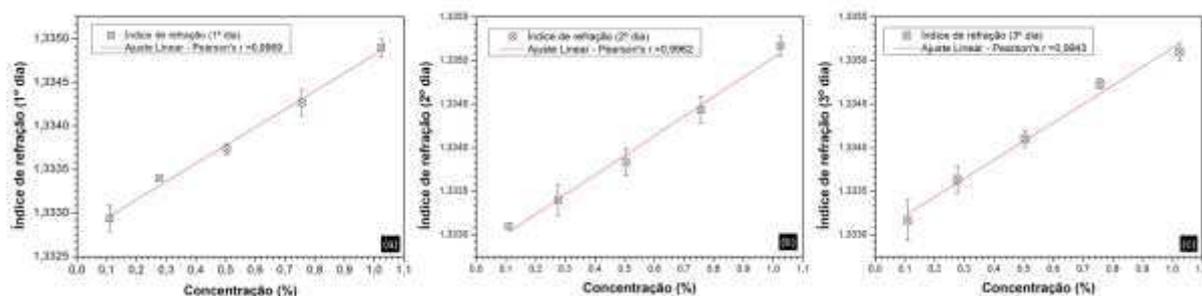
O índice de refração (IR) de uma substância é a relação entre a velocidade da luz no vácuo e sua velocidade na substância. Quando um raio de luz monocromática atravessa dois meios de densidades ópticas diferentes, ele é refletido ou refratado, podendo ser medido. Para fins práticos mede-se a refração com referência ao ar e à substância ao invés de medir com referência ao vácuo e à substância (ANVISA, 2010b).

A determinação de IR de materiais líquidos é relativamente direta e simples, porém a medida de sólidos pode acabar envolvendo algumas dificuldades. Uma das técnicas empregadas para avaliar o IR de sólidos pode ser a microscopia de luz polarizada, porém as substâncias orgânicas, como os fármacos, podem apresentar cristais irregulares ou até mesmo ausência de simetria, dificultando este tipo de análise (CAO et al., 2009). A planaridade e a geometria das moléculas também podem interferir em algumas práticas usadas para determinação de IR de sólidos, como a elipsometria, além de acabarem sendo mais elaboradas (NUSSBAUMER et al., 2005; MEICHNER et al., 2015), o que reduz sua aplicabilidade na rotina de indústrias farmacêuticas, cujo objetivo é a agilidade nas análises.

Desta forma, o trabalho tem o objetivo de apresentar um protocolo simples de determinação de IR para sólidos a partir de soluções diluídas do ativo (SAVEYN et al., 2002) utilizando um refratômetro Abbe (MALVERN, 2003). Para demonstrar este protocolo,

utilizou-se o ativo em estudo (Cloridrato de venlafaxina) e calculou-se os índices de refração pelas equações da reta obtidas em três dias diferentes (Figura 3). O resultado médio do índice de refração foi de 1,550, como pode ser observado na Tabela 2.

Figura 3- Gráficos de regressão linear para os dados no primeiro dia (a), segundo dia (b) e terceiro dia (c) de análise para determinação do índice de refração experimental.



Fonte: Autor

Tabela 2. Resultados dos índices de refração realizados em três dias.

Índice de refração	Resultados
Índice de refração – Primeiro dia	1,543
Índice de refração - Segundo dia	1,563
Índice de refração - Terceiro dia	1,543
Média	1,550

Fonte: Autor.

Não há na literatura muitos dados sobre índices de refração experimentais de substâncias ativas. Desta maneira, para comparação do valor encontrado, recorreram-se às referências de IR estimados. O valor encontrado como referência para o ativo em questão foi de 1,544 (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2015), baseado em IR preditivo calculado

por um *software* (*ACD/Labs Percepta Platform - PhysChem Module*). Ainda, desejando-se confirmar o valor experimental obtido, utilizou-se o método de Eisenlohr, descrito por Cao et al. (2009) para calcular o índice de refração teórico do fármaco, no qual o valor de 1,539 foi obtido. Verificou-se que tanto o valor do índice experimental quanto os valores teóricos disponíveis encontram-se próximos. Com isso, a determinação do índice de refração do ativo pode ser realizada através do método experimental descrito.

3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Os resultados apresentados na Tabela 3 referem-se às médias das seis amostras do primeiro dia de análise bem como seu desvio padrão relativo (DPR). A partir dos resultados apresentados na tabela, pode-se verificar que as amostras apresentaram valores de DPR dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para este método, conforme preconizado pela Farmacopeia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019). Desta forma, os preparos foram repetidos em um segundo dia e os resultados estão apresentados na Tabela 4. Assim como no primeiro dia, as amostras do segundo dia de análise também se apresentaram adequados com a especificação estabelecida.

Tabela 3. Resultados do tamanho hidrodinâmico (nm) D10, D50 e D90 do primeiro dia da análise de precisão.

Amostras/Dia 1	D10	D50	D90
Amostra 1	3,299	16,615	46,358
Amostra 2	3,259	16,566	46,865
Amostra 3	3,290	16,461	44,799
Amostra 4	3,296	16,998	49,276
Amostra 5	3,220	16,484	43,707
Amostra 6	3,218	16,737	44,557
Média	3,264	16,644	45,927
DPR (%)	1,15	1,20	4,39

Fonte: Autor.

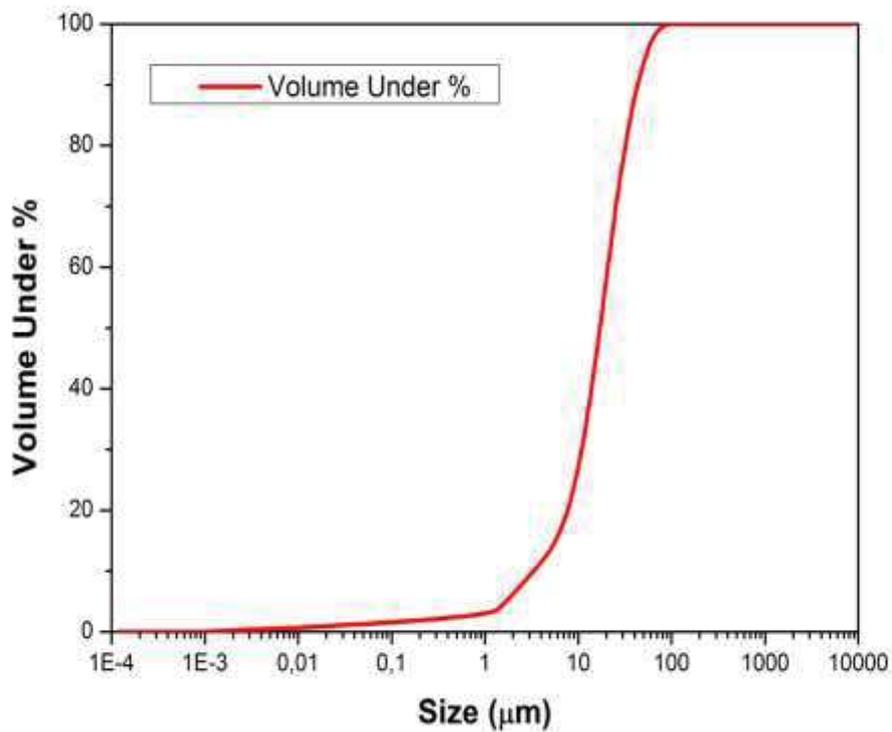
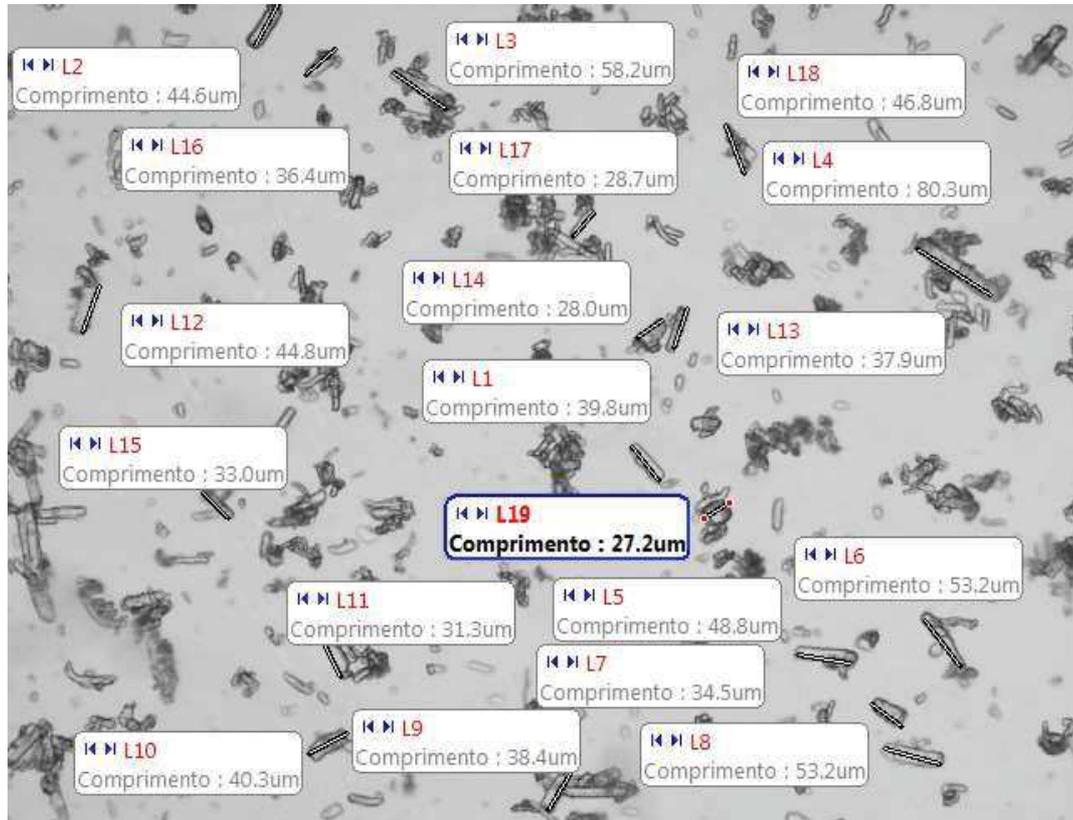
Tabela 4. Resultados do tamanho hidrodinâmico (nm) D10, D50 e D90 do segundo dia da análise de precisão.

Amostras/ Dia 2	D10	D50	D90
Amostra 1	3,177	17,032	50,022
Amostra 2	3,454	18,093	50,337
Amostra 3	3,702	19,138	48,466
Amostra 4	3,278	17,975	47,064
Amostra 5	3,302	18,15	47,699
Amostra 6	3,332	17,124	43,142
Média	3,374	17,919	47,788
DPR (%)	5,45	4,32	5,46
Média - (n = 12)	3,319	17,281	46,858
DPR (%) – (n =12)	4,19	4,96	5,18

Fonte: Autor.

Para demonstrar a exatidão do método compararam-se os resultados médios da precisão com as imagens obtidas com a microscopia eletrônica (figura 4A). Através da figura, percebe-se que a maior parte das partículas têm tamanhos inferiores a 47 μm , como disposto nas tabelas 3 e 4. Além disso, não há presença de partículas com tamanho superiores 108 μm , o que indica que 100% dos particulados sólidos apresentam tamanhos aproximadamente inferiores a este valor, como comprovado no gráfico de volume under % (figura 4B).

Figura 4 - Imagem da microscopia da amostra de Cloridrato de venlafaxina em duas regiões (Aumento de 10x) (A) e o gráfico do Under Volume (B).



B

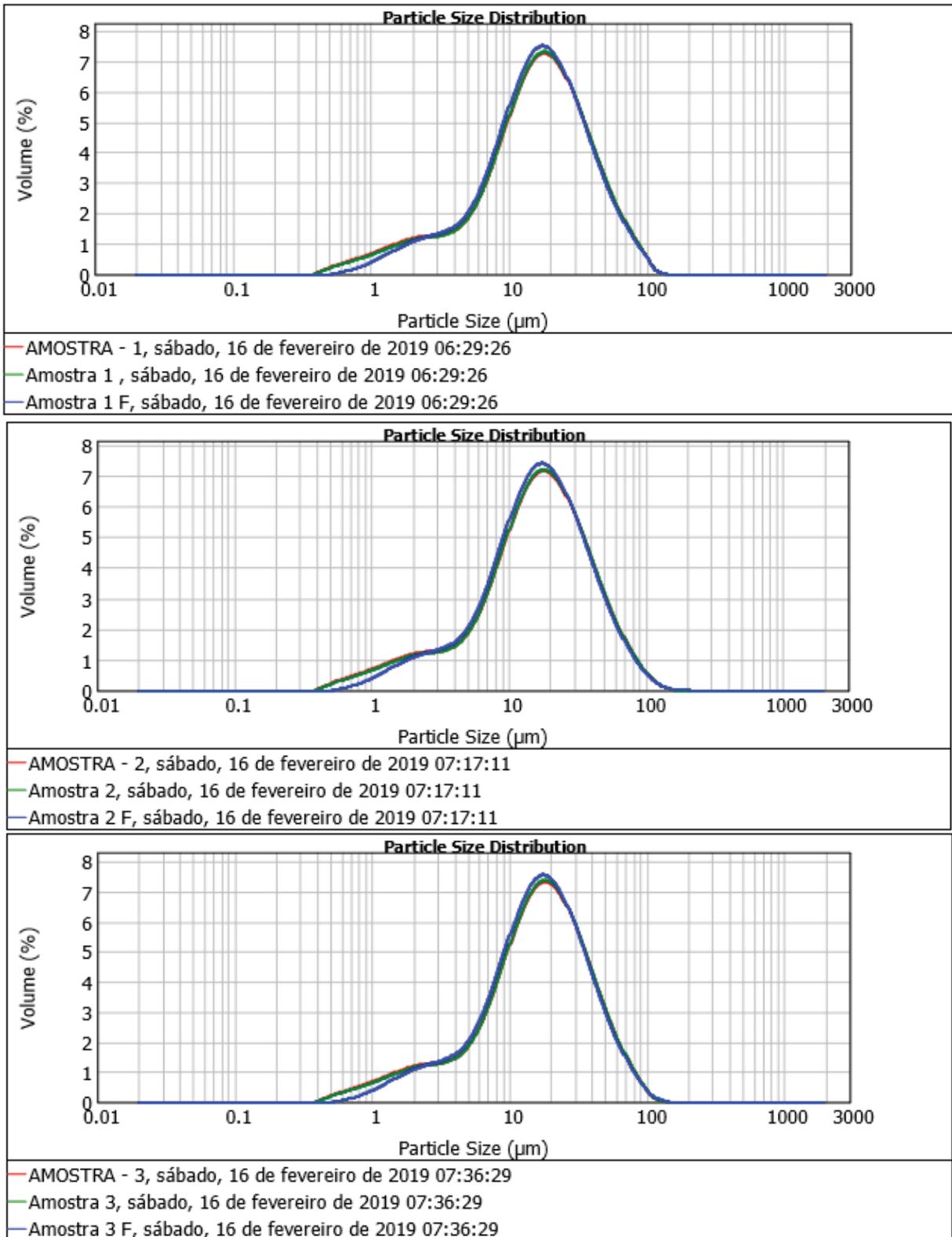
Fonte: Autor.

Portanto, como traz o capítulo geral <429> da Farmacopeia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019), a exatidão do método deve ser comprovada pela calibração do equipamento e a comparação dos resultados com microscopia e a precisão deve ser avaliada pela determinação da repetibilidade. Como os demais critérios de validação não são aplicáveis à técnica e todos os critérios estabelecidos acima foram testados e aprovados, pode-se afirmar que método utilizado na avaliação da distribuição granulométrica do ativo em estudo pode ser considerado validado, segundo a Farmacopeia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

3.3. COMPARAÇÃO DOS MODELOS ÓPTICOS

A fim de se realizar um comparativo entre os modelos ópticos para calcular o tamanho dos particulados, as médias foram calculadas pela Teoria de Mie e pela Aproximação de Fraunhofer. Para Teoria de Mie, separou-se em dois grupos. O primeiro grupo era calculado utilizando o índice de refração da referência (1,544) e o segundo grupo calculado pelo índice experimental obtido neste trabalho (1,550). E, por fim, o terceiro grupo teve as médias calculadas utilizando a Aproximação de Fraunhofer.

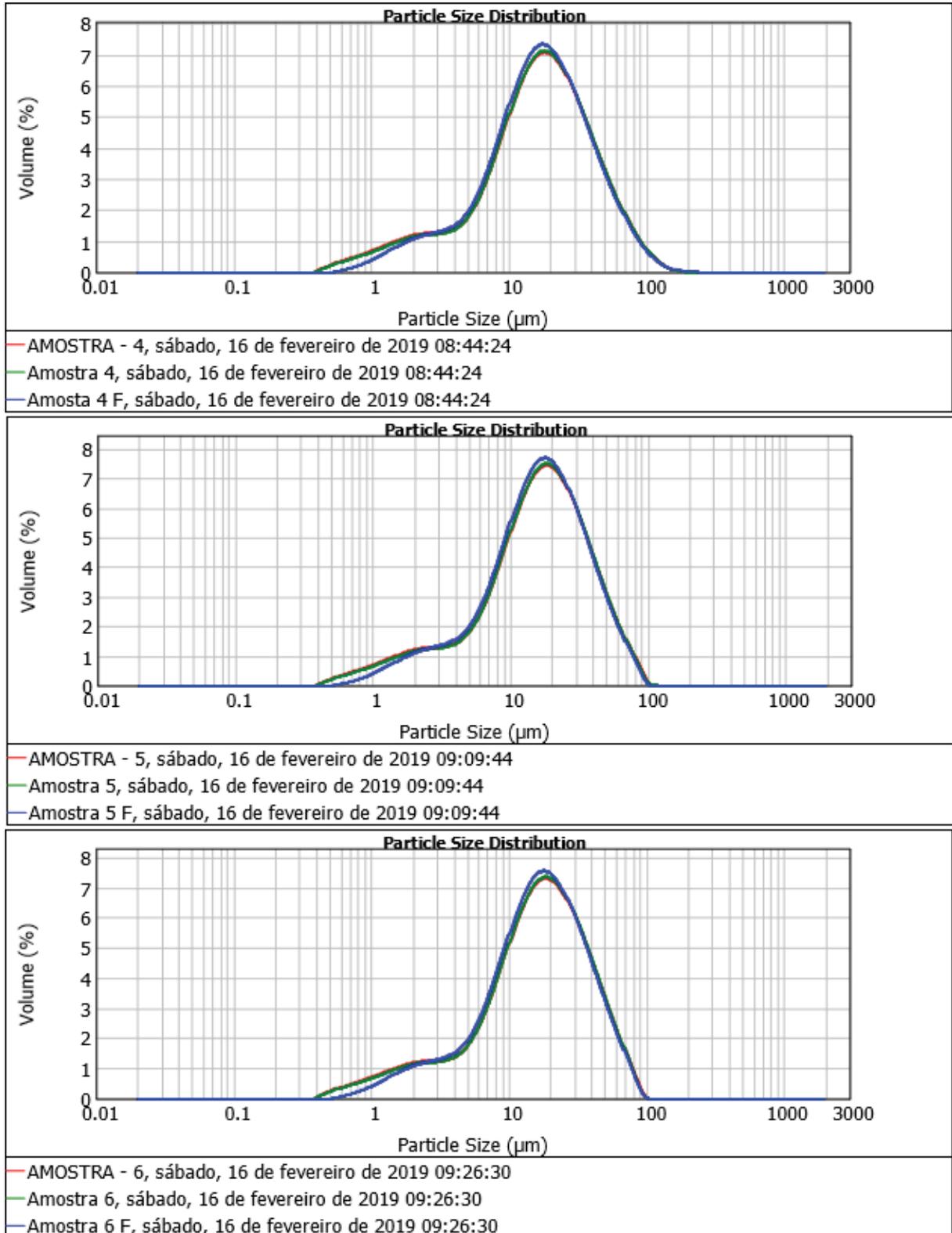
Figura 5 - Comparativo da distribuição granulométrica das amostras 1, 2 e 3.



Legenda: AMOSTRA – 1/2/3 (Teoria de Mie – IR referência); Amostra 1/2/3 (Teoria de Mie – IR experimental); Amostra 1/2/3–F (Aproximação de Fraunhofer).

Fonte: Autor.

Figura 6 - Comparativo da distribuição granulométrica das amostras 4, 5 e 6.



Legenda: AMOSTRA – 4/5/6 (Teoria de Mie – IR referência); Amostra 4/5/6 (Teoria de Mie – IR experimental); Amostra 4/5/6–F (Aproximação de Fraunhofer).

Fonte: Autor.

Para demonstrar a comparação entre os três grupos citados acima, podemos observar a figura 5 e a figura 6. Percebe-se que os três grupos apresentam uma distribuição granulométrica bastante semelhante, com uma pequena diferença nos tamanhos menores (D10) para as amostras cujas médias foram calculadas usando a Aproximação de Fraunhofer. Esta diferença foi comprovada estatisticamente também, pois apresenta valor de $p < 0,05$ para D10.

Este comportamento é esperado, pois o modelo de Fraunhofer apresenta certa limitação em medições de tamanhos abaixo de $10 \mu\text{m}$. Isto ocorre porque este modelo leva em consideração algumas suposições, que o isenta de ter conhecimento do índice de refração da partícula (HORIBA, 2012; JILLAVENKATESA; DAPKUNAS; LUM, 2001), ocasionando erros nas medições de partículas pequenas. No estudo com os ativos Maleato de Enalapril e Lisinopril, também se pode observar resultados menores quando calculados com a Aproximação de Fraunhofer. Neste estudo, todos os percentis da distribuição granulométrica apresentaram certo decaimento em relação à Teoria de Mie, porém o próprio tamanho das partículas dos ativos estudados são menores que $20 \mu\text{m}$ (MALVERN, 2003). Diferentemente do ativo Cloridrato de venlafaxina, cuja maior parte das partículas (D90) possui tamanho em aproximadamente $47 \mu\text{m}$.

Entre os resultados da Teoria de Mie, não ocorreu variações nas médias pela utilização do índice teórico e o experimental, como já era esperado uma vez que ambos foram muito próximos entre si.

4 CONCLUSÃO

O método proposto mostrou-se adequado para os parâmetros de validação exigidos nos compêndios oficiais para a determinação de tamanho de partículas via difração a *Laser* para o insumo farmacêutico ativo cloridrato de venlafaxina.

O índice de refração do insumo farmacêutico ativo pôde ser determinado através de um protocolo simples, prático e robusto utilizando um refratômetro Abbe. O protocolo investigado pode ser útil para demais ativos na rotina de indústrias farmacêuticas para insumos não fotossensíveis. Outras técnicas de determinação do índice de refração podem ser utilizadas, no entanto, deve-se analisar a viabilidade das mesmas na rotina da indústria, o que torna o protocolo estudo de grande importância.

A partir dos índices de refração teórico e experimental, os modelos ópticos para determinação da distribuição granulométrica (Teoria de Mie e Aproximação de Fraunhofer) foram analisados. Para tamanhos acima de 10 μm os dados foram correlatos, contudo variações significativas da distribuição foram observados para partículas menores deste tamanho. Ainda, as distribuições granulométricas foram validadas pela análise de microscopia.

Os resultados da distribuição de tamanho do ativo utilizando a teoria de Mie com os índices de refração teóricos e experimentais apresentaram-se muito próximos. Sendo assim, conclui-se, que apesar do método experimental de determinação do índice de refração ser simples, o valor obtido segundo método de Eisenlohr também apresenta resultado semelhante a referência usada, sem desperdício de insumo farmacêutico, o que torna-o de fácil aplicação.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, pode-se citar a continuação dos estudos com este ativo para comprovação da influência do tamanho dos particulados sólidos na dissolução e liberação do fármaco a partir de formulações preparadas com diferentes tamanhos da matéria-prima. E, também, podem ser obtidos sistemas monodispersos por via *(i)* química, com auxílio de excipientes (tensoativos) e posterior liofilização e *(ii)* física, por meio de moinhos de bolas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIMELEN, O. S.; MULHOLLAND, A. J.; SEFEIK, J. Modelling of artefacts in estimations of particle size of needle-like particles from laser diffraction measurements. **Chemical Engineering Science**, v. 158, p. 445 – 452, 2017.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 17, de 16 de abril de 2010. 2010a.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasilia, 2010b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância em Saúde – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. 2017.

ARAUJO, T. S. de; SOUZA, S. O. de. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, v. 4, n.11, p. 1 – 7, 2008.

CAO, X.; HANCOCK, B. C.; LEYVA, N.; BECKER, J. YU, W.; MASTERSON, V. M. Estimating the refractive index of pharmaceutical solids using predictive methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 368, p. 16 – 23, 2009.

FIGUEIREDO, M. A. J.; LAPORTA L. **Requisitos Específicos para Formas Farmacêuticas Sólidas**. 2003. 30 f. Monografia (Especialização em Análise de Registro de Medicamentos) - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2003.

HORIBA. A guidebook to particle size analysis. Horiba Instruments, Inc. Horiba Scientific. p. 30. 2012.

JILLAVENKATESA, A.; DAPKUNAS, S. J.; LUM, L-S. H. Particle size characterization. **NIST-National Institute of Standards and Technology, Recommended Practice Guide**. Special publication 960-1. 2001. p. 164.

KULKARNI, V. S.; SHAW, C. Particle Size Analysis: An Overview of Commonly Applied Methods for Drug Materials and Products. In.: **Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages**. Academic Press, p. 137-144, 2016.

MALVERN. **Wet method development for laser diffraction measurements**. Mastersizer 2000. Application note MRK561-01. 2001.

MALVERN. **Rapid refractive index determination for pharmaceutical actives**. Application note - MRK529-03. 2003.

MALVERN. **A Basic Guide to Particle Characterization**. Malvern Instruments Worldwide. Inform whitepaper. 2015. Disponível em <https://www.cif.iastate.edu/sites/default/files/uploads/Other_Inst/Particle%20Size/Particle%20Characterization%20Guide.pdf>. Acessado em <setembro/2018>.

MARSH, W. Venlafaxine. In: ENNA, S.J; BYLUND, D.B. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. New York: Elsevier, 2007, p. 1–5.

MARSON, M. B.; ROSA, F. da. Importância do controle das características físico-químicas de insumos farmacêuticos na qualificação de fornecedores. **Revista Analytica**, n° 52, 2011.

MEICHNER, C.; SCHEDL, A. E.; NEUBER, C.; KREGER, K.; SCHMIDT, H.-W.; KADOR, L. Refractive-index determination of solids from first- and second-order critical diffraction angles of periodic surface patterns. **AIP Advances**, V.5, (8), 087135, 2015.

NUSSBAUMER, R. J.; HALTER, M.; TERVOORT, T.; CASERI, W.R.; SMITH, P. A simple method for the determination of refractive indices of (rough) transparent solids. **Journal of Materials Science**, v. 40, p. 575–582, 2005.

RAWLE, A. **Basic Principles of Particle Size Analysis**. Malvern Instruments Ltd. Ref: WR14 1XZ. 2001.

RICHARDSON, A. M.; TYUFTIN, A. A.; KILCAWLEY, K. N.; GALLAGHER, E.; O' SULLIVAN, M. G.; KERR, J. P. The impact of sugar particle size manipulation on the physical and sensory properties of chocolate brownies. **LWT - Food Science and Technology**, Accepted Manuscript, 2018.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. ChemSpider: Search and share chemistry – Venlafaxine. c2015. Disponível em <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5454.html>>. Acesso em: 15 de maio de 2019.

SAVEYN, H.; MERMUYS, D.; THAS, O.; VAN DER MEEREN, P. Determination of the refractive index of water dispersible granules for use in laser diffraction experiments. **Particle and Particle Systems Characterisation**. V. 19, p. 426-432, 2002

SHEKUNOV, B.Y.; CHATTOPADHYAY, P.; TONG, H. H. Y.; CHOW, A. H. L. Particle Size Analysis in Pharmaceutics: Principles, Methods and Applications. **Pharmaceutical Research**. EUA, v.24, N. 2, 2006.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P. G.; RODRIGUES, D; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v.35, n. 1, p. 1 – 16, 1999.

UNITED STATES PHARMACOPEIA - USP. General Chapters. Laser Light Diffraction Measurement of Particle Size. 42. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2019, Cap. 429, p. 161-165.

VENLAXIN: cloridrato de Venlafaxina. Responsável técnico: Dra. Maria Benedita Pereira. São Paulo: Eurofarma, 2015. Bula de remédio.

YU, L. X. Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control. **Pharmaceutical Research**, v.25, n. 4, p. 781 – 791, 2008.

ZHAO, C.; JIN, C.; GAO, H.; WANG, L.; LIU, H.; HE, Z. Effect of raw material variability of glipizide on the in vitro dissolution rate and in vivo bioavailability performance: the

importance of particle size. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Accepted Manuscript, 2018.