

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E  
PROPRIEDADE INTELECTUAL

DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E  
ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO  
EM GEL DE DICLORIDRATO DE CLOREXIDINA DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

THIAGO ABÍLIO LOPES ROCHA

Belo Horizonte

2015

THIAGO ABÍLIO LOPES ROCHA

DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E  
ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO  
EM GEL DE DICLORIDRATO DE CLOREXIDINA DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E  
PROPRIEDADE INTELECTUAL DO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS  
GERAIS PARA CUMPRIMENTO DAS  
EXIGÊNCIAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE MESTRE EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA  
E PROPRIEDADE INTELECTUAL PELA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS  
GERAIS

ORIENTADOR: PROFA. DRA. MARIA ESPERANZA CORTÉS SEGURA (UFMG)

COORIENTADOR: PROF. DR. RUBEN DARIO SINISTERRA MILLÁN (UFMG)

Belo Horizonte

2015

- 043 Rocha, Thiago Abílio Lopes.  
Desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da qualidade e estabilidade da  
formulação em gel de dicloridrato de clorexidina de liberação prolongada  
[manuscrito] / Thiago Abílio Lopes Rocha. – 2015.  
104 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Maria Esperanza Cortês Segura. Co-orientador: Ruben Dario  
Sinisterra Millán.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas.

1. Clorexidina - Teses. 2. Ciclodextrina - Teses. 3. Inovação incremental. 4.  
Solubilidade - Teses. 5. Excipientes - Teses. 6. Gel - Teses. 7. Estabilidade -  
Teses. I. Cortês Segura, Maria Esperanza. II. Millán, Ruben Dario Sinisterra. III.  
Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV.  
Título.

CDU: 57

**“DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO EM GEL DE DICLORIDRATO DE CLOREXIDINA DE LIBERAÇÃO PROLONGADA”.**

**THIAGO ABÍLIO LOPES ROCHA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 15 de abril de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:



DRA. CYNTHIA CABRAL RIBEIRO  
DEP. DE QUÍMICA/UFMG



DR. PEDRO PIRES GOULART GUIMARÃES  
ICB/UFMG



PROF. DR. RUBEN DARIO SINISTERRA MILLAN  
DEP. DE QUÍMICA/UFMG, CO-ORIENTADOR



PROFA. DRA. MARIA ESPERANZA CORTÉS SEGURA  
DEP. DE ODONTOLOGIA/UFMG, ORIENTADORA

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 15 de abril de 2015.

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais, Abílio e Rosária, que sempre se doaram em prol da minha formação como pessoa e profissional, acreditando nas minhas decisões e as apoiando.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a fé necessária para superar os desafios em todos os aspectos da vida.

A toda minha família, que entendeu minhas ausências e abdições necessárias à doação neste trabalho. Um abraço carinhoso a meus pais Abílio e Rosária, minha irmã Thalita e à sempre presente Vó Amélia que, juntamente com o Vovô João, Vovó Lourdes e meu saudoso Vovô Deca, tornaram meus momentos realmente valiosos.

Ao Tio Leco, por acreditar, persistir e perseverar junto comigo nesta empreitada. Nada disso seria possível sem nossas longas conversas e discussões junto com os conselhos da Sandra.

Ao meu amigo Alesandro, que mesmo em outro continente, se dispôs a me incentivar e direcionar quanto a busca de aperfeiçoamento.

A Juçara, amiga dos conselhos da vida e de conversas acadêmicas que, como sempre, entendeu meu contexto e me ajudou nas horas atribuladas.

Aos colegas de mestrado e todo o corpo docente, com quem desfrutei a companhia e aprendizado no programa de Mestrado do ICB-UFMG.

Aos professores Dr. Ruben e Dra. Esperanza por me orientarem e me darem o projeto com plena liberdade de trabalho. Obrigado também pela paciência e por somarem em minha vida, mostrando que mesclar experiência de trabalho com formação acadêmica leva a caminhos maiores e melhores, compartilhados entre quem se dispõe a fazer e as pessoas que estão ao seu redor.

A Dra. Karina, pela ajuda e ambientação na FO-UFMG, assim como pelos conselhos e suporte científico enriquecendo este trabalho.

À Ariane, minha amiga de Goiás, estado que tanto amo. Obrigado por me escutar e me ajudar nos ensaios de infravermelho, mas principalmente por doar seu tempo me ajudando a estruturar minhas ideias no momento em que mais precisei.

A Moniquinha, amiga para quase todos os momentos, por ajudar com seus conhecimentos analíticos e conversas nas horas mais inesperadas.

À todos os meus colegas de trabalho de todas as áreas da empresa, em especial à amiga Núbia, que acompanharam minha jornada e muitas vezes aguardavam meu retorno à empresa para solucionarmos os desafios diários.

A toda equipe do Desenvolvimento: Carol, Caroline, Flávia, Geraldo, Gabriel, Igor, e em especial a Kelen e Raquel colegas de Farmacotécnica, obrigado por me ajudarem tecnicamente e psicologicamente, apoiando e doando seu tempo para a realização dos testes. Vocês foram meu alicerce.

Ao Leonardo, amigo, colega de trabalho e agora mestrando, obrigado pelo desenvolvimento metodológico, foi essencial neste projeto e no meu aprendizado analítico, mas muitos mais no fortalecimento de minha crença que as pessoas devem se ajudar.

Ao Pharmascience Laboratórios LTDA por ter cedido toda estrutura farmacotécnica, analítica, microbiológica e de estabilidade e de tempo, sem este auxílio não poderia ter realizado este projeto.

*“O esforço é sempre temporário,  
algumas glórias são para sempre.”*

## RESUMO

O presente trabalho envolveu o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de dicloridrato de clorexidina (CxC) complexado em betaciclodextrina ( $\beta$ CD) na proporção molar 1:1. Através desta abordagem de inovação incremental foi possível aumentar a solubilidade do ativo em água. A formação do complexo CxC: $\beta$ CD foi evidenciada por testes de solubilidade e espectrofotometria na região do infravermelho. Pautado na racionalidade técnica, regulatória e comercial, excipientes de baixo custo, com funções farmacotécnicas definidas e dentro de suas concentrações de uso, foram elencados para compor a matriz do gel. Processos produtivos padronizados e replicáveis de obtenção do composto fármaco-ciclodextrina e da formulação final foram obtidos de forma a torná-los escalonáveis em ambiente industrial. A avaliação da estabilidade do produto foi realizada por 6 meses em três condições de temperatura e umidade, através da quantificação do teor de dicloridrato de clorexidina, do limite de *p*-cloroanilina (impureza) e das avaliações físicas, de pH e microbiológicas. O gel se manteve estável em duas das três condições: ( $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ /  $60\%\pm 5\%\text{UR}$  e  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Na condição mais drástica ( $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ /  $75\%\pm 5\%\text{UR}$ ) houve queda de teor de CxC no T6<sup>o</sup>mês. Todos os demais parâmetros se mantiveram dentro de suas especificações, inclusive para a impureza. Estes resultados demonstram boa estabilização proporcionada pela ciclodextrina e possibilidade de estudos mais aprofundados como os de longa duração ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ /  $75\%\pm 5\%\text{UR}$  por 24 meses) com esta composição binária ou proporções superiores.

**Palavras-chave:** Clorexidina, Ciclodextrina, inovação incremental, solubilidade, excipientes, gel, estabilidade



## ABSTRACT

The current work involved the development of a controlled release system of chlorhexidine dihydrochloride (CxC) complexed with betacyclodextrin ( $\beta$ CD) in the molar ratio (1:1). Through this incremental innovation approach, it was possible to increase the solubility of the active in water. The complex CxC: $\beta$ CD formation was evidenced by solubility tests and in the infrared spectrophotometry. Based on the technical, regulatory and commercial rationality, inexpensive excipients, with defined pharmacotechnical functions and within their usual concentrations were used form a gel matrix. Standardized and reproducible production process for obtaining a drug-cyclodextrin compound and the final formulation were obtained in a manner scalable to make them in an industrial environment. The evaluation of the stability of the product was executed for six months under three conditions of temperature and humidity by quantifying the level of chlorhexidine dihydrochloride, *p*-chloroaniline limit (impurity), physical assessments, pH values and microbiological results. The gel remained stable in two of three conditions ( $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ /  $60\%\pm 5\%\text{RU}$  and  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ). In the most drastic condition ( $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ /  $75\%\pm 5\%\text{RU}$ ) there was a decrease in the level of CxC in the T6<sup>o</sup>month. All others parameters remained within its specifications, including the impurity. These results demonstrated good stabilization provided by cyclodextrin and the possibility of further studies such as long-term ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ /  $75\%\pm 5\%\text{RU}$  for 24 months) with this binary composition or higher proportions.

**Key words:** Chlorhexidine, cyclodextrin, incremental innovation, solubility, excipients, gel, stability

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - Estrutura química do digluconato de clorexidina.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 2 - Estrutura química do dicloridrato de clorexidina. ....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 3 - Representação da cavidade hidrofóbica e grupos hidroxilas da betaciclodextrina. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 4 - Estrutura molecular da betaciclodextrina e suas sete unidades de glicose. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 5 - Formação do complexo CxC:βCD (1:1).....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 6 - Representação visual da bisnaga utilizada como acondicionamento primário do gel. ....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 7 - Espectros na região do infravermelho de CxC, βCD e CxC:βCD (1:1). ....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 8 - Representação visual dos géis após 24h de manufatura retirados das bisnagas e expostos em vidro de relógio: Placebo (1), Placebo (2) e Fortificado (amostra contendo o ativo não complexado em betaciclodextrina). ....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 9 - Característica visual da fórmula padrão .....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 10 - Característica visual da fórmula padrão após o envase em bisnaga.....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 11 - Cromatograma de clorexidina obtido com as condições cromatográficas desenvolvidas e otimizadas. Condições: eluição gradiente, FM: acetonitrila e solução aquosa de trietilamina 1% v/v pH 3,0, fluxo 1,5 mL/min, temperatura 40 °C, detecção UV/DAD λ 239 nm, volume de injeção 2 µL.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 12 – Cromatograma de clorexidina junto à impureza <i>p</i>-cloroanilina obtido com as condições cromatográficas desenvolvidas e otimizadas. Condições: eluição gradiente, FM: acetonitrila e solução aquosa de trietilamina 1% v/v pH 3,0, fluxo 1,5 mL/min, temperatura 40 °C, detecção UV/DAD λ 239 nm, volume de injeção 2 µL.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 13 - Cromatogramas da solução placebo.....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 14 - Cromatogramas da solução placebo fortificada com padrão de acetato de clorexidina. ....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 15 - Curva analítica para avaliação da linearidade do método para determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE. ....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 16 - Estruturas moleculares do dicloridrato de clorexidina e da <i>p</i>-cloroanilina exibindo o ponto de clivagem e formação da impureza. ....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 17 – Representação visual da preparação farmacêutica ao fim da Condição 1 de estudo de estabilidade acelerada.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Maiores mercados farmacêuticos.....</b>	<b>21</b>
<b>Tabela 2 - Características físicas e químicas do dicloridrato de clorexidina. ....</b>	<b>30</b>
<b>Tabela 3 - Resumo da algumas propriedades das ciclodextrinas (CD).....</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 4 - Métodos empregados na obtenção de complexos fármaco-CD.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabela 5 - Tipos de instabilidades em medicamentos. ....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 6 - Estequiometria para o preparo de soluções aquosas na proporção molar (1:1) de fármaco-CD. ....</b>	<b>46</b>
<b>Tabela 7 - Tabela representativa dos quantitativos de dicloridrato de clorexidina, betaciclodextrina e do solvente utilizado no preparo das soluções individuais.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 8 - Estequiometria proporção molar (1:1) do complexo fármaco-CD.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 9 - Gradiente de eluição das fases móveis do método de doseamento de dicloridrato de clorexidina da monografia da USP 2014. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 10 - Parâmetros cromatográficos e especificações do método analítico.....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 11 - Gradiente de eluição das fases móveis. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 12 - Preparo das soluções de clorexidina em diluente para construção da curva analítica e avaliação da linearidade. ....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 13 - Termos descritivos de solubilidade e seus significados. ....</b>	<b>65</b>
<b>Tabela 14 - Composição quali/quantitativa do complexo Fármaco-CD. ....</b>	<b>69</b>
<b>Tabela 15 - Composição quali/quantitativa de excipientes da matriz do gel.....</b>	<b>71</b>
<b>Tabela 16 - Caracterização física do aspecto dos géis fortificado e placebos. ....</b>	<b>72</b>
<b>Tabela 17 - Valores de pH obtidos a partir dos géis fortificado e placebos.....</b>	<b>74</b>
<b>Tabela 18 - Performance visual e leituras de pH dos géis manipulados através do delineamento do processo produtivo. ....</b>	<b>76</b>
<b>Tabela 19 - Resultados de avaliação da linearidade do método para determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE. ....</b>	<b>83</b>
<b>Tabela 20 - Resultados de avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método de determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE.....</b>	<b>84</b>

<b>Tabela 21 - Resultados de avaliação da exatidão do método de determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE pela recuperação de ativo adicionado ao placebo.....</b>	<b>85</b>
<b>Tabela 22 - Resultados de avaliação da robustez do método de determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE. ....</b>	<b>86</b>
<b>Tabela 23 - Condição 1 de armazenamento a 15-30°C. ....</b>	<b>87</b>
<b>Tabela 24 - Condição 1 - Resultados Microbiológicos.....</b>	<b>90</b>
<b>Tabela 25 - Condição 2 de armazenamento a 2-8°C. ....</b>	<b>91</b>
<b>Tabela 26 - Condição 2 - Resultados Microbiológicos.....</b>	<b>92</b>
<b>Tabela 27 - Condição 3 de armazenamento a 2-8°C. ....</b>	<b>93</b>
<b>Tabela 28 - Condição 3 - Resultados Microbiológicos.....</b>	<b>94</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACN	Acetonitrila
BP	<i>British Pharmacopoea</i>
BPF	Boas Práticas de Liberação
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CD	Ciclodextrinas
CGTase	Ciclodextrina-glicosiltransferase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CoA	<i>Certificate of Analysis</i>
Cx	Clorexidina
CxA	Acetato de Clorexidina
CxC	Dicloridrato de Clorexidina
CxG	Digluconato de Clorexidina
CxA:βCD	Acetato de Clorexidina: Betaciclodextrina
CxG:βCD	Digluconato de Clorexidina: Betaciclodextrina
CxC:βCD	Dicloridrato de Clorexidina: Betaciclodextrina
DCB	Denominação Comum Brasileira
DPR	Desvio padrão relativo
DMF	<i>Drug Master File</i>
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
F.BRAS	Farmacopeia Brasileira
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSK	GlaxoSmithKline

HB	<i>Handbook of Pharmaceutical Excipients</i>
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IF	Insumo Farmacêutico
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IFNA	Insumo Farmacêutico Não-ativo
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JP	<i>Japanese Pharmacopoea</i>
MS	Ministério da Saúde
NCE	<i>New Chemical Entity</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pCLA	<i>p</i> -cloroanilina
PD&I	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PhEur	<i>European Pharmacopoeia</i>
PNSB	Programa Nacional de Saúde Bucal
p/v	Peso por volume
p/p	Peso por peso
q.s.p.	Quantidade suficiente para
SINDUSFARMA	Sindicato das Indústrias Farmacêuticas do Estado de São Paulo
SLC	Sistema(s) de Liberação Controlado(a)(os)(as)
SUS	Sistema Único de Saúde
TEA	Trietilamina
USP	<i>United States Pharmacopoea</i>
UR	Umidade Relativa
UFC	Unidade formadora de colônia

VR	Valor Rotulado
WHO	<i>World Health Organization</i>
$\alpha$ CD	Alfaciclodextrina
$\beta$ CD	Betaciclodextrina
$\gamma$ CD	Gamaciclodextrina

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
1.1. Indústria Farmacêutica e inovação .....	20
1.2. A clorexidina na terapêutica: uma possibilidade de inovação.....	22
1.3. Estudo do insumo farmacêutico ativo: dicloridrato de clorexidina .....	28
1.4. Ciclodextrinas.....	31
1.5. Processo de encapsulamento de fármacos: inclusão em ciclodextrinas.....	34
1.6. Considerações sobre o delineamento, pré-formulação e desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos .....	37
1.7. Considerações sobre o estudo de estabilidade de medicamentos .....	39
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
2.1. Objetivo geral .....	43
2.2. Objetivos específicos .....	43
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
3.1. Equipamentos.....	44
3.2. Reagentes e Padrões .....	44
3.3. Materiais.....	45
3.4. Métodos.....	45
3.4.1. Avaliação da solubilidade do dicloridrato de clorexidina.....	45
3.4.2. Alternativa farmacotécnica para a estabilização de clorexidina em ciclodextrinas: preparo dos compostos de inclusão .....	46
3.4.3. Liofilização do composto de inclusão na proporção molar 1:1 .....	48
3.4.4. Caracterização do composto de inclusão na proporção molar 1:1 liofilizado .....	48
3.4.5. Seleção de excipientes e composição da fórmula padrão .....	49
3.4.6. Preparo dos géis fortificado e placebos.....	50
3.4.7. Caracterização dos géis fortificado e placebos.....	51
3.4.8. Desenvolvimento do processo produtivo e preparo do gel aquoso com o composto de inclusão Cx $\alpha$ : $\beta$ CD (1:1) .....	52



3.4.9. Desenvolvimento de método analítico para a quantificação do dicloridrato de clorexidina presente na formulação.....	54
3.4.10. Preparo da amostra para a quantificação de dicloridrato de clorexidina presente na formulação.....	56
3.4.11. Preparo da amostra para a quantificação de <i>p</i> -cloroanilina presente na formulação.....	56
3.4.12. Validação de método analítico por CLAE para quantificação de dicloridrato de clorexidina presente na formulação.....	57
3.4.13. Estudo de estabilidade .....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1. Avaliação da solubilidade do dicloridrato de clorexidina.....	65
4.2. Alternativa farmacotécnica para a estabilização de clorexidina em ciclodextrinas: preparo dos compostos de inclusão .....	66
4.3. Caracterização do composto de inclusão na proporção molar 1:1 liofilizado .....	67
4.4. Desenvolvimento da matriz mucoadesiva.....	68
4.5. Caracterização dos géis fortificado e placebos.....	72
4.5.1. Aspecto dos géis fortificado e placebos .....	72
4.5.2. Determinação do pH dos géis fortificado e placebos .....	74
4.6. Desenvolvimento do processo produtivo .....	75
4.7. Caracterização da fórmula padrão .....	77
4.7.1. Aspecto da fórmula padrão.....	77
4.7.2. Determinação do pH da fórmula padrão.....	78
4.8. Especificação técnica de produto acabado .....	79
4.9. Desenvolvimento de método analítico por CLAE para a quantificação de dicloridrato de clorexidina presente na formulação.....	80
4.10. Validação de método analítico por CLAE para quantificação de dicloridrato de clorexidina presente na formulação.....	82
4.10.1. Seletividade .....	82
4.10.2. Linearidade .....	823
4.10.3. Repetitividade.....	824
4.10.4. Exatidão.....	85

<b>4.10.5. Robustez .....</b>	<b>85</b>
<b>4.11. Estudo de estabilidade .....</b>	<b>86</b>
<b>4.11.1. Condição 1 de estudo de estabilidade.....</b>	<b>86</b>
<b>4.11.2. Condição 2 de estudo de estabilidade.....</b>	<b>90</b>
<b>4.11.3. Condição 3 de estudo de estabilidade.....</b>	<b>92</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>

## INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica brasileira tornou-se expressivamente produtiva, mas ainda pouco competitiva globalmente. Dar sustentabilidade às organizações via ações de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de medicamentos que tragam qualidade de vida à população (MS, 2014), tornou-se imperativo (PALMEIRA FILHO et al., 2012). Neste contexto, desafios e possibilidades de inovação são alçados nas diversas áreas das ciências da vida.

Especialmente em odontologia, a saúde bucal é parte integral da saúde geral (DAB, 2014; MS, 2004; WHO, 2014). Acometimentos periodontais e gengivites surgem como plataforma de melhoria nos serviços de saúde e permitem alçar estratégias inovadoras frente aos tratamentos convencionais. Os sais de clorexidina consagram-se neste ambiente pelo amplo espectro de ação, baixa toxicidade e ausência de resistência. Apesar das vantagens, importantes efeitos adversos limitam seu uso como manchas no esmalte, na língua e nas restaurações dentárias; alteração no paladar e gosto fortemente amargo de difícil mascaramento (CORTÉS et al., 2001).

Estudos aprofundados trouxeram a possibilidade de alterar a solubilidade do Dicloridrato de Clorexidina, para obter uma forma farmacêutica em gel de liberação prolongada (Qi et al., 1994; CORTÉS, 1999). A opção por uma matriz mucoadesiva contendo um fármaco pouco solúvel complexado em ciclodextrina, parte do pressuposto de que estes sistemas podem ser aplicados localmente e que, quando oriundos de inovações incrementais de moléculas com baixo custo, estimulam e fortalecem as ações de P&D na área de fármacos e medicamentos.

Espera-se, com este enfoque, obter e avaliar a estabilidade de uma formulação que mantenha a atividade da clorexidina, permitindo a ampliação do seu período de ação, assim como dispor de um tratamento clínico adequado num universo de produtos com pouca adesão e efeitos desagradáveis pronunciados.

# 1. REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1. Indústria Farmacêutica e inovação

A indústria farmacêutica possui como características principais o elevado dinamismo e o alto grau de globalização, crescendo a taxas superiores àquelas vivenciadas pela economia mundial. O seu sucesso está pautado na Pesquisa e Desenvolvimento, assim sendo, o P&D é o início da cadeia de valor e o valor de criação mais importante desse setor (PALMEIRA FILHO et al.,2012).

Os países desenvolvidos concentram os estágios de produção de fármacos e, especialmente os estágios de P&D. Os países em desenvolvimento atuam, principalmente, nos estágios de produção de especialidades farmacêuticas, na realização dos testes clínicos, em especial nas fases 3 (segurança, eficácia e monitoramento de reações adversas) e 4 (vigilância pós-comercialização e investigações clínicas continuadas); e no marketing e comercialização de medicamentos líderes de vendas (ALLEN Jr.; POPOVICH; ANSEL, 2007; SELAN; KANNEBLEY; PORTO, 2007).

O Brasil, em contrapartida, continental e globalmente, destaca-se como um dos mercados em que a indústria farmacêutica experimentará elevadas taxas de crescimento nos próximos anos. Segundo Campbell (2011), o mercado farmacêutico brasileiro elevará ainda mais sua demanda por produtos e serviços de saúde, fazendo com que este mercado se consolide no sexto lugar do ranking global de mercados consumidores farmacêuticos, à frente, por exemplo, de países como Itália, Índia, Espanha, Rússia e Reino Unido.

Na **Tabela 1** é apresentada a evolução dos mercados farmacêuticos mundiais.

**Tabela 1 - Maiores mercados farmacêuticos.**

	Ranking 2005	Ranking 2010	Ranking 2015
1	Estados Unidos	Estados Unidos	Estados Unidos
2	Japão	Japão	Japão
3	França	China	China
4	Alemanha	Alemanha	Alemanha
5	Itália	França	França
6	Reino Unido	Itália	Brasil
7	Espanha	Brasil	Itália
8	Canadá	Espanha	Índia
9	China	Canadá	Espanha
10	Brasil	Reino Unido	Rússia
11	México	Rússia	Canadá
12	Austrália	Índia	Reino Unido
13	Coreia do Sul	Austrália	Venezuela
14	Turquia	México	Turquia
15	Índia	Coreia do Sul	Coreia do Sul
16	Rússia	Turquia	Austrália
17	Holanda	Polônia	México
18	Bélgica	Holanda	Argentina
19	Polônia	Bélgica	Polônia
20	Grécia	Grécia	Bélgica

Fonte: adaptado de Campbell (2011).

O Sindicato da Indústria Farmacêutica do Estado de São Paulo (SINDUSFARMA), principal associação setorial e com indústrias associadas de todo as regiões do país, aponta que o mercado farmacêutico brasileiro encerrará o ano de 2014 com vendas superiores a R\$ 64 bilhões, considerando apenas o canal farmácia (vendas no varejo).

No entanto, ao avaliar as exportações brasileiras frente às importações observamos que, no total acumulado até outubro de 2014, o País exportou US\$ 192.964.517.599,00 sendo 1.324.236.717,00 ou 0,69%, a participação de produtos farmacêuticos neste total. Ao passo que, no mesmo período, as importações foram de US\$ 193.836.680.246,00 sendo US\$ 6.267.478.751,00 ou 3,23%, produtos farmacêuticos no total importado. Um percentual negativo quase seis vezes superior ao exportado (SINDUSFARMA, 2014).

Este fato corrobora a necessidade de produzir tecnologia inovadora em medicamentos ao longo de toda a cadeia produtiva no Brasil, colaborando para alcançar a universalidade do acesso à saúde, ao mesmo tempo que amplia a competitividade das empresas nacionais, uma vez que o setor industrial

farmacêutico é tido como atividade-chave para o desenvolvimento social, econômico e industrial do país (PALMEIRA FILHO et al., 2012).

O'Sullivam (2006) destaca que, de forma geral, a inovação é sempre uma atividade de longo a médio prazo, intensiva em capital e carregada de risco. Significativos aportes financeiros são necessários para seu início, sustentação e término. Tal incumbência pode ser trabalhada exclusivamente no âmbito privado com atividades e recursos internos das empresas, mas talvez de maneira mais sustentável, por meio de financiamentos públicos, leis de incentivo à inovação, parcerias público-privadas, entre empresas e centros de pesquisa e instituições de ensino superior (SELAN; KANNEBLEY; PORTO, 2007).

Na indústria farmacêutica brasileira, em especial, é visível, necessário e crescente o financiamento de atividades de P&D por órgãos fomentadores governamentais e privados mobilizando organizações que incorporam desde o conhecimento químico clássico (PALMEIRA FILHO et al., 2012) até novas estratégias tecnológicas relacionadas ao desenvolvimento de fármacos como: terapia gênica, terapia celular, biotecnologia, nanotecnologia, tecnologias disruptivas e inovações incrementais em moléculas.

Estas medidas e ações poderão mudar de patamar o painel da indústria farmacêutica nacional, hoje composto prioritariamente por organizações de baixo grau de investimento em PD&I, que replicam moléculas criadas por outras indústrias cujas patentes expiraram (medicamentos genéricos), para empresas com maior intensidade de esforço tecnológico em um setor que é, mundialmente, um dos mais intensivos em tecnologia (BRASIL 1996; BRASIL, 1999; SELAN; KANNEBLEY; PORTO, 2007).

## **1.2. A clorexidina na terapêutica: uma possibilidade de inovação**

As doenças bucais, além de restringirem as atividades escolares, no trabalho e em casa, causam um impacto psicossocial negativo na qualidade de vida e bem estar das pessoas. Assim, a saúde bucal é tida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em políticas básicas, como parte integrante e essencial para a saúde geral. Muito além de uma questão estética, refere-se à ausência de doenças

crônicas, orofaciais, lesões no tecido bucal, câncer na boca e faringe, e outras desordens que possam afetar os tecidos bucais, dentais e o complexo craniofacial (WHO, 2014).

Esta premissa da OMS vai de encontro à Política Nacional de Saúde Bucal (PNSB) – Programa Brasil Sorridente, que constitui-se em uma série de medidas que visam garantir ações de promoção, prevenção e recuperação da saúde bucal dos brasileiros, fundamental para a saúde geral e qualidade de vida da população por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) (DAB, 2014).

Essa política pública instaurada em 2004 pelo Ministério da Saúde (MS), justamente proporciona um ambiente para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes na profilaxia e tratamento de doenças bucais, estimulando ações de pesquisa e desenvolvimento de produtos farmacêuticos nessa linha, ao mesmo tempo que visa melhorar as condições de saúde bucal de milhões de pessoas no país. Por esta ótica, tanto o fomento às atividades de P&D quanto a ampliação do acesso à saúde, ambos extremamente necessários, seriam metas tangíveis de serem traçadas e alcançadas (MS, 2004; DAB, 2014).

Particularmente, no âmbito de doenças periodontais e gengivites, diversas estratégias inovadoras de desenvolvimento de novas moléculas (MENEGON, 2009) e/ou matrizes de liberação modificada (RASO et al., 2009) têm sido estudadas e trabalhadas, conjuntamente com a condução de estudos (CORTÉS et al., 2001) no sentido de avaliar o impacto dos microrganismos presentes tanto nos estágios iniciais quanto na progressão daqueles acometimentos.

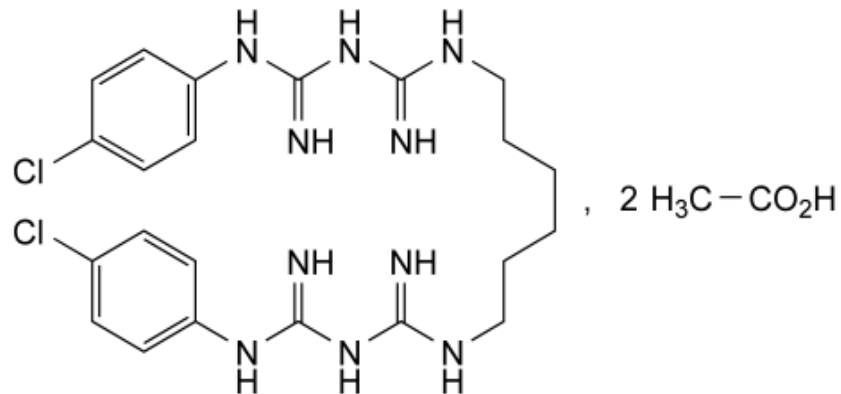
A placa bacteriana é apontada clinicamente como o principal fator etiológico envolvido na manifestação de gengivite crônica, assim como outros microrganismos específicos, como por exemplo, o *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que demonstram participar de doenças periodontais crônicas (CORTÉS et al., 2001). As bactérias formadoras do biofilme são habitantes normais da cavidade bucal que recobrem a superfície dos dentes porém, não havendo interferência em seu processo colonizatório, o biofilme dental se modifica quali e quantitativamente, tornando-se mais propício ao aparecimento da doença periodontal inflamatória (LISTGARTEN, 1987; CHRISTERSSON et al., 1989; CORTÉS et al., 2001).

É notório em odontologia que os sais Clorexidina (Cx) apresentam um efeito anti-placa marcadamente superior a outros agentes antissépticos testados na prática clínica. A efetividade deste biocida no controle da placa supragengival e no tratamento da gengivite é devida à sua “substantividade”, ou seja, a capacidade de se adsorver às superfícies sendo retida por algumas estruturas da cavidade oral como a hidroxiapatita, proteínas salivares e polissacarídeos extracelulares bacterianos (CORTÉS et al., 2001). Dada sua natureza bicatiônica, a Cx liga-se fortemente a grupos carregados negativamente (ex: grupos hidroxila) (GJERMO et al., 1973; BARKVOLL et al., 1988). Estas propriedades que permitem à Cx se ligar e alterar o potencial das membranas e paredes celulares causando suas rupturas, seriam seu grande diferencial sobre os demais agentes antimicrobianos (JENKINS et al., 1988; JONES, 1997; TEIXEIRA et al. 2012).

Contudo, apesar deste composto bisbisguanídínico demonstrar excelente atividade antisséptica e desinfetante, com amplo espectro de ação no pH fisiológico e ausência de resistência de microrganismos relatada, as mesmas propriedades que amplificam sua atividade biológica, ao que tudo indica, seriam também responsáveis por seus efeitos colaterais mais pronunciados: manchas sobre esmalte dos dentes, língua e restaurações dentárias, alteração no paladar devido à interação com as papilas gustativas e um gosto fortemente amargo, de difícil mascaramento farmacotécnico (FLÖTRA et al., 1971; CORTÉS et al., 2001).

A forma mais utilizada da clorexidina no Brasil e no mundo para prevenção de gengivite, controle de placa bacteriana e candidíase oral tem sido a solução de digluconato de clorexidina (CxG) a 20% conforme apresentado na **Figura 1**. Suas preparações variam em teor de 0,12% a 0,2% em meio hidroalcoólico, prioritariamente, e géis dentais a 0,2% e 1,0% de CxG, sendo estas últimas, preparações menos comuns (GLAXOSMITHKLINE, 2014; LACER, 2014).





**Figura 1 - Estrutura química do digluconato de clorexidina.**

No mercado nacional possuímos comercialmente os produtos Periogard® pertencente à americana Colgate-Palmolive e seus concorrentes nacionais, como o Noplak® Max, do laboratório fluminense Daudt e o Perioplak®, comercializado pelo laboratório goiano Reymer do Brasil, entre outros; todos utilizando o CxG em suas preparações (COLGATE-PALMOLIVE, 2014; DAUDT, 2014; REYMER, 2014).

Internacionalmente, grandes corporações como a indústria farmacêutica anglo-holandesa GSK, trabalham com o CxG em creme dental, colutório, spray e gel dental (Corsodyl®), ocorrendo o mesmo com o laboratório catalão Lacer S.A. e sua Lacer® Chlorexidina. Já a norte americana de consumo 3M, tida como uma das empresas mais inovadoras do mundo, em sua divisão *Dental Professionals*, como a grande maioria das outras organizações, conta com o CxG sob a forma de enxaguatório bucal a 0,12% (Peridex™) (3M, 2014; GLAXOSMITHKLINE, 2014; LACER, 2014).

Com estes dados globais observa-se que, independente do laboratório, marca e formas farmacêuticas comercializadas, o sal de clorexidina utilizado é sempre o digluconato em solução diluída, evidenciando que as posologias são parecidas à prática convencional e, portanto, os efeitos colaterais são semelhantes aos até então listados.

Outro dado interessante aponta que, dos 41 estudos clínicos listados no *Clinical Trials*, pesquisados de forma a atrelar, especificamente, tratamentos de gengivites e periodontites (“*Gum Diseases*” – *Gingivitis and Periodontal Disease*) com o uso de clorexidina, 32 estão concluídos, um se encontra aberto, mas não recrutando voluntários, 4 estão em fase de recrutamento, outros 3 não encontram-se

em fase de recrutamento e um único estudo desconhecido é relatado dentro deste universo. Porém, nenhum deles relata, exclusivamente, a utilização de diferentes sais de clorexidina como precursor da clorexidina base. Ao contrário, tanto de forma isolada, como em associações com outras classes de fármacos e até na forma de chip implantável (PerioChip<sup>®</sup> 2,5mg), o sal utilizado é sempre o convencional CxG (CLINICAL TRIALS, 2014; DEXCEL DENTAL, 2014).

Estes fatos somados aos anteriores, evidenciam a amplitude de mercado e abrangência dos acometimentos bucais na população mundial. Por consequência, demonstram também a dificuldade e o desafio de se trabalhar com a molécula de Cx e seus sais em abordagens farmacotécnicas mais inovadoras e de vanguarda.

Mantendo o foco terapêutico, mas com o intuito de prolongar a atividade antimicrobiana da Cx e, ao mesmo tempo, diminuir seus efeitos adversos, uma nova abordagem foi proposta para este fármaco: os sistemas de liberação controlada (SLC) e a utilização de diferentes sais de Cx através da proposta de formação de compostos de inclusão do tipo hospedeiro-convidado entre a betaciclodextrina ( $\beta$ CD) e a Cx (Qi et al., 1994; CORTÉS, 1999).

A preparação, caracterização e avaliação microbiológica de compostos de inclusão de dicloridrato de clorexidina: betaciclodextrina (CxC: $\beta$ CD) na proporção molar de 1:2 foram estudados por Cortés e colaboradores (2001) e trouxeram dados físico-químicos e moleculares acerca do mecanismo de complexação, bem como a potencialização dos efeitos inibitórios contra microrganismos.

Os resultados mostraram a ocorrência de fenômenos de desorganização e reorganização das moléculas após a inclusão pela atuação forças intermoleculares, passando de um estado cristalino a um estado amorfo da matéria-prima. A complexação proporcionou uma maior biodisponibilidade do ativo, possibilitando o mesmo atuar em baixa concentração por um tempo e uma efetividade maiores quando comparados à Cx não complexada (Cx livre).

Como ponto negativo, foi listada a grande dificuldade de utilização do CxC em preparações farmacêuticas devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso.

Em estudos posteriores, Denadai e colaboradores (2007) avaliaram a  $\beta$ CD como molécula carreadora de antimicrobianos. Especialmente a Cx e seus sais em diferentes proporções molares de complexo fármaco-CD (1:1, 1:2, 1:3 e 1:4). Os

resultados demonstraram a potencialidade destes sistemas com a elevação molar de ciclodextrinas (CD) em soluções. Além de melhorar sua solubilidade, os compostos auto-organizados resultantes, tornam-se mais efetivos contra os microrganismos conforme se elevava a estequiometria do complexo fármaco-CD no sentido da CD (DENADAI et al., 2007).

Um apontamento interessante foi a conclusão de que todos os compostos são estáveis físico-quimicamente, principalmente a proporção 1:2 de menor entalpia, e podem, em diferentes porcentagens, coexistir simultaneamente dentro do equilíbrio de cinética química (DENADAI et al., 2007). Estudos recentes continuam a apresentar resultados extremamente positivos quanto à eficácia e vantagens de SLC de antimicrobianos em relação aos fármacos convencionais.

Raso e colaboradores (2009) apresentaram como proposta SLC de digluconato de clorexidina (CxG) e acetato de clorexidina (CxA) complexados em betaclodextrinas (CxG: $\beta$ CD e CxA: $\beta$ CD, respectivamente) na proporção molar de 1:2 utilizando como substrato matrizes de sílica porosa, obtendo resultados *in vitro* biologicamente efetivos no controle da evolução microbiológica de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

Teixeira e colaboradores (2012) demonstraram, a nível celular de bactérias e fungos, que compostos de inclusão de dicloridrato de clorexidina (CxC) em  $\beta$ CD para a liberação controlada diminuíram as concentrações terapêuticas efetivas e, paralelamente, prolongaram a atividade antimicrobiana do fármaco. Ou seja, apresentaram potencial aplicação no controle químico do biofilme em doses e concentrações menores que aquelas já usadas em soluções, bochechos e géis de CxC livre (TEIXEIRA et al., 2012; TEIXEIRA; 2012).

Foi demonstrado nestes trabalhos, considerando os aspectos físico-químicos, uma forte correlação da atividade antimicrobiana com a estrutura dos compostos de inclusão de sais de Cx em  $\beta$ CD, onde os resultados da atividade antimicrobiana foram potencializados frente aos tratamentos convencionais (CORTÉS et al. 2001; DINIZ, 2007; DENADAI et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2012).

As conclusões positivas envolvendo SLC e, paralelamente, as dificuldades farmacotécnicas encontradas na complexação e, principalmente, a posterior veiculação da Cx, em especial o CxC, em formas farmacêuticas aquosas fomentam

o interesse no estudo e inovação na concepção de formulações comercialmente viáveis e que, técnica e terapeuticamente, consigam garantir uma aplicação homogênea do fármaco através da correta adesão à mucosa bucal e a liberação da substância ativa em quantidade necessária à eficácia antisséptica.

### **1.3. Estudo do insumo farmacêutico ativo: dicloridrato de clorexidina**

A denominação insumo farmacêutico (IF) abrange tanto insumo farmacêutico ativo (IFA), também denominado fármaco ou princípio ativo (componente farmacologicamente ativo de um medicamento), como as substâncias aditivas ou complementares, usualmente denominadas excipientes.

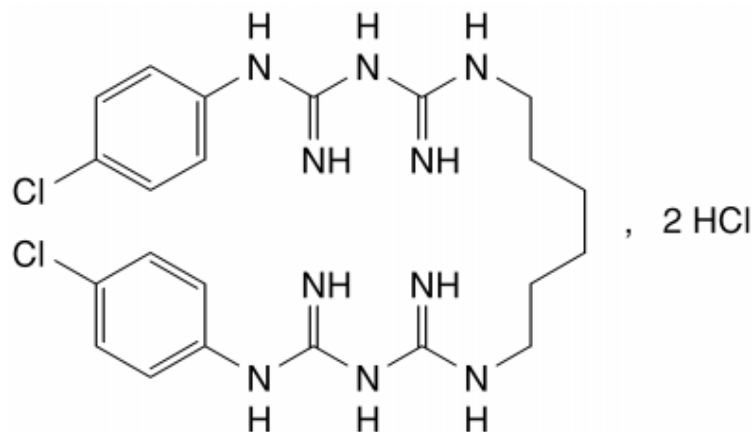
O sucesso de uma formulação farmacêutica baseia-se, inicialmente, no conhecimento do IFA utilizado. Este conhecimento se aprofunda desde o certificado do fabricante, garantindo que as Boas Práticas de Fabricação (BPF) foram respeitadas, até o conhecimento das características físico-químicas e especificações do IFA (STORPIRTIS et al., 2011), confrontadas com as especificações de fontes indexadas. Estas informações quando consideradas durante o planejamento da formulação aumentam as chances de que a mesma venha a possuir absorção e a ação farmacológica adequadas, com o mínimo de efeitos indesejáveis ou tóxicos (BANAKAR, 1992; AMIDON; BERMEJO, 2003).

A análise do IFA deve compreender as descrições existentes nas farmacopeias e, quando for o caso, para excipientes, outras fontes indexadas e respaldadas pelas agências regulatórias podem ser consultadas para esta avaliação, como o *Martindale – The Complete Drug Reference*, *Merck Index*, *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (HB) e o *International Conference and Harmonization* (ICH) (STORPIRTS et al., 2011).

Em situações técnico-regulatórias, após a assinatura de termos de confidencialidade, é disponibilizado pelo fabricante do ativo, entre outras documentações técnicas, um dossiê contendo informações sobre a fabricação daquele IFA. Este dossiê é comumente chamado de Documentação Técnica do IFA ou, mais rotineiramente, *Drug Master File* (DMF) (FDA, 1989).

O dicloridrato de clorexidina está presente na Farmacopeia Brasileira. Possui

monografias específicas nas farmacopeias internacionais: *United States Pharmacopeia* (USP 37); *British Pharmacopoeia* (BP, 2014); *European Pharmacopoeia* (Ph Eur 6.0, 2009) e *Japanese Pharmacopoeia* (JP, 2011); e nas principais fontes indexadas e respaldadas, aceitas por órgãos regulatórios do mundo, inclusive a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (HB, 2009); *Martindale* (2009) e *Merck Index* (2001). A **Figura 2** mostra a estrutura química do dicloridrato de clorexidina.



**Figura 2** - Estrutura química do dicloridrato de clorexidina.

A Cx e seus sais possuem uma ação bacteriostática a baixas concentrações ( $\approx 0,6\%$ ) e uma ação bactericida em concentrações mais elevadas (2-5%) contra uma vasta gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo menos efetivo contra estas últimas. Atua também sobre algumas espécies de *Pseudomonas* e *Proteus*, onde estas possuem uma menor susceptibilidade à sua ação e é ineficaz contra micobactérias. A atividade antimicrobiana ótima da Cx ocorre na faixa de pH entre 5 e 7. Valores de pH acima de 8 fazem com que a clorexidina base se precipite em soluções aquosas (ROWE et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2012).

Através do estudo prévio englobando levantamento bibliográfico em compêndios oficiais, fontes indexadas, produção técnico-científica sobre o tema e avaliação do CoA (*Certificate of Analysis*) do fabricante, as seguintes características físicas e químicas do CxC foram compiladas conforme apresenta a **Tabela 2**.

**Tabela 2 - Características físicas e químicas do dicloridrato de clorexidina.**

Propriedades	Descrição
Nomenclatura IUPAC	1(E)-2-[6-[(amino-[(E)-[amino-(4-chloroanilino)methylidene]amino)methylidene]amino]exyl]-1-[amino-(4-chloroanilino)methylidene]guanidine; dyhydrochloride
Fórmula Molecular	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}.2HCl$
Massa molar	578,37g/mol
Aspecto	Pó cristalino, branco ou quase branco, inodoro e de sabor amargo
Conteúdo (teor)	Não menos que 98% e não mais que 101% de $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}.2HCl$ , calculado em base anidra (seca)
Faixa de fusão	A partir de 261°C, com decomposição
Solubilidade	Insolúvel em ácido fórmico, levemente solúvel em metanol aquecido, praticamente insolúvel a moderadamente solúvel em água, moderadamente solúvel em propilenoglicol, muito ligeiramente solúvel em Etanol (96% GL) e dietiléter
pKa	10,3 (a 25°C)
LogP	4,51
Potência	98,0% ( <i>Sigma-Aldrich</i> )

Fonte: QI et al., 1994; CHEMICALIZE.ORG, 2014; Sigma-Aldrich Co. LCC, 2014; U.S. Department of Health and Human Services, 2014.

A literatura oficial, artigos e fontes indexadas referenciadas não fazem alusão à presença de polimorfismo para a molécula de clorexidina e, especificamente, o CxC não apresenta tal habilidade química de existir sob a forma de mais de uma estrutura cristalina por meio de diferentes conformações e/ou interações intra e intermoleculares que modificam o empacotamento das moléculas gerando as formas polimórficas (McCRONE, 1965; LACHMAN, 2001; MORISSETT et al., 2004).

Por conseguinte, suas propriedades mais relevantes em tecnologia farmacêutica e desenvolvimento de produtos como o ponto de fusão, higroscopicidade, propriedades óticas e elétricas, estabilidade química e física (reatividade), solubilidade, velocidade de dissolução e biodisponibilidade

(STORPIRTIS, 2011), que são dependentes da forma cristalina, são mantidas inalteradas neste composto químico. Este fato demonstra uma variável positiva de se trabalhar com esta matéria-prima em termos farmacotécnicos, de estabilidade e, principalmente, de eficácia terapêutica.

Destaca-se ainda, que os sais de Cx são estáveis à temperatura normal de armazenamento (25°C) quando na forma de pó. Contudo, o CxC é bastante higroscópico, absorvendo quantidades significativas de umidade em temperaturas de até 37°C e umidade relativa de até 80% (ROWE et al., 2009).

O aquecimento a 150°C decompõe a Cx e seus sais, gerando vestígios de *p*-cloroanilina (pCLA), uma impureza química. Rowe e colaboradores (2009) reportaram que, após autoclavagem por 30 min a 120°C e em pH 9 de uma solução de CxG a 0,02% p/v, verificou-se que 1,56% p/p do conteúdo Cx original tinha sido convertido em pCLA. Em soluções menos básicas, em pH 6,3 e pH 4,7, sob as mesmas condições, o teor de pCLA foi de 0,27% p/p e 0,13% p/p, respectivamente, do conteúdo original de CxG.

O CxC, em especial, é o sal mais termoestável, podendo ser aquecido a 150°C durante 1 hora, sem formação significativa de pCLA. Já sob a forma de soluções aquosas a reação de formação de pCLA pode ser catalisada por aquecimento em pH alcalino (ROWE et al., 2009).

O CxC portanto, como os outros sais de Cx, apresenta razoável estabilidade física e físico-química enquanto IFA candidato a utilização em formulações farmacêuticas. Em contraponto, demonstra algumas características físico-químicas que dificultam sua solubilização e conseqüentemente veiculação em matrizes aquosas bioadesivas destinadas à aplicação na cavidade oral que consigam promover sua atividade terapêutica antimicrobiana.

#### **1.4. Ciclodextrinas**

Fármacos pouco solúveis, como o CxC, para os quais a dissolução é o fator limitante para a absorção (AMIDON et al., 1995), representam um grande desafio farmacotécnico. Nesse sentido, a utilização de recursos capazes de promover sua solubilização representam uma alternativa viável (PINNAMANENI et al., 2002). Tais

recursos tecnológicos, incluem desde a simples redução do tamanho das partículas do IFA até a formulação de sistemas nanoestruturados (ALLEN Jr. et al., 2007; STORPIRTS et al., 2011).

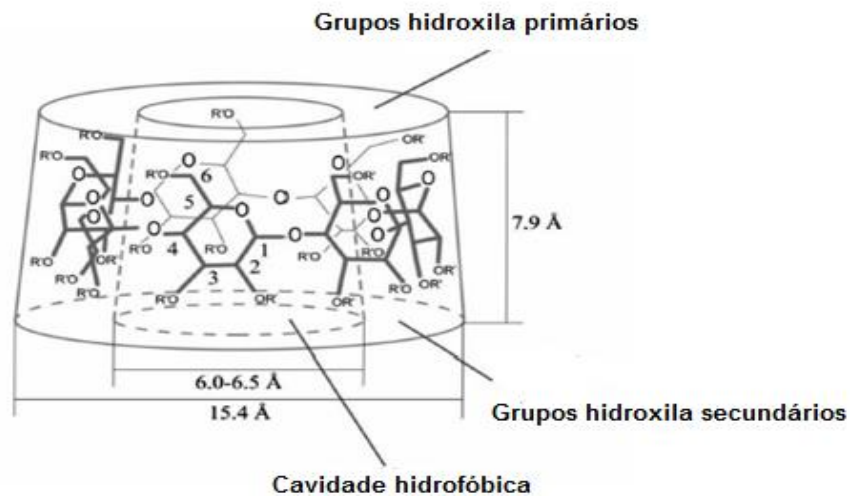
Estas estratégias não resultam em uma nova estrutura química (ou NCE – *new chemical entity*), mas sim, muitas das vezes, em produtos resultantes de inovações incrementais. Este fato minimiza gastos com desenvolvimento e simplifica o registro destes produtos (STORPIRTS et al., 2011).

A complexação de fármacos com CD está entre as estratégias mais utilizadas para aumentar a biodisponibilidade de drogas pouco solúveis. Os avanços na tecnologia de CD têm sido impressionantes e hoje já é possível encontrar uma série de medicamentos ao redor do mundo que utilizam fármacos complexados com CD (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

Entretanto, as aplicações das CD vão muito além da melhoria da biodisponibilidade de IFA pouco solúveis, sendo também empregadas para aumentar a estabilidade de moléculas instáveis, mascarar odores e sabores desagradáveis, converter fármacos líquidos em pós, dentre várias outras (VEIGA et al., 2006).

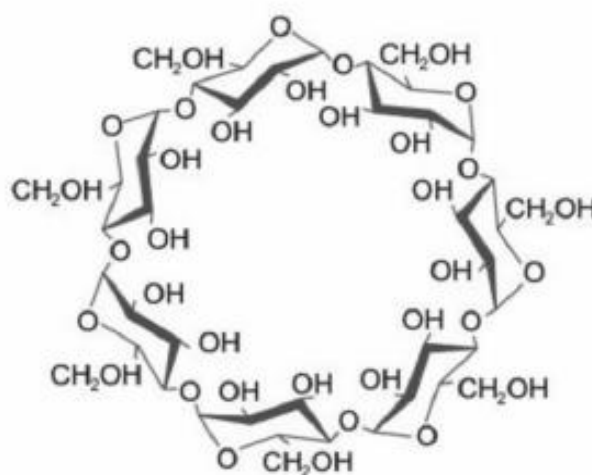
As CD são compostos que, apesar de sua solubilidade aquosa, apresentam uma cavidade central hidrofóbica (**Figura 3**) capaz, portanto, de acomodar fármacos também hidrofóbicos ou regiões hidrofóbicas das moléculas. Assim, os complexos formados a partir desta interação apresentam, em geral, solubilidade mais elevada em relação àquela observada para o IFA original (VEIGA et al., 2006; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; CARRIER et al., 2007).





**Figura 3** - Representação da cavidade hidrofóbica e grupos hidroxilas da betaciclodextrina.

As CD naturais são formadas a partir da degradação do amido pela enzima ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase). São compostas por moléculas de glicose interligadas por ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas, que as permitem conter 6, 7 ou até 8 unidades de glicose conhecidas, respectivamente, como alfaciclodextrina ou alfadex ( $\alpha$ CD), betaciclodextrina ou betadex ( $\beta$ CD) e gamaciclodextrina ( $\gamma$ CD) (DENADAI, 2007; ROWE et al., 2009; STORPIRTIS, 2011, USP, 2014). A estrutura da  $\beta$ CD e um resumo das propriedades das CD naturais é demonstrado na **Figura 4** e na **Tabela 3**, respectivamente.



**Figura 4** - Estrutura molecular da betaciclodextrina e suas sete unidades de glicose.

**Tabela 3 - Resumo da algumas propriedades das ciclodextrinas (CD).**

CD	CAS	Peso Molecular	Cavidade	Solubilidade em água	Ponto de Fusão
$\alpha$ CD	[10016-20-3]	972,84 g/mol	4,7-5,3 Å	1:7 partes a 20°C 1:3 partes a 50°C	250-260°C
$\beta$ CD	[7585-39-9]	1.134,98 g/mol	6,0-6,5 Å	1:50 partes a 20°C 1:20 partes a 50°C	255-265°C
$\gamma$ CD	[17465-86-0]	1.297,12 g/mol	7,5-8,3 Å	1:4,4 partes a 20°C 1:2 partes a 45°C	245-265°C

Nota: 1Å= 0,1nm.  $\beta$ CD é solúvel 1:200 partes em propilenoglicol.

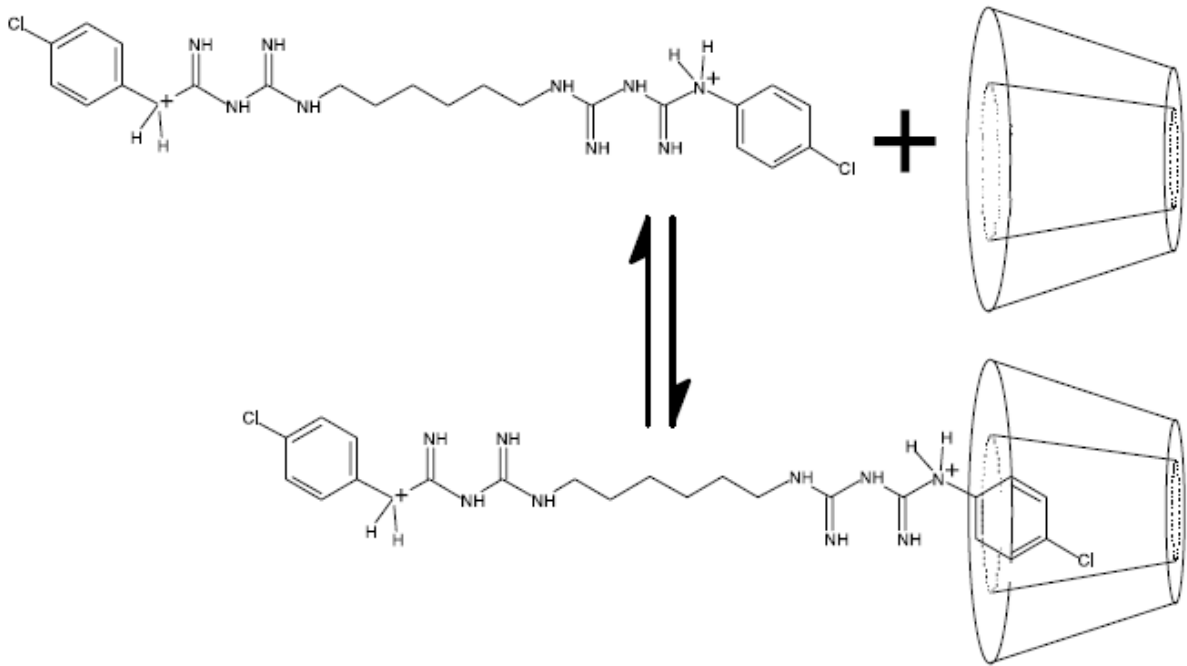
Atualmente, também é possível encontrar derivados sintéticos de CD, frutos de modificações introduzidas nas moléculas originais. Assim, foi possível obter CD mais solúveis, ampliando-se também as possibilidades de complexação dessas estruturas com um grande número de fármacos (CORTÉS et al., 2001; STORPIRTS et al., 2011).

### 1.5. Processo de encapsulamento de fármacos: inclusão em ciclodextrinas

Para que uma molécula de CD seja capaz de originar um complexo com o fármaco de escolha, é necessário que haja certo grau de compatibilidade estrutural e estereoquímica, além de propriedades físico-químicas favoráveis entre ambos. Assim, é de fundamental importância que a molécula do IFA, ou parte dela, como é mais comum, seja capaz de se ajustar à cavidade daquela CD elencada.

A alta eficiência terapêutica de complexos formados com a CD é provavelmente em função do seu pequeno tamanho relativo quando comparada com as membranas celulares. Esta característica estrutural permite que um grande número de moléculas de CD possa interagir diretamente com estas superfícies (MESMIN et al., 2009).

A localização das moléculas de CD perto da superfície da célula permite solubilização do colesterol presente na membrana que se adsorve diretamente na cavidade hidrofóbica da CD sem entrar na fase aquosa (ATGER et al., 1997; BESENICAR et al., 2008, TEIXEIRA et al., 2012). A **Figura 5** mostra esquematicamente a complexação da molécula de CxC junto à  $\beta$ CD conforme resultados encontrados por Denadai et al. (2007).



**Figura 5 - Formação do complexo CxC:βCD (1:1).**

A obtenção dos compostos pode ser feita por diferentes métodos e a opção mais adequada para cada caso é um passo importante no desenvolvimento destes sistemas (VEIGA et al., 2006). Os métodos mais empregados na obtenção de complexos fármaco-CD são descritos na **Tabela 4**.

**Tabela 4 - Métodos empregados na obtenção de complexos fármaco-CD.**

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Malaxagem	Simplicidade do método: pasta úmida da mistura fármaco-CD pela utilização de pouco solvente aquoso ou hidroalcoólico.	Complexação pouco eficiente.
Co-evaporação	Eficiência na formação de cristais de complexo fármaco-CD via precipitação de material por adição de solventes orgânicos à mistura e aplicação de temperaturas bruscas.	Baixo rendimento em grande escala. Risco de gerar complexos com a presença do solventes residuais orgânicos.
Liofilização	Elevado rendimento e baixo estresse térmico pela eliminação de solventes da solução congelada de fármaco-CD por meio de secagem a pressões reduzidas	Custo elevado. Obtenção de complexos amorfos de difícil caracterização
<i>Spray-drying</i>	Rapidez de processo de secagem da solução hidroalcoólica de fármaco-CD no equipamento para secagem por pulverização do material.	Baixo rendimento final. Não indicado para produtos termolábeis.
Fluído Supercrítico	Não emprega solventes, pois os complexos são obtidos pelo uso de CO <sub>2</sub> em estado supercrítico que rapidamente é eliminado por despressurização.	Ainda é uma técnica em estágios experimentais, com um alto investimento em equipamentos e estrutura

Através dos resultados de trabalhos que evidenciaram a capacidade da  $\beta$ CD em modificar as propriedades de IFA insolúveis, em especial a Cx, ao potencializar sua ação terapêutica frente a células procariotas e/ou eucariotas enquanto minimiza seus efeitos indesejados (TEIXEIRA, 2012), o estudo aprofundado de uma formulação capaz de veicular o composto de inclusão para tratamentos profiláticos e preventivos em periodontia torna-se um desafio e também uma oportunidade de trazer à tona uma nova possibilidade de desenvolvimento de medicamentos via de inovação incremental de moléculas.

Levando-se em consideração a importância da Cx na prática clínica odontológica e a mudança nas propriedades propiciadas pela inclusão molecular, entende-se que é importante avaliar a sua viabilidade técnica em um ambiente de laboratório de desenvolvimento farmacotécnico vislumbrando possibilidades de escalonamento industrial.

Este trabalho propõe a parametrização da preparação dos compostos de inclusão via processo de liofilização, a preparação de um gel de base aquosa como forma farmacêutica veiculadora do complexo Cx $\alpha$ : $\beta$ CD e a avaliação de sua estabilidade. Embora a literatura relate a formação de compostos com diferentes sais de Cx em diferentes matrizes (Cortés et al., 2001; Denadai et al., 2007; Raso et al., 2009), os objetivos desses pesquisadores foram diferentes dos propostos para o presente estudo.

#### **1.6. Considerações sobre o delineamento, pré-formulação e desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos**

Os fármacos, de maneira geral, não são administrados de forma isolada, mas como parte de uma formulação contendo outros insumos farmacêuticos não-ativos (IFNA) que possuem funções farmacotécnicas diversas e específicas, necessárias à obtenção da forma farmacêutica (ALLEN Jr. et al., 2007).

A escolha dos IFNA deve ser pautada na racionalidade farmacotécnica, onde os excipientes deverão ser bem estabelecidos em razão da forma farmacêutica, via de administração e em concentrações adequadas à função pretendida (BRASIL, 2011), sem deixar de avaliar, contudo, os fatores tecnológicos de produção (STORPIRTIS, 2011).

Muitas pesquisas sobre a interação fármaco-excipiente têm sido realizadas com o objetivo de otimizar os aspectos positivos destas interações, tais como o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis, estabilidade, aumento da biodisponibilidade e diminuição de efeitos adversos (KALINKOVA, 1999; GIBSON, 2009). As características de uma formulação estão diretamente relacionadas às especificações dos IFNA utilizados na composição de um medicamento, bem como ao processo produtivo definido na fase de desenvolvimento da formulação.

O FDA, por exemplo, disponibilizou uma relação de excipientes de medicamentos aprovados pela agência norte americana. Tal banco de dados lista quantidade máxima de cada IFNA para cada via de administração e forma farmacêutica conhecidas. Quando usa-se uma quantidade de excipiente diferente daquela definida na lista, deve-se justificar a ausência do efeito desse excipiente na

biodisponibilidade do fármaco (POLLI et al., 2004; FDA, 2014).

A área de atuação referente ao estudo da formulação, determinação de sua qualidade, produção, estabilidade, eficácia terapêutica e segurança é chamada de Desenvolvimento Farmacotécnico de Medicamentos (AUTON, 2005; ALLEN Jr. et al., 2007). A Farmacotécnica, por este ponto de vista, trata da técnica de incluir ou veicular o fármaco em uma forma farmacêutica adequada à via de administração e ao objetivo terapêutico desejados (STORPIRTIS, 2011). Seguindo este conceito, o medicamento final deve ser concebido com medidas apropriadas de controle de qualidade e de acondicionamento em recipientes que mantenham suas características iniciais (ALLEN Jr. et al., 2007).

A realização de uma ampla e minuciosa pesquisa bibliográfica na fase de pré-formulação (CONSIGLIERI et al., 2000; HORTER; DRESSMAN, 2001; ARAÚJO et al., 2002), durante a execução dos testes de bancada e nos testes de aumento de escala é indispensável, pois permite conhecer as características físicas, físico-químicas, farmacotécnicas e mesmo regulatórias destes componentes, selecionando-os assertiva e adequadamente, além de possibilitar trabalhar as operações unitárias mais viáveis envolvidas na fabricação.

Através da abordagem de conceitos de tecnologia farmacêutica, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento de uma composição farmacotécnica satisfatória e de um processo produtivo robusto capazes de viabilizar a formação de uma preparação farmacêutica em gel contendo CxC veiculado a 0,6% de concentração.

Os géis ou sistemas gélicos são preparações farmacêuticas semissólidas em que a fase líquida, principal componente, está inserida e organizada dentro de uma matriz polimérica tridimensional, seja ela de origem natural ou sintética, onde um elevado grau de reticulação física ou por vezes química, foi introduzido e mantido, fazendo com que dispersões de pequenas e grandes moléculas naquele veículo líquido e hidrofílico, geralmente aquoso, adquiram consistência semelhante às geleias pela adição de um adjuvante farmacêutico que funcione como promotor e agente de gelificação (LACHMAN et al., 2001; AULTON, 2005; ALLEN Jr. et al., 2007; GIBSON, 2009).

Sua principal característica é sua estrutura contínua, que lhe confere propriedades semelhantes às das preparações sólidas e sua principal funcionalidade

é a capacidade de adesão à superfície de aplicação por um período de tempo até a remoção por lavagem ou devido ao uso. Esta adesão deve-se ao seu comportamento reológico plástico que permite ao gel manter sua forma e aderir como um filme até a aplicação de uma força externa, quando então o deforma e faz fluir (LACHMAN et al., 2001; AULTON 2005; GIBSON, 2009).

Os polímeros usados para preparar géis farmacêuticos incluem desde as gomas naturais, como a adraganta, pectina e o ácido algínico, a materiais sintéticos e semissintéticos, como os derivados de celulose como a hidroxietilcelulose e a carboximetilcelulose, e os Carbopols<sup>®</sup>, que são polímeros de vinila com grupos carboxílicos ionizáveis (LACHMAN; LIERBERMAN; KANIG, 2001; GIBSON, 2009).

Além do agente gelificante e da água, as formulações de gel podem conter outros solventes como o álcool e/ou propilenoglicol, conservantes antimicrobianos, como metil e propilparabenos, e estabilizantes físico-químicos como o EDTA dissódico (LACHMAN et al., 2001; AULTON, 2005; ROWE et al., 2009).

A maioria das preparações semissólidas são aplicadas na superfície da pele, onde servem de veículos à fármacos de aplicação tópica. Contudo, uma pequena fração dessas formas farmacêuticas, entre elas os géis, destina-se à aplicação em mucosas como os tecidos retal, bucal, mucosa vaginal e nasal, membrana uretral, revestimento externo do ouvido e a córnea.

A vantagem terapêutica desta via é justamente facilitar a absorção sistêmica quando este é o objetivo, uma vez que a pele normal é relativamente impermeável (LACHMAN et al., 2001; ALLEN Jr et al., 2007).

### **1.7. Considerações sobre o estudo de estabilidade de medicamentos**

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais e de outros relacionados ao próprio produto, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Os fatores ambientais que podem reduzir a estabilidade dos medicamentos incluem exposição à temperatura adversa, luz, umidade, oxigênio e dióxido de carbono. Os fatores de formulação que influenciam a estabilidade de medicamentos

incluem aditivos químicos, excipientes, pH, composição do sistema solvente, incompatibilidade com ânions e cátions, potência da solução iônica, tamanho de partículas, difusão de fármaco e outros. Além disso, outra importante fonte de degradação é a exposição à iluminação UV que pode causar decomposição e cisão de ligações covalentes (fotólise) (SANTOS; MORETO, 2005).

Essencialmente, o estudo de estabilidade é o conjunto de avaliações que se faz para prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade dos medicamentos (SANTOS; MORETO, 2005; BRASIL, 2005). Por isso, os estudos de estabilidade baseados em princípios físicos e químicos apropriados para determinar o envelhecimento de um medicamento ou avaliar formas farmacêuticas mais estáveis para um determinado fármaco são cada vez mais necessários (LACHMAN et al., 2001).

A ANVISA, em 2005, estabeleceu o Guia para a realização de estudos de estabilidade (Resolução RE nº 1, de 2005) que traz as orientações técnicas para a realização de testes de estabilidade em produtos farmacêuticos e algumas definições importantes.

O Guia define como Estudo de Estabilidade Acelerado aquele que visa acelerar as possíveis degradações químicas e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento como metodologia para extrapolar resultados em condições exacerbadas às quais um produto pode passar durante estágios de transporte, armazenamento e distribuição, por exemplo.

Por sua vez o Estudo de Estabilidade de Longa Duração direciona para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado em condições ambientais brandas. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005).

Como recomendação técnica o Guia trata do Estudo de Fotoestabilidade, que avalia o impacto da exposição à luz como fonte de alterações na formulação. Em situações em que embalagem primária é fotoprotetora, tais como tubos de alumínio, por exemplo, os testes não precisam ser realizados (BRASIL, 2005).

Durante a realização dos testes de estabilidade de medicamentos não é



incomum o aparecimento de instabilidades que afetam a qualidade dos produtos. A **Tabela 5** apresenta um resumo das principais instabilidades ocorridas em medicamentos.

**Tabela 5 - Tipos de instabilidades em medicamentos.**

Instabilidade	Características
Química	O IFA não retém sua integridade química e sua potência rotulada dentro dos limites especificados
Física	As propriedades físicas originais incluindo aparência, paladar, uniformidade, dissolução e suspensibilidade não são mantidas
Microbiológica	Ocorre perda de esterilidade ou da resistência ao crescimento microbiano além dos limites especificados
Terapêutica	Os efeitos terapêuticos se alteram de maneira significativa
Toxicológica	Ocorre aumento significativo na toxicidade

Dentre os cinco tipos de instabilidade listados na Tabela 5, a degradação química é a desestabilização mais frequentemente observada durante e/ou após o desenvolvimento e não deixa de ser um dos focos principais do presente trabalho pelo mesmo motivo.

É razoável dizer que os processos químicos destrutivos podem apresentar-se na forma de reações de descarboxilação, desidratação mas, principalmente, decorrentes de reações de hidrólise e oxidação em medicamentos.

A hidrólise é o processo de solvólise em que as moléculas (fármaco) interagem com as moléculas de água, originando produtos de clivagem. É provavelmente a causa mais importante de decomposição, pois muitos agentes terapêuticos são ésteres ou contém grupos funcionais, tais como amidas, lactonas e lactamas, também susceptíveis a esses processos (SANTOS; MORETO, 2005; ALLEN Jr. et al., 2007).

A oxidação responde pela degradação química de muitos fármacos

derivados de aldeídos, álcoois, fenóis, açúcares, alcalóides, ácidos graxos insaturados e óleos. Quimicamente, é a perda de elétrons de um átomo ou molécula, que é aceito por outro átomo ou molécula, reduzindo o receptor. Envolve radicais livres, os quais são moléculas ou átomos contendo um ou mais elétrons desemparelhados, tais como o oxigênio molecular (atmosférico) ( $\bullet\text{O-O}\bullet$ ) e a hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ). Esses radicais tendem a tomar elétrons de outras substâncias, oxidando, assim, o doador (SANTOS; MORETO, 2005; ALLEN Jr. et al., 2007).

Muitas das mudanças oxidativas em medicamentos têm a característica das auto-oxidações. Ocorrem de forma espontânea sob a influência inicial do oxigênio atmosférico, cujo o início de processo é lento, mas seguido de alterações mais rápidas. Normalmente, acompanhado do fenômeno oxidativo o produtos farmacêuticos sofrem alterações organolépticas de cor e odor (ALLEN Jr. et al., 2007).

A avaliação cronológica da concentração (teor) do fármaco revela sua estabilidade sob condições específicas ao longo do tempo (ALLEN Jr. et al., 2007). Aliar técnicas físicas às analíticas torna o processo investigativo mais rico em informações e, conseqüentemente, provedor de dados que podem ajudar a elencar qual a melhor forma farmacêutica para determinado fármaco ou mesmo a condição de armazenamento e o material de embalagem que melhor promovem a permanência das condições satisfatórias do produto em seu prazo de validade vislumbrado durante seu desenvolvimento e posterior estudo de estabilidade.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Realizar o desenvolvimento de uma formulação em gel contendo clorexidina para o tratamento de gengivite e doenças periodontais, bem como avaliar sua estabilidade, qualidade e viabilidade técnica.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Realizar o delineamento farmacotécnico de eleição de excipientes em suas respectivas concentrações e justificá-los técnica-regulatoriamente quanto ao uso para a função desejada na formulação de um medicamento novo: Gel bucal contendo 0,6% (p/p) de CxC.

- Realizar a complexação de CxC em  $\beta$ CD na proporção molar de 1:1 visando obter um processo replicável e escalonável.

- Desenvolver um processo de fabricação para a obtenção da formulação final, sumarizado, replicável e escalonável através da avaliação dos pontos críticos do processo produtivo.

- Desenvolver um método analítico instrumental por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) capaz de avaliar o teor do fármaco veiculado na formulação final.

- Estudar a estabilidade física, físico-química e microbiológica da formulação final no material de embalagem por um período de 6 meses (período de estudo de estabilidade acelerada) em câmara climática de estabilidade, ambiente (25°C) e geladeira (frio).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Equipamentos**

Sistema de Purificação de Água Milli-Q Millipore ET045 (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Balança analítica Gehaka modelo BG 200 (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Balança analítica Shimadzu AUY 220 (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Merck Elite Lachrom (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Placa aquecedora com agitação CORNING PC 230 (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Placa aquecedora com agitação SPLabor Modelo 752A (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Agitador Mecânico IKA RW 20 Digital (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Liofilizador Thermo Electron Corporation Savant D-Freeze Dryer (Departamento de Química – UFMG);

Espectrofotômetro de Infravermelho Perkin-Elmer 283B (Departamento de Química – UFMG);

Potenciômetro/ medidor de pH DIGIMED – DM-20 (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Seladora manual de bisnagas (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Câmara Climática de Estabilidade Acelerada Nova Ética Modelo 420/CLD (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Geladeira Metalfrio Modelo EC/0,2/R-F (Pharmascience Laboratórios LTDA).

#### **3.2. Reagentes e Padrões**

Padrão primário de Acetado de Clorexidina (Sigma-Aldrich®);

Padrão primário de *p*-cloroanilina (Merck);

Dicloridrato de Clorexidina (Sigma-Aldrich®);

Água de Osmose Reversa (Pharmascience Laboratórios LTDA);

Metilparabeno (Ueno Fine - Pharmascience Laboratórios LTDA);

Propilenoglicol (SKC - Pharmascience Laboratórios LTDA);

Betaciclodextrina (Cerestar - Departamento de Química – UFMG).

### **3.3. Materiais**

Bisnaga metálica de alumínio epoxifenólica pigmentada ouro (Bispharma Packaging);

Tampa plástica de bisnaga (Bispharma Packaging).

### **3.4. Métodos**

#### **3.4.1. Avaliação da solubilidade do dicloridrato de clorexidina**

A determinação do grau de solubilidade do CxC livre (sem betaciclodextrina) em água foi realizada através do preparo de uma solução final de 100mL em balão volumétrico, contendo a quantidade necessária para atender ao quesito farmacopeico deste IFA quanto à solubilidade em água conforme descrito na **Tabela 2** do item 1.3.

Desta forma, 1g de IFA foi adicionado ao balão volumétrico e o volume completado para 100mL com água purificada. Paralelamente, o mesmo desenho de estudo foi feito adicionando 0,6g de IFA e completado o volume para 100mL com água purificada em outro balão volumétrico de mesma capacidade, com o intuito de atingir a concentração de 0,6% deste sal como proposto na preparação farmacêutica final. Cada solução foi transferida para béqueres de 250mL e permaneceram sob agitação em placa agitadora por um período de 8h sem aquecimento, seguido de um período de 4 horas a 50°C e, por fim, 1h a 75°C.

### 3.4.2. Alternativa farmacotécnica para a estabilização de clorexidina em ciclodextrinas: preparo dos compostos de inclusão

Foram preparadas duas soluções aquosas individuais: uma do IFA e outra da  $\beta$ CD. Ao final, foi gerada uma solução binária de fármaco-CD na proporção molar de 1:1. A estequiometria dos componentes e algumas características físico-químicas foram consideradas conforme descrito na **Tabela 6**.

**Tabela 6 - Estequiometria para o preparo de soluções aquosas na proporção molar (1:1) de fármaco-CD.**

Matéria-prima	Massa Molecular	Solubilidade em água (20°C)	Faixa de fusão	Massa pesada para uma UN (20g)
Dicloridrato de Clorexidina	578,37 g/mol	1:100 a 1:1000 partes de água	A partir de 261°C com decomposição	0,120000g
Betaciclodextrina	1.134,98 g/mol	1: 50 partes de água	255°C a 265°C	0,235485g

Antes do preparo das soluções individuais do CxC e da  $\beta$ CD foi realizado o cálculo do quantitativo total de complexo fármaco-CD necessário aos diferentes estágios deste trabalho: 1) desenvolvimento da formulação; 2) do processo fabricação; 3) do método de análise de teor no produto acabado; 4) realização do estudo de estabilidade.

Desta forma, sabendo que são necessários 0,12g de IFA para corresponder a uma concentração de 0,6% (p/p) de ativo em 20g de gel, seriam gastos 6,6g de IFA para 1.100g de produto final aproximadamente, destinado à utilização nos quatro estágios do trabalho. Contudo, a potência desta matéria-prima é de 98% (CoA – *Sigma-Aldrich*®); com sua correção para 100% de potência seriam necessários 6,73g do IFA. A **Tabela 7** mostra a correlação entre os cálculos de potência assim como a quantidade de  $\beta$ CD a ser utilizada para a complexação na estequiometria de 1:1.

**Tabela 7 - Tabela representativa dos quantitativos de dicloridrato de clorexidina, betaciclodextrina e do solvente utilizado no preparo das soluções individuais.**

Matéria-prima	Potência	1UN (20g)	55 UN (1.100g)	Água
Dicloridrato de Clorexidina	98,0%	0,120000g a 98%	6,600000g a 98%	-
		0,122448g a 100%	6,734694g a 100%	1.000mL
Beta-cilodextrina	Não se aplica	0,235485g	12,951675g	-
		0,240291g	13,215995g	1.000mL

Os cálculos foram feitos pensando em um total de 55 bisnagas contendo, cada uma, 20g de gel. Deste total, 15 bisnagas ou 300g do produto serviram ao delineamento da formulação e do processo de produtivo (3 testes de 100g ou 5 bisnagas por processo). Após a definição do processo de manufatura com a formulação ideal, o restante do complexo fármaco-CD foi utilizado para a produção de um lote de bancada de 40 bisnagas ou 800g de gel, sendo 4 bisnagas (80g) utilizadas no desenvolvimento do método analítico e 36 bisnagas (720g) destinadas às três condições ambientais a serem estudadas.

Cada solução individual foi preparada utilizando béqueres de 2.000mL providos de agitação e aquecimento. A cada béquer foram adicionados volumes iguais de 1.000mL de água purificada aquecidos a  $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ .

Ao atingir a temperatura requerida IFA e CD foram adicionados a cada recipiente sob agitação vigorosa e permaneceram por um período de 15 minutos à temperatura e agitação constantes. Ao término, as soluções foram unificadas em um terceiro béquer de 4.000mL de capacidade. Especificamente, a solução aquosa de CxC foi vertida vagarosamente, sob agitação e aquecimento constantes, sobre a solução aquosa de  $\beta$ CD. Esta solução final de fármaco-CD permaneceu sob agitação e aquecimento constantes por 10 minutos neste terceiro recipiente.

A solução final límpida e incolor foi resfriada à temperatura ambiente e congelada para ser trabalhada na etapa seguinte: a liofilização, onde, então, toda a água foi removida, formando os complexos.

### 3.4.3. Liofilização do composto de inclusão na proporção molar 1:1

Como melhor boa prática de fabricação para a obtenção dos complexos e, levando-se em consideração as capacidades de equipamentos e operações que seriam entraves de processo como a capacidade operacional do liofilizador, por exemplo, a solução final de fármaco-CD preparada no item anterior (3.4.2) foi dividida em duas frações de igual volume e, posteriormente, congeladas.

A **Tabela 8** apresenta a composição da solução binária de fármaco-CD. Essa tabela especifica a quantidade final em massa de complexo CxC:βCD (1:1) dissolvida nos 2.000mL de água submetidos à liofilização.

**Tabela 8 - Estequiometria proporção molar (1:1) do complexo fármaco-CD.**

Solução	CxC (g)	βCD (g)	CxC:βCD (g)	Água Purificada
1	6,734694	-	-	1.000mL
2	-	13,215995	-	1.000mL
3	-	-	19,95069	2.000mL

Desta forma foi possível atender à capacidade operacional do equipamento sem comprometer o montante final de fármaco-CD.

### 3.4.4. Caracterização do composto de inclusão na proporção molar 1:1 liofilizado

A caracterização do composto fármaco-CD liofilizado foi realizada através da técnica de espectroscopia de infravermelho com transmitância de Fourier (FT-IR) pela comparação dos espectros do CxC livre, da βCD e, por fim, do complexo CxC:βCD.

As amostras foram preparadas na forma de pastilhas com brometo de potássio. Estas pastilhas foram levadas ao equipamento para a leitura do percentual de transmitância na região de 4000 a 400cm<sup>-1</sup> com uma resolução de 4cm<sup>-1</sup> realizando 32 scans por amostra.



### 3.4.5. Seleção de excipientes e composição da fórmula padrão

A constatação de que as opções terapêuticas no mercado nacional (Periogard®; Noplak® Max; Perioplak®) e internacional (Corsodyl®; Peridex™ e Lacer® Clhorexidina) são formas farmacêuticas líquidas contendo digluconato de clorexidina (CxG) com posologias que apresentam efeitos colaterais indesejáveis, motivaram a abordagem de inovação incremental de moléculas para o desenvolvimento de uma preparação farmacêutica mais eficiente contra gengivites e periodontites.

Assim, o dicloridrato de clorexidina foi veiculado sob a forma farmacêutica de um gel de base aquosa, abarcado em excipientes elencados de acordo com informações compendiais pesquisadas e mediante a verificação de que estes possuíam compatibilidade física e química entre si e o IFA.

Para compor a matriz mucoadesiva, a  $\beta$ CD foi utilizada como agente promotor de solubilidade do fármaco visto que proporcionaria à estrutura do complexo  $\beta$ CD:CxC, após processo de liofilização, maior solubilidade frente à CxC livre e às formulações convencionais de digluconato de clorexidina.

Afim de evitar possíveis danos causados por microrganismos à formulação e garantir que a mesma se mantivesse com características microbiológicas satisfatórias, utilizou-se o Metilparabeno como conservante microbiológico.

O Propilenoglicol foi o co-solvente selecionado para potencializar a solubilidade do complexo  $\beta$ CD:CxC e do metilparabeno na base aquosa.

A Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) ou Hipromelose, foi selecionada como agente de espessamento e incrementador de viscosidade para tornar o gel mais resistente e enrijecido (ALLEN Jr. et al., 2007).

A Água Purificada foi utilizada como solvente principal, ou seja, como acceptor e carreador dos constituintes da formulação e base da matriz do gel (ALLEN Jr. et al., 2007).

Algumas técnicas de manipulação foram testadas conforme o item 3.4.8 que demonstra o desenvolvimento do processo produtivo mais adiante no texto.

Durante a manipulação do produto todos os excipientes, incluindo aqueles

na forma líquida (propilenoglicol e água) foram pesados individualmente.

Cerca de 80% do total de água purificada presente na formulação foi adicionada ao recipiente de preparo. Sequencialmente, sob agitação mecânica, adicionou-se o metilparabeno, seguido do propilenoglicol e do complexo  $\beta$ CD:CxC liofilizado. Por fim, foi adicionada a HPMC, para garantir que o início do intumescimento e reticulação da matriz ocorresse após a adição do IFA. Completando o processo de obtenção do gel a fração remanescente de água foi adicionada.

#### 3.4.6. Preparo dos géis fortificado e placebos

Para constatar na prática, a compatibilidade dos componentes, seguiu-se à preparação de dois tipos de géis: Fortificado (contendo CxC livre, sem complexação em  $\beta$ CD) e Placebo (sem CxC, portanto, não fortificados, contendo apenas excipientes).

- Gel Placebo (1) de CxC: $\beta$ CD: terminologia utilizada para indicar a ausência do composto de inclusão fármaco-CD. Gel não fortificado (Pi01/14 - 100g).

- Gel Placebo (2) de CxC: terminologia utilizada para indicar a ausência de IFA no placebo, mas a presença de  $\beta$ CD. Gel não fortificado (Pi02/14 - 100g).

- Gel Fortificado (3): terminologia utilizada para indicar a ausência de  $\beta$ CD e a presença de IFA na forma livre, não complexado. Gel fortificado (Pi03/14 - 100g).

Os três géis foram preparados, mantidos em recipientes fechados e avaliados quanto ao aparecimento de turvação, precipitação e alterações organolépticas de odor e cor. Leituras de pH, como avaliação físico-química foram realizadas nos tempos 0 e 24h. Uma segunda avaliação de mesmo desenho de estudo, paralela à primeira, foi feita também no material de acondicionamento primário: bisnaga de alumínio.

Conforme metodologia de processo produtivo pormenorizada adiante no item 3.4.8, foi adicionado em um béquer cerca de 80% (p/p) da quantidade total de água da formulação. Os 20% (p/p) restantes foram utilizados para completar o volume final da preparação farmacêutica de forma a buscar o rendimento máximo ao final do preparo.

O conservante microbiológico e o co-solvente foram adicionados na sequência do processo de manufatura dos géis. As operações unitárias até aqui foram comuns aos três testes: (1), (2) e (3).

Para o Gel Placebo (1) continuou-se o processo adicionando o agente doador de viscosidade e, posteriormente, completando o volume final com a água.

Para o Gel Placebo (2) continuou-se o processo adicionando o agente estabilizante e solubilizante ( $\beta$ CD) e seguiram-se os passos finais do processo de obtenção do gel (1).

Para o Gel Fortificado (3) continuou-se o processo adicionando o IFA não complexado (CxC livre) analogamente ao processo de obtenção do gel (2), ou seja, no lugar de adicionar  $\beta$ CD foi adicionado o CxC. A partir daí, seguiram-se os passos finais do processo de obtenção do gel (1).

#### 3.4.7. Caracterização dos géis fortificado e placebos

##### 3.4.7.1. Aspecto dos géis fortificado e placebo

A observação da cor, odor e turvação das amostras mantidas em béqueres e em bisnagas e das alterações visíveis do aspecto dos géis quando aplicados às superfícies de vidros de relógio foram utilizadas para a caracterização quanto ao aspecto das preparações. Todas as observações foram realizadas à temperatura ambiente.

##### 3.4.7.2. Determinação de pH dos géis placebo e gel fortificado

Os valores de pH dos géis obtidos foram determinados a partir da leitura direta de uma amostra do produto final utilizando um potenciômetro com eletrodo tipo escoamento DIGMED.

### 3.4.8. Desenvolvimento do processo produtivo e preparo do gel aquoso com o composto de inclusão CxC:βCD (1:1)

Como abordagem produtiva foram testadas três formas de manufatura da fórmula do gel. Desta maneira, foi possível avaliar a evolução do processo de fabricação a cada ensaio, bem como o apontamento de seus pontos críticos.

A primeira proposta foi pautada na ausência de energia térmica (aquecimento), visando redução de gasto de energia, tempo para aquecer e resfriar a matriz e, conseqüentemente, custo total de processo produtivo.

Esta abordagem também avaliou o grau de gelificação frente à porcentagem do HPMC selecionada para compor a formulação e o grau de dispersibilidade do complexo CxC:βCD em propilenoglicol e a posterior solubilização deste e dos demais constituintes na base aquosa do gel.

Além da avaliação da viabilidade de um processo sem calor e da melhoria da dispersibilidade do fármaco proporcionada pela βCD, os primeiros tempos de processo (agitação e homogeneização) foram testados e avaliados.

O **Processo Nº 01** (lote: Pi 04/14 – 100g) fez uso de um recipiente principal dotado de agitação em que foi adicionada a Água Purificada Fração I (80% (p/p) do total de água da formulação) e um recipiente auxiliar dotado de agitação em que foi adicionado o Propilenoglicol.

No recipiente auxiliar foi realizada a dispersão do Metilparabeno e do complexo CxC:βCD. Sequencialmente, a dispersão foi transferida ao recipiente principal em que (Propilenoglicol + Metilparabeno + Complexo fármaco-CD) foram incorporados à Água Purificada Fração I. Ainda sob agitação, procedeu-se à adição gradativa da HMPC, de forma a promover sua hidratação e gelificação. O volume final foi completado com a Água Purificada Fração II (Água q.s.p.)

O **Processo Nº02** (lote: Pi 05/14 – 100g) teve como indicador chave de performance a inclusão da operação de aquecimento frente à primeira abordagem. Nesta técnica a Água Purificada Fração I foi aquecida à temperatura de 80°C ± 5°C. O Metilparabeno foi adicionado e solubilizado a quente. Ao término, a temperatura da solução de (Água + Metilparabeno) foi reduzida para 70°± 5°C e mantida sob aquecimento e agitação constantes.

Em recipiente auxiliar o complexo CxC:βCD foi disperso em Propilenoglicol. Na sequência, a dispersão foi vertida no recipiente principal. Com a agitação vigorosa, foi realizada a hidratação do agente gelificante e o volume completado com água de maneira análoga ao Processo N°01.

O gel resultante foi resfriado a  $35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , agitado e homogeneizado. Ao atingir as condições ambientais de temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  e 45% de UR, ainda no recipiente principal, uma amostra foi retirada para a leitura direta do pH (Potenciômetro DIGIMED – DM-20).

Por fim, a preparação foi parcialmente envasada e avaliada por 189 horas (7 dias corridos). Nessa avaliação, metade do teste foi acondicionado em bisnagas e a outra metade foi mantida no recipiente principal de manipulação. Após este período, nova leitura de pH e avaliação visual foram feitas.

No **Processo N°03** (lote: Pi 06/14 – 100g) o aquecimento da água foi mantido e com ele dois benefícios extremamente importantes: a total solubilização do parabeno, conforme preconizado em literatura (ROWE et al., 2009) e, conseqüentemente, pôde-se, como no Processo N°02, obter uma solução aquosa já conservada microbiologicamente para ser receber os demais excipientes e o IFA em uma situação pré-estabelecida de conservância.

Para otimizar a manipulação o co-solvente (Propilenoglicol) foi adicionado à solução de (água + parabeno). Com isso, o resfriamento para  $70^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  foi alcançado rápido e satisfatoriamente pela adição deste terceiro componente.

Obteve-se uma solução anfifílica de (água + metilparabeno + propilenoglicol) pronta para receber o complexo fármaco-CD. Após a adição do IFA complexado o mesmo solubilizou-se rapidamente, sem ser notado qualquer indício de uma dispersão leve ou parcial do mesmo. Seguindo o processo, foi iniciada a fase de gelificação com a adição e hidratação da HPMC.

O volume final foi completado conforme os processos anteriores e a agitação e homogeneização finais iniciados à temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Ao atingir a temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  e 51% de UR, uma amostra foi retirada para a leitura direta do pH (Potenciômetro DIGIMED – DM-20).

Por fim, a preparação final mais uma vez foi parcialmente envasada e avaliada por uma semana nas mesmas condições do Processo N°02.

#### 3.4.8.1. Caracterização da fórmula padrão

A fórmula padrão foi justamente aquela que resultou nas melhores condições de estabilização do fármaco. Neste trabalho, em particular, em função das características do incluso de CxC, dos excipientes e de seu processo de fabricação.

A caracterização da fórmula padrão permitiu avaliar a viabilização da forma farmacêutica proposta para veicular o fármaco insolúvel em questão através da análise de aspecto e de resultados mensurados com metodologias analíticas devidamente aplicadas para a determinação do pH, do doseamento do princípio ativo e de sua impureza em potencial e análise microbiológica condizentes com as especificações do produto acabado.

#### 3.4.8.2. Determinação do pH da fórmula padrão

A determinação do pH da fórmula padrão objetivou determinar se este parâmetro físico-químico estava de acordo com a faixa de pH de maior estabilidade e atividade do fármaco conforme relatado no item 1.3 e a faixa de pH fisiológico da cavidade bucal onde se pretende aplicar a preparação farmacêutica. Os valores de pH dos géis obtidos foram determinados a partir da leitura direta de uma amostra do produto final utilizando um potenciômetro com eletrodo DIGMED.

#### 3.4.9. Desenvolvimento de método analítico para a quantificação do dicloridrato de clorexidina presente na formulação

A princípio foram testadas as condições cromatográficas da análise de doseamento do princípio ativo presente na monografia do CxC USP 2014 que são: coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano C18, dimensões 250x4,6 mm, 5 µm, fase móvel de eluição gradiente constituída por acetonitrila e solução tampão fosfato pH 3,0 contendo trietilamina, seguindo as proporções de acordo com a **Tabela 9**, fluxo 1,5 mL/min, temperatura de 40°C com detecção UV, λ 239 nm e volume de injeção 50 µL (USP, 2014).

**Tabela 9 - Gradiente de eluição das fases móveis do método de doseamento de dicloridrato de clorexidina da monografia da USP 2014.**

Tempo (minutos)	% Fase Móvel A (Tampão fosfato +TEA)	% Fase Móvel B (ACN)
0	100	0
9	100	0
10	45	55
15	45	55
16	100	0
21	100	0

O valor de assimetria do pico correspondente ao CxC foi maior que 2,0, o que torna o perfil cromatográfico inadequado para a realização da integração para quantificações. Diante disso, desenvolveu-se um novo método com as condições cromatográficas otimizadas descritas na **Tabela 10**.

**Tabela 10 - Parâmetros cromatográficos e especificações do método analítico.**

Parâmetros Cromatográficos	Especificações
Coluna Cromatográfica	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 4,6 mm – 3,5 µm)
Eluição	Gradiente
Fase Móvel	Solução aquosa de trietilamina 1% v/v pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico): Acetonitrila
Fluxo de Corrida	1,5 mL/min
Tempo de Corrida	25 min
Comprimento de onda ( $\lambda$ )	239 nm
Volume de Injeção	2µL
Diluyente	Acetonitrila: água (30:70) pH 3,0
Temperatura da coluna	40°C

A **Tabela 11** representa as proporções das misturas dos solventes em função do tempo no gradiente das fases móveis.

**Tabela 11 - Gradiente de eluição das fases móveis.**

Tempo (minutos)	% Fase Móvel A (TEA 1%)	% Fase Móvel B (ACN)
0	95	5
20	40	60
20,1	95	5
25	95	5

Com essas condições foi possível também quantificar uma impureza potencial da clorexidina, a *p*-cloroanilina (pCLA). Em seguida, o método

desenvolvido passou por validação.

#### 3.4.10. Preparo da amostra para a quantificação de dicloridrato de clorexidina presente na formulação

Para a quantificação do teor de CxC, foi preparada uma solução padrão de acetato de clorexidina (CxA) na concentração de 0,24mg/mL e de padrão *p*-cloroanilina (pCLA) na concentração de 0,048mg/mL.

Foram pesados, previamente, cerca de 12mg de padrão de pCLA e transferidos para um balão volumétrico de 100mL. O padrão pesado foi diluído com 80mL de solução diluente e levado ao ultrassom por 10min. O volume foi completado com solução diluente e obteve-se uma solução estoque de pCLA a 0,12mg/mL.

Na sequência foram pesados cerca de 12mg de padrão CxA e transferidos para um balão volumétrico de 50mL. A esta massa foram adicionados 20mL da solução estoque de pCLA 0,12mg/mL, previamente preparada, e levou-se ao ultrassom por 10min. O volume foi completado com solução diluente. Assim obteve-se a solução padrão para doseamento do dicloridrato clorexidina (CxC).

A amostra de produto acabado foi preparada de modo a obter uma solução amostra de CxC de 0,24mg/mL. Para isso, foram pesados cerca de 2000mg de gel bucal de CxC a 0,6% (p/p). Esta massa foi transferida para um balão volumétrico de 50mL, diluída com 35mL de solução diluente e levada ao agitador magnético por 30min. Após este tempo o volume foi completado com solução diluente. Desta forma obteve-se a solução amostra.

Em todas as diluições com a solução diluente utilizada foi a composição de água ultrapura (previamente acidificada com ácido fosfórico em pH 3,0): acetonitrila grau HPLC (70:30).

#### 3.4.11. Preparo da amostra para a quantificação de *p*-cloroanilina presente na formulação

Para realizar a quantificação da *p*-cloroanilina, foi preparada uma solução padrão pCLA na concentração de 0,12µg/mL.



Foram pesados cerca de 12mg de padrão de pCLA e transferidos para um balão volumétrico de 100mL. A esta massa foram adicionados 20mL da solução diluente. Levou-se ao ultrasson por 10min e o volume foi completado com o diluente. Posteriormente foi pipetado 1mL desta diluição para um balão volumétrico de 100mL e completado o volume com o diluente. Por fim, 10mL da segunda diluição foram pipetados e transferidos para balão volumétrico de 100mL e o volume completado com a mesma solução diluente das duas primeiras diluições. Desta forma obteve-se a solução padrão de impureza.

O preparo da solução amostra seguiu o mesmo procedimento de preparação de preparação da amostra.

#### 3.4.12. Validação de método analítico por CLAE para quantificação de dicloridrato de clorexidina presente na formulação

O método para a determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE foi validado de acordo com o anexo da Resolução RE nº 899 que dispõe sobre o Guia de Avaliação de Métodos Analíticos e Bionalíticos (BRASIL, 2003). Visto que o método tem a finalidade de ser utilizado para o doseamento, os parâmetros de validação avaliados foram seletividade, linearidade, repetitividade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Os cálculos foram realizados com o auxílio do software Microsoft Excel® versão 2010.

##### 3.4.12.1. Seletividade

Inicialmente a seletividade do método foi avaliada com duas injeções de solução placebo na concentração correspondente à da amostra no doseamento com a massa de ativo subtraída. O placebo foi constituído por todos os componentes presentes na formulação exceto o dicloridrato de clorexidina (CxC), com as proporções mantidas. A solução placebo foi obtida adicionando o placebo na solução diluente. Em seguida, a seletividade foi finalmente avaliada com duas injeções de solução contendo placebo fortificado com padrão de acetato de clorexidina (CxA). O ativo e os excipientes estavam na concentração correspondente

à da amostra no doseamento.

A seletividade foi demonstrada por meio da ausência de picos no mesmo tempo de retenção do pico correspondente ao dicloridrato de clorexidina nos cromatogramas obtidos com as soluções placebo e fortificada. A pureza de pico foi avaliada no cromatograma obtido com a solução fortificada por meio do detector ultravioleta com arranjo de diodos.

#### 3.4.12.2. Linearidade

Prepararam-se cinco soluções de concentrações crescentes de CxC correspondentes a 80, 90, 100, 110 e 120 % da concentração da solução amostra da análise de doseamento. Foi utilizado a substância química de referência acetato de clorexidina. Diluições foram realizadas a partir de uma preparação estoque de concentração 2,4 mg/mL de clorexidina em diluente.

Os pontos da curva para avaliação da linearidade foram determinados para contemplar a faixa em torno da concentração da amostra do teste de doseamento. As soluções de cada nível foram pesadas e solubilizadas separadamente. As concentrações correspondentes estão expostas na **Tabela 12**.

**Tabela 12 - Preparo das soluções de clorexidina em diluente para construção da curva analítica e avaliação da linearidade.**

Nível (%)	Volume da alíquota da solução estoque (mL)	Solução diluente q.s.p (mL)	Concentração (mg/mL)
80	8,0	100	0,192
90	9,0	100	0,216
100	10,0	100	0,240
110	11,0	100	0,264
120	12,0	100	0,288

Cada solução foi preparada em triplicata e todas foram injetadas ao cromatógrafo e as áreas correspondentes aos picos de clorexidina foram registradas para construção da curva analítica.

A linearidade foi avaliada por meio do cálculo da equação que representa a curva de regressão por meio da estimativa do parâmetro coeficiente de determinação ( $R^2$ ). A significância da regressão foi avaliada por análise de

variâncias (ANOVA), para a qual o valor de  $F_{\text{calculado}}$  deve ser superior ao  $F_{\text{crítico}}$ , determinando a razão entro o modelo e seu erro (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

#### 3.4.12.3. Repetitividade e precisão intermediária

A repetitividade do método foi avaliada por meio do preparo de seis soluções amostra correspondentes à análise de doseamento desenvolvida para a quantificação de CxC. Após 48 horas, o teste de precisão foi realizado conforme descrito anteriormente por outro analista para avaliar a precisão intermediária.

A avaliação da repetitividade do método foi estimada pelo cálculo de desvio padrão relativo (DPR) das seis amostras por quantificações de CxC, enquanto que a precisão intermediária foi avaliada pelo cálculo do DPR entre as médias das áreas encontradas na repetitividade e precisão intermediária por quantificação do mesmo ativo (BRUCE, 1998; KUTTATHARMMAKUL, 1999; BRASIL, 2003).

#### 3.4.12.4. Exatidão

A exatidão do método de quantificação de CxC por CLAE foi avaliada em três concentrações correspondentes a 80, 100 e 120% da concentração da solução amostra da análise de doseamento, cada uma em triplicata. As amostras foram preparadas por fortificação do placebo com substância de referência CxA. O placebo foi manipulado conforme descrito em Seletividade (item 3.4.12.1).

Inicialmente, prepararam-se três soluções estoque de padrão primário de clorexidina de concentração 2,4 mg/mL em diluente. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 8,0; 10,0 e 12,0 mL da solução estoque para balões volumétricos de 100 mL que continham massa de placebo correspondente às tomadas de amostra. Esses preparos foram realizados em triplicata com alíquotas provenientes das três soluções estoques respectivamente.

Os resultados do teste de exatidão do método foram expressos em porcentagem de recuperação do fármaco adicionado ao placebo.

#### 3.4.12.5. Robustez

As condições cromatográficas propositalmente alteradas foram: fluxos 1,3 e 1,7 mL/min, temperaturas 38 e 42°C. Também avaliou-se outro lote de coluna cromatográfica. Para essa avaliação três amostras foram preparadas (triplicata) conforme o doseamento de CxC.

A robustez foi estimada pelo cálculo de DPR dos resultados médios de clorexidina encontrados na triplicata do teste com as condições alteradas em relação ao resultado obtido na análise com as condições do método desenvolvido não alteradas.

#### 3.4.13. Estudo de estabilidade

##### 3.4.13.1. Condições de estudo de estabilidade

A avaliação da estabilidade do gel visou acelerar possíveis degradações químicas e/ou mudanças físicas em condições padronizadas de temperatura e umidade relativa.

As diretrizes dos estudos foram feitas com base nos parâmetros adaptados segundo o que traz o Anexo da RE nº1/2005, o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade (BRASIL, 2005).

Conforme consta no **Quadro 1**, que enfatiza apenas as condições de estudos para formas farmacêuticas semissólidas, segundo condições de armazenamento e tipo de embalagem primária preconizados, os estudos de estabilidade foram executados.

**Quadro 1 - Condições de estudos de estabilidade por forma farmacêutica, condição de armazenamento e tipo de embalagem.**

Forma Farmacêutica	Condição de armazenamento *	Embalagem	Temperatura e Umidade Acelerado **	Temperatura e Umidade Longa Duração **
Semissólido ***	15°C -30°C	Semipermeável	40°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR	30°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR
Todas as formas farmacêuticas	2°C - 8°C	Semipermeável	25°C ± 2°C / 60 % UR ± 5% UR	5°C ± 3°C

Além das especificações contidas no quadro acima particularidades importantes devem foram consideradas conforme nota abaixo:

“\*Qualquer recomendação de armazenamento em temperatura dentro destas faixas deve constar de bulas e rótulos. A temperatura recomendada não exige de que os testes de estabilidade sejam realizados com as temperaturas definidas nas duas últimas colunas da tabela. \*\*Os valores de temperatura e umidade são fixos e as variações são inerentes às oscilações esperadas pela câmara climática e por eventuais aberturas para retirada ou colocação de material. \*\*\*Líquidos e semissólidos de base aquosa devem realizar o estudo com umidade a 25% UR ou 75% UR. Caso se opte por 75% UR, o valor da perda de peso deverá ser multiplicado por 3,0 (Anexo da RE nº1/2005-Guia para a estabilização de estudos de estabilidade)”

Os estudos foram conduzidos seguindo duas propostas de condições de armazenamento: 15-30°C e 2-8°C. Para a condição 2-8°C, dois acompanhamentos, em diferentes temperaturas, foram conduzidos paralelamente ao estudo em câmara climática, representando padrões ambientais distintos que objetivaram avaliar qual a melhor condição ou condições de armazenamento do produto:

- Condição 1 de armazenamento entre 15-30°C: estudo de estabilidade acelerada conduzido em câmara de estabilidade a 40°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR.
- Condição 2 de armazenamento de 2-8°C: estudo de estabilidade acelerada conduzido em ambiente controlado a 25°C ± 2°C / 60 % UR ± 5% UR.
- Condição 3 de armazenamento de 2-8°C: adaptação da condição de temperatura do estudo de estabilidade de longa duração para um estudo de 6 meses conduzido em ambiente controlado de geladeira a 5°C ± 3°C.

Mesmo sendo preconizada por legislação (BRASIL, 2005) que a realização dos ensaios de teor de produto acabado e testes físicos aconteçam apenas nos tempos 0, 3<sup>o</sup>mês, e 6<sup>o</sup>mês; para o estudo acelerado em câmara a 40°C/ 75% UR (Condição 1), os ensaios foram realizados com maior periodicidade de avaliação, ocorrendo nos tempos 0, 1<sup>o</sup>mês, 2<sup>o</sup>mês, 3<sup>o</sup>mês e 6<sup>o</sup> mês. Os testes de perda de peso, obrigatórios apenas para esta condição, seguiram a mesma periodicidade.

Os testes à temperatura ambiente (Condição 2) e em geladeira (Condição 3), por serem situações menos destrutivas, foram conduzidos segundo os tempos preconizados no Guia da RE n°1/2005.

As avaliações físico-químicas foram realizadas através do método analítico desenvolvido para o doseamento de CxC no gel, para avaliar a estabilidade química dentro da faixa especificada de 90-110% de teor ou Valor Rotulado (VR). Esta avaliação de teor foi usada para extrapolar a efetividade terapêutica por meio de um parâmetro analítico *in vitro*. Adicionalmente, o método analítico quantificou a de *p*-cloroanilina, potencial impureza, para a observar se a mesma se mantinha em padrões aceitáveis para medicamentos (BRASIL, 2013).

As avaliações de pH também foram realizadas conforme os períodos de avaliação para constatar a alteração ou manutenção deste parâmetro físico-químico de qualidade e estabilidade dentro da faixa especificada de 5,5-7,0.

As avaliações de integridade microbiológica foram realizadas nos três desenhos de estudo nos tempos T0 e T6<sup>o</sup>mês conforme legislação vigente e os critérios dos métodos gerais da F.BRAS (BRASIL, 2005; F.BRAS, 2010).

#### 3.4.13.2. Material de embalagem primária

As exposições do produto foram realizadas em bisnagas 20g, confeccionadas em alumínio com película interna (verniz) epóxi-fenólica e, mais internamente, revestidas em lâmina de ouro conforme mostra a **Figura 6**.



**Figura 6** - Representação visual da bisnaga utilizada como acondicionamento primário do gel.

#### 3.4.13.3. Quantitativo de amostras por condição de estudo

O lote Pi07/14 de 800g gerou um total de 40 bisnagas contendo 20g de gel. Deste total, 4 bisnagas foram consumidas no desenvolvimento e validação do método analítico de produto acabado.

As 36 bisnagas remanescentes (720g) geraram as amostras para a condução dos estudos de estabilidade, para os ensaios físicos e físico-químicos e microbiológicos durante o período de 6 meses de avaliação. Daquele total, exatamente 2 bisnagas foram utilizadas para as análises microbiológicas e físico-químicas (teor, limite e pH) e geraram os resultados de TZero para as três condições estudadas.

A Condição de Estudo 1 consumiu 22 bisnagas para todos os seus testes e conclusão de estudo, sendo 10 bisnagas destinadas à avaliação de perda de peso e 12 bisnagas destinadas aos ensaios físico-químicos (considerando análise e reanálise, caso necessário) e microbiológicos, este último no encerramento do estudo (T6<sup>o</sup> mês). As Condições de Estudo 2 e 3 consumiram, cada uma, 6

bisnagas, destinadas aos ensaios físico-químicos e microbiológicos conforme efetuado na Condição 1, totalizando 12 bisnagas em avaliação.

As amostras, assim dispostas, deram entrada em estudo de estabilidade acelerada seguindo o protocolo de registro de conforme **Quadro 2**.

**Quadro 2 - Registo de entrada de produtos em estabilidade.**

**Registro de Entrada de Produtos em Estabilidade**

**Produto (Nome Genérico): Dicloridrato de Clorexidina 0,6% gel bucal 20g**

Fabricante do ativo: Sigma-Aldrich®	Lote do ativo: 011M1319V
Lote do Teste: Pi 07/14	Validade do ativo: 29/11/15
Tamanho do Lote: 720g	Início do Estudo: 07/07/2014
Data de Fabricação: 28/06/2014	Término do Estudo: 07/01/2015
Aspecto: Gel homogêneo, límpido e incolor	Tempo do Estudo: 6 meses
	Validade Efetiva: 24 meses

Embalagem Primária: Bisnaga de alumínio epóxi-fenólica pigmentada ouro

Objetivo: Avaliação de fórmula, produto, processo e material de embalagem primária em condição de estresse ambiental para obtenção de resultados físicos e físico-químicos e microbiológicos com o intuito de desenvolvimento de um novo produto.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação da solubilidade do dicloridrato de clorexidina

Estudos publicados sobre a dificuldade de solubilização da Cx e seus sais em água, bem como a baixa solubilidade descrita em monografias oficiais demonstram que a evidenciação da solubilidade deste IFA trate-se de uma técnica eficaz e prática em estudos de pré-formulação no desenvolvimento de preparações farmacêuticas (CORTÉS et al. 2001; DENADAI et al. 2007; ROWE et al., 2009; BP, 2014; JP 2011).

Inicialmente, tentou-se a solubilização do CxC livre em água de acordo com a especificação de sua monografia de matéria-prima descrita nas farmacopeias Britânica, Japonesa e também no HB. A esta especificação atrelou-se os conceitos de classificação de solubilidade vigente na F.BRAS, conforme **Tabela 13**.

**Tabela 13 - Termos descritivos de solubilidade e seus significados.**

<b>Solubilidade</b>	<b>Termo descritivo</b>
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
<b>Pouco solúvel</b>	<b>De 100 a 1000 partes</b>
Muito pouco solúvel	De 1.000 a 10.000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10.000 partes

Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª Edição, 2010.

Mesmo considerado moderadamente solúvel em água conforme consta nas monografias, o IFA não se solubilizou segundo os testes realizados no item 3.4.1. Uma inferência química que pode ser feita para analisar melhor estes dados e justificá-los, parte do princípio de que o CxC é um sal polivalente, os quais são, em geral, menos solúveis que sais monovalentes, sendo assim estes resultados que contrariam as literaturas oficiais, se justificariam.

Tanto a incorporação do CxC livre a 1,0% (p/v) e a 0,6% (p/v) em volumes finais de 100mL de água sob as situações de temperaturas propostas geraram soluções turvas com formação de sobrenadante branco quando cessadas a agitação e o aquecimento. Estes resultados foram tratados como controle negativo

de CxC livre (não complexada em CD), insolúvel em meio aquoso segundo o conceito farmacopeico de solubilidade da molécula atrelado à classificação da **Tabela 13**.

#### **4.2. Alternativa farmacotécnica para a estabilização de clorexidina em ciclodextrinas: preparo dos compostos de inclusão**

De forma a viabilizar o desenvolvimento farmacotécnico da formulação em gel aquoso mucoadesivo, a inclusão do CxC em  $\beta$ CD foi capaz de contornar a baixa solubilidade do IFA em meio aquoso, levando-se em consideração as inúmeras alterações de características físico-químicas decorrentes do processo de inclusão de moléculas em CD, mais especificamente, sais de Cx (CORTÉS et al. 2001; LOFTSSON, DUNCHÊNE, 2007; DENADAI et al., 2007).

A solução final, límpida e incolor evidenciou, portanto, que a  $\beta$ CD atuou como agente solubilizante sobre o sal de Cx que, na sua forma livre em solução aquosa e sob aquecimento, se apresentou como uma solução levemente esbranquiçada e turva em conformidade com o controle negativo de CxC livre obtido nos testes de solubilização dos item 3.4.1 discutidos no item 4.1.

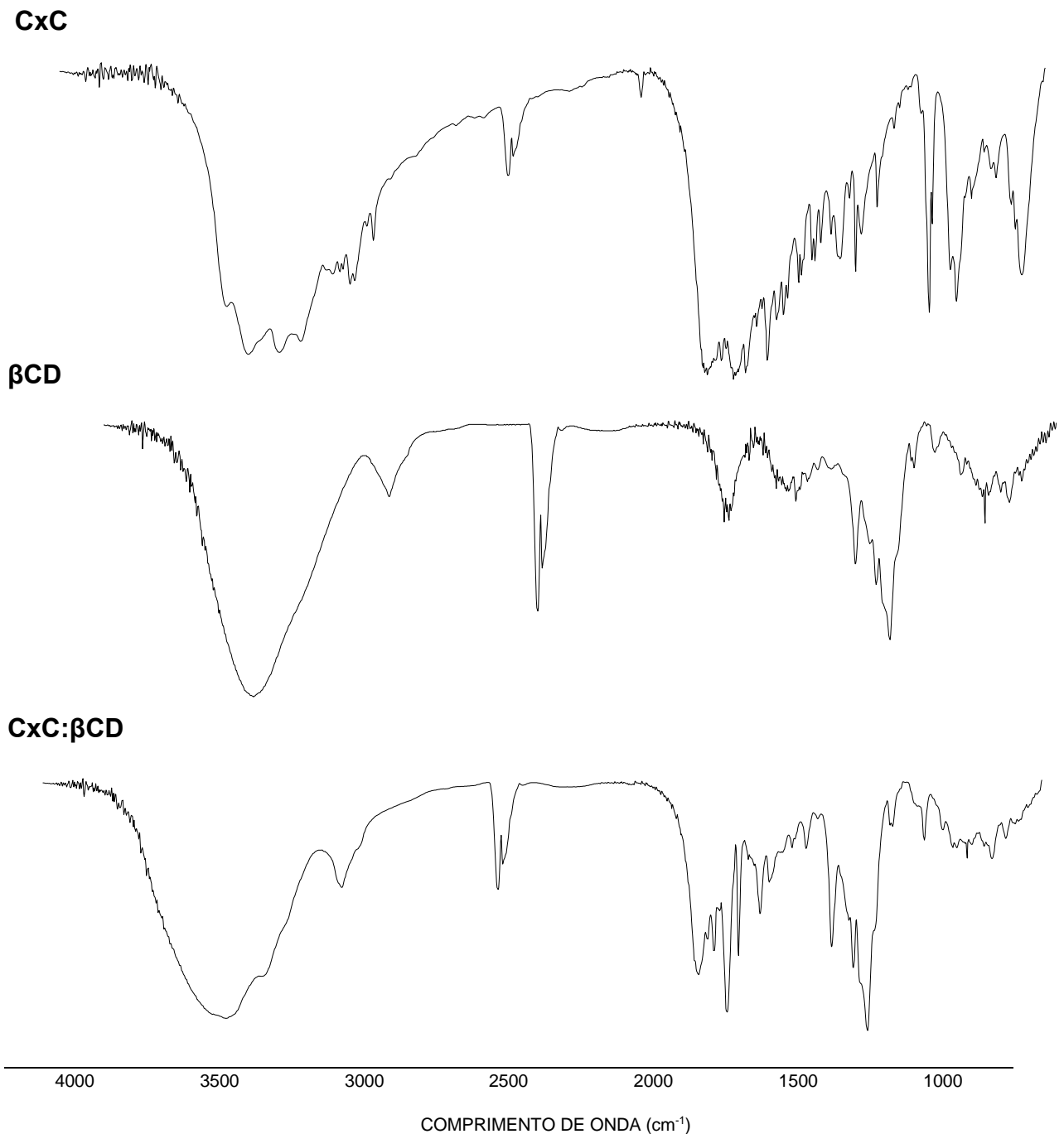
Por fim, o complexo fármaco-CD solubilizado foi resfriado à temperatura ambiente e congelado. A liofilização, na sequência, removeu todo o quantitativo de água existente. Como resultado final obteve-se novos complexos de CxC: $\beta$ CD (1:1) que se apresentaram sob a forma sólida amorfa.

Conforme relatado por Denadai e colaboradores (2007) a estrutura linear da molécula de CxC aumentou as chances de inclusão de parte da molécula no interior da cavidade hidrofóbica da CD. Além disso, como o CxC possui um coeficiente de partição octanol/água ou Log P de 4,51 (CHEMICALIZE.ORG, 2014), assim, entende-se que exista uma maior afinidade daquela molécula por estruturas e componentes apolares.

Por último, o fato do CxC ser um sólido à temperatura ambiente (ROWE et al., 2009) facilitou seu manuseio e processamentos para a obtenção dos compostos de inclusão.

### 4.3. Caracterização do composto de inclusão na proporção molar 1:1 liofilizado

A espectroscopia no infravermelho possibilitou caracterizar e comprovar a obtenção do composto fármaco-CD através da identificação dos espectros gerados pelos diferentes grupos funcionais do IFA (Cx<sub>2</sub>C), do excipiente ( $\beta$ CD) e do composto (Cx<sub>2</sub>C: $\beta$ CD). Na **Figura 7** estão representados os espectros.



**Figura 7 - Espectros na região do infravermelho de Cx<sub>2</sub>C, βCD e Cx<sub>2</sub>C:βCD (1:1).**

O espectro do CxC apresentou bandas fortes entre 1800 e 1500cm<sup>-1</sup> relacionadas ao grupamento imina (>C=N-H) da molécula de Cx. A banda média, por volta de 1400 a 1200cm<sup>-1</sup> refere-se à amina secundária ligada ao anel aromático (Ø-NH-R) e as bandas fracas em 1000 e 800 cm<sup>-1</sup> referem-se aos anéis aromáticos e os estiramentos de ligações C=C (MOFFAT et al., 2004, TEIXEIRA, 2008).

Como pode-se observar no espectro, as bandas apresentadas para a βCD são características. Ou seja, bandas largas entre 3000 a 3500cm<sup>-1</sup>, correspondentes às vibrações dos grupos (-O-H), bandas de estiramento da vibração das ligações (-CH) e (-CH<sub>2</sub>), que aparecem na região entre 2800 e 3000cm<sup>-1</sup> e bandas na região de 1000 e 1100cm<sup>-1</sup> relacionadas aos estiramentos (C-O-C) (MOFFAT et al., 2004, TEIXEIRA, 2008, NETO, 2012)

O espectro do composto CxC:βCD apresentou modificações que evidenciam uma interação hospedeiro-convidado entre a βCD (hospedeiro) e a Cx livre (convidado) (SINISTERRA et al., 1995, CORTÉS et al., 1999).

Houve alteração do perfil espectral em toda região que vai de 1800 a 800 cm<sup>-1</sup> das bandas características da fração hidrofóbica da estrutura do dicloridrato de clorexidina, tornando o perfil do composto CxC:βCD e a intensidade das bandas dos grupamentos funcionais mais semelhantes ao da betaciclodextrina.

Este comportamento endossa o fenômeno de encapsulamento de parte da molécula linear do CxC, especialmente a região do anel aromático, na cavidade hidrofóbica da βCD conforme ilustrado na **Figura 5** que ilustra a formação do complexo fármaco-CD.

#### 4.4. Desenvolvimento da matriz mucoadesiva

A eleição das classes de excipientes foi feita de modo a estabelecer uma relação de concentrações adequadas às funções farmacotécnicas pretendidas para cada um, em razão da forma farmacêutica (gel) e a via de administração objetivadas (mucosa bucal), visando proporcionar qualidade e estabilidade à preparação (BRASIL, 2011), bem como alinhá-la a um processo robusto com variáveis e pontos críticos detectáveis e controláveis (GIBSON, 2009).

Na **Tabela 14** tem-se um resumo referente à composição final obtida do composto de inclusão fármaco-CD e cada matéria-prima utilizada em sua obtenção.

**Tabela 14 - Composição quali/quantitativa do complexo Fármaco-CD.**

<b>Matéria-prima</b>	<b>Função Teor na fórmula</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>	<b>Especificação de uso</b>
Clorexidina 2HCl	Ativo 0,6%	-	-
		Handbook	Sem restrição quantitativa de uso
Betaciclodextrina	Solubilizante, Estabilizante 1,1774%	FDA	≤1% Gel tópico, mas sem quantitativo para gel bucal
		Health Canada	≤ 5mg/ Kg de peso corporal/dia
CxC: βCD	Ativo complexado 1,7774%	-	-

A avaliação desta tabela permite identificar que a βCD encontra-se dentro das especificações de uso recomendadas e aceitas pela ANVISA, ou seja, respaldada pelo *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, que não faz menção restritiva a respeito do limite de uso deste excipiente em preparações tópicas e/ou orais, mais especificamente, a mucosa oral.

O Banco de Dados de Ingredientes em Produtos para Saúde (*Natural Health Products Ingredients Database*) do *Health Canada*, a agência regulatória canadense, de maneira similar ao HB, permitiu consolidar e viabilizar a utilização da βCD baseada em critérios que vão além da forma farmacêutica e via de administração, como o uso baseado no peso corpóreo do paciente.

Por fim, o banco de dados para as quantidades máximas de uso de excipientes por via de administração e forma farmacêutica do *U.S. Food and Drug Administration (Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products)* limita a 1% sobre o total da formulação o uso de betadex, como é referenciada naquela fonte e na USP esta CD em particular.

A pesquisa em diferentes bancos de dados é especialmente interessante e necessária, pois muitas vezes seu uso pode ser restrito em uma determinada base de dados e irrestrito em outra, ou como é mais comum, demonstrar sua aplicabilidade dentro de uma faixa, fundamentando e respaldando tecnicamente sua

utilização.

Neste trabalho, utilizou-se a  $\beta$ CD a 1,1774% (p/p). Este quantitativo encontra-se 0,1774% acima do preconizado pelo FDA de forma genérica para géis na via tópica, mas não especificamente para o uso em mucosa bucal como acontece para outros excipientes. Um apontamento que pode justificar a ausência de um quantitativo específico para este adjuvante farmacotécnico na rota de administração bucal talvez seja, justamente, a ausência de formulações farmacêuticas em gel, que fazem uso de Cx complexada com CD para os fins terapêuticos; objetivo a que se destina a inovação deste trabalho.

A avaliação paralela em outras fontes indexadas e respaldadas como o Health Canada e o HB permitiram a condução dos trabalhos de desenvolvimento da formulação final de forma segura, tanto do ponto de vista farmacotécnico quanto regulatório.

Complementando a composição quali e quantitativa do gel, a **Tabela 15** demonstra a avaliação dos demais componentes, especificados pela sua denominação comum brasileira (DCB) listada na F.BRAS. A função farmacotécnica e a porcentagem de utilização na formulação estão presentes nesta tabela de maneira análoga à **Tabela 14**.

**Tabela 15 - Composição quali/quantitativa de excipientes da matriz do gel.**

<b>Matéria-prima</b>	<b>Função Teor na fórmula</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>	<b>Especificação de uso</b>
Metilparabeno	Conservante Microbiológico 0,15%	Handbook	0,02-0,30% preparações tópicas
		FDA	0,3% preparações tópicas na forma de gel
		Health Canada	≤ 10mg/ Kg de peso corporal/dia como soma dos derivados do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
Propilenoglicol	Co-solvente, Estabilizante 15,00%	Handbook	5-80% como solvente ou co-solvente para formas tópicas ≈ 15% como umectante para formas tópicas
		FDA	98,09% para preparações tópicas na forma de gel
Hidroxiopropil-metilcelulose	Gelificante 3,00%	Health Canada	5-80% como solvente ou co-solvente para formas tópicas ≈ 15% como umectante para formas tópicas
		Handbook	2,00-5,00% para formas orais líquidas
Água Purificada q.s.p.	Solvente q.s.p. 100%	FDA	Sem descrição quantitativa para gel bucal
		Health Canada	≤ 36% em produtos tópicos, a menos que evidência adicional para segurança seja submetida
		-	Sem restrição de uso

Estes apontamentos denotam que, neste trabalho, as concentrações de todos os excipientes eleitos foram avaliadas através de compêndios especializados e fontes indexadas aceitas pela comunidade regulatória internacional garantindo técnica e regulatoriamente sua justificativa de uso na preparação farmacêutica em questão conforme delineamento farmacotécnico realizado no item 3.4.5.

## 4.5. Caracterização dos géis fortificado e placebos

### 4.5.1. Aspecto dos géis fortificado e placebos

Os géis fortificado e placebos não apresentaram dificuldades quanto a incorporação dos excipientes. Especificamente na etapa de adição da HPMC houve a manifestação física de intumescimento e reticulação em água deste agente espessante e, por conseguinte, o processo de gelificação da matriz. Formaram-se géis com baixa interpolação de ar e rendimento total (100%) do semiacabado, ou seja, no recipiente principal de manipulação.

A **Tabela 16** apresenta os resultados obtidos da avaliação do aspecto dos diferentes géis placebos e fortificado.

**Tabela 16 - Caracterização física do aspecto dos géis fortificado e placebos.**

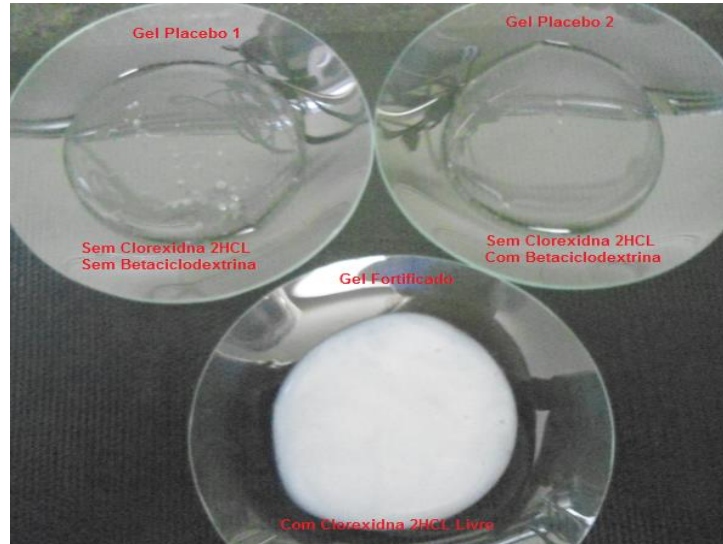
Parâmetro	Géis placebo (não fortificados)		Gel fortificado (CxC livre)
	Gel (1)	Gel (2)	Gel (3)
Aspecto			
Cor	Homogêneo, límpido e incolor	Homogêneo, límpido e incolor	Homogêneo, branco a levemente cinza
Odor	Característico	Característico	Característico
Material Particulado	Ausente	Ausente	Ausente
Turvação	Ausente	Ausente	Presente

Ao término do preparo dos três géis foi notada uma diferença entre o aspecto dos géis não fortificados (1) e (2) (aqueles que não continham o IFA em sua composição) para o gel fortificado (3) (contendo a CxC livre). Enquanto que os placebos se apresentavam visualmente límpidos e incolores, o gel com o CxC livre se apresentou porém com a cor branca a levemente cinza, corroborando mais uma vez com a dificuldade de solubilização da Cx em meio aquoso.

Após as 24h de experimento os três géis mantiveram seus aspectos visuais inalterados em relação ao Tempo 0. Estes comportamentos foram iguais tanto no acondicionamento em recipientes transparentes (béqueres), quanto nas bisnagas



de alumínio, sem alterações de aspecto constatáveis ao olho nu em superfície de vidro de relógio conforme **Figura 8**.



**Figura 8** - Representação visual dos géis após 24h de fabricação retirados das bisnagas e expostos em vidro de relógio: Placebo (1), Placebo (2) e Fortificado (amostra contendo o ativo não complexado em betaciclodextrina).

Estes resultados evidenciaram que a bisnaga de alumínio poderia ser elencada como material de embalagem primária para os estudos de estabilidade deste trabalho, visto sua inércia de reatividade com os constituintes da fórmula.

Adicionalmente, o gel em questão não faz uso de álcool em sua composição, algo comum nas opções terapêuticas comercializadas (enxaguatórios bucais). Assim, neste gel, não houve qualquer evaporação de solventes (água e propilenoglicol), que poderiam culminar em pontos de concentração de excipientes (formação de grumos ou filme) e, conseqüentemente, possível retenção de fármaco na matriz. Soma-se a este fato, a manutenção de características como a adesividade, a textura, a emoliência e a lubrificância da formulação, que se mantiveram devido à opção de não ser utilizado um solvente etanólico como estratégia, por exemplo, para facilitar a solubilização do metilparabeno contido na formulação, uma prática comum em farmacotécnica para preparações que utilizam parabenos.

Por fim, a demonstração de que a  $\beta$ CD se solubilizou na matriz do Gel (2) mantendo as mesmas características de aspecto do Gel (1) (sem  $\beta$ CD e sem IFA), ao passo que o CxC livre no Gel (3) gerou uma formulação turva e esbranquiçada,

endossou de maneira prática o embasamento técnico à utilização de complexação em CD como ferramenta de tecnologia farmacêutica para a solubilização e estabilização do CxC na matriz do gel proposto.

#### 4.5.2. Determinação do pH dos géis fortificado e placebos

A **Tabela 17** apresenta os resultados obtidos da determinação do pH dos géis placebos não fortificados ((1) e (2)) e do gel fortificado (3) realizado por meio de leituras diretas das amostras em Potenciômetro DIGMED em T0 e T24h.

**Tabela 17 - Valores de pH obtidos a partir dos géis fortificado e placebos.**

<b>Tipo de Gel</b>	<b>pH (T0h)</b>	<b>pH (T24h)</b>
Gel (1) – ausência de composto CxC:βCD	5,28	5,33
Gel (2) – ausência de CxC/ presença de βCD	6,39	6,25
Gel (3) – ausência de βCD / presença de CxC	5,40	5,42

A determinação do pH revelou boa estabilidade físico-química da matriz independentemente da presença ou ausência tanto do IFA quanto do agente de solubilização e estabilização do mesmo, a βCD. Isto denota boa compatibilidade física e estabilidade entre os componentes.

Levando-se em consideração as faixas de pH das formulações farmacopeicas convencionais contendo Cx como IFA e que, limitam o pH final destas preparações às faixas de 5,0 a 7,0 para a farmacopeia americana (USP, 2014) e de 5,5 a 7,0 para a farmacopeia britânica (BP, 2014), os resultados de pH dos géis, especialmente do gel fortificado, permitiram trabalhar nas mesmas faixas, mais especificamente na faixa mais restrita de pH variando de 5,5 a 7,0.

Esta especificação de pH permitiu avaliar se o produto final em seu material de embalagem oscilou menos que as preparações convencionais quanto a valores de potencial hidrogeniônico, mantendo-se próximo a um pH ótimo de 6,0-6,5.

#### 4.6. Desenvolvimento do processo produtivo

Durante o estudo e eleição dos excipientes da forma farmacêutica, as operações unitárias e equipamentos passíveis de utilização foram estudados paralelamente. Foi realizada o que se chama de seleção de equipamentos para uso e controle do processo, visando a promoção de melhorias ao longo dos testes.

O Processo Produtivo N°01 (sem aquecimento) não produziu como efeito um gel adequado em termos produtivos e visuais. O gel obtido e o processo foram considerados insatisfatórios, devido à permanência de pequenas partículas e grumos de HPMC. Com estes apontamentos o envase e o pH do produto final não foram realizados uma vez que não houve solubilização completa de todos os componentes perante o intumescimento da matriz aquosa e formação do gel.

As características do gel resultante do Processo Produtivo N°02 (com aquecimento) apontaram melhorias significativas na formulação final. As melhorias e o processo como um todo foram considerados satisfatórios. Contudo, foi identificada a possibilidade de otimizar o tempo de produção e reduzir possíveis perdas de ativo e excipiente durante a etapa de adição de complexo fármaco-CD no propilenoglicol.

O fato do complexo CxC:βCD apenas se dispersar e não se solubilizar já nesta etapa de adição ao co-solvente sugere que, a quantidade de propilenoglicol pudesse ser elevada afim de solubilizar por completo a proporção molar de 1:1, mas impactaria na possível elevação da viscosidade da formulação final. Outra alternativa poderia ser o aumento da proporção molar de βCD em relação ao fármaco como foi utilizado em trabalhos anteriores, aumentando a estabilização e solubilidade do IFA complexado.

Ambas as possibilidades seriam viáveis e passíveis de justificativas técnicas, mas trariam consigo a necessidade de embasamento acerca da segurança de uso de uma maior porcentagem de CD e, em menor escala de impacto, a necessidade de justificar o encarecimento da formulação pelo aumento na composição do propilenoglicol, da βCD, ou de ambos.

Adicionalmente, a elevação da proporção molar 1:1 de complexo fármaco-CD para estequiometrias como 1:2, 1:3 ou 1:4 não permitiria avaliar o grau de estabilização e solubilização do IFA, em uma situação de menor estequiometria de

complexação 1:1, contrariando o objetivo do trabalho.

A avaliação racional em termos produtivos resultaram nas modificações finais que otimizaram a preparação do gel no Processo Produtivo N°03.

A manutenção dos resultados farmacotécnicos satisfatórios observados durante e após a avaliação das formulações acondicionadas tanto em bisnagas quanto no recipiente principal de manipulação, resultaram em uma formulação robusta, oriunda de operações unitárias mais bem delineadas e padronizadas. Além disso, possibilitarem ganhos de tempo de produção e, portanto, redução de custo de fabricação geral.

Não foi necessária a elevação do quantitativo de propilenoglicol na formulação, nem tão pouco a alteração da proporção de molar de fármaco-CD mantida em 1:1.

A **Tabela 18** resume as características de performance visual e físico-química (pH) conforme procedimento executado no item 3.4.8 referente ao três processos de manipulação executados.

**Tabela 18 - Performance visual e leituras de pH dos géis manipulados através do delineamento do processo produtivo.**

Processo	Variável	Performance visual e físico-química	
		Aspecto	Leitura de pH
Processo Produtivo n°01	Processo a frio	Gel translúcido com presença de grumos de HPMC	Não se aplica
Processo Produtivo n°02	Processo com aquecimento e utilização de 2 recipientes de manipulação	Homogêneo, límpido e incolor	5,91
Processo Produtivo n°03	Processo com aquecimento e utilização de um único recipiente de manipulação	Homogêneo, límpido e incolor	5,89

Tanto a fórmula padrão, quanto os testes realizados até alcançar o processo de fabricação ideal (*Master* de Fabricação), estabelecido na terceira abordagem produtiva, serviram de base para a realização do piloto em escala laboratorial para

desenvolvimento do método analítico e estudos de estabilidade. Antes disso, a fórmula padrão e processo produtivo elencado foram utilizados na produção dos géis placebos e do gel fortificado antes deste último lote.

Observou-se assim que, fatores como qualidade, reprodutibilidade e o bom rendimento foram características marcantes do processo definido demonstrando boa capacidade de *scale-up*.

#### 4.7. Caracterização da fórmula padrão

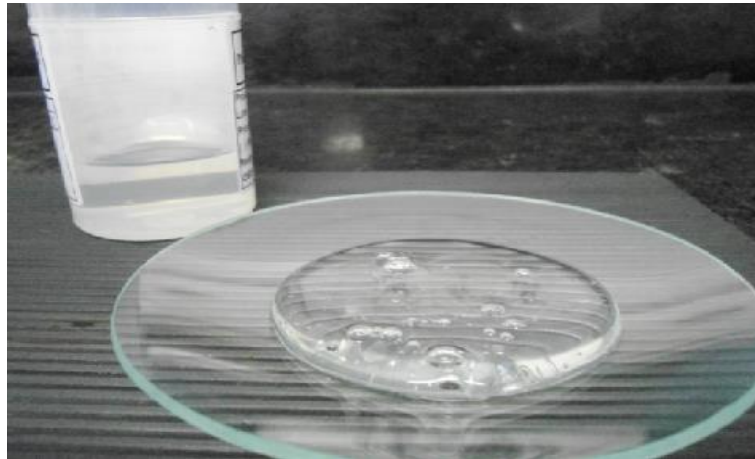
A fórmula padrão caracterizada correspondeu ao gel de base aquosa límpido e transparente contendo o complexo CxC:βCD, fruto da inovação incremental de moléculas efetuada neste trabalho, acrescido dos excipientes elencados.

O gel oriundo desta fórmula e do processo de fabricação adequado, apresentou um rendimento de 100,0% do produto semiacabado. Os estudos de pré-formulação para a eleição de excipientes, o sumário de execução do desenvolvimento do processo produtivo, bem como o próprio preparo e caracterização dos géis placebos e gel fortificado permitiram avaliar o grau de compatibilidade dos componentes como um todo.

Esta confirmação de compatibilidade viabilizou a proposta de complexação do fármaco, promovendo sua completa solubilização, anteriormente não factível como evidenciado pelo Gel (3) (CxC livre) e também nas literaturas estudadas.

##### 4.7.1. Aspecto da fórmula padrão

O aspecto do gel resultante da fórmula padrão foi o de uma preparação farmacêutica ausente de grumos, material reticulado ou precipitado, homogêneo, límpido e incolor, ausente de material particulado ou sujidade e em que o odor característico se manteve. A fórmula padrão é mostrada nas **Figuras 9 e 10**.



**Figura 9 - Característica visual da fórmula padrão**



**Figura 10 - Característica visual da fórmula padrão após o envase em bisnaga**

#### 4.7.2. Determinação do pH da fórmula padrão

A faixa de pH ótimo para a atividade antimicrobiana e antisséptica da Cx é de 5 a 7 (LACHMAN; LIERBERMAN; KANIG, 2001; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). O pH da fórmula padrão foi de 5,89. Sendo assim, o valor de pH da fórmula padrão foi considerado satisfatório.

Este valor de pH demonstra que a adição do complexo fármaco-CD não gerou uma alteração significativa deste parâmetro em comparação com o valores encontrados na avaliação dos géis placebos e gel fortificado. Ao contrário, o pH encontrado manteve-se dentro do limite ótimo estimado entre 6,0-6,5, fato interessante por não exigir qualquer reformulação do produto ou mesmo a adição de um agente corretivo de pH.

A utilização de nenhuma ou da menor quantidade de agente corretivo de pH em formulações líquidas e semissólidas, em especial o gel proposto, é uma grande

vantagem técnica e terapêutica dada a sua importância na manutenção da estabilidade do fármaco, principalmente os sais de Cx que demonstraram capacidade de precipitar na presença de ânions, como grupos hidroxila, por exemplo (GJERMO et al., 1973; BARKVOLL et al., 1988).

O pKa do fármaco determina seu grau de ionização em função do pH, influenciando assim a sua capacidade de difusão nas membranas. No caso da Cx, que possui em pKa de 10,3 a sua ionização reduz a sua difusão na membrana mucosa, garantindo maior disponibilidade na luz da cavidade e ação antimicrobiana local, colaborando para o intuito de liberação estendida do IFA (GJERMO et al., 1973; QI et al., 1994; BARKVOLL et al., 1988, Pubchem, 2014).

O equilíbrio de uma faixa de pH que se relacione com a estabilidade solubilização do IFA em seu veículo e que permita sua melhor atividade terapêutica, promove a manutenção da integridade química da molécula ativa e reduz o surgimento de possíveis produtos tóxicos ao longo da vida útil do medicamento.

O valor de pH obtido, por estar abaixo do valor de pKa do IFA, proporcionou uma condição adequada ao local de aplicação do gel, à ionização do fármaco e condições de estabilidade adequadas. Possibilitou também, em termos práticos, utilizar a especificação de pH de 5,5 a 7,0 para o monitoramento no produto acabado durante sua avaliação de estabilidade.

#### **4.8. Especificação técnica de produto acabado**

Com o conhecimento adquirido nos estudos de pré-formulação, pesquisas bibliográficas e ensaios práticos, atrelados às informações compendiais da matéria-prima ativa e de preparações farmacêuticas com sais de Cx, foi possível estabelecer os parâmetros e critérios de qualidade sobre os quais a formulação proposta deve cumprir ao longo dos estudos de estabilidade conduzidos.

O **Quadro 3** traz os testes e as especificações de qualidade (limites) que devem ser respeitados pela formulação em termos de qualidade física, físico-química e microbiológica.

**Quadro 3 - Especificações técnicas de produto**

<b>Especificações do Produto</b>	
<b>Testes</b>	<b>Limites</b>
Descrição	Gel homogêneo, límpido e incolor <sup>(2)</sup> .
Faixa de pH	5,5-7,0 <sup>(2)</sup>
Peso Teórico	20,0g <sup>(1)</sup> .
Material Particulado	Ausente <sup>(3)</sup> .
Determinação de Peso	Satisfaz os requerimentos <sup>(1)</sup> .
Teor de Dicloridrato de Clorexidina	5,4 a 6,6 mg/g (90,0 a 110,0%) <sup>(2)</sup> .
Limite de <i>p</i> -cloroanilina	≤ 0,05% em até 1g de Dicloridrato de Clorexidina <sup>(4)</sup> .
Bactérias Viáveis Totais	Máximo 10 <sup>2</sup> UFC/g <sup>(1)</sup> .
Fungos e/ou Leveduras Viáveis	Máximo 10 UFC/g <sup>(1)</sup> .
Patógenos	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente em 1g ou 1mL.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente em 1g ou 1mL <sup>(1)</sup> .

(1) Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição, Volume 1, métodos gerais, 2010

(2) Especificação interna

(3) Farmacopeia Portuguesa, 8ª Edição, Volume 1, capítulos gerais, 2005

(4) RDC 58/2013

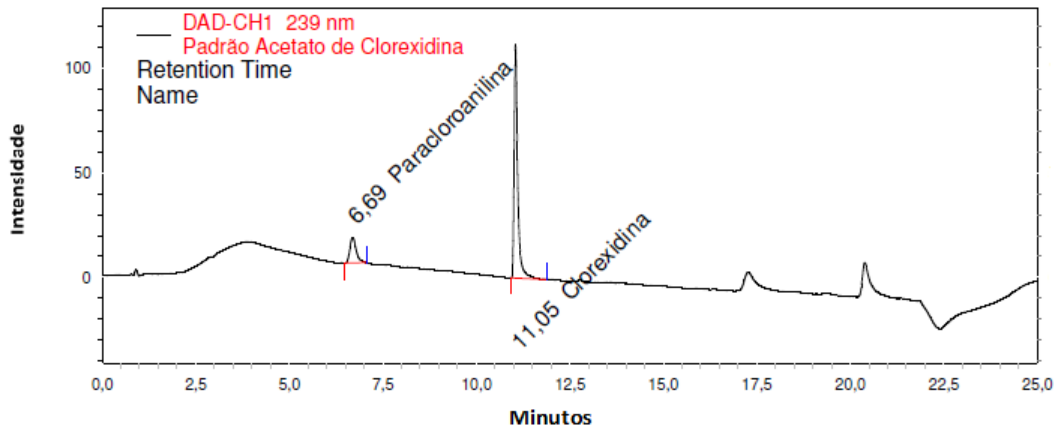
#### **4.9. Desenvolvimento de método analítico por CLAE para a quantificação de dicloridrato de clorexidina presente na formulação**

O método desenvolvido otimizado a partir das condições cromatográficas expostas na monografia de clorexidina da USP 2014, apresentou as seguintes condições: coluna cromatográfica de fase reversa C18, dimensões 100x4,6 mm, partícula de 3,5 µm (Zorbax Eclipse Plus - Agilent), fase móvel constituída por mistura de acetonitrila e solução aquosa de trietilamina 1% v/v pH 3,0, com gradiente de acordo com a **Tabela 11**, fluxo 1,5 mL/min, temperatura de 40°C com detecção por ultravioleta (UV) em λ 239 nm e volume de injeção 2 µL.

Os parâmetros cromatográficos do pico correspondente ao dicloridrato clorexidina apresentaram valores adequados. O valor de assimetria do pico foi menor que 2,0, o número de pratos teóricos maior que 2000 e o fator capacidade (k)

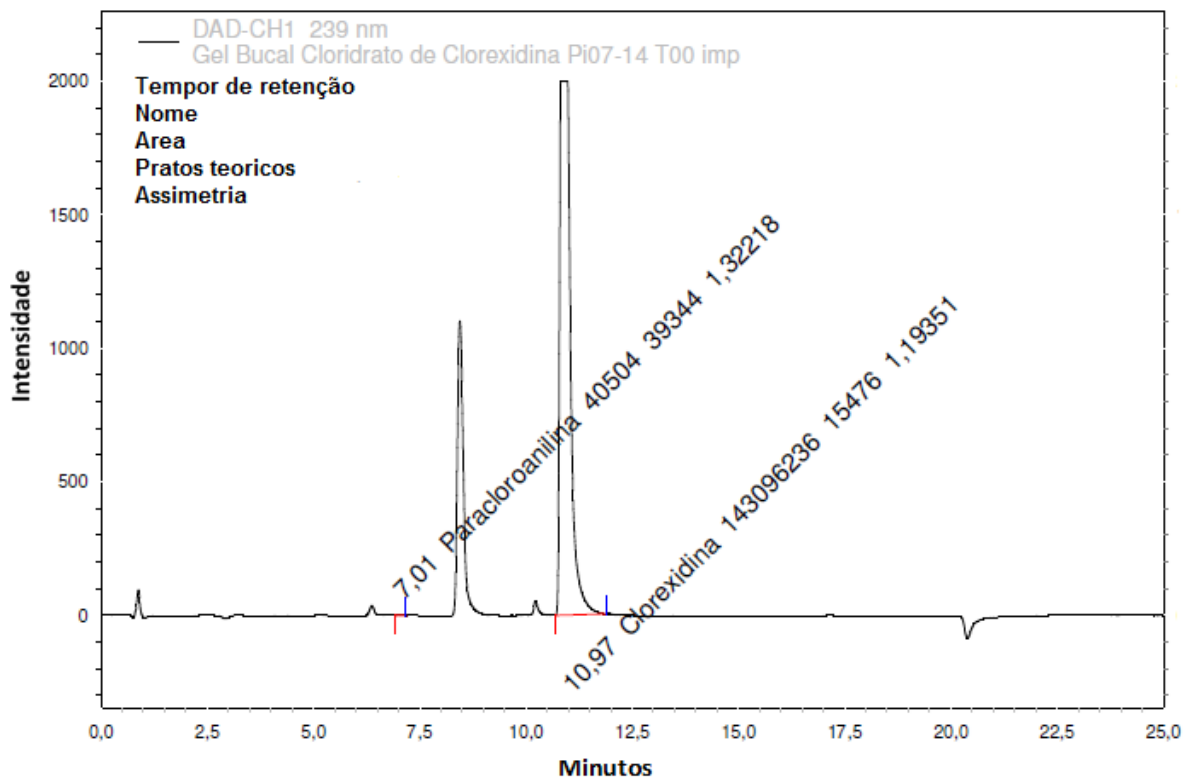


foi maior que 1,0, o que permite a integração dos picos de forma não errônea.



**Figura 11** - Cromatograma de clorexidina obtido com as condições cromatográficas desenvolvidas e otimizadas. Condições: eluição gradiente, FM: acetonitrila e solução aquosa de trietilamina 1% v/v pH 3,0, fluxo 1,5 mL/min, temperatura 40 °C, detecção UV/DAD  $\lambda$  239 nm, volume de injeção 2  $\mu$ L.

O método desenvolvido também foi útil para avaliar os teores da impureza *p*-cloroanilina, uma vez que a resolução entre os picos da impureza e do ativo apresentou valor maior 2,0, logo, com uma separação apropriada para integração dos picos separados como exposto no cromatograma exibido na **Figura 12**.

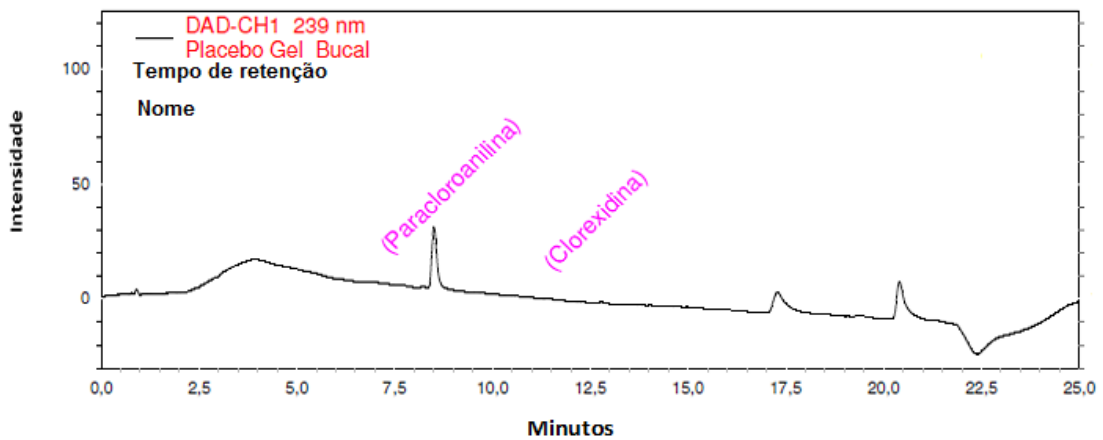


**Figura 12** – Cromatograma de clorexidina junto à impureza *p*-cloroanilina obtido com as condições cromatográficas desenvolvidas e otimizadas. Condições: eluição gradiente, FM: acetonitrila e solução aquosa de trietilamina 1% v/v pH 3,0, fluxo 1,5 mL/min, temperatura 40 °C, detecção UV/DAD  $\lambda$  239 nm, volume de injeção 2  $\mu$ L.

#### 4.10. Validação de método analítico por CLAE para quantificação de dicloridrato de clorexidina presente na formulação

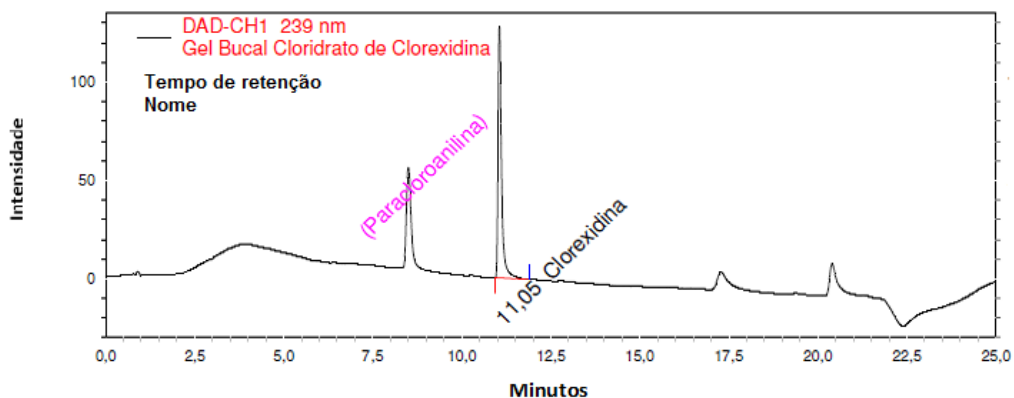
##### 4.10.1. Seletividade

A solução de placebo injetada no cromatógrafo sob as condições do método de quantificação do CxC por CLAE desenvolvido gerou um cromatograma que não apresentou pico no tempo de retenção correspondente ao pico do CxC (**Figura 13**). Logo, não há excipientes na formulação da amostra que coeluem junto ao ativo.



**Figura 13 - Cromatogramas da solução placebo.**

Também foi injetada a solução contendo placebo fortificado com padrão de acetato de clorexidina (**Figura 14**). O pico cromatográfico correspondente à clorexidina apresentou-se puro junto aos componentes excipientes. A pureza cromatográfica do pico de clorexidina apresentou índice de similaridade espectral maior 0,99, o que significa que não há interferência de substâncias de espectro diferente ao da clorexidina que elua junto ao ativo.



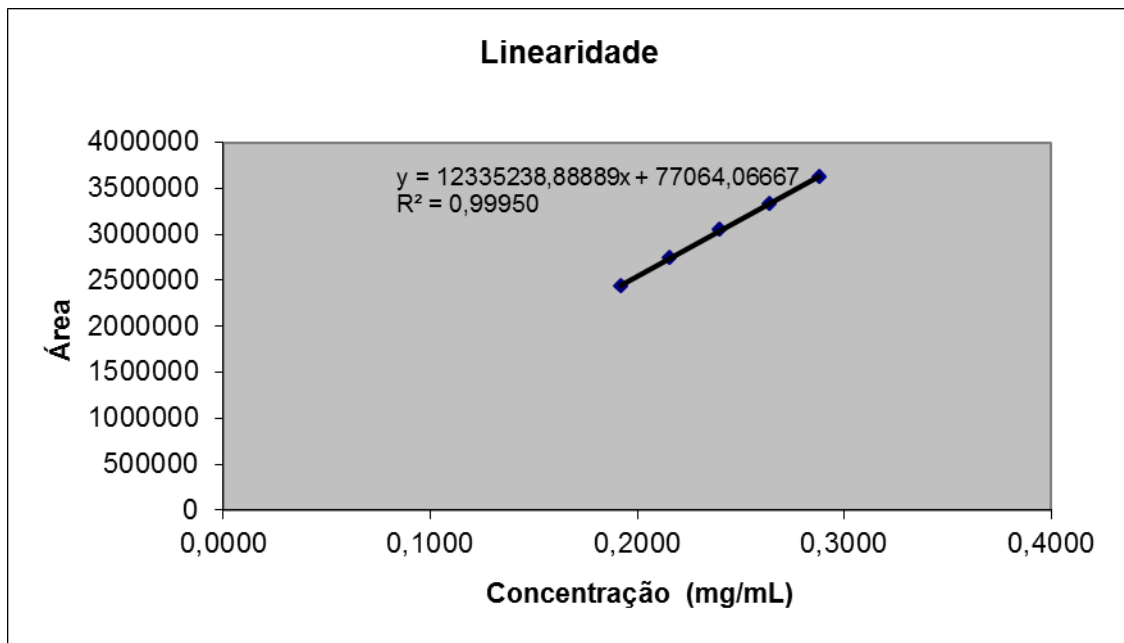
**Figura 14 - Cromatogramas da solução placebo fortificada com padrão de acetato de clorexidina.**

4.10.2. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pela injeção de cinco soluções, em triplicata no cromatógrafo, cujos preparos foram apresentados na **Tabela 12**. Os resultados do teste estão expostos na **Tabela 19** e a curva analítica construída a partir da regressão linear desses dados está apresentada na **Figura 15**.

**Tabela 19 - Resultados de avaliação da linearidade do método para determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE.**

Nível (%)	Concentração (X) (µg/mL)	Área (Y)
80	0,192	2441662
		2431783
		2434881
90	0,216	2763667
		2735866
		2729336
100	0,240	3044513
		3085100
		3033364
110	0,264	3375861
		3331997
		3290547
120	0,288	3641554
		3574935
		3647755



**Figura 15 - Curva analítica para avaliação da linearidade do método para determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE.**

A linearidade do método de determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE na faixa de concentração de 0,192 a 0,288 mg/mL foi comprovada. O coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,99950$ ) foi superior a 0,99 e a regressão foi significativa, uma vez que o valor de  $F_{\text{calculado}}$  (410241,2377) é maior que o  $F_{\text{crítico}}$  ( $2,1177 \times 10^{-24}$ ) para  $p < 0,05$  (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

#### 4.10.3. Repetitividade e precisão intermediária

Para avaliar a repetitividade do método de determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE foram preparadas seis replicatas das amostras correspondentes a o teste de doseamento. Para a precisão intermediária, foram preparadas mais seis amostras. Os resultados da avaliação da repetitividade para cada um dos testes estão apresentados na **Tabela 20**.

**Tabela 20 - Resultados de avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método de determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE.**

Parâmetro	Nível de concentração	
		100%
Repetitividade (n=6)	Média da área	35647116,17
	%DPR	4,88
Precisão intermediária (n=6)	Média da área	3802101,83
	%DPR	4,76
Entre médias da repetitividade e da Precisão intermediária	%DPR	4,56

Os valores de DPR da repetitividade e entre as médias da repetitividade e precisão intermediária foram inferiores a 5%, o que significa que o método de quantificação de dicloridrato de clorexidina por CLAE avaliado é preciso (BRASIL, 2003).

#### 4.10.4. Exatidão

A avaliação da exatidão do método de determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE foi realizada com placebo fortificado com quantidades conhecidas de substância de referência de clorexidina que geraram soluções cujas concentrações contemplam a faixa correspondente ao teste de doseamento. A porcentagem de recuperação foi calculada pela razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica de dicloridrato de clorexidina. Os resultados estão expostos na **Tabela 21**.

**Tabela 21** - Resultados de avaliação da exatidão do método de determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE pela recuperação de ativo adicionado ao placebo.

Nível (%)	Concentração teórica de dicloridrato de clorexidina (mg/mL)	Concentração real obtida de dicloridrato de clorexidina (mg/mL)	Recuperação (%)	Média/DPR (%)
80	0,192	0,191	99,50	99,46/ 0,09
		0,191	99,36	
		0,191	99,52	
100	0,240	0,238	99,33	98,69/ 0,61
		0,237	98,59	
		0,236	98,14	
120	0,288	0,289	100,43	100,77/ 0,37
		0,289	100,37	
		0,287	99,64	

Os resultados de recuperação para cada nível de concentração permaneceram entre 98,0 e 102,0% e os valores de DPR foram menores que 2%; isso comprova a exatidão do método (GREEN, 1996).

#### 4.10.5. Robustez

A fim de avaliar se o método é capaz de resistir a alterações durante as análises de rotina, algumas condições cromatográficas foram modificadas. Os fluxos testados foram 1,3 e 1,7 mL/min, as temperaturas 38 e 42°C e outro lote da coluna cromatográfica também foi avaliado. Utilizaram-se amostras do doseamento em triplicata. Os teores encontrados na avaliação da robustez foram comparados aos teores obtidos com amostras submetidas ao método não alterado (nominal) por meio do DPR entre as médias (**Tabela 22**).

**Tabela 22 - Resultados de avaliação da robustez do método de determinação de dicloridrato de clorexidina por CLAE.**

Condição	Média / DPR (%)	DPR em relação à média nominal (%)
Nominal*	107,03 / 3,09	—
Fluxo 1,3 mL/min	105,43 / 2,89	1,07
Fluxo 1,7 mL/min	106,67 / 3,48	0,24
Temperatura 38°C	103,28 / 2,72	2,52
Temperatura 42°C	104,39 / 4,33	1,77
Coluna 2° lote	105,54 / 3,56	0,99

\* Nota: Condições cromatográficas não alteradas.

Visto que os valores de DPR entre as médias dos teores obtidos com as condições alteradas em relação à média na condição nominal foram menores que 5% (GREEN,1996), o método foi considerado robusto diante das alterações avaliadas.

#### 4.11. Estudo de estabilidade

Os estudos de estabilidade acelerada, conduzidos através da metodologia proposta, trouxeram os seguintes resultados conforme tópicos a seguir.

##### 4.11.1. Condição 1 de estudo de estabilidade

A Condição 1 objetivou trazer evidências visando propor o armazenamento do produto à temperatura de 15°C a 30°C. A **Tabela 23** mostra os resultados físicos e físico-químicos obtidos neste estudo à temperatura de 40°C ± 2°C e UR de 75% ± 5%.

**Tabela 23 - Condição 1 de armazenamento a 15-30°C.**

		Temperatura e Umidade Relativa 40°C ± 2°C e 75% ± 5% de UR				
Ensaio	Período	T <sub>zero</sub> 07/07/14	T <sub>1° mês</sub> 07/08/14	T <sub>2° Mês</sub> 07/09/14	T <sub>3° mês</sub> 07/12/14	T <sub>6° Mês</sub> 07/01/15
	Especificação					
Aspecto	Gel homogêneo, límpido e incolor	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Não Conforme
Teor de CxC	90-110%	99,97	99,85	101,59	94,49	87,59
Faixa de pH	5,5 – 7,0	5,91	5,87	5,89	6,10	6,25
Perda de Peso	20g: Variação de peso ≤ 5%	0%	1,80%	0,24%	0,09%	0,15%
Material Particulado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Limite de pCLA	≤ 500µg/g de CxC (≤ 0,05%)	0,025%	0,037%	0,040%	0,047%	0,045%

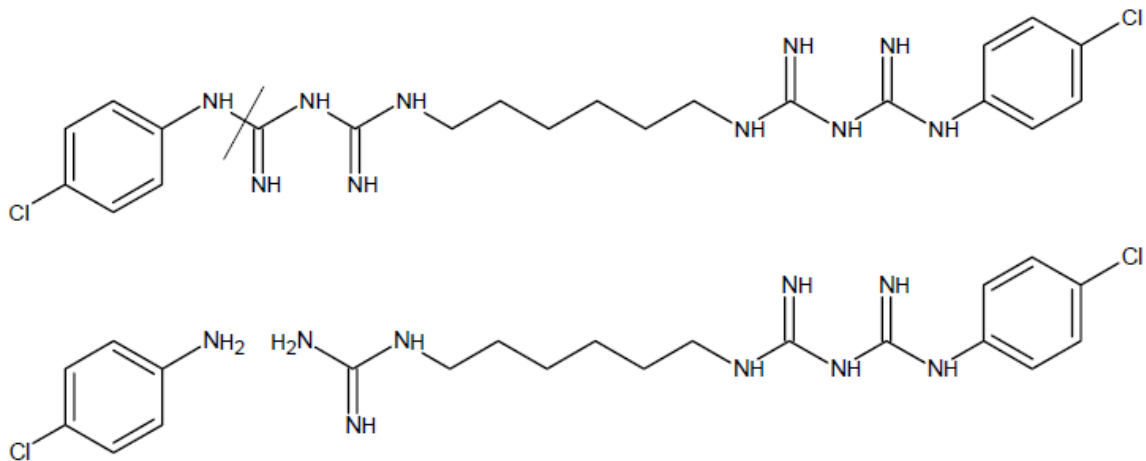
Os teores de CxC no gel demonstraram que o produto manteve-se dentro do especificado até o T3ºMês de estresse. Contudo, mesmo aprovado dentro da faixa especificada (90-110%), o teor do 3º mês apresentou queda de 7,1% em relação ao período anterior (T2ºmês) e de 5,48% em relação ao TZero. Este último doseamento excede em 0,48% a variação máxima de 5,0% sobre o valor de liberação do lote (TZero).

Em situações onde que a queda de teor supera a especificação de 5% no estudo acelerado e é inferior a 10%, mantendo-se as demais especificações dentro de seus limites, seu prazo de validade pode ser reduzido de 24 meses para até 12 meses (BRASIL, 2005; SANTOS; MORETO, 2005; GIBSON, 2009).

De maneira a avaliar a queda ou manutenção do teor e das demais especificações nesta condição mais destrutiva de estabilidade, o estudo foi continuado até o T6ºmês. Os ensaios de pH, peso, material particulado e limite de pCLA se mantiveram dentro do especificado. Porém, um novo registro de queda de teor de CxC acentuado e fora da especificação foi detectado: 87,59% (queda de 6,79% em relação ao período anterior - T3ºmês - e de 12,38% em relação TZero), reprovando o produto nesta condição de estresse pronunciado.

A elevação dos níveis de formação de pCLA apresentados pode estar

relacionada com as condições ambientais mais drásticas, conforme citado no item 1.3 (Estudo do insumo farmacêutico ativo), as quais favorecem a degradação do ativo mediante clivagem hidrolítica da molécula de Cx em pCLA e, no mínimo, um segundo subproduto conforme **Figura 16** (ROWE et al., 2009; CARDOSO et al., 2011).



**Figura 16 - Estruturas moleculares do dicloridrato de clorexidina e da *p*-cloroanilina exibindo o ponto de clivagem e formação da impureza.**

No entanto, os valores encontrados para a impureza demonstram a robustez da formulação proposta, notada pela discreta modificação de pH do gel frente às alterações físico-químicas ocorridas durante a exposição ao calor e umidade excessivos.

Ao término do estudo o aspecto visual do produto não correspondeu à especificação como nos períodos anteriores. Visualmente o gel apresentou turbidez esbranquiçada e um leve precipitado de cor branca, muito provavelmente relacionado à queda de teor da clorexidina. Esta observação fica evidenciada na **Figura 17**.





**Figura 17** – Representação visual da preparação farmacêutica ao fim da Condição 1 de estudo de estabilidade acelerada.

As CD naturais são menos solúveis que as CD sintéticas, assim, quando utilizadas na formação de complexos com fármacos lipofílicos e outros compostos com solubilidade aquosa limitada, tendem a precipitar os complexos fármaco-CD em veículos de base aquosa. Especialmente, a  $\beta$ CD forma ligações de hidrogênio intramolecular entre grupos OH secundários, o que limita a formação de ligações de hidrogênio com as moléculas de água circundantes, resultando em sua menor solubilidade aquosa (LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E., 1993).

Outra hipótese levantada sobre o aspecto visual não conforme, seria a competição pela cavidade hidrofóbica da  $\beta$ CD entre a Cx e o metilparabeno. A Cx é uma molécula simétrica com dois grupamentos *p*-clorofenil substituídos por grupos guanidínicos hidrofílicos e o metilparabeno possui um grupo *p*-hidroxifenil com substituição hidrofílica. Assim, sob temperatura elevada, um desequilíbrio da complexação culminaria na substituição do anel aromático da Cx pelo anel aromático do metilparabeno na cavidade interna da  $\beta$ CD, precipitando parte do ativo.

Mesmo com os apontamentos referentes ao teor de Cx e inferências ao comportamento do metilparabeno, os resultados microbiológicos, revelaram que a integridade biológica da fórmula manteve-se inalterada, muito provavelmente pela ação do conservante, sinergicamente intensificada pelo próprio dicloridrato de clorexidina e o subproduto da clivagem.

A **Tabela 24** apresenta os resultados referentes aos limites microbianos

avaliados no início e término do estudo conforme preconizado por legislação vigente (BRASIL, 2005).

**Tabela 24 - Condição 1- Resultados Microbiológicos.**

Contagem de Mesófilos			
Ensaio	Período	T <sub>zero</sub> 30/06/14 a 07/07/14	T <sub>6° Mês</sub> 01/01/15 a 14/01/15
	Especificação		
Bactérias viáveis totais	Máximo 10 <sup>2</sup> UFC/g	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)
Fungos e/ou leveduras viáveis	Máximo 10 UFC/g	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)
Pesquisa de Patógenos			
Ensaio	Período	T <sub>zero</sub> 01/07/15 a 02/07/14	T <sub>6° Mês</sub> 07/01/15 a 09/01/15
	Especificação		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente em 1g ou 1mL	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente em 1g ou 1mL	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)

#### 4.11.2. Condição 2 de estudo de estabilidade

A Condição 2 de estudo de estabilidade objetivou trazer evidências para endossar a possibilidade de uma condição de armazenamento do produto à temperatura entre 2°C e 8°C.

A **Tabela 25** mostra os resultados físicos e físico-químicos obtidos neste estudo à temperatura de 25°C ± 2°C e UR de 60% ± 5%.

**Tabela 25 - Condição 2 de armazenamento a 2-8°C.**

		Temperatura e Umidade Relativa 25°C ± 2°C e 60% ± 5% de UR			
		Período	T <sub>zero</sub> 07/07/14	T <sub>3° Mês</sub> 07/12/14	T <sub>6° Mês</sub> 07/01/15
Ensaio	Especificação				
Aspecto	Gel homogêneo, límpido e incolor		Conforme	Conforme	Conforme
Teor de CxC	90-110%		99,97	101,87	99,55
Faixa de pH	5,5 – 7,0		5,91	6,36	6,45
Material Particulado	Ausente		Ausente	Ausente	Ausente
Limite de pCLA	≤ 500µg/g de CxC (≤ 0,05%)		0,025%	0,026%	0,024%

Diferente do comportamento observado para o produto estressado na Condição 1, no estudo conduzido à temperatura de 25°C ± 2°C, houve manutenção da integridade físico-química do gel através da avaliação dos doseamentos de CxC obtidas. Adicionalmente, os demais ensaios se mantiveram igualmente aprovados e dentro das especificações.

Novamente discreta variação do pH da formulação foi observada ao longo do estudo, reforçando a estabilidade da composição farmacêutica. Os valores de impureza obtidos permaneceram praticamente inalterados em relação às análises de liberação do lote.

Estes apontamentos evidenciam e fortalecem a teoria de que fatores como o tempo, a temperatura, umidade e variações de potencial hidrogeniônico possam levar à degradação da clorexidina em *p*-cloroanilina e outros subprodutos. A redução de temperatura da ordem de 15°C nesta condição de estudo em relação à condição anterior demonstra de forma prática esta afirmação.

É interessante analisar que, o estudo na Condição 2 de armazenamento (25°C ± 2°C e UR de 60% ± 5%) se aproxima das condições de um estudo de estabilidade de longa duração (24 meses sob 30°C ± 2°C e 75% UR ± 5% UR) para produtos que devem ser armazenados entre 15°C e 30°C em suas embalagens. Este fato endossa a possibilidade de que a fórmula possa resistir a um estudo de 24

meses sob aquelas condições ambientais, algo igualmente aceito acerca de estudos de estabilidade para fins de registro de produto (BRASIL, 2005).

A **Tabela 26** apresenta os resultados referentes aos limites microbianos avaliados no início e término do estudo conforme preconizado por legislação vigente (BRASIL, 2005).

**Tabela 26 - Condição 2 - Resultados Microbiológicos.**

<b>Contagem de Mesófilos</b>			
<b>Ensaio</b>	<b>Período</b>	<b>T<sub>zero</sub></b> <b>30/06/14 a 07/07/14</b>	<b>T<sub>6° Mês</sub></b> <b>07/01/15 a 14/01/15</b>
	<b>Especificação</b>		
Bactérias viáveis totais	Máximo 10 <sup>2</sup> UFC/g	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)
Fungos e/ou leveduras viáveis	Máximo 10 UFC/g	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)
<b>Pesquisa de Patógenos</b>			
<b>Ensaio</b>	<b>Período</b>	<b>T<sub>zero</sub></b> <b>01/07/14 a 02/07/14</b>	<b>T<sub>6° Mês</sub></b> <b>08/01/15 a 09/01/15</b>
	<b>Especificação</b>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente em 1g ou 1mL	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente em 1g ou 1mL	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)

Assim como na condição anterior, os resultados microbiológicos demonstraram a integridade microbiológica do gel pela presença do metilparabeno na formulação, com sua ação potencializada pelo co-solvente (propilenoglicol), assim como o próprio CxC.

#### 4.11.3. Condição 3 de estudo de estabilidade

A Condição 3, originalmente uma condição de estudo de longa duração (24 meses, 5°C ± 3°C, armazenamento entre 2°C e 8°C) foi adaptada para um desenho de estudo acelerado que trouxe mais informações e evidências para a materializar o de armazenamento do produto de 2°C a 8°C complementarmente à Condição 2.

Para além disso, muito se avaliou fisicamente em termos de características organolépticas, especialmente a cor do gel submetido a baixas temperaturas, neste

caso, bem como sua aceitabilidade comercial versus a aparência do produto mantido armazenado entre 15°C e 30°C, como na Condição 1.

A **Tabela 27** mostra os resultados físicos e físico-químicos obtidos neste estudo adaptado à temperatura entre 2°C e 8°C.

**Tabela 27 - Condição 3 de armazenamento a 2-8°C.**

Ensaio	Especificação	Temperatura 5°C ± 3°C		
		Período	T <sub>zero</sub> 07/07/14	T <sub>3° Mês</sub> 07/12/14
Aspecto	Gel homogêneo, límpido e incolor	Conforme	Gel de aparência branca	Gel de aparência branca
Teor de CxC	90-110%	99,97	99,40	100,97
Faixa de pH	5,5 – 7,0	5,91	6,12	6,09
Material Particulado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Limite de pCLA	≤ 500µg/g de CxC (≤ 0,05%)	0,025%	0,025%	0,025%

Os resultados extraídos desta última tabela reafirmam as condições de estabilidade e qualidade no produto final, na condição de armazenamento entre 2°C e 8°C, visto que todos os ensaios apresentaram resultados satisfatórios frente às suas especificações.

Ressalva foi feita apenas à questão organoléptica. O gel adquiriu um aspecto opaco, de aparência branca a levemente acinzentada, esse fenômeno foi devido ao fato da matriz ser essencialmente aquosa e ter sido submetida a temperaturas frias (geladeira). Esta “divergência” de especificação de aspecto desapareceu quando o produto adquiriu padrões de temperatura ambiental.

Neste sentido, durante a utilização terapêutica do gel, e não de armazenamento, pode-se concluir que, previamente à sua aplicação clínica, o mesmo deve ser submetido à temperatura ambiente antes de sua inserção na mucosa bucal.

A **Tabela 28** apresenta os resultados referentes aos limites microbianos avaliados no início e no término do estudo conforme preconizado por legislação vigente (BRASIL, 2005).

**Tabela 28 - Condição 3 - Resultados Microbiológicos.**

<b>Contagem de Mesófilos</b>			
<b>Ensaio</b>	<b>Período</b>	<b>T<sub>zero</sub></b> <b>30/06/14 a 07/07/14</b>	<b>T<sub>6° Mês</sub></b> <b>07/01/15 a 14/01/15</b>
	<b>Especificação</b>		
Bactérias viáveis totais	Máximo 10 <sup>2</sup> UFC/g	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)
Fungos e/ou leveduras viáveis	Máximo 10 UFC/g	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)
<b>Pesquisa de Patógenos</b>			
<b>Ensaio</b>	<b>Período</b>	<b>T<sub>zero</sub></b> <b>01/07/14 a 02/07/14</b>	<b>T<sub>6° Mês</sub></b> <b>08/01/15 a 09/01/15</b>
	<b>Especificação</b>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente em 1g ou 1mL	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente em 1g ou 1mL	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)	Não houve crescimento (< 10 UFC/g)

Finalizando os ensaios, os resultados microbiológicos revelaram que a integridade biológica manteve-se, mais uma vez, ao término da estabilidade de maneira análoga às duas condições anteriores.

Ao avaliar os resultados de conservação microbiológica ao fim dos três estudos e retomando a discussão sobre a degradação da clorexidina em *p*-cloroanilina e, pelo menos, um segundo subproduto, é possível inferir apontamentos relevantes.

O primeiro refere-se ao poder de conservação da clorexidina em porcentagens inferiores ao valor rotulado, visto que na Condição 1, com um teor de CxC inferior a 90% o gel manteve-se íntegro, é possível que concentrações inferiores a 0,6% de CxC complexada em  $\beta$ CD poderiam ser efetivas clinicamente às preparações convencionais e ao próprio gel proposto.

O segundo apontamento faz alusão à investigação do(s) subproduto(s) gerados pela degradação do ativo. Dada a aprovação microbiológica do gel com 87,59% de teor de CxC ao fim do estudo na Condição 1, assim como nas Condições 2 e 3, é possível que a(s) substância(s) geradas pela clivagem da Cx também possuem ação antimicrobiana como seu precursor.

Estes achados e apontamentos colocam a formulação, em termos gerais,

como satisfatória aos fins terapêuticos a que se destina, assim como esclarece algum parâmetros de estabilidade ao passo que permite levantar discussões futuras.

## CONCLUSÃO

Através de conceitos racionais de pré-formulação e delineamento farmacotécnico, veiculou-se o dicloridrato de clorexidina em uma nova preparação farmacêutica para o tratamento de gengivites e periodontites: gel bucal. A característica de baixa solubilidade em água do CxC que, a princípio, inviabilizaria o preparo de uma matriz mucoadesiva predominantemente aquosa, foi contornada pela complexação do fármaco em betaciclodextrina. Esta tecnologia de inovação incremental, gerou um composto fármaco-CD na proporção molar 1:1, solúvel em água, situação improvável com CxC livre.

Os complexos foram obtidos via liofilização, com alto rendimento final. Os demais excipientes foram elencados respeitando parâmetros técnico-regulatórios. A eficiência produtiva foi considerada, permitindo parametrizar o processo de fabricação da formulação final. Através da avaliação de pontos críticos, gargalos produtivos e indicadores chave de performance, obteve-se um processo robusto e passível de escalonamento para ambientes produtivos.

A estabilidade e qualidade da formulação foram avaliadas por 6 meses em diferentes condições de temperatura e umidade no material de embalagem primária proposto: bisnaga de alumínio. Foram avaliados parâmetros físicos, microbiológicos e físico-químicos.

O gel apresentou-se estável em duas condições de estabilidade acelerada:  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e UR de  $60\% \pm 5\%$  e a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Desta forma é possível o armazenamento do produto à temperatura entre  $2^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$ .

Na condição mais drástica:  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e UR de  $75\% \pm 5\%$  houve queda de teor de CxC a partir do 3º mês e reprovação do mesmo em 6º mês de estudo obtendo-se um teor final de 87,59% de ativo. Este valor é 2,41% inferior ao limite mínimo de sua especificação (90% do VR). Todos os demais parâmetros se mantiveram dentro de suas especificações, porém este resultado inviabilizaria, num primeiro momento, o armazenamento do produto à temperatura entre  $15^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C}$ .



## PERSPECTIVAS FUTURAS

Pelo que foi apresentado neste trabalho, caminhos se abrem para ações inovadoras e criativas, que melhoraram a qualidade dos serviços de saúde ao passo que impulsionam ações de vanguarda no desenvolvimento de medicamentos. Abordagens farmacotécnicas que desenvolvam formas farmacêuticas de melhor biodisponibilidade e perfil farmacocinético controlado, com estabilidade adequada, são desafios aos tecnologistas de instituições públicas e privadas. Tais abordagens devem ser simples, reprodutíveis, economicamente viáveis e passíveis de sofrer transposição de escala.

A indústria e o sociedade se beneficiarão. A primeira poderá dar expressão à produção de sistemas terapêuticos de alto valor agregado, por meio de suas unidades de P&D, gerando fórmulas e processos que permitam obter preparações de baixa toxicidade e com requisitos de qualidade, segurança e eficácia; enquanto a segunda usufruirá de um leque terapêutico mais seguro, efetivo e com maior adesão ao tratamento.

Os resultados obtidos para esta formulação permitirão aprofundar os estudos sobre a substantividade do complexo Cx $\beta$ CD frente às formulações convencionais e avaliar clinicamente a redução drástica dos efeitos indesejáveis.

Estudos de estabilidade de longa duração, para o complexo 1:1, poderão ser realizados de modo a concluir efetivamente a estabilidade ou não da formulação, caso seja interessante armazená-la entre 15 e 30°C.

A nível de fórmula, poderão ser avaliados géis sem conservantes microbiológicos, uma vez que o próprio IFA pode exercer tal função. Em outra abordagem, o metilparabeno poderá ser substituído por conservantes sem grupos fenil, como o acetato de sódio por exemplo, minimizando a competição pela cavidade da  $\beta$ CD. Ambas as estratégias poderão elucidar se o fenômeno de descomplexação observado nos resultados de estabilidade acelerada a 40°C  $\pm$  2°C e UR de 75%  $\pm$  5% seriam sanados, potencializando a qualidade do gel formulado.

Trata-se, portanto, de uma plataforma de estudo que não se esgota, ao contrário, expande-se, e desperta o interesse de pesquisadores, os quais possam trazer achados e informações ainda mais relevantes e esclarecedores.

## REFERÊNCIAS

- 3M ESPE DENTAL PROFESSIONALS: Peridex™ Oral Rinse. Disponível em: <[http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en\\_US/3M-ESPE-NA/dental-professionals/](http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/3M-ESPE-NA/dental-professionals/)>. Acesso em: 18/06/2014.
- ALLEN Jr., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. **A theoretical basis for biopharmaceutic drug classification: the correlation of an in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability**. Pharm. Res., v. 12, p. 413-420, 1995.
- AMIDON, G.L.; BERMEJO, M. **Modern Biopharmaceuticals [computer program]**. Version 6.03, TSRL, Inc., 2003.
- ARAÚJO, A.S.S.; MERCURI, L.P.; STORPIRTIS, S. **Thermal analysis of antirretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms**. Int. J. Pharmac., 260:303-314, 2002.
- ATGER, V.M., MOYA, M.L., STOUT, G.W., RODRIGUEZ, W.V., PHILLIPS, M. C. **Cyclodextrins as Catalysts for the Removal of Cholesterol from Macrophage Foam Cells**. J. Clin. Invest. 99,773–780, 1997.
- AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BARKVOLL, P.; RÖLLA, G.; BELLAGAMBA, S. **Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium monofluorophosphate in vitro**. Scand. J. Dent. Res., v. 96, p. 30-33, 1988.
- BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. **Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers**. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.
- BRASIL, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Lei 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula os direitos e obrigações relativos à Propriedade Industrial. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 de junho de 1996.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 de janeiro de 1999.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei 6.360/76, estabelece o medicamento genérico. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 de fevereiro de 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 junho de 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Diretrizes da Política Nacional de Saúde Bucal**, Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza *ad referendum* a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1º de outubro de 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária. RDC nº 37, de 3 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para Isenção e substituição dos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 de agosto de 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária. RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013. Estabelece os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de dezembro de 2013.

BISPHARMA PACKAGING – Produtos: embalagens de alumínio. Disponível em: <[www.bispharma.com.br](http://www.bispharma.com.br)>. Acesso em: 15/04/2014.

BRUCE, P.; MINKKINEM, P.; RIEKKOLA, M.L. **Practical method validation: validation suficiente for analysis method**. *MiKrochimica Acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.

CAMPBELL, D. **Pharmerging Markets**. Apresentação realizada em BIO Convention 2011, Partnering for Global Health Forum. Washington, DC, 2011.

CARDOSO, M.A., FÁVERO, M.L.D., GASPARETTO, J.C., HESS, B.S., STREMEL, D.P., PONTAROLLO, R. **Development and validation for an RP-HPLC method for determination of chlorhexidine and p-chloroaniline in various pharmaceutical formulations**. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 34, p. 1556-1567, 2011.

CHEMICALIZE.ORG: By ChemyAxon Ltd. Disponível em <<http://www.chemicalize.org>>. Acesso em: 21/03/2014.

CLINICAL TRIALS.GOV: A service of the U.S. National Institutes of Health. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov>>. Acesso em: 18/06/2014.

BRITISH PHARMACOPOEIA, **Medicinal Substances**. Vol. I and II, London: The Stationery Office, 2014

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. **The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability.** Journal of Controlled Release, v. 123, p. 78-99, 2007.

CHRISTERSSON, L.A.; ZAMBON, R.G.; DUNFORD, R.G.; GROSSI, S.G.; GENCO, R.J. **Specific subgingival bacteria and diagnosis of gingivitis and periodontitis.** J. Dent. Res., v. 68 (Spec. Iss), p. 1633-1639, 1989.

COLGATE-PALMOLIVE COMPANY: Enxaguatório Bucal Colgate Periogard®. Disponível em <<http://www.colgateprofissional.com.br>>. Acesso em 18/06/2014.

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S.; FERRAZ, H.G. **Aspectos farmacotécnicos relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos.** Rev. Bras. Cien. Farma., v. 21, p. 23-41, 2000.

CORTÉS, M.E. **Estudo dos compostos de inclusão tipo hospedeiro convidado entre a clorexidina e a beta-ciclodextrina: Avaliação in vitro.** São Paulo: Faculdade de Odontologia, USP, 1999.

CORTÉS, M.E.; SINISTERRA, R.D.; AVILA-CAMPO, M.A.; TORTAMANO, M.; ROCHA, R.G. **The chlorhexidine:  $\beta$ -cyclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation.** J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., v. 40, p. 297-302, 2001.

DAUDT LABORATÓRIO FARMACÊUTICO: Solução Bucal Noplak®. Disponível em <<http://www.labdaudt.com.br>>. Acesso em 18/06/2014.

DENADAI, A.M.L.; TEIXEIRA, K.I.; SANTORO, M.M.; PIMENTA, A.M.C.; CORTÉS, M.E.; SINISTERRA, R.D., **Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cliclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine.** Carbohydr. Res., v. 342, p. 2286-2296, 2007.

DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA (DAB), **Programa Brasil Sorridente** - Ministério da saúde. Disponível em: <[http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape\\_brasil\\_sorridente.php](http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_brasil_sorridente.php)>. Acesso em: 12/11/2014.

DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA (DAB), **Política Nacional de Saúde Bucal** - Ministério da saúde. Disponível em: <<http://dab.saude.gov.br/portaldab/pnsb.php>>. Acesso em: 12/11/2014.

DEXCEL DENTAL: Periodontal Pocket Delivery System (PerioChip®). Disponível em <<http://www.dexcelandental.co.uk>>. Acesso em 18/06/2014.

DINIZ, H.F. **Nanoagregados baseados em ciclodextrinas em associação com a tetraciclina: caracterização físico-química e avaliação antimicrobiana.** Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG, 2007.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, **Métodos Gerais e Textos.** 5ª Ed., Vol. I, Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FARMACOPEIA PORTUGUESA, **Capítulos Gerais**. 8ª Ed., Vol I, Lisboa: Ministério da Saúde, 2007.

FLÖTRA, L.; GJERMO, P.; RÖLLA, G.; WAERHAUG, J. **Side effects of chlorhexidine mouthwashes**. Scand. J. Dent. Res., v. 79, p. 119–125, 1971.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for validation chromatographic methods**. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Evaluation Research (CDER), Rockville, 1994

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Immediate Release Solid Oral Forms. Scale-up and Post-Approval Changes: Chemistry facturing and Controls, In vitro Dissolution Testing, and In vivo Bioequivalence Documentation**. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Evaluation Research (CDER), Rockville, 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Drug Master File Guidelines**. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, 1989. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122886.htm>>. Acesso em: 13/08/2014.

GJERMO, P.; RÖLLA, G.; ARKSKAUG, L. **Effect on dental plaque formation and some in vitro properties of 12 bis-biguanides**. J. Periodont. Res., v. 8, p. 81-88, 1973.

GIBSON, M. **Pharmaceutical Preformulation and Formulation. A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form**. 2nd Ed., New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2009.

GLAXOSMITHKLINE Consumer healthcare: Corsodyl®; disponível em <<http://www.corsodyl.co.uk>>. Acesso em 18/06/2014.

GREEN, J. M. **A practical guide to analytical method validation**. Analytical Chemistry, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

HEALTH CANADA. Natural Health Products Ingredients Database. Drugs and Health Products, Ottawa, 2014. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodnatur/applications/online-enligne/nhpid-bipsn-eng.php>>. Acesso em: 14/04/2014.

HORTER, D.; DRESSMAN, J.B. **Influence of physicochemical properties on dissolution drug in the gastrointestinal tract**. Adv. Drug. Del. Rev., Vol. 46:75-87, 2001.

JAPANESE PHARMACOPEIA. **Official Monographs**. 16<sup>th</sup> Ed. Tokio: Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2011.

JENKINS, S.; ADDY, M.; WADE, W. ***The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo.*** J. Clin. Periodontol., v. 15, p. 415–424, 1988.

JONES, C. G. ***Chlorhexidine: is it still the gold standard?*** Periodontol. 2000, v.15, p. 55–62, 1997.

KALINKOVA, G.N. ***Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulation.*** In. J. Pharm., Bulgaria, v. 187, n. 1, p. 1-15, 1999.

KUTTATHARMMAKUL, S.; MASSART, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J. ***Comparison of alternative measurement methods.*** Analytica Chimica Acta, v. 391, p. 203-225, 1999.

LACER S.A.: Lacer<sup>®</sup> Clorexidina. Disponível em <<http://www.lacerodontologia.com>>. Acesso em 18/06/2014.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. ***Teoria e prática na indústria farmacêutica.*** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LISTGARTEN, M.A. ***Nature of periodontal disease: pathogenic mechanisms.*** J. Periodontal. Res., v. 22, p. 172-178, 1987.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. ***Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization.*** Jr. of Pharm. Sciences, v.1, n. 10, p. 1017-1025, 1993.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. ***Cyclodextrins and their pharmaceutical applications.*** International Journal of Pharmaceutics, v. 329, n. 1-2, p. 1-11, 2007.

MARTINDALE: ***The complete drug reference.*** 36<sup>th</sup> Ed, London-Chicago: 2009.

McCRONE, W.C. ***Polymorphism.*** Phys. Chem. Org. Solid State, vol. II, p. 725-767, 1965.

MENEGON, R.F. ***Estudo biológico e desenvolvimento de formulação do sal de tetrapalmitato de clorexidina para uso em doenças bucais.*** Araraquara: Faculdade de ciências farmacêuticas de Araraquara, Unesp, 2009.

MESMIN, B.; MAXFIELD, F.R. ***Intracellular sterol dynamycs.*** Biochim Biophys Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 179, p. 636-645, 2009.

MOFFAT, A.C., OSSLETON, M.D., WIDROP, B. ***Clarke's analysis of drugs and poisons.*** v. 1 e 2, 3<sup>a</sup> Ed., London: Pharmaceutical Press, 2004.

MORISSETT, S.L.; ALRMARSSON, O.; PETTERSON, M.L.; REMENAR, J.F.; et al. ***High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids.*** Adv. Drug Delivery Rev., v. 56, p. 275:300, 2004.

NETO, F.J.R. **Estudo da inclusão de ciclodextrinas em polímeros sintéticos**. Porto: Faculdade de Ciências, U.Porto, 2012.

O'SULLIVAN, M. **Finance and innovation**. In: FAGERBERG, J.; MOMERY, D.C.; NELSON, R. (ed.). **The Oxford Handbook of Innovation**. Oxford: Oxford University Press, 2006.

PALMEIRA FILHO, P.L.; PIERONI, J.P.; ANTUNES, A.; BOMTEMPO, J.V. **O desafio à inovação farmacêutica no Brasil: a experiência do BNDES Profarma**. BNDES Setorial. Rio de Janeiro: n. 37, p. 67-90, 2012.

PINNAMANENI, S.; DAS, N.G.; DAS, S.K. **Formulation approaches for orally administered poorly soluble drugs**. Pharmazie, v. 57, n. 5, p. 291-300, 2002.

POLLI, J.R.; YU, L.X.; COOK, J.A.; AMIDON, G.L.; BORCHARDT, R.T.; BURNSIDE, B.A.; et al. **Summary workshop report: biopharmaceuticals classification system implementation challenges and extension opportunities**. J. Pharm. Sci. Hoboken, v. 93, n. 6, p. 1375-1381, 2004.

QI, H.; NISHIHATA, T.; RITTING, J.H. **Study of interaction between  $\beta$ -cyclodextrin and chlorhexidine**. Pharmaceutical Research, v. 1, n. 8, p. 1207-1210, 1994.

RASO, E.M.G.; CORTÉS, M.E.; TEIXEIRA, K.I.; FRANCO, M.B.; MOHALLEN, N.D.S.; SINISTERRA, R.D. **A new controlled release system of chlorhexidine and chlorhexidine: $\beta$ cd inclusion compounds based on porous silica**. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., v. 67, p. 159-168, 2010.

REYMER DO BRASIL.: Enxaguatório Bucal Perioplak®. Disponível em <<http://www.reymer.com.br>>. Acesso em 18/06/2014.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J., QUINN, M.E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6<sup>th</sup> Edition, London: Pharmaceutical Press, 2009.

SANTOS Jr., N.; MORETTO, L.D.; **Estabilidade de Fármacos e Medicamentos**. Vol. 6. São Paulo: FEBRAFARMA - Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica, 2005.

SELAN, B.; KANNEBLEY Jr., S.; PORTO, G. S. **Relatório setorial sobre inovação tecnológica na indústria farmacêutica brasileira: uma análise a partir dos indicadores de inovação**. Ribeirão Preto: FIPASE, p.9-52, 2007.

SIGMA-ALDRICH. Chlorhexidine Dihydrochloride. Sigma-aldrich Co. LCC. Disponível em: <[www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c8527](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c8527)>. Acesso em: 12/05/2014.

SIGMA-ALDRICH. Chlorhexidine acetate. Sigma-aldrich Co. LCC. Disponível em: <[www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/phr1222](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/phr1222)>. Acesso em: 12/05/2014.



SINDUSFARMA. **Sindicato das Indústrias Farmacêuticas do Estado de São Paulo** < [http://sindusfarma.org.br/cadastro/index.php/site/ap\\_indicadores](http://sindusfarma.org.br/cadastro/index.php/site/ap_indicadores)>. Acesso em 19/11/2014.

SINISTERRA, R.D.; ALVES DE CARVALHO, C.A.; ALVES, O.L., SANTOS, O.S.; CONDE DA SILVA, O.C. **Preparation and characterizations of the inclusion compound Rhodium (II)  $\alpha$ -methyl cynamate:  $\beta$ -cyclodextrin**. J. Inclusion Phenomen, v. 22, p. 91-8, 1995.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. **A procedure to assess linearity by ordinary least squares method**. Analytica Chimica Acta, v. 552, p. 25-35, 2005.

STORPIRTIS, S.; GOLNÇALVES, J.E.; CHIAM, C.; GAY, M.N. **Biofarmacotécnica – Ciências Farmacêuticas**. 1ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011

TEIXEIRA, K.I.R. **Estudo das alterações da membrana celular de microrganismos por compostos de inclusão de Clorexidina:beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares usando microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura**. Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia, UFMG, 2008.

TEIXEIRA, K.I.R. **Estudo comparativo dos efeitos dos compostos de inclusão de clorexidina em ciclodextrinas nas células bacterianas e eucariotas**. Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia, UFMG, 2012.

TEIXEIRA, K.I.R.; ARAUJO, P.V., SINISTERRA, R.D.; COTÉS, M.E. **Chlorhexidine:Beta-cyclodextrin inhibits yeast growth by extraction of ergosterol**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 43, p. 810-818, 2012.

THE MERCK INDEX. **An encyclopedie of Chemicals, Drugs and biological**. 13<sup>th</sup> Edition, 2001.

UNITED States Pharmacopeia. **Official Monographs**. 37 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES – National Institutes of Health: U.S. National Library - PUBCHEM – Open Chemistry Database. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> >. Acesso em: 21/03/2014.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, 2014. Disponível em <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>>. Acesso em :14/04/2014.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. 1ª ed. Coimbra: Editora Minerva, 228p., 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Oral Health – Policy basis**. Disponível em <[http://www.who.int/oral\\_health/policy/en/](http://www.who.int/oral_health/policy/en/)>. Acesso em: 12/11/2014.