



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Departamento de Ciências Farmacêuticas**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**



**Dissertação de Mestrado**

**Construção de uma câmara de fotoestabilidade, estudo da fotodegradação da vitamina A e da ação antioxidante do polifosfato de sódio em misturas de nutrição parenteral.**

**Clayton Anderson de Azevedo Filho**

**Recife – PE Brasil**  
**Agosto / 2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Departamento de Ciências Farmacêuticas**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**



**Construção de uma câmara de fotoestabilidade, estudo da fotodegradação da vitamina A e da ação antioxidante do polifosfato de sódio em misturas de nutrição parenteral.**

**Clayton Anderson de Azevedo Filho**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Beate Saegesser Santos**

**Recife – PE Brasil**  
**Agosto / 2008**

Azevedo Filho, Clayton Anderson de

Construção de uma câmara de fotoestabilidade, estudo da fotodegradação da vitamina A e da ação antioxidante do polifosfato de sódio em misturas de nutrição parenteral / Clayton Anderson de Azevedo Filho.

– Recife : O Autor, 2008.

xv, 107 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Nutrição parenteral. 2. Fotoestabilidade – Vitamina A. 3. Polifosfato de sódio. I. Título.

612.392.9

CDU (2.ed.)

UFPE

613.28

CDD (22.ed.)

CCS2009-099



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**


Recife, 29 de agosto de 2008.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 29 de agosto de 2008 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:


**PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Beate Saegesser Santos** (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: 

**EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto** (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: 

**EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. José Almiro Paixão** (Deptº Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: 

O presente trabalho foi desenvolvido pelo Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral (NP2) localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCFar) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e realizado no Laboratório de Biofísica Química do Departamento de Biofísica (CCS/UFPE) e no Laboratório de Óptica Não Linear e Optoeletrônica localizado no Departamento de Física (DF) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN/UFPE).

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais Clayton Anderson de Azevedo e Léa Costa de Azevedo que me deram todo o incentivo e por terem sonhado por este momento e que hoje compartilham comigo.

A minha namorada Mirtes Gonçalves Barbosa da Silva que esteve presente em todos os momentos, principalmente os mais difíceis, dando-me apoio e equilíbrio emocional para seguir em frente.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À Prof. Dra. Beate Saegesser Santos pela disposição em me orientar e por ter abraçado a idéia deste trabalho juntamente comigo, dando toda a oportunidade de crescer. Obrigado pelos incentivos e palavras amigas nos momentos difíceis. Um exemplo de profissionalismo, competência e segurança, e estas virtudes permanecerão comigo sempre!



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter por ter me dado saúde, sabedoria e perseverança para concluir este trabalho, me acompanhado em mais uma etapa da minha vida, e colocado tantas pessoas importantes em meu caminho;

Aos meus irmãos Laerson, Carmem e Ana Léa, e familiares por todo apoio e pelas palavras de incentivo;

Ao meu amigo Daniel Filgueiras Gomes pela grande contribuição para a realização deste trabalho, pelo apoio em todas as horas, por sua cooperação e disponibilidade, e também a sua esposa Maria José que tanto nos apoiou neste trabalho;

Aos alunos Rayana Muniz, Albérico Duarte, Verônica Alves e João Paulo Guedes, do Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral do DCFar/UFPE, pela contribuição e dedicação a este trabalho;

Ao Prof. Dr. Waldeciro Colaço por gentilmente ceder o radiômetro e se colocado à disposição como um colaborador deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Cid Araujo por ceder o espectrofotômetro e aos seus alunos Luiz Arturo, Euclides, Tâmara, Marcos André e Ernesto Valdéz pela ajuda com o uso do Espectrofotômetro;

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Maria da Conceição Barros e Margarete Valdevino, e à secretária do Departamento de Ciências Farmacêuticas Fátima por todo o apoio técnico prestado.

Aos Professores. Dr. José Almiro, Dra. Adriana Fontes e Dra. Patrícia Farias pelos esclarecimentos, disponibilidade e pelo apoio dado durante todo este trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Biofísica Química Claudilene, Aluízio, Denise, Rafael, Breno, Cynthia, Kilmara, Rosana e Rebeca que puderam compartilhar comigo muitos bons momentos durante a realização deste trabalho;

Aos meus amigos José de Arimatea, João Roberto, Daniele Lordão, Júlio Cesar, Catarine Cavalcanti, Frederico Menezes, Sarah Ximenes, Jussara Diniz, Bráulio Cesar, Caueh Jovino, Ádley Antonini, Emmanuela Paiva e Marianne Lima, por todo apoio, incentivo e pelo companheirismo;

Aos funcionários da Central Analítica do DQF/UFPE Ricardo Oliveira e Eliete Vasconcelos e às alunas do Laboratório de Saneamento Ambiental do CTG/UFPE, Luiza Feitosa e Poliana Maria pela cooperação com este trabalho;

Aos Farmacêuticos Demóstenes Marques (HC/UFPE) e Jean Batista (HUOC/UPE), do Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral, à Profª. Dra. Ivone Souza (DCFAR/UFPE) e o aluno do DCFAR Sérgio Nóbrega pelo apoio técnico e intelectual dado a esta pesquisa;

Aos meus grandes amigos Josué Santiago, Efraim Sales, Flavio Azevedo, Tibério Sales, Thiago Sales, Henrique Randau, Cláudio Damasceno e Robinson Costa, por todo apoio dado durante a realização deste trabalho;

À FACEPE, Propesq e CNPq pelo apoio financeiro;

E finalmente a todos que de certa forma me ajudaram a chegar até aqui.

Muito Obrigado!

“Muitos dos fracassos desta vida estão concentrados nas pessoas que desistiram por não saberem que estavam muito perto da linha de chegada”.

Thomas Alva Edison

## Sumário

<b>Capítulo I – Apresentação e Objetivos.....</b>	<b>01</b>
1.1 Apresentação.....	02
1.2 Objetivos.....	04
1.2.1 Objetivo geral.....	04
1.2.2 Objetivos específicos.....	04
<b>Capítulo II – Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>05</b>
2.1. Histórico evolutivo: preocupação com a estabilidade de medicamentos.....	06
2.2. Metaestabilidade de sistemas químicos.....	08
2.3. Estudos de estabilidade de medicamentos.....	10
2.4. Estudos de fotoestabilidade de medicamentos.....	11
2.4.1. Princípios básicos para testes de fotoestabilidade de medicamentos...	12
2.4.1.1. Fotoreação direta.....	14
2.4.1.2. Fotoreação indireta.....	14
2.4.1.3. Fotoreações auto-sensíveis.....	15
2.4.2. Actinometria.....	16
2.4.2.1. Actinômetros físicos.....	16
2.4.2.2. Actinômetros químicos.....	18
2.4.3. Câmaras de fotoestabilidade.....	19
2.4.3.1. Mapeamento da Superfície de Exposição	21
2.4.3.2. “ <i>ICH Harmonised Tripartite Guideline: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B</i> ”.....	22
2.5. Estabilidade de misturas de nutrição parenteral.....	24
2.5.1. Processos Fotoinduzidos em Nutrição Parenteral.....	25
2.5.2. Fotodegradação da vitamina A.....	28
2.5.3. Agentes antioxidantes em NP.....	31
2.6. Uso do polifosfato de sódio como agente antioxidante.....	32
<b>Capítulo III – Materiais e Métodos.....</b>	<b>35</b>
3.1 Materiais de estudo.....	36
3.2 Equipamentos utilizados.....	38
3.3 Delineamento experimental.....	39
3.4 Construção da câmara de fotoestabilidade.....	39
3.5 Mapeamento da superfície de exposição.....	40
3.6 Medidas da potência UV e iluminância no berçário e UTI neonatal do Hospital das Clínicas de Pernambuco.....	41
3.7 Preparação e estabilidade de emulsões de vitamina A.....	41
3.8 Determinação das concentrações da vitamina A através de espectroscopia de absorção eletrônica no UV e visível.....	41
3.9 Preparação das misturas de nutrição parenteral, determinação da cinética de degradação da vitamina A e estudo do efeito antioxidante do polifosfato de sódio.....	42
<b>Capítulo IV – Resultados e Discussão.....</b>	<b>43</b>
4.1 Construção da Câmara de Fotoestabilidade.....	44
4.2 Mapeamento da superfície de exposição e determinação do tempo de exposição.....	48

4.3 Medidas da potência UV e da iluminância do berçário no Hospital das Clínicas de Pernambuco.....	55
4.4 Preparação e caracterização físico-química das microemulsões de vitamina A..	57
4.5 Determinação das concentrações da vitamina A através de espectroscopia de absorção eletrônica no UV e visível.....	59
4.6 Estudo da fotodegradação da vitamina A e ação antioxidante do polifosfato de sódio em misturas para nutrição parenteral.....	60
<b>Capítulo V – Conclusões e Perspectivas.....</b>	<b>67</b>
5.1 Conclusões.....	68
5.2 Perspectivas.....	69
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO A1:</b> Tabela de composição da solução de aminoácidos pediátricos 10%. Fórmula similar ao Aminoped® 10%.....	83
<b>ANEXO A2:</b> Tabela contendo as vitaminas e seus respectivos valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR).....	83
<b>ANEXO B:</b> Especificações técnicas da câmara de fotoestabilidade desenvolvida pelo Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral/UFPE.....	84
<b>ANEXO C:</b> Definições importantes em fotometria e radiometria.....	84
<b>ANEXO D:</b> Artigo Científico Submetido ao International Journal of Pharmaceutics (Qualis A Internacional).....	85

## Lista de figuras

Figura 2.1 – Actinômetros físicos: luxímetro (esquerda) e radiômetro (direita).....	17
Figura 2.2 - a) Espectro de emissão do ultravioleta próximo, entre 300 e 400 nm. b) Espectro de emissão da luz visível, entre 400 e 700 nm [Fonte: TØNNESEN, 2004].....	17
Figura 2.3 - Cinchona officinalis e o alcalóide quinina.....	19
Figura 2.4 – Câmara de fotoestabilidade modelo 65460 comercializada pela CARON™ [Fonte: www.caronproducts.com].....	20
Figura 2.5 – Espectro de distribuição de potência relativa das lâmpadas ID65, branca fria e ultravioleta e outros tipos de lâmpadas [Fonte: Piechock & Thoma, 2007].....	21
Figura 2.6 – Espectro de distribuição completo do UV e visível de uma lâmpada de arco de xenônio utilizada em câmaras de fotoestabilidade.....	22
Figura 2.7 – Estrutura molecular de uma cadeia de polifosfato [PO <sub>3</sub> -] <sub>n</sub> , com n = 9 [retirada de PEREIRA, 2007].....	32
Figura 4.1 – Visão interna da versão preliminar da câmara de fotoestabilidade, contendo seis lâmpadas BF e duas lâmpadas UV.....	44
Figura 4.2 – Compartimento contendo as instalações elétricas da câmara de fotoestabilidade, três reatores eletrônicos para lâmpadas BF e um reator para duas lâmpadas UV.....	45
Figura 4.3 – Esquema representativo da lei do inverso do quadrado. Intensidade por unidade de área varia inversamente proporcional ao quadrado da distância de um ponto da fonte de iluminação.....	47
Figura 4.4 – Visão geral da câmara de fotoestabilidade construída pelo Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral.....	47
Figura 4.5 – Delineamento da área útil na superfície de exposição das amostras dentro da câmara de fotoestabilidade.....	49
Figura 4.6 – Ilustração da posição dos detectores do radiômetro e luxímetro nos pontos demarcados na câmara de fotoestabilidade.....	50
Figura 4.7 – Mapas de intensidade bidimensionais da iluminância monitorada no interior da câmara de fotoestabilidade para as lâmpadas (a) branca fria; (b) UV; (c) UV+BF e da irradiância observada para (d) BF; (e) UV; e (f) UV+BF.....	51
Figura 4.8 – Mapas de intensidade tridimensionais da iluminância monitorada no interior da câmara de fotoestabilidade para as lâmpadas (a) branca fria; (b) UV; (c) UV+BF e da irradiância observada para (d) BF; (e) UV; e (f) UV+BF.....	52
Figura 4.9 – Localização de uma incubadora próximo à janela na UTI neonatal do Hospital das Clínicas da UFPE.....	55
Figura 4.10 – Espectro de absorção eletrônica de microemulsão de vitamina A.....	58
Figura 4.11 – Regressão linear da vitamina A microemulsionada.....	59
Figura 4.12 – Exposição das formulações de NP na câmara de fotoestabilidade.....	61
Figura 4.13 – Espectros de absorção da vitamina A (linha tracejada) e da mistura para NP contendo vitamina A (linha cheia). A seta evidencia o comprimento de onda (326 nm) monitorado durante o experimento de fotodegradação.....	62
Figura 4.14 – Perfil de fotodegradação acelerada da Vitamina A sob ação das lâmpadas UV (■) e BF (●) sob um tempo equivalente a 10 h de exposição na sala de UTI neonatal do Hospital das Clínicas.....	62
Figura 4.15 – Cinética de degradação da vitamina A em formulações com e sem PoliP (a) usando luz visível e (b) usando luz UV.....	64

## Lista de tabelas

Tabela 2.1 – Tipos de Estabilidade a serem previstas em sistemas de uso farmacêutico.....	11
Tabela 3.1 – Produtos utilizados no preparo dos sistemas estudados.....	36
Tabela 3.2 – Componentes utilizados nos experimentos de fotodegradação e suas respectivas concentrações.....	37
Tabela 3.3 – Equipamentos utilizados nas análises das preparações estudadas.....	38
Tabela 4.1 – Medidas da temperatura, luminosidade média e potência UV da montagem preliminar e final da câmara de fotoestabilidade.....	48
Tabela 4.2 – Valores médios das irradiâncias e das iluminâncias dos 16 pontos críticos do berçário e UTI neonatal do HC/UFPE.....	56
Tabela 4.3 – Formulação da microemulsão de vitamina A utilizada neste estudo.....	57
Tabela 4.4 – Parâmetros que definem a função da reta de regressão $y = a + bx$ .....	60



## Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

NP – nutrição parenteral

UV – ultravioleta

PoliP – polifosfato de sódio

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Vis – visível

nm – nanômetros

$\text{PO}_4^{3-}$  – íons fosfato

$[\text{NaPO}_3]_n$  – fórmula empírica do polifosfato de sódio

n – grau de polimerização

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

FDA – *Food and Drug Administration*

WHO – *World Health Organization*

ICH - Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso em Seres Humanos

REM – radiação eletromagnética

ISO – *International Organization for Standardization*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

NPT – nutrição parenteral total

EVA – etinil-vinil-acetato

$\text{H}_2\text{O}_2$  – radicais peróxidos

TCM – triglicerídeos de cadeia média

DNA – ácido desoxirribonucléico

pH – potencial hidrogeniônico

BF – branca fria

EPIs – Equipamentos de proteção individual

UV-Vis – ultravioleta e visível

HC – Hospital das Clínicas

$I_\lambda$  – fluxo de fótons

$\lambda$  – comprimento de onda

$\phi(\lambda)$  – campo quântico

$\epsilon_\lambda$  – absortividade molar

$^1\text{O}_2$  – oxigênio molecular singleto

$h\nu$  – radiação eletromagnética

cm – centímetros

°C – graus centígrados

$\pi = 3,14$

h – hora

W – watt

PS80 – polisorbato 80

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{W}$  – microwatt

$\text{Ca}^{++}$  – íon cálcio

$\text{Mg}^{++}$  – íon magnésio

UVA – ultravioleta A

UVB – ultravioleta B

## Resumo

A incidência direta ou indireta da luz visível e ultravioleta nas preparações de nutrição parenteral induz a fotodegradação de seus componentes, dentre eles as vitaminas. Há diversos estudos que relatam a fotossensibilidade das vitaminas, principalmente a vitamina A, que desempenha um importante papel na visão, crescimento e manutenção dos tecidos, e no sistema imunológico. Há poucas opções de substâncias utilizadas como antioxidantes e que consigam suprimir a taxa de fotodegradação de componentes da NP. Também estudos de fotoestabilidade de misturas de NP sob condições controladas de exposição à radiação são escassos.

O Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral/UFPE desenvolveu uma câmara de fotoestabilidade a fim de verificar a influência da luz na região ultravioleta (UVA e UVB) (290-390 nm) e na região da luz visível (400-700 nm) sobre os componentes das misturas de NP e a ação antioxidante do polifosfato de sódio (PoliP), com n=9-12, um polímero inorgânico utilizado como conservante em alimentos. A câmara de fotoestabilidade foi construída de acordo com os padrões adotados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), constituída de uma lâmpada UV, com máximo de emissão entre 350 e 370 nm, e duas lâmpadas Branca Fria emitindo a luz visível, mapeada por radiometria e calibrada por actinometria química. Microemulsões de vitamina A (palmitato de retinila) foram preparadas em solução aquosa, em pH controlado, e a caracterização realizada através da determinação de tamanho de partículas. Foram construídas as curvas-padrão de cada uma delas através de espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis. Misturas de NP sem aminoácidos e lipídeos foram preparadas contendo estas vitaminas, e divididas em dois grupos; um grupo contendo PoliP e o outro fosfato de potássio, e colocadas na câmara de fotoestabilidade, acompanhando a taxa de fotodegradação.

Verificou-se a necessidade de se realizar um modelo reduzido de plano de estudo de fotoestabilidade, uma vez que as doses mínimas de luz UV e visível recomendadas pela ANVISA poderiam comprometer os resultados. Sob estas condições, os resultados evidenciaram que após a simulação de 10 h de incidência de luz UV houve degradação de mais de 85% da vitamina A enquanto que para a degradação sob luz branca fria observou-se um valor de 50%. O PoliP demonstrou ter ação antioxidante suprimindo a taxa fotodegradativa desta vitamina sob luz UV mas não sob luz visível, mostrando-se um candidato potencial para uso em formulações para nutrição parenteral.

**Palavras-chave:** fotoestabilidade, nutrição parenteral, polifosfato, vitamina A.

## Abstract

The incidence of direct and indirect ultraviolet and visible light in admixtures of parenteral nutrition induce the photodegradation of its compounds, such as vitamins. There are various reports about the photosensitivity of vitamins, especially of vitamin A, which is known to perform an important role on vision, growth and restoration of tissues and in the immunologic system. There are only a few options for substances used as antioxidants that are able to suppress the photodegradation rate of the components of the parenteral nutrition (PN). Also, photostability studies of admixtures of NP under controlled conditions of exposure to radiation are scarce.

The Laboratory of Parenteral Nutrition / UFPE developed a photostability chamber to study the influence of UV (UVA and UVB) (290-390 nm) and visible light (400-700 nm) over the components of PN admixtures and the antioxidant activity of sodium polyphosphate (PolyP), with  $n=9-12$ , an inorganic polymer used as a preservative in foods. The chamber was built in accordance with the National Agency of Sanitary Vigilance (ANVISA). It consists of an UV fluorescent lamp having a spectral distribution from 320 nm to 400 nm with a maximum energy emission between 350 nm and 370 nm, and two cool white fluorescent lamps, mapped by radiometry and calibrated by chemical actinometry, respectively. Oil/water microemulsions containing vitamin A (retinyl palmitate), with control of pH, and characterization was held measuring the particles size. It was made the standard curve of this vitamin through spectroscopy of electronic absorption UV-Vis. Admixtures of NP without amino acids and lipids were prepared containing vitamin A, into two groups, one group with PolyP and a second group containing potassium phosphate, and placed in the photostability chamber, monitoring the photodegradation rate.

Since the minimum doses of UV and visible light recommended by ICH could compromise the results it was necessary to perform a reduced photodegradation experiment. Under these conditions, the results showed that after 10h of UV exposition the 85% of vitamin A had degraded while using the visible light the degradation rate observed was of 50%. The PolyP showed antioxidant activity for the UV light but not for the visible light, demonstrating its use as a potential antioxidant candidate for use in PN admixtures.

**Keywords:** photostability, parenteral nutrition, polyphosphate, vitamin A.

# CAPÍTULO I

---

## Apresentação e Objetivos

## 1.1 Apresentação

O preparo de misturas para Nutrição Parenteral (NP) inevitavelmente forma sistemas que são bem menos estáveis que seus constituintes individuais. Durante a preparação, conservação e administração dessas misturas há a possibilidade de ocorrer incompatibilidades entre as substâncias presentes, com formação de precipitados e/ou a ocorrência de degradações e alterações físicas e químicas [ALLWOOD & KEARNEY, 1998].

Durante a administração lenta e contínua das misturas de nutrição parenteral, as bolsas de infusão ficam por um longo tempo expostas à luz, e embora todas as vitaminas estejam propensas a degradar em função desta exposição, o retinol (vitamina A) é a mais sensível à fotólise [ALWOOD, 1998; EDWARDS, 2001]. Existem vários estudos mostrando a degradação foto-induzida de vitaminas nas misturas de NP, porém só mais recentemente estudos mais sistemáticos vêm sendo mostrados por diferentes grupos de pesquisa. Todos esses estudos mostraram que a fotodegradação da vitamina A em formulações de nutrição parenteral é influenciada por diversos fatores, tais como intensidade da luz do dia, proximidade da bolsa em relação à fonte de emissão de luz e o uso de dispositivos de proteção contra a luz.

Com o intuito de minimizar a fotodegradação, vêm-se buscando novos antioxidantes biocompatíveis para uso nas formulações para NP, uma vez que há poucas alternativas. Comumente são utilizados como antioxidantes nas emulsões lipídicas e soluções de aminoácidos, respectivamente, a vitamina E e o metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) [BRAWLEY, 1998; PIRONI, 1998].

Recentemente, o uso de polifosfato de sódio  $[\text{NaPO}_3]_n$  ( $20 < n < 100$ ) foi patenteado como agente antioxidante em formulações farmacêuticas de uso geral,

incluindo as formulações parenterais [KIM, 2004]. O polifosfato é um polímero inorgânico pertencente ao grupo dos fosfatos condensados, constituídos por unidades básicas de íons ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Em sucos de frutas, os polifosfatos são utilizados principalmente para estabilizar vitamina C por apresentarem esta capacidade antioxidante [HOURANT, 2004].

Com tal promissora possibilidade de se utilizar este poliânion também como fonte de fósforo, é interessante que se comprove sua capacidade antioxidante nestas mesmas formulações de NP. Desta forma, torna-se necessário um estudo sistemático que possa, por um lado quantificar o grau de degradação fotoinduzida, tanto da vitamina A, como às demais vitaminas, aminoácidos e lipídeos, e por outro lado, quantificar a ação antioxidante do polifosfato de sódio neste tipo de formulações.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

- ✓ Investigar a contribuição do polifosfato de sódio, com n=9-12, como agente antioxidante na fotodegradação da vitamina A (na forma de palmitato de retinila), em preparações de nutrição parenteral, sob condições controladas de exposição de luz visível e UV.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Construir uma câmara de fotoestabilidade que atenda aos requisitos recomendados na opção 2 estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na RE nº 1 de 29 de Julho de 2005;
- ✓ Monitorar a fotodegradação da vitamina A (na forma de palmitato de retinila), sob condições controladas de exposição à luz visível e UV;
- ✓ Verificar a potencial ação antioxidante do polifosfato de sódio (n=9-12) em misturas de nutrição parenteral, expostas sob condições controladas de emissão de luz UV e visível, contendo a vitamina A (palmitato de retinila).



## CAPÍTULO II

---

# Revisão Bibliográfica

### **2.1. Histórico evolutivo: preocupação com a estabilidade de medicamentos**

A partir da década de 50, com as publicações de Leon Lachman e Jack Cooperas intituladas “A Comprehensive Pharmaceutical Stability Testing Laboratory – Part I” e “Physical Layout of Laboratory of Facilities Available For Stability Testing” que surgiram as primeiras preocupações de se realizar sistemas de testes acelerados, sob condições controladas, de estabilidade de fármacos e medicamentos que pudessem imitar da mais fidedigna forma possível as condições as quais medicamentos em processos de produção ou produtos acabados [PIECHOCK & THOMA, 2007].

A primeira proposta de guia para testes de estabilidade data de 1970. Esta foi revisada e publicada pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1982 e 1983, respectivamente. Em 1984, esta guia foi colocada em consulta para diversos segmentos da indústria farmacêutica e finalmente regulamentada em 1985, porém não tinha força de lei, mas sim, continha procedimentos e recomendações com vistas ao prazo de validade e estabilidade de produtos farmacêuticos. Até a década de 80 as metodologias de avaliação da estabilidade seguiam princípios técnicos e científicos sem interferências de atos regulatórios de autoridades sanitárias [LEITE, 2005].

Os Estados Unidos da América (EUA), Japão, Alemanha, França e Inglaterra elaboraram guias com a finalidade de realizar estudos de estabilidade e, assim, autorizar a comercialização de produtos farmacêuticos. No entanto, essas guias apresentavam diferenças nos conteúdos, adequando-os às necessidades das indústrias do próprio país, o que era uma situação inconveniente uma vez que seria necessário realizar testes, muitas vezes distintos, para registrar o mesmo produto em cada país [ICH, 2007; LEITE, 2005].

A Comunidade Européia (atual União Européia) na década de 1980 foi pioneira em implantar a harmonização de requisitos regulamentares e avançou para o

desenvolvimento de um mercado único de produtos farmacêuticos. O sucesso alcançado na Europa demonstrou que a harmonização era viável. Ao mesmo tempo, havia discussões bilaterais entre a Europa, o Japão e os EUA sobre as possibilidades de harmonização. Foi, no entanto, na Organização Mundial de Saúde (OMS) durante a Conferência Internacional de Autoridades Reguladoras de Medicamentos (WHO International Conference of Drug Regulatory Authorities - ICDRA), em Paris, em 1989, onde foram discutidos planos de ação específicos que começaram a materializar-se. Pouco depois, as autoridades juntaram-se à Federação Internacional de Indústrias Farmacêuticas e Associações (International Federation of Pharmaceutical Manufactures & Associations – IFPMAS) para discutir numa junta regulatória da indústria sobre a harmonização internacional, e foi concebido o guia intitulado “Guidance for Industry Q1B Photostability Testing of New Drug Substances and Products” [ICH, 2007].

As autoridades regulatórias da Europa, do Japão e dos EUA e entidades representantes das indústrias farmacêuticas criaram, em 1990, um Comitê Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso em Seres Humanos (designado de ICH). Os objetivos dessa harmonização são o uso econômico de recursos humanos, animais e materiais, e a promoção do avanço no desenvolvimento e disponibilidade global de novos medicamentos, mantendo a qualidade, segurança e eficácia [PIECHOCK & THOMA, 2007].

No Brasil, as primeiras preocupações legais quanto à estabilidade foram mencionados na Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976 [BRASIL, 1976]. E apenas em abril de 2002, foi publicado um “Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade”. Em 2004, a resolução RE n.º 398 instituiu novo guia, com a mesma finalidade, que tem como referência os “*guidelines*” de qualidade editados pelo ICH relativo a requerimentos técnicos para registro de medicamentos para uso humano. Uma terceira

guia foi publicada na RE nº 01 de 29 de julho de 2005, elaborada com o propósito, dentre outros, de adequar as condições de armazenamento de medicamentos para conduzir os estudos de estabilidade e fotoestabilidade de acordo com as condições climáticas do país [BRASIL, 2005].

## **2.2. Metaestabilidade de sistemas químicos**

Um estado de equilíbrio estável é alcançado quando um sistema adquire a configuração termodinâmica de menor energia livre. Assim, existem estados de equilíbrio que não são estáveis e podem ser permanentemente alterados em função do tempo quando influenciados por fatores internos e/ou externos. Estes são chamados de metaestáveis. Um sistema termodinâmico está em uma condição ou estado metaestável se toda mudança isotérmica pequena de qualquer de suas variáveis termodinâmicas resulta em um aumento na sua energia livre, enquanto alterações isotérmicas grandes nestas variáveis podem levar a um estado com menor energia livre [COLLARES, 2002].

A idéia de metaestabilidade, por definição, requer que, ao longo de todas as possíveis rotas entre o estado metaestável e estável de um sistema termodinâmico, haja estados de maior energia livre que o estado metaestável. Estes estados intermediários representam barreiras de energia livre, impedindo a transformação espontânea do estado metaestável para o estado de maior estabilidade do sistema, promovendo mudanças indesejáveis como separação de fases, precipitação, oxidação, etc. [COLLARES, 2002].

Os objetos comuns da experimentação química não são partículas individuais de qualquer tipo, mas sistemas mais complexos que podem conter sólidos, líquidos ou gases. As experiências realizadas nesses sistemas medem as suas propriedades, sendo estas, atributos que permitem descrevê-los de modo completo, o que define o estado dos

sistemas. Neste ponto surge a idéia de previsibilidade. Espera-se que, uma vez medidas e conhecidas as propriedades de um sistema químico, adquira-se a capacidade de prever o comportamento de um segundo sistema químico que tenha o mesmo conjunto de propriedades, a partir do conhecimento prévio do primeiro deles [MOORE, 1976].

Freqüentemente, consideram-se situações em que são feitas observações quanto a um período de tempo, situações essas influenciadas por efeitos aleatórios, não só em um único instante, mas por toda seqüência ou intervalo de tempo considerado. Essa situação é denominada um processo estocástico [KRÖGER, 2003].

Em termos gerais, um processo estocástico é um fenômeno que varia em algum grau, de forma imprevisível, à medida que o tempo passa. A imprevisibilidade, nesse caso, implica que se observou uma seqüência de eventos num determinado intervalo de tempo em diversas ocasiões diferentes, sob condições presumivelmente "idênticas", sendo o resultado, observações diferentes. Assim, a probabilidade aparece, mas não no sentido de que cada resultado de uma experiência aleatória num sistema químico determine somente uma única resposta. Pelo contrário, espera-se que a experiência aleatória determine o comportamento do sistema para uma seqüência ou intervalo de tempo inteiro. Isto é, o resultado da experiência aleatória é uma função, e não apenas um único valor [KRÖGER, 2003].

Sistemas químicos podem sofrer mudanças nas propriedades mecânicas, variações de temperatura, estado de agregação e reações químicas. Quando um sistema não apresenta nenhuma tendência de mudar suas propriedades com o tempo, diz-se que o mesmo atingiu um estado de equilíbrio. A condição de um sistema em equilíbrio é reprodutível e pode ser definida por um conjunto de propriedades, que são as funções de estado, isto é, que não dependem da história dos sistemas antes que os mesmos tenham atingido o equilíbrio [MOORE, 1976].

### 2.3. Estudos de estabilidade de medicamentos

A estabilidade é um importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia exigidas para o registro sanitário de produtos farmacêuticos. A determinação deste parâmetro fundamenta-se não apenas no cumprimento de exigências legais, mas, também, na preocupação com a saúde pública, uma vez que a instabilidade pode estar relacionada à perda do efeito terapêutico ou à exposição do consumidor aos efeitos tóxicos de produtos de degradação. Vários países publicaram diretrizes para a avaliação da estabilidade farmacêutica. No Brasil, os estudos de estabilidade devem ser conduzidos segundo a Guia para Realização de Estudos de Estabilidade, publicada na Resolução - RE n.º 01, de 29 de julho de 2005 [LEITE, 2005; BRASIL, 2005].

O objetivo dos testes de estabilidade é fornecer provas de ensaio sobre o modo como a qualidade de um fármaco ou medicamento varia com o tempo sob a influência de uma variedade de fatores ambientais como temperatura, umidade e da luz, e relacionar com os produtos outros fatores que possam influenciar nesta estabilidade, por exemplo, as propriedades físicas e químicas dos componentes, a forma farmacêutica, o processo de fabricação, a natureza e propriedades dos materiais para recipientes e embalagens. Sendo assim, a estabilidade de todos os componentes do medicamento deve ser levada em consideração, já que a interação de todos estes elementos afeta a eventual estabilidade do produto [WHO, 1996].

Como resultados dos ensaios de estabilidade, pode ser sugerida a reelaboração dos testes, ou estabelecido o prazo de validade dos produtos farmacêuticos, além de serem recomendados as condições de armazenamento [BRASIL, 2005].

ANSEL e colaboradores (2000) define estabilidade de fármacos e medicamentos como a extensão em que estes retêm, dentro dos limites especificados e dentro do seu prazo de validade, as mesmas propriedades e características que possuíam na ocasião

em que foram fabricados. Entende-se por prazo de validade o período de tempo compreendido entre a fabricação do produto farmacêutico até aquele que sua potência não seja inferior a 90%, desde que os produtos de degradação estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos e que a qualidade do produto esteja dentro do especificado [ANSEL, 2000].

Existem cinco importantes tipos de estabilidade que devem ser determinadas, tal como apresentado na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1 – Tipos de Estabilidade a serem previstas em sistemas de uso farmacêutico.**

<b>Tipos de Estabilidade</b>	<b>Condição a manter dentro dos limites especificados durante o prazo de validade do produto farmacêutico.</b>
<b>Química</b>	A integridade química e a potência (doseamento e impurezas/produtos de degradação), indicadas na embalagem.
<b>Física</b>	As propriedades físicas originais, incluindo aparência, palatabilidade, uniformidade, dissolução, dispersibilidade, entre outras.
<b>Terapêutica</b>	A esterilidade ou resistência ao crescimento microbiológico e a eficácia dos agentes antimicrobianos, quando presentes.
<b>Terapêutica</b>	O efeito terapêutico deve permanecer inalterado.
<b>Toxicológica</b>	Não deve ocorrer aumento da toxicidade.

#### **2.4. Estudos de fotoestabilidade de medicamentos**

Estudos de fotoestabilidade são conduzidos a fim de quantificar a extensão pelas quais as reações induzidas pela luz afetam as formulações dos medicamentos. Em alguns casos, determinar os mecanismos de fotoreações dos fármacos e de outros componentes que compunham o produto avaliado [PIECHOCK & THOMA, 2007].

Para o registro de produtos no Brasil, poderá ser necessária a comprovação da fotoestabilidade em adição aos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos. A RE - 01/2005 reporta as recomendações para realização desses estudos. A não apresentação do estudo de fotoestabilidade deve ser justificada tecnicamente com bases em

evidências científicas de que os componentes do produto não sofrem fotodegradação ou que a embalagem primária não permite a passagem de luz [BRASIL, 2005].

#### **2.4.1. Princípios básicos para testes de fotoestabilidade de medicamentos**

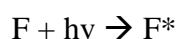
Medicamentos são expostos a uma variedade de fontes de emissão de radiação eletromagnética (REM) durante o processo de fabricação, embalagem, distribuição, e nos locais de venda nas farmácias, e nos locais de utilização. As fontes de iluminação são as mais variadas, desde iluminações artificiais como lâmpadas de vapor de Hg, incandescentes, fluorescentes, à iluminação natural pela luz solar filtrada e luz solar direta [TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007].

Na rotina de testes de fotoestabilidade, medicamentos são iluminados com extremo cuidado em condições controladas a fim de se determinar se eles são fotoestáveis e quantificar a extensão da fotodegradação de medicamentos que mostram certa sensibilidade à luz [TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007].

A fotodegradação de medicamentos pode conduzir à perda de princípios ativos e assim à perda na sua eficiência, além de formar subprodutos ou intermediários tóxicos de vida curta (p.ex., radicais livres) [LAVOIE, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007].

A primeira lei da fotoquímica, proposta por Grotthus em 1817 e Draper em 1843, estabelece que apenas radiações que são absorvidas por moléculas podem ser efetivas na promoção de mudanças fotoquímicas nesta molécula. Muito embora, medicamentos que absorvem radiação eletromagnética nem sempre sofrem fotodegradação [TØNNESEN, 2004].

Considerando a seguinte descrição de absorção de fótons (hv) ultravioleta (UV) e visível por fármacos:





Onde F é o fármaco, hv é a radiação eletromagnética (REM) com certa energia, frequência e comprimento de onda, F\* é o fármaco em um estado eletronicamente excitado. Assim, estes fármacos excitados podem dissipar a energia absorvida de várias maneiras.

Para soluções diluídas que exibem baixa absorbância ( $A < 0,12$ ), a relação que expressa a degradação do fármaco é dada a seguir:

$$-d[F]/dt = -k[F] = -2,303b[F] \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \phi_{\lambda} I_{\lambda} \epsilon_{\lambda} d\lambda$$

Onde [F] é a concentração molar do fármaco, k é a constante da cinética de primeira ordem ( $s^{-1}$ ), b é o caminho óptico (cm),  $\phi_{\lambda}$  é o campo quântico da fotoreação,  $I_{\lambda}$  é o fluxo de fótons (einstein  $L^{-1} s^{-1}$ ), e  $\epsilon_{\lambda}$  é a absortividade molar da fármaco ( $M^{-1} cm^{-1}$ ). Os limites da integral ( $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ ) são escolhidos de modo a englobar todo o comprimento de onda de interesse (p.ex., 290-400 nm). O campo quântico da reação pode ser definido como o número de moléculas que participam da fotoreação dividido pelo número de fótons absorvidos.

Nos casos em que as soluções apresentam alta absorbância ( $A > 1,3$ ):

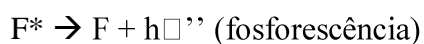
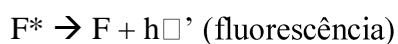
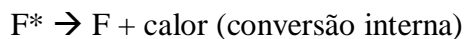
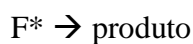
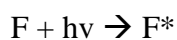
$$-d[F]/dt = -k = - \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \phi_{\lambda} I_{\lambda} d\lambda$$

Neste caso, k é a constante da cinética de ordem zero ( $s^{-1}$ ). Examinado as equações aqui apresentadas percebe-se que o campo quântico, o fluxo de fótons, e a absortividade molar são todas dependentes de  $\lambda$ . A taxa de fotodegradação é, assim, diretamente proporcional ao campo quântico e o fluxo de fótons que vêm das fontes de iluminação e atingem as amostras sobre todo  $\lambda$  absorvido para o qual o campo quântico da fotoreação

não é nulo. O valor de  $I_\lambda$  é obtido por actinometria [TØNNESEN, 2004; KUHN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007].

#### 2.4.1.1. Fotoreação direta

Fotoreação direta refere-se a uma situação em que os fármacos que absorvem REM UV ou visível resultam na perda deste fármaco e a formação de produtos:

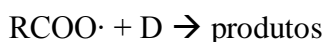
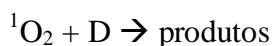
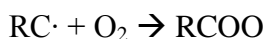
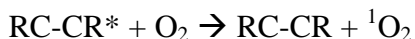
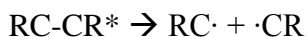


Onde F é o fármaco,  $h\nu$  é a radiação eletromagnética (REM) com certa energia, frequência e comprimento de onda,  $F^*$  é o fármaco em um estado eletronicamente excitado,  $h\nu'$  e  $h\nu''$  são fótons emitidos via fluorescência e fosforescência, respectivamente, M é uma molécula aceptora, e  $M^*$  é a molécula aceptora no estado eletronicamente excitado após receber energia do fármaco [KUHN, 2004; TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007].

#### 2.4.1.2. Fotoreação indireta

No caso de fotoreações indiretas, não o fármaco, mas outro componente da formulação (p.ex., excipientes ou impurezas) absorve REM UV ou visível resultando na

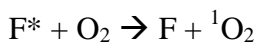
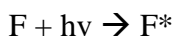
formação de uma ou mais espécies reagentes as quais reagem com os fármacos como indicado à seguir:

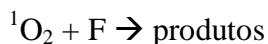


Aqui, RC-CR é uma molécula orgânica presente como aditivo ou impureza no medicamento e que absorve REM UV ou visível. Em alguns casos, a RC-CR pode sofrer fotólise produzindo RC·, uma espécie de radical livre que pode combinar com oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) produzindo radicais alcóxil (RCOO·) que podem reagir e assim degradar alguns fármacos. Em outros casos, a energia pode ser transferida de um estado eletronicamente excitado (RC-CR\*) para o oxigênio molecular produzindo oxigênio molecular singleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), uma espécie reativa seletiva que pode reagir e degradar alguns fármacos. O grau com que certos fármacos estão suscetíveis a sofrer reações com radicais peróxil e oxigênio molecular singleto é dependente da estrutura molecular do fármaco, da composição da formulação, e das condições sobre as quais ele é exposto à REM [KUHN, 2004; TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007].

#### 2.4.1.3. Fotoreações auto-sensíveis

Alternativamente, os fármacos podem, em certos casos, sofrer auto-sensibilização:





Neste caso, o fármaco eletronicamente excitado ( $\text{F}^*$ ) transfere energia para a molécula de oxigênio produzindo  ${}^1\text{O}_2$  com quem pode, em determinadas situações, reagir e degradar o fármaco [TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007].

#### 2.4.2. Actinometria

A actinometria permite a determinação do fluxo de fótons ( $I_\lambda$ ) ou “dose de luz” em que os medicamentos são expostos durante os ensaios de fotoestabilidade, quer por um meio instrumental, com o uso de radiômetro espectral, em radiometria, ou por métodos químicos [KUHN, 2004; TØNNESEN, 2004].

De acordo com o “Glossário de termos usados em fotoquímica” (Recomendações IUPAC, 1996) um actinômetro é um sistema químico ou dispositivo físico em que o número de fótons num feixe absorvido em um espaço definido pode ser integralmente determinado [KUHN, 2004].

##### 2.4.2.1. Actinômetros físicos

Existem dois principais tipos de detectores como forma de medidas instrumentais empregadas: detectores térmicos que convertem energia radiante em calor (bolômetros e termistores), e dispositivos fotoelétricos que convertem energia radiante em corrente elétrica (fototubos, células fotovoltaicas, luxímetros e radiômetros espectrais). Uma grande variedade destes aparelhos está disponível no mercado [TØNNESEN, 2004], na Figura 2.1 podem ser observados exemplos de detectores para luz visível e ultravioleta.



Figura 2.1 – Actinômetros físicos: luxímetro (esquerda) e radiômetro (direita).

A radiometria é feita a partir de dispositivos fotoelétricos que convertem energia eletromagnética em corrente elétrica. O aparelho consiste de um detector UV ou visível com filtro que permite a passagem de comprimentos de onda bem definidos para o sensor (Figuras 2.2. a e b).

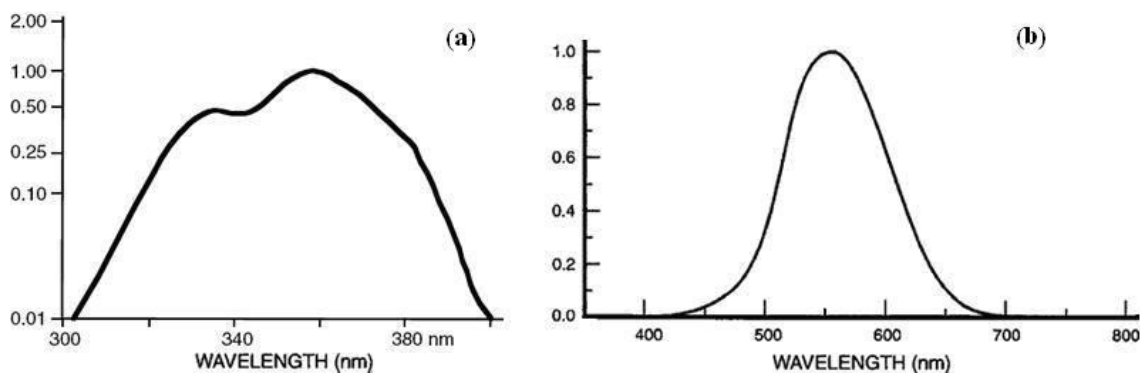


Figura 2.2 - a) Espectro de emissão do ultravioleta próximo, entre 300 e 400 nm. b) Espectro de emissão da luz visível, entre 400 e 700 nm [Fonte: TØNNESEN, 2004].

Para medidas da luz visível, recomenda-se o uso de um luxímetro, devidamente calibrado uma vez que o luxímetro é um aparelho que mede a intensidade da luz visível percebida pelo olho humano, em outras palavras, mede a intensidade de uma iluminação, ou a iluminância, não sendo sensível, portanto, a outros tipos de fonte de emissão [TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007].

Radiômetros UV podem ser calibrados para dar uma medição absoluta da irradiância para um determinado tipo de fonte, por exemplo, lâmpadas de xenônio ou fluorescentes de um tipo particular. Estes radiômetros podem proporcionar um meio simples de medição de nível da irradiância em toda a área da amostra, mas é necessário realizar calibrações esporádicas uma vez que as medidas podem mudar com o tempo de vida de uma determinada fonte.

Até o momento, ainda não foi estabelecido nenhum filtro UV internacionalmente padronizado. Isto significa que medidores de diferentes fabricantes podem não medir a mesma fração de irradiância a partir de uma determinada fonte [TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007].

#### **2.4.2.2. Actinômetros químicos**

Um actinômetro químico ou dosímetro é um sistema químico (fluido, gás, sólido, ou um ambiente heterogêneo) que se submete a reações induzidas pela luz (em determinados comprimentos de onda ( $\lambda$ ), no qual um campo quântico -  $\phi(\lambda)$  - é precisamente conhecido [KUHN, 2004].

Os princípios da actinometria estão bem estabelecidos, mas ainda não estão bem estabelecidos os sistemas sensíveis apenas à radiação ultravioleta [TØNNESEN, 2004]. O cloridrato de quinina monohidratado foi originalmente proposta pelo Japanese National Institute of Health Sciences e Japanese Pharmaceutical Manufacturer's Association [YOSHIOKA, 1994]. Na concentração recomendada (2%), a solução de quinina tem uma absorvância  $\geq 2$  entre 320 a 367 nm, de modo que a irradiância UV acima deste intervalo pode ser determinada utilizando este sistema [YOSHIOKA, 1994; ICH, 1996; TØNNESEN, 2004; PIECHOCK & THOMA, 2007].

O sal monoclóridrato de quinina diidratada, alcalóide extraído da planta *Cinchona officinalis* (Figura 2.3), foi selecionado como padrão actinométrico para o UV por ter suficiente solubilidade e relativo baixo custo, e por ser comercialmente viável [YOSHIOKA, 1994; SIMÕES, 2004].

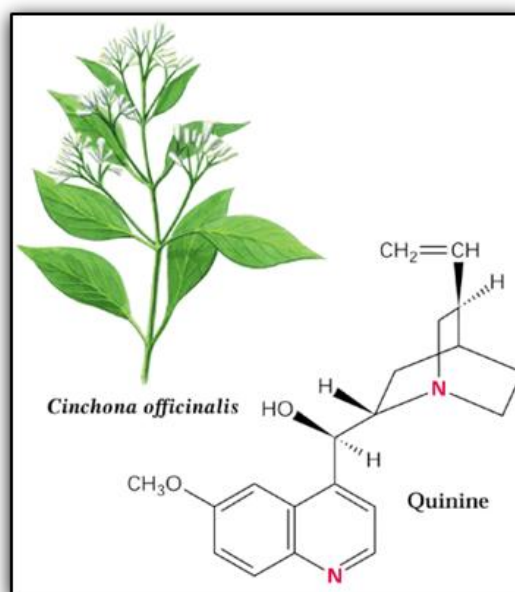


Figura 2.3 - *Cinchona officinalis* e o alcalóide quinina.

Recomenda-se o uso de cubetas de quartzo ou ampolas de vidro para a exposição da solução de quinina a fim de que seja feita a calibração por actinometria química. Antes de serem realizadas as medidas, faz-se necessário verificar se esses recipientes estão isentos de vestígios de ácido, base, sais e tampão [ICH, 1996].

#### 2.4.3. Câmaras de fotoestabilidade

O design das câmaras de fotoestabilidade comumente encontrado na Europa e América é do tipo exposição plano horizontal, sem rotação. Considerando que a irradiação é homogênea na área da superfície de exposição é importante determinar precisamente a intensidade de irradiação recebida pelas amostras quando dispostas na

área de exposição [PIECHOCK & THOMA, 2007]. A Figura 2.4 ilustra um modelo comercial desenvolvido pelo fabricante CARON™.



**Figura 2.4 – Câmara de fotoestabilidade modelo 65460 comercializada pela CARON™**  
[Fonte: [www.caronproducts.com](http://www.caronproducts.com)]

Duas opções de sistemas de lâmpadas foram sugeridas para a montagem das câmaras de fotoestabilidade. A natureza das lâmpadas fica a critério de escolha dos fabricantes, desde que atenda aos requisitos estabelecidos. No caso, a opção 1 recomenda o uso de lâmpadas fluorescentes, de xenônio ou halógenas, combinando emissão ultravioleta e visível (similar à emissão da lâmpada D65/ID65), e a opção 2 montada com uma lâmpada branca fluorescente fria, padrão ISO 10977 (1993) e lâmpada fluorescente ultravioleta próximo com espectro de 320 nm a 400 nm, e máximo de emissão entre 350 e 370 nm [PIECHOCK & THOMA, 2007; ICH, 1996, BRASIL, 2005]. A Figura 2.5 mostra os espectros de distribuição de lâmpadas fluorescentes brancas fria, ultravioleta e padrão D65 e ID65.



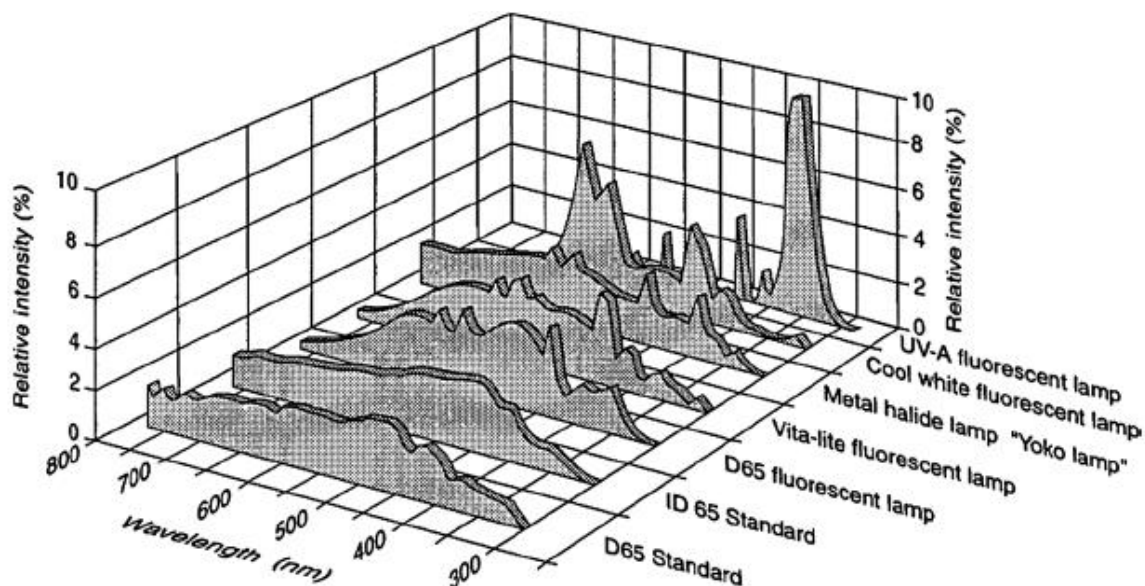


Figura 2.5 – Espectro de distribuição de potência relativa das lâmpadas ID65, branca fria e ultravioleta e outros tipos de lâmpadas [Fonte: Piechock & Thoma, 2007].

#### 2.4.3.1. Mapeamento da Superfície de Exposição

O mapeamento da superfície de exposição da câmara para qualificar e quantificar a iluminação é o mais importante passo para realização dos testes de fotoestabilidade. Dois métodos, anteriormente citados, são comumente utilizados para realização do mapeamento: por actinometria química com o uso da quinina e por radiometria, com o uso combinado de fotômetro/radiômetro, conforme recomendado pelo ICH (1996). O método mais confiável de mapeamento de câmara de fotoestabilidade é com um espectro-radiômetro equipado com uma esfera de integração [ICH, 1996; LABSPHERE, 2008].

Apenas um radiômetro pode mostrar os efeitos, isolados ou combinados, sobre os diferentes componentes de uma câmara, tais como refletores, filtros, extensão da lâmpada, envelhecimento da lâmpada, combinação de iluminação, refração, reflexão, etc. O gráfico de distribuição de potência espectral das várias lâmpadas citadas no guideline do ICH dá clara evidência de que elas não são comparáveis [PIECHOCK &

THOMA, 2007; ICH, 1996]. A Figura 2.6 mostra o espectro de distribuição completo do UV e visível de uma lâmpada de arco de xenônio utilizadas e câmaras de fotoestabilidade.

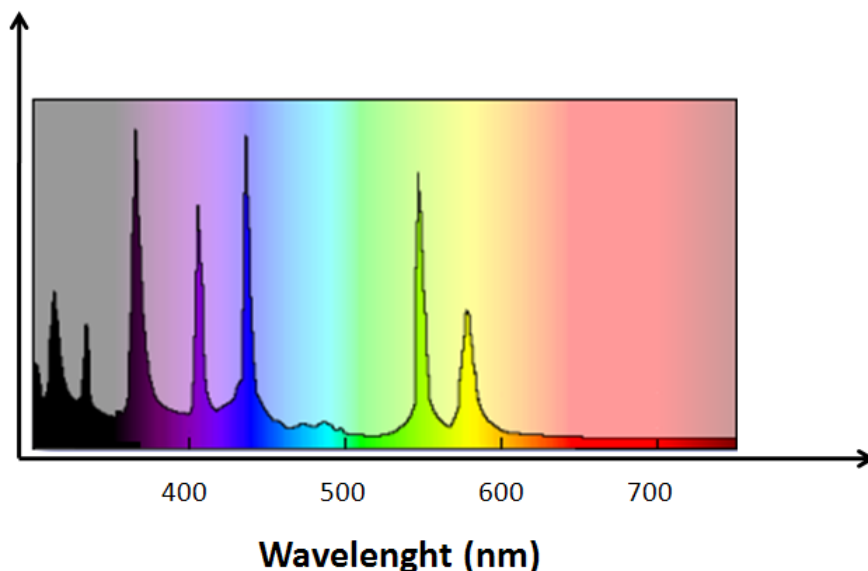


Figura 2.6 – Espectro de distribuição completo do UV e visível de uma lâmpada de arco de xenônio utilizada em câmaras de fotoestabilidade.

#### 2.4.3.2. “*ICH Harmonised Tripartite Guideline: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B*”

O *Guideline Q1B* que padroniza os testes de fotoestabilidade de medicamentos para a indústria farmacêutica teve sua primeira publicação em 1996, com o “*ICH Harmonised Tripartite Guideline: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B*” (*Guideline Q1B*), adotado pela ANVISA na RE n° 398 de 12 de novembro de 2004, que determinou a Guia de Publicação de Estudos de Estabilidade, a qual foi revogada pela RE n° 01 de 29 de Julho de 2005. De acordo com a *Guideline Q1B* as características intrínsecas da fotoestabilidade de substâncias ativas e produtos farmacêuticos devem ser avaliadas para demonstrar que a exposição à luz não resulta em mudanças inaceitáveis. A *Guideline Q1B* foi concebido para testar a fotoestabilidade

do produto até a venda, e não menciona testes durante a administração, porém, segundo a recomendação técnica da ANVISA, é apropriado testar certos produtos como infusões líquidas e cremes tópicos a fim de garantir a fotoestabilidade durante o uso. Para isso, modelos reduzidos de planos de estudos de fotoestabilidade podem ser elaborados [ICH, 1996; BRASIL, 2005; LEITE, 2005]. Segundo o *Guideline Q1B* existem dois tipos de estudos de fotoestabilidade:

- I. **Degradação Forçada:** tem como objetivo obter informações a respeito da fotoestabilidade intrínseca da molécula e, portanto, pode ser comparado a um **teste de estresse**. São testes que fazem parte do desenvolvimento da metodologia analítica, desenvolvimento da formulação, validação da especificidade e são conduzidos com os princípios ativos para entender as vias de fotodegradação;
- II. **Comprobatório:** esse estudo é conduzido com o produto final; pode ser entendido como um teste de estabilidade acelerado. Nessa etapa é muito importante que o estado físico-químico da amostra esteja de acordo com a forma como ele é comercializado. Fornece informações a respeito de precauções especiais a serem adotadas durante o manuseio, a embalagem e a rotulagem dos produtos farmacêuticos. As amostras devem ser expostas à iluminação integrada total de não menos que 1,2 milhões de Lux.hora e a uma energia UV próxima de não menos que 200 W.hora/m<sup>2</sup>, permitindo comparação direta entre substância e produto.

Segundo a recomendação técnica da ANVISA o teste de fotoestabilidade tem como objetivo demonstrar que a exposição à luz não resulta em alterações significantes

no produto. A recomendação é de que se proteja o produto de forma a evitar subprodutos de degradação pela luz, porém, caso a presença seja inevitável, a quantidade dessas impurezas não deve comprometer a qualidade do produto [ICH, 1996; BRASIL, 2005; GONÇALVES, 2008].

Em alguns produtos onde tem sido demonstrado que a embalagem primária é completamente fotoprotetora, tais como tubos de alumínio ou enlatados, os testes não precisam ser realizados desde que estejam tecnicamente justificados demonstrando que os componentes da formulação não apresentam problemas de fotoestabilidade, o que isenta o produto ao teste [LEITE, 2005; GONÇALVES, 2008].

Os resultados obtidos da análise de amostras expostas devem ser avaliados tanto individualmente como parte de um conjunto de resultados de estabilidade. Esses estudos combinados, por exemplo, resultados de estudo de estabilidade de longa duração somados aos resultados de fotoestabilidade, fornecem a informação necessária para avaliar se a data de validade proposta é aceitável ou se deve ser reduzida [GONÇALVES, 2008].

## **2.5. Estabilidade de misturas de nutrição parenteral**

Misturas de nutrição parenteral (NP) são soluções ou emulsões, compostas de carboidratos, aminoácidos, lipídios, vitaminas, oligoelementos e minerais, estéreis e apirogênicas, acondicionadas em recipiente de vidro ou plástico, destinadas a pacientes em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar. A administração da NP geralmente requer um acesso venoso central a fim de fornecer nutrientes em grandes concentrações, o que não é possível através de veias periféricas [BRASIL, 1998; ANSEL et al., 2000]. Podem ser classificadas como NP 2-em-1, constituída por glicose, aminoácidos e

eletrólitos, e as misturas 3-em-1, na qual é adicionada a emulsão lipídica [BRASIL, 1998; ANTUNES, 2004].

São preparações extemporâneas que podem conter acima de 40 diferentes componentes, podendo desenvolver uma variedade de interações físico-químicas [DRISCOLL et al., 1986; ANTUNES, 2004]. Segundo a American Society of Health-Systems Pharmacists (ASPH), preparações extemporâneas são preparações farmacêuticas que não seguem aos critérios padronizados de compêndios oficiais, mas são preparadas de acordo com as necessidades específicas do paciente [ASPH, 2008; SANTELL & KAMALICH, 1996]. Apresentações de NP disponíveis comercialmente muitas vezes não atendem às necessidades dos pacientes, com isso farmácias institucionais, principalmente as hospitalares, se vêem obrigadas, muitas vezes, por uma necessidade premente, a manipular este tipo de preparação a fim de atender a demanda [WAITZBERG, 2002; SEVERINO et al., 2007].

Uma das dificuldades enfrentadas nesses tipos de preparações é a falta de informações imediatas sobre a estabilidade de um componente quando associado à formulação [WAITZBERG, 2002; ANSEL et al., 2000]. A avaliação da estabilidade nesses casos deve ser ainda mais criteriosa, levando-se em consideração a ausência ou presença de partículas suspensas, mudanças de coloração, aspecto físico da EL quando esta se faz presente, esterilidade e luminosidade que possam alterar de alguma maneira as características físico-químicas dessas preparações [BRASIL, 2005; WAITZBERG, 2002; BRASIL, 1998].

### **2.5.1. Processos Fotoinduzidos em Nutrição Parenteral**

Um dos problemas negligenciados na aplicação da nutrição parenteral total (NPT) é a degradação devido à fotoxidação de alguns de seus componentes [CHYTIL,

1996]. Misturas de NP, ao serem irradiadas com UV, tornam-se um local de reações entre oxigênio e elétrons doadores, resultando na geração de peróxidos os quais são considerados como elementos chave para a toxicidade de células [CHESSEX, 2002] e dentre os componentes susceptíveis à degradação fotoinduzida e presentes em formulações utilizadas em NPT encontram-se as vitaminas, os aminoácidos e a emulsão lipídica [ALWOOD & KEARNEY, 1998, ALWOOD & MARTIN, 2000; BATHIA et al., 1992].

Há diversos relatos de processos de fotodegradação de vitaminas em formulações para NP, principalmente sob irradiação UV, mostrando que, por exemplo, existe uma intensa degradação das vitaminas A, E, K e B<sub>2</sub>. Estudos também demonstram que existem fatores cruzados e intrínsecos evidenciando incompatibilidades entre os constituintes das formulações que podem induzir também processos foto-oxidativos [ALWOOD & MARTIN, 2000; ALWOOD & KEARNEY, 1998; STEINDAL, 2006; BLANCO et al., 2000].

Apesar dos estudos abrangerem um conjunto bastante amplo e disperso de condições experimentais, os resultados apontam para uma degradação fotoinduzida máxima para compostos expostos indiretamente à luz do dia, mesmo acondicionados em bolsas de etil-vinil-acetato (EVA) multilaminadas comumente empregadas em NP [LAVOIE et al., 1997; DUPERTUIS et al, 2002].

Relata-se ainda a presença de subprodutos tóxicos nas misturas relacionados à derivados de fotodegradação da Vitamina C, que em presença de alguns cátions divalentes, geram intermediários que podem reagir com outros componentes presentes no meio formando potenciais formadores de radicais peróxidos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nocivos a saúde [LAVOIE et al., 2004].

Estudos de fotodegradação de aminoácidos [SOUZA, 2005; ALWOOD, 1998; EDWARDS, 2001] em misturas nutricionais parenterais em experimentos controlados, evidenciam que certos aminoácidos nas NP são mais susceptíveis à instabilidade, no que diz respeito à fotodegradação [ASPEN, 2002]. Em estudos realizados em infusões parenterais contendo aminoácidos foi relatada fotoxidação do triptófano, da histidina e da metionina pela ação da luz visível [EDWARDS, 2001].

Além da redução da concentração dos componentes na NP, outro problema decorrente das reações induzidas por fotodegradação é a formação de precipitados, como é o caso da dimerização da cisteína [SALJOUGHIAN, 2003; SHULMAN, 2000], ou da degradação da tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), que incorre na formação de precipitados. A precipitação da tiamina é causada, em particular, pela sua redução induzida pelo metabissulfito de sódio, substância utilizada como antioxidante em soluções comerciais de aminoácidos, induzida pela luz UV [SCHEINER, 1981].

Os lipídeos são fornecidos na forma de emulsões lipídicas óleo/água. As mais comuns são compostas por: triglicerídeos de cadeia longa, provenientes do óleo de soja, girassol, peixe ou oliva; fosfolipídios (lecitina), provenientes da gema do ovo, como agente emulsificante; e glicerol para ajuste ao pH fisiológico e da tonicidade [ARIZMENDI, 2002]. Existem emulsões lipídicas as quais são incorporados triglicerídeos de cadeia média (TCM) e ácidos graxos de cadeia curta, essenciais para a manutenção da capacidade absorviva do intestino [FÜRST, 1998; WAITZBERG, 2002].

Esses sistemas podem apresentar outros constituintes isolados que representam potenciais fontes de oxidantes. Pelo fato dos lipídeos infundidos nas misturas de NP estarem contaminados por peróxidos, acredita-se que, quase sempre, essas emulsões são as maiores fontes de oxidantes das misturas de NP. Muito embora, outros nutrientes possam promover a peroxidação, exemplificando além de aminoácidos, vitaminas,

traços de minerais ou aditivos usados como estabilizantes [PICAUD et al., 2004; CHESSEX et al., 2002].

A peroxidação lipídica constitui a principal causa de deterioração dos corpos graxos (lipídios e matérias graxas) principais constituintes das emulsões lipídicas. Afastados do seu contexto de proteção natural, os corpos graxos sofrem, no decurso de processos de transformação, armazenamento e exposição à luz ultravioleta e luz visível, alterações oxidativas, as quais tem, como principal consequência, a modificação de sua composição química [PICAUD et al., 2004; CHESSEX et al., 2002; SILVA et al., 1998].

O estudo da instabilidade de vitaminas, aminoácidos e emulsões lipídicas decorrente da fotodegradação constitui uma área de intensa investigação científica com muitas questões ainda a serem resolvidas [ASPEN, 1998]. Dentre os fatores que contribuem para a importância desse estudo ressalta-se a necessidade de controle e prevenção destes processos em misturas utilizadas em nutrição parenteral, nas quais se faz necessário um rigoroso controle químico de qualidade.

### **2.5.2. Fotodegradação da vitamina A**

As vitaminas estão envolvidas na utilização de substratos energéticos, atuando como co-fatores de enzimas no metabolismo intermediário e na síntese protéica, assim como no sistema imunológico [ARIZMENDI et al., 2002]. A deficiência destes compostos no organismo induz o surgimento das doenças de carência; já o excesso pode causar efeitos tóxicos [WAITZBERG, 2002; PAIXÃO & STAMFORD, 2004].

As vitaminas (ANEXO A2) são classificadas em [WAITZBERG, 2002; PAIXÃO & STAMFORD, 2004]:



- I. Hidrossolúveis - Tiamina (B<sub>1</sub>); riboflavina (B<sub>2</sub>); niacina (B<sub>3</sub>); ácido pantotênico (B<sub>5</sub>); piridoxina (B<sub>6</sub>); biotina (B<sub>7</sub>); ácido fólico (B<sub>9</sub>); cianocobalamina (B<sub>12</sub>) e ácido ascórbico (C).
- II. Lipossolúveis - Retinol (A); calciferol (D); tocoferol (E); fitomenadiona (K<sub>1</sub>).

Quimicamente, a vitamina A pode ser qualquer um dos vários retinóides inter-relacionados que exibem a atividade biológica do retinol. As formas naturais da vitamina A incluem retinol, alfa, beta e gama caroteno e criptoxantina. Dentro do organismo, existe na forma de retinol, éster retinil, retinal e ácido retinóico [TEE, 1992; BALL, 1988]. É encontrada nas plantas ainda como carotenóides, principalmente betacaroteno, e quando presente na alimentação é transformada em retinol e absorvida no intestino na forma de quilomicrons [TEE, 1992; LEHNINGER et al., 1993].

A vitamina A desempenha importante papel no crescimento e diferenciação celular, no crescimento e reparação nas células dos ossos, dentes e cartilagens, e na manutenção da integridade do epitélio do sistema respiratório. Também está envolvida na formação de pigmentos fotossensíveis na retina e no desenvolvimento do sistema imunológico [TEE, 1992; LEHNINGER et al., 1993].

Durante a administração lenta e contínua das misturas de NP, as bolsas de infusões ficam por um longo tempo expostas à luz. Embora todas as vitaminas estejam propensas a degradar em função desta exposição, retinol (vitamina A), tocoferol (vitamina E), riboflavina (vitamina B<sub>12</sub>) e ácido ascórbico (vitamina C) são as mais sensíveis à fotólise [ALWOOD et al., 1998; EDWARDS & SILVA, 2001; DROTT et al., 1991]. Existem vários estudos mostrando a degradação foto-induzida de vitaminas nas misturas de NP, porém só mais recentemente estudos mais sistemáticos vêm sendo

mostrados por diferentes grupos de pesquisa [ALWOOD, 1982; GILLIS, 1983; RIGGLE, 1986; SHENAI, 1981; THOMAS, 1991; MANNING, 1992; ALWOOD, 1986; ALWOOD, 2000; CARLOTTI, 2002; HAAS, 2002]. Alwood e Martin relatam perdas da vitamina A durante simulações de infusões de misturas de NP expostas em bolsas à luz do dia a uma iluminância numa escala entre 2000 - 4000 Lux [ALWOOD & MARTIN, 2000]. Haas e colaboradores também simularam infusões de NP contendo vitamina A e registraram as perdas num período de 24h. As condições de iluminação registrada no local da bomba de infusão e conectores foi entre 1000 - 1600 Lux durante um dia de sol no verão, e entre 200 - 600 Lux à noite sob luz artificial, na unidade de cuidados intensivos. Eles também monitoraram a degradação da vitamina durante a fototerapia em luz azul (espectro de emissão entre 410 e 450 – 460 nm, iluminância entre 9,000 – 11,000 Lux) [HAAS et al., 2002].

Carlotti e colaboradores desenvolveram um estudo mais sistemático da fotodegradação da vitamina A com controle da luz irradiada, porém, solubilizadas em meios orgânicos [CARLOTTI et al., 2002]. Todos esses estudos mostraram que a fotodegradação da vitamina A em formulações de nutrição parenteral, ou em outros meios, é influenciada por diversos fatores, tais como intensidade da luz do dia, proximidade desta em relação à fonte de emissão de luz e o uso de dispositivos de proteção contra a luz (por exemplo, capas poliméricas opacas). No caso da fonte de iluminação ambiente for artificial composta de lâmpadas brancas fluorescente fria, a taxa de degradação é descrita como insignificante, uma vez que a taxa de emissão de luz UV é diminuta, mas ainda assim pode ocorrer fotodegradação, especialmente com a vitamina A.

### 2.5.3. Agentes antioxidantes em NP

Sabendo-se que tanto os componentes constituintes como as misturas nutritivas são susceptíveis a processos oxidativos torna-se necessário efetivar metodologias de prevenção para estes tipos de processos. Uma das formas utilizadas para minimizar a oxidação de tais nutrientes é a adição de agentes químicos internos capazes de suprimir estes processos, chamados de antioxidantes [ANSEL et al., 2000; KIM et al., 2004].

Os agentes antioxidantes atualmente utilizados são divididos em três classes:

1) Agentes antioxidantes artificialmente sintetizados tais como o BHT (terc-butilhidroxitolueno) e BHA (terc-butilhidroxianisol);

2) Agentes antioxidantes naturais tais como o  $\alpha$ -Tocoferol, Vitamina C, carotenóide, flavonóides, taninos, riboflavina, FMN (flavina mononucleotídeo) e FAD (flavina dinucleotídeo);

3) Enzimas antioxidantes tais como SOD (superóxido dismutase).

Há poucos estudos sistemáticos que abordam o uso de agentes antioxidantes em formulações para nutrição parenteral. Menciona-se que as próprias vitaminas de uma forma geral desempenham este papel quando adicionadas às formulações de NP. Comumente são utilizados como agentes antioxidantes nas emulsões lipídicas e soluções de aminoácidos, respectivamente, a vitamina E e o metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) [BRAWLEY et al., 1998; PIRONI et. al., 1998].

Ainda assim, o metabissulfito apresenta efeitos locais vasoreativos [LAVOIE & CHESSEX, 1983] e pode desencadear reações de hipersensibilidade em pacientes sensíveis a esta substância química. Além disso, relata-se que os sulfitos de uma forma geral reagem espontaneamente com oxigênio para formar radicais livres inorgânicos [BRAWLEY et al., 1998]. Apesar de ser comercializado amplamente seu uso em NP

ainda é cogitado, principalmente por ter sido relatada sua incompatibilidade com a Vitamina B<sub>1</sub> [SCHEINER et al., 1981].

## 2.6. Uso do polifosfato de sódio como agente antioxidante

Recentemente, o uso de polifosfato de sódio [NaPO<sub>3</sub>]<sub>n</sub> (20<n<100) foi patenteado como agente antioxidante em formulações farmacêuticas de uso geral, incluindo as formulações parenterais [KIM et al., 2004]. Nesta patente relata-se que polifosfatos contendo de 20 a 100 monômeros de fosfato são capazes de diminuir a oxidação do DNA causada por radicais livres gerados pela radiação UV, de modo que preparações farmacêuticas contendo esse polímero tenham atividade antioxidante [KIM et al., 2004]. Embora sugira o uso em NP, o referido trabalho não mostra evidências conclusivas.

Por outro lado, desde 2004 o **Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral (NP<sup>2</sup>)** sediado no Depto. Ciências Farmacêuticas da UFPE vem utilizando com sucesso o [NaPO<sub>3</sub>]<sub>n</sub>, com n entre 9 e 12 (Figura 2.7), como fonte alternativa de fósforo em formulações para NP [Pereira, 2007] em substituição ao fosfato de potássio, fonte inorgânica mais economicamente viável no mercado atualmente, visando uma melhor estabilidade físico-química de interação entre Ca<sup>2+</sup> e fosfato.

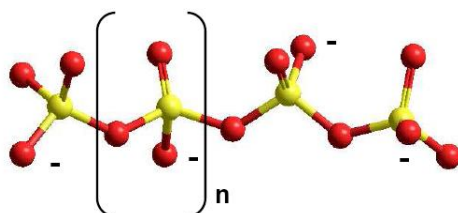


Figura 2.7 – Estrutura molecular de uma cadeia de polifosfato [PO<sub>3</sub>]<sub>n</sub>, com n = 9 [retirada de PEREIRA, 2007]

O polifosfato é um polímero inorgânico pertencente ao grupo dos fosfatos condensados, constituídos por unidades básicas de íons ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). A sua

estrutura pode ser representada por  $[\text{PO}_3^-]_n$ , onde o **n**, ou grau de polimerização, pode assumir valores de 2 a 300, quando obtidos sinteticamente. Contudo, na natureza pode-se encontrar polifosfatos cujo **n** atinge valores da ordem de  $10^6$  [KULAEV, 2004]. A habilidade dos polifosfatos em prevenir a precipitação ou dissolver precipitados de metais alcalinos terrosos é conhecida desde o início das pesquisas com estes compostos [VAN WAZER & CALLIS, 1958]. O fenômeno é atribuído à formação de complexos solúveis relativamente estáveis entre o metal e o fosfato [VAN WAZER & CAMPANELLA, 1950].

Os polifosfatos possuem também muitas aplicações na indústria alimentícia. São bastante utilizados em carnes por promoverem um aumento do pH, a retenção de água e a abertura das estruturas das proteínas [ÜNAL et al., 2006]. Desta forma, mantêm a maciez e suculência de carnes cozidas, melhoram a textura e homogeneidade de carnes em conserva, reduzem a rancidez oxidativa, estabilizam a cor da cura e melhoram a qualidade microbiológica, embora possam não ser considerados conservantes [HOURANT, 2004].

Em sucos de frutas, os polifosfatos são utilizados principalmente para estabilizar vitamina C por apresentarem capacidade antioxidante. Alguns polifosfatos são adicionados em determinadas bebidas energéticas como suplementos nutricionais dos minerais fósforo, potássio ou cálcio [HOURANT, 2004].

Na produção de queijos processados, apresentam as seguintes funções: controle de pH (propriedade tamponante); trocador iônico na fusão do queijo; promotor da emulsificação por intumescer a caseína [HOURANT, 2004; MIZUNO & LUCEY, 2005].

Ainda na indústria alimentícia, os polifosfatos são utilizados no processamento de ovos, leites, cereais, óleos e gorduras devido à capacidade tamponante, antioxidante e

estabilizante de um modo geral. Os polifosfatos também inibem as degradações microbiológicas e enzimáticas destes alimentos [HOURANT, 2004].

Na indústria farmacêutica, os polifosfatos vêm sendo utilizados na produção de cosméticos. Nesses produtos, são usados como agente quelante e para ajustes e tamponamento de pH, mas principalmente devido a sua atividade antioxidante e bactericida. Alguns produtos cosméticos contendo polifosfatos são: óleos, sabonetes e sais de banho; maquiagens; loções hidratantes; preparações para corpo e mãos [KIM et al., 2004; LANIGAN, 2001]. Diversos produtos utilizados na higiene bucal, como dentrífcios, possuem polifosfatos em sua composição, onde atuam na remoção de cálculos dentários [WHITE & GERLACH, 2000].

Recentemente foram realizados estudos sobre a estabilidade físico-química do polifosfato de sódio  $[\text{Na}(\text{PO})_3]_9$  em formulações 2-em-1 contendo  $\text{Ca}^{2+}$ . O conjunto de dados obtidos indica que, do ponto de vista físico-químico, este polieletrólito pode ser utilizado de forma definitiva como fonte alternativa de fósforo na composição de formulações de nutrição parenteral [PEREIRA, 2007].

Com tal promissora possibilidade de se utilizar este poliânion como fonte de fósforo é também interessante estudar o potencial antioxidante nestas mesmas formulações. Desta forma, torna-se necessário um estudo sistemático que possa, por um lado quantificar o grau de degradação fotoinduzida, tanto da vitamina A, como as demais lipossolúveis e hidrossolúveis, aminoácidos e lipídeos, e por outro lado, quantificar o poder antioxidante do polifosfato de sódio neste tipo de formulações.

# CAPÍTULO III

---

## Materiais e Métodos

## 3.1 Materiais de estudo

Os produtos utilizados no preparo dos sistemas estudados na presente pesquisa encontram-se listados com suas respectivas especificações na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Produtos utilizados no preparo dos sistemas estudados

PRODUTO	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO	APRESENTAÇÃO	FABRICANTE
Água estéril para injetáveis	H <sub>2</sub> O	-	Ampola 1000 mL	Fresenius-Kabi Laboratórios Ltda.
Polifosfato de sódio	(NaPO <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	96% m/m	Sal em pó	Aldrich Co.
Solução injetável de aminoácidos de uso pediátrico (Aminoped®)	ANEXO A1	10% m/v	Frasco-ampola 1000 mL	Fresenius-Kabi Laboratórios Ltda.
Solução injetável de Cloreto de Potássio	KCl	19,1% m/v	Ampola 10 mL	Isofarma Industrial Farmacêutica Ltda.
Solução Injetável de Cloreto de Sódio	NaCl	20% m/v	Ampola 10 mL	Isofarma Industrial Farmacêutica Ltda.
Solução injetável de Glicose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	50% m/v	Ampola 10 mL	Samtec Biotecnologia
Solução injetável de Fosfato de Potássio	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mEq/mL (1,1 mmol/mL)	Ampola 10 mL	Darrow Laboratórios S.A.
Solução injetável de Oligoelementos de uso pediátrico (Ped-Element®)	Zn <sup>2+</sup>	0,125 g/mL	Ampola 4 mL	Darrow Laboratórios S.A.
	Cu <sup>2+</sup>	2,5.10-2 g/mL		
	Mn <sup>2+</sup>	2,5.10-3 g/mL		
	Cr <sup>3+</sup>	2,5.10-4 g/mL		
Solução injetável de Sulfato de Magnésio	MgSO <sub>4</sub>	1m Eq/mL	Ampola 10 mL	Darrow Laboratórios S.A.
Palmitato de Retinol	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>2</sub>	1.800.000 UI/g	Ampola 1 g	Sigma
Polisorbato 80	-	P.S.	Frasco 1 Kg	Vetec
Manitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	P.A.	Frasco 500 g	CRQ



A Tabela 3.2 descreve as quantidades de componentes nas formulações de nutrição parenteral utilizadas no estudo de fotodegradação acelerada da vitamina A.

**Tabela 3.2 – Componentes utilizados nos experimentos de fotodegradação e suas respectivas concentrações.**

COMPONENTE	QUANTIDADE
Glicose	26,20 mL
Cloreto de potássio	0,80 mL
Cloreto de sódio	0,60 mL
Sulfato de magnésio	0,30 mL
Gluconato de cálcio	4,00 mL
Fosfato de potássio	1,00 mL
Polifosfato de sódio (20 mM)	6,00 mL
Emulsão de vitamina A (120 µg/mL)	5,12 mL
Oligoelementos	0,40 mL
Água q.s.p.	100,00 mL

### 3.2 Equipamentos utilizados

A Tabela 3.3 apresenta as especificações dos equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais.

**Tabela 3.3 – Equipamentos utilizados nas análises das preparações estudadas.**

EQUIPAMENTO	FABRICANTE	MODELO	CARACTERÍSTICAS
<b>Espectrofotômetro de absorção eletrônica UV-Visível</b>	Beckman	DU7500	Escala de comprimento de onda de 190-800 nm
<b>pHmetro digital</b>	PHTEK	PHS-3B	pH de 0.00 a 14.00 pH, mV de -1999 a +1999 mV e temperatura de 0 a 100°C
<b>Câmara de fotoestabilidade</b>	NP2/UFPE	BCD1.0	Opção 2 ICH
<b>Medidor de tamanho de partículas</b>	Microtec	S3500	Software Microtec Flex 10.4.3
<b>Balança analítica</b>	Shimadzu	AY220	Digital, Função Windows™ Direct
<b>Multímetro</b>	Minipa	ET-1400	Display LCD 2000 contagens e função Data-Hold
<b>Luxímetro</b>	Minipa	MLM-1011	Display LCD 3 ½ dígitos com leitura máxima de 1999, indicação x10 e x100
<b>Radiômetro</b>	Instrutherm	MRU-201	Display LCD de 3 1/2 dígitos, escala de 1.999 uW/cm <sup>2</sup> a 19.990 uW/cm <sup>2</sup> , resposta espectral na faixa de 290 a 390 nm
<b>Ponta termopar</b>	Minipa	MTK01	Medida de -40°C a 204°C
<b>Software Scilab</b>	Scilab	-	V4.1.2
<b>Software Origin</b>	OriginLab Corporation	-	V7.0

### 3.3 Delineamento experimental

Os estudos que envolvem a quantificação do palmitato de retinol (Vitamina A) foram realizados através da técnica de espectroscopia de absorção eletrônica no ultravioleta e visível [BALL, 1988]. A taxa de fotodegradação desta vitamina foi determinada através de um modelo reduzido de plano de estudo de fotoestabilidade acelerada, realizado numa câmara de fotoestabilidade desenvolvida pelo Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral/UFPE, de acordo com a opção 2 determinada pela Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos (ICH) e a **Food and Drugs Administration** (FDA) [ICH, 1996] os quais são adotados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [BRASIL, 2005], simulando as condições de iluminância e irradiância medidas no berçário e UTI Neonatal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

### 3.4 Construção da câmara de fotoestabilidade

Para a construção da câmara de fotoestabilidade, vários parâmetros foram levados em consideração, dentre eles destacaram-se: (i) as lâmpadas utilizadas como fonte de luz; (ii) a disponibilidade de materiais e (iii) mão-de-obra especializada para a execução do projeto.

Com relação à fonte de luz, a escolha das lâmpadas atendeu aos critérios estabelecidos pela Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos (ICH) e a **Food and Drugs Administration** (FDA) [ICH, 1996; PIECHOCK & THOMA, 2007], adotados também pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [BRASIL, 2005]. Foram escolhidas as lâmpadas que melhor atenderam às exigências dos órgãos regulatórios acima citados, levando-se em consideração custo, dimensões e potência. Foram utilizadas duas lâmpadas brancas

fluorescente fria (OSRAM – Germany) e uma lâmpada ultravioleta (Philips – Holland) conectadas a reatores eletrônicos específicos para cada tipo de lâmpada, acionados de forma independente por botões de acionamento localizados no painel.

O modelo construído foi montado a partir de moldes em madeira, revestido externamente por fórmica e internamente por lâminas de alumínio.

Toda a parte elétrica foi feita no seu compartimento superior e protegido por uma tampa na qual foram instalados dois exaustores. Outros dois exaustores mais potentes foram colocados na parte de trás da câmara a fim de promover a troca do ar ambiente com o compartimento interno para manter a temperatura constante.

Um fio Termopar<sup>®</sup>, conectado a um multímetro (Minipa<sup>®</sup>), foi colocado no interior da câmara, na parte inferior central a fim de se monitorar a temperatura neste ponto, local onde ficaram expostas as amostras.

### **3.5 Mapeamento da superfície de exposição**

As medidas da irradiância e da iluminância foram feitas utilizando-se um radiômetro e um luxímetro, respectivamente, conforme especificados na Tabela 3.2.

Para fazer o mapeamento, foi necessário definir, primeiramente, a área de trabalho na superfície de exposição. Foram medidas as intensidades da lâmpada UV e BF ligadas em conjunto e individualmente, registrando-se a intensidade detectada pelos luxímetro e radiômetro em cada situação.

Por medida de segurança, e por se tratar de um modelo protótipo, foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPIs) com a finalidade de proteger o operador, principalmente, dos raios UV.

### **3.6 Medidas da potência UV e iluminância no berçário e UTI neonatal do Hospital das Clínicas de Pernambuco**

Realizaram-se medidas da intensidade e potência luminosa da luz incidida, utilizando-se, respectivamente, o luxímetro e o radiômetro, em 16 pontos próximos às janelas (locais onde estão situados os sistemas de gases e onde ficarão confinados as incubadoras), entre 8:00 e 18:00h, com intervalo médio entre as leituras de duas horas.

### **3.7 Preparação e caracterização de emulsões de vitamina A**

Realizou-se um levantamento de acordo com Blanco e colaboradores (2000) e classificação segundo Ansel (2000) dos excipientes comumente utilizados e suas respectivas concentrações nas preparações de emulsões de vitaminas lipossolúveis comercialmente disponíveis [BLANCO et al., 2000; ANSEL, 2000].

A estabilidade das emulsões da vitamina foi observada quando em repouso após a preparação. Além disso, foi determinado, em triplicata, o tamanho médio das emulsões formadas através de um medidor de tamanho de partículas e observado o perfil de absorção através da técnica de espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis. Também foi verificado o pH de cada preparação. Os equipamentos utilizados encontram-se descritos na Tabela 3.3.

### **3.8 Determinação das concentrações da vitamina A através de espectroscopia de absorção eletrônica no UV e visível**

Através da técnica de espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis foram preparadas curvas padrão da vitamina A, em concentrações pré-determinadas, utilizando-se como valor de referência as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO) [WHO, 1996], a fim de se obter o ajuste da reta de regressão linear e,

conseqüentemente, os valores das concentrações da vitamina A nas misturas de nutrição parenteral.

### **3.9 Preparação das misturas de nutrição parenteral, determinação da cinética de degradação da vitamina A e estudo do efeito antioxidante do polifosfato de sódio.**

A primeira etapa foi determinar os espectros de absorção de cada componente da mistura separadamente, em concentrações usualmente utilizadas.

A partir dos dados disponíveis foram formuladas nutrições parenterais contendo glicose, eletrólitos, oligoelementos e a emulsão com a vitamina A, conforme descritos na Tabela 3.1 e colocadas na câmara de fotoestabilidade, em frascos-ampola de vidro, lacrados com tampa de borracha.

A partir do mapeamento da superfície de exposição e das medidas de iluminância e irradiância no berçário e UTI neonatal do Hospital das Clínicas/UFPE, determinou-se o tempo equivalente de exposição das amostras para cada tipo de fonte de luz.

A partir das curvas padrão da vitamina A determinadas anteriormente, foi observado o perfil da cinética de fotodegradação desta vitamina quando adicionada às misturas de NP, na presença e ausência do polifosfato de sódio.

# CAPÍTULO IV

---

## Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos nesta dissertação.

#### 4.1 Construção da Câmara de Fotoestabilidade

Foi escolhido o modelo de exposição de amostras no plano horizontal, o qual é adotado na maioria dos países da Europa e América [TØNNESEN, 2004].

A armação estrutural do equipamento foi feita de madeira compensada e fórmica, pelo fato de ser um material não condutor e de baixo custo, além de não influenciar nos processos de degradação promovidos pelo equipamento.

As dimensões da câmara foram estipuladas pela quantidade e comprimento das lâmpadas, distância destas em relação ao suporte das amostras e distância de separação entre as lâmpadas. A princípio, oito lâmpadas compunham o equipamento, sendo seis do tipo branca fria e duas do tipo UV. A Figura 4.1 apresenta uma visão geral da parte interna na versão preliminar.

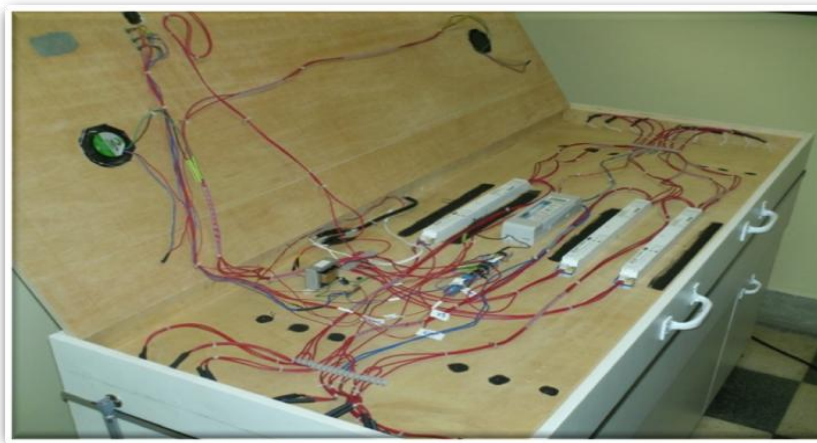


**Figura 4.1 – Visão interna da versão preliminar da câmara de fotoestabilidade, contendo seis lâmpadas BF e duas lâmpadas UV.**

As instalações elétricas foram feitas na região superior do equipamento (Figura 4.2). Foram utilizados para a montagem do sistema elétrico de acionamento das



lâmpadas um reator eletrônico multivolt de 80 W com acoplamento para duas lâmpadas UV e três reatores eletrônicos multivolt de 58 W com acoplamento para duas lâmpadas brancas frias (BF).



**Figura 4.2 – Compartimento contendo as instalações elétricas da câmara de fotoestabilidade, três reatores eletrônicos para lâmpadas BF e um reator para duas lâmpadas UV.**

Os dispositivos complementares instalados ao sistema elétrico permitem que sejam realizadas as seguintes operações: acionamento elétrico geral do equipamento, acionamento do sistema de exaustão (botão liga/desliga), acionamento independente das lâmpadas branca fria e ultravioleta, e chave de desligamento das lâmpadas.

Por medidas de segurança, um interruptor foi colocado em contato com a tampa a fim de que quando esta for levantada, enquanto as lâmpadas estiverem ligadas, todo o sistema elétrico é automaticamente desligado, com exceção dos exaustores.

Para garantir que o equipamento não volte a funcionar caso ocorra uma súbita falta e fornecimento de energia, um sistema de relés foi desenvolvido para garantir que a câmara será efetivamente desligada e não mais volte a religar. Caso haja amostras em exposição o experimento é cessado e deverá ser novamente realizado.

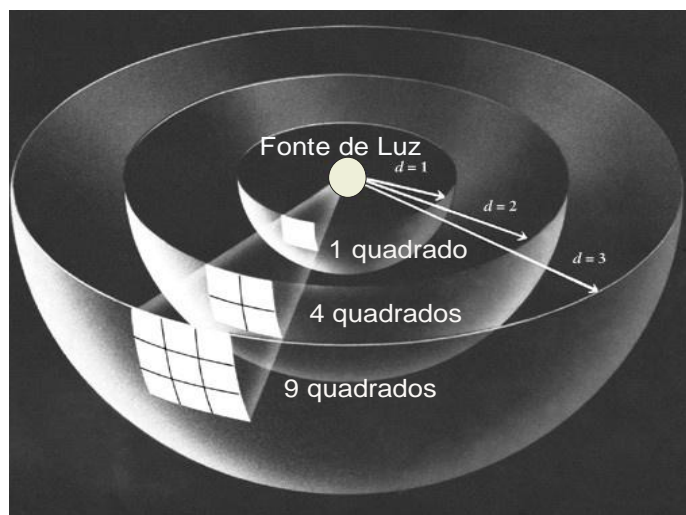
Todo o compartimento interno da câmara foi forrado com folhas de alumínio, conforme recomendado por Turner (1998) [TURNER, 1998 apud PIECHOCK &

THOMA, 2007, p.90], formando uma superfície refletora, garantindo espalhamento contínuo e homogêneo da luz por toda a área de exposição, e aumentando a eficiência da câmara [PIECHOCK & THOMA, 2007].

A distância entre as fontes de irradiação e a superfície de exposição, onde se localizam as amostras, foi de 15 cm. Uma vez que a potência e a luminosidade são fixas, a distância passa a ser relevante para o mapeamento da superfície de exposição e, conseqüentemente, a determinação do tempo de exposição.

Um fio Termopar<sup>®</sup>, conectado a um multímetro (Minipa<sup>®</sup>), foi colocado na parte inferior interna, mais precisamente no centro da câmara, a fim de monitorar a temperatura na superfície de exposição onde ficam as amostras. Quatro exaustores no total foram instalados a fim de promover a circulação do ar, tanto na parte elétrica como na área de exposição, promovendo a passagem do ar no ambiente externo para o interno e vice versa. A câmara de fotoestabilidade é dependente da temperatura e umidade do ambiente externo.

A posição, forma e tamanho das fontes de irradiação têm influência diretamente na distribuição da luz, na potência irradiada e nos níveis de iluminação. Porém, a distância entre uma fonte de iluminação e um fotodetector (ou da superfície de exposição), deve ser sempre levada em consideração, uma vez que, os níveis de iluminação que partem desta fonte e chegam a uma determinada área decaem na relação do inverso do quadrado da distância à medida que esta aumenta entre esses dois pontos, como estabelecido na lei do inverso quadrado (Figura 4.3) [CAMPINI, 2005].



**Figura 4.3 – Esquema representativo da lei do inverso do quadrado. Intensidade por unidade de área varia inversamente proporcional ao quadrado da distância de um ponto da fonte de iluminação.**

Um espaço excedente na parte inferior da câmara pode ser usado para guardar todo o material constantemente utilizado durante os ensaios, como: lâmpadas novas, suportes, fios, etc. Na parte inferior externa estão situados os rodízios necessários para o deslocamento do equipamento. Pode-se ter uma visão geral do equipamento construído na Figura 4.4.



**Figura 4.4 – Visão geral da câmara de fotoestabilidade construída pelo Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral.**

Medidas preliminares realizadas com a primeira montagem indicaram níveis altos da temperatura, luminosidade e potência na superfície de exposição. Portanto, fez-se necessário reduzir o número de lâmpadas de seis para duas brancas fluorescentes frias e de duas para uma lâmpada UV, o que refletiu, conseqüentemente, na diminuição da temperatura.

A montagem final da câmara de fotoestabilidade construída de acordo com a opção 2 do guia intitulado “*ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE*” [ICH, 1996], e adotado pela ANVISA, contém uma lâmpada UV, com espectro distribuído entre 320 nm e 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 e 370 nm, e duas lâmpadas fluorescentes brancas frias, similar à ISO 10977 (1993), como fonte de emissão de luz visível (400 – 700 nm).

A Tabela 4.1 compara os resultados obtidos das medidas da temperatura, luminosidade e potência, respectivamente, realizadas no ponto central da montagem preliminar e final.

**Tabela 4.1 – Medidas da temperatura, luminosidade média e potência UV da montagem preliminar e final da câmara de fotoestabilidade.**

Ponto Central	Temperatura (°C)	Luminosidade Média (Lux)	Dose Média ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )
<b>Montagem Preliminar</b>	40	370.000	3.060
<b>Montagem Final</b>	28	14.472	1.416

No ANEXO C encontra-se uma tabela com as especificações técnicas da câmara de fotoestabilidade desenvolvida pelo Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral/UFPE após as devidas modificações e pronta para uso.

#### **4.2 Mapeamento da superfície de exposição e determinação do tempo de exposição**

Alguns conceitos aplicados à fotometria e radiometria são imprescindíveis para uma melhor compreensão sobre o mapeamento da superfície de exposição, e podem ser encontrados no ANEXO C.

Fixadas as condições experimentais, foi delineada uma área útil de trabalho na câmara de fotoestabilidade, conforme mostra a Figura 4.5. Assim, a partir de linhas paralelas e transversais desenhadas na superfície de exposição foram determinados 30 pontos nos quais foram fixados os detectores do luxímetro e do radiômetro (Figura 4.6), acionando-se em seguida as lâmpadas. Dessa forma, foram medidas as intensidades das lâmpadas UV e BF ligadas em conjunto ou individualmente e registradas as intensidades detectadas aparelhos em cada situação.



**Figura 4.5 – Delineamento da área útil na superfície de exposição das amostras dentro da câmara de fotoestabilidade.**

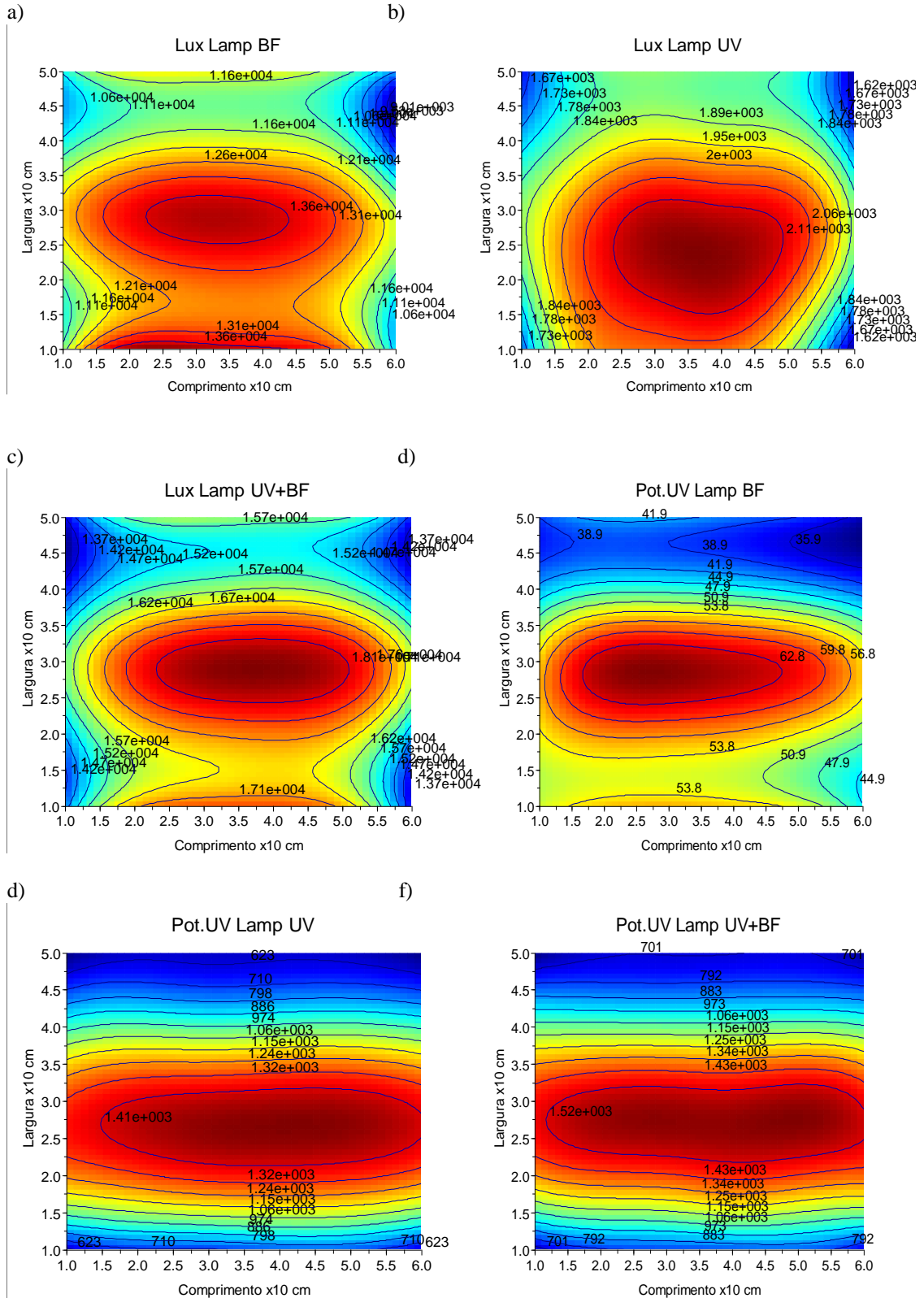


**Figura 4.6 – Ilustração da posição dos detectores do radiômetro e luxímetro nos pontos demarcados na câmara de fotoestabilidade.**

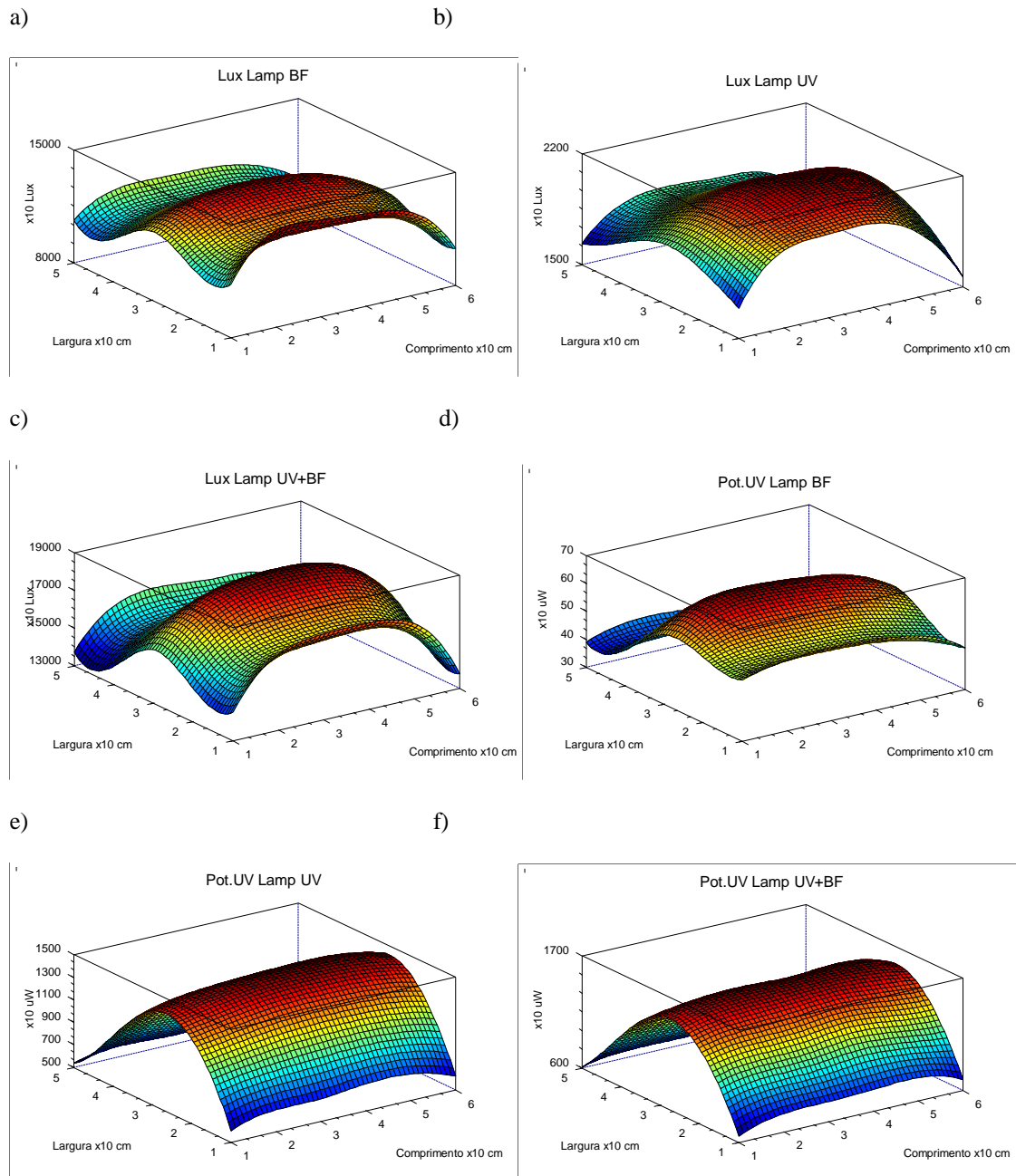
Utilizando-se o software *Scilab v4.1.2 for windows*, foram feitos os tratamentos estatísticos adequados e gerados os gráficos bi e tri-dimensionais evidenciando a superfície de exposição das amostras. Assim, foram gerados os gráficos da iluminância das lâmpadas: BF, UV e BF + UV; e da irradiância de cada fonte ligadas isoladas e em conjunto. Os mapas podem ser conferidos nas Figuras 4.7 – 4.8.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## CAPÍTULO IV



**Figura 4.7 – Mapas de intensidade bidimensionais da iluminância monitorada no interior da câmara de fotoestabilidade para as lâmpadas (a) branca fria; (b) UV; (c) UV+BF e da irradiância observada para (d) BF; (e) UV; e (f) UV+BF.**



**Figura 4.8 – Mapas de intensidade tridimensionais da iluminância monitorada no interior da câmara de fotoestabilidade para as lâmpadas (a) branca fria; (b) UV; (c) UV+BF e da irradiância observada para (d) BF; (e) UV; e (f) UV+BF.**



A câmara de fotoestabilidade desenvolvida utiliza uma lâmpada fluorescente com potência descrita pelo fabricante de 22 W de potência ultravioleta emitida, e duas lâmpadas BF de 5.200 lumens emitidos. Assim, foi calculada a irradiância e iluminância teórica para a luz ultravioleta e visível, respectivamente:

#### Irradiância UV na amostra

Potência = 22 W

Distância aproximada radial do centro da lâmpada UV para a amostra = 0,18 m

Largura da lâmpada (L) = 1,5 m

Área da Superfície da Lâmpada =  $2\pi rL = 0,18 \cdot \pi \cdot 1,5 \approx 1,7 \text{ m}^2$

Irradiância calculada na amostra =  $22 \text{ W} / 1,7 \text{ m}^2 \approx 12,9 \text{ W/m}^2$  ou  $1.290 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$

#### Iluminância na amostra

Lumens = 5.200

Distância aproximada radial do centro de uma lâmpada BF para a amostra = 0,18 m

Largura da lâmpada (L) = 1.5 m

$A = 2\pi rL \approx 1,7 \text{ m}^2$

Iluminância calculada na amostra =  $5.200 \text{ lumens} / 1,7 \text{ m}^2 \approx 3060 \text{ Lux/lâmpada}$

Apesar de serem utilizadas abordagens distintas para o cálculo da irradiância, os resultados se mostram bastante convergentes, tornando-os altamente confiáveis. Ainda assim, é necessário a determinação da irradiância por actinometria química como um resultado confirmativo.

Os resultados teóricos e os experimentais de medidas de iluminância apresentam boa correlação, possuindo a mesma ordem de grandeza. Diferenças são esperadas pois,

são utilizadas duas lâmpadas na câmara, portanto, o ponto de medida não é na superfície das lâmpadas e, além disso, as paredes da câmara são refletoras o que muda a distribuição da luz.

A intensidade da fonte de fótons é a maior variável e depende bastante da natureza da lâmpada (formato e tempo de uso). Estes fatores, com respeito às amostras, irão determinar a dose incidente que as amostras irão receber.

A partir dos resultados experimentais, foram calculados os tempos de exposição para cada fonte de emissão. De acordo com a ANVISA, a dose de luz UV mínima recomendada para testes de fotoestabilidade é de  $200 \text{ W h} / \text{m}^2$ , e de luz visível  $1.200.000 \text{ Lux h}$ . O cálculo da equivalência em tempo necessário para duas fontes de radiação com irradiâncias ou iluminâncias diferentes produzirem a mesma dose é feito através de uma simples “regra de três”:

$$R_1 \cdot t_1 = R_2 \cdot t_2 \rightarrow R_1 \cdot t_1 = \text{Dose}_1$$

Onde  $R_1$  é a irradiância ou iluminância pré-estabelecida, e  $t_1$  é o tempo conhecido;  $R_2$  é a irradiância ou iluminância máxima da câmara, e  $t_2$  é o tempo equivalente. Assim, para o cálculo do tempo mínimo de exposição, a partir da dose recomendada pela ANVISA, temos:

1) Para a emissão máxima da lâmpada UV:

$$\text{Dose ANVISA} = 20.000 \mu\text{W h.cm}^{-2}$$

$$\text{Irradiância UV da câmara} = 1.416 \mu\text{W.cm}^{-2}$$

$$20.000 \mu\text{W h.cm}^{-2} / 1.416 \mu\text{W.cm}^{-2} = 14\text{h } 7\text{min.}$$

2) Para a emissão máxima das lâmpadas BF:

Dose ANVISA = 1.200.000 Lux

Iluminância da lâmpada BF da câmara =  $12.290\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$

$1.200.000\text{ Lux h} / 14.472\text{ Lux} = 82\text{h } 55\text{min}$  (~ 4 dias).

### 4.3 Medidas da potência UV e da iluminância do berçário no Hospital das Clínicas da UFPE

Antes de se iniciarem as medidas de iluminância e irradiância, foi feito um reconhecimento do berçário e UTI neonatal, e determinada a localização das incubadoras. Verificou-se que dos 21 pontos de distribuição de oxigênio e ar medicinal existentes, e que no caso representam a capacidade total de leitos dos dois locais, sendo 6 na UTI neonatal e 15 no berçário, 16 estavam situados próximos às janelas. Estes foram denominados críticos, uma vez que há uma maior intensidade luminosa nesses locais (exemplificado na Figura 4.9).



**Figura 4.9 – Localização de uma incubadora próximo à janela na UTI neonatal do Hospital das Clínicas da UFPE.**

As janelas são revestidas por uma película a fim de minimizar a intensidade luminosa para dentro do berçário e UTI neonatal, porém percebeu-se também que as

películas não eram uniformes, já que foram detectadas falhas em algumas delas e verificado diferenças das intensidades entre elas.

A Tabela 4.2 indica a média das irradiâncias e iluminâncias dos 16 pontos escolhidos, medidas a cada duas horas por um período de 10h, e a dose nas diferentes situações (janela aberta e janela fechada).

**Tabela 4.2 – Valores médios das irradiâncias e das iluminâncias dos 16 pontos críticos do berçário e UTI neonatal do HC/UFPE.**

MÉDIA	HORÁRIO 08:00	HORÁRIO 10:00	HORÁRIO 12:00	HORÁRIO 14:00	HORÁRIO 16:00	HORÁRIO 18:00	DOSE
Janela Aberta (LUX)	6.558,7	6.188,6	5.050,5	3.432,0	1.323,7	248,6	22.802,2
Janela Fechada (LUX)	251,9	240,1	204,1	161,7	64,7	259,3	1.182,0
Janela Aberta (RAD)	105,5	94,1	88,2	66,8	17,7	0,03	372,5
Janela Fechada (RAD)	11,6	9,4	8,3	6,0	1,7	0,04	37,1

As medidas com as janelas abertas representam a situação mais crítica em que as bolsas contendo a NP podem estar sujeitas. Dez horas representam um tempo de medida que equivale a quase o tempo total em que estas infusão podem ser administradas, recomendadas entre 12 e 24h.

As misturas de nutrição parenteral são administradas em ambientes bem específicos, p.ex. enfermarias e UTIs de hospitais, ou na própria casa do paciente *home parenteral nutrition* (HPN), isso diversifica muito as condições de exposição. As medidas no hospital se fizeram necessárias uma vez que a literatura não trás referências de intensidades de potências similares às condições encontradas. Estas medidas servirão como referência para o cálculo do tempo de exposição equivalente na câmara de fotoestabilidade.

#### 4.4 Preparação e caracterização físico-química das microemulsões de vitamina A

A princípio, foram escolhidos os excipientes comumente empregados na preparação de emulsões de vitaminas. Para o presente trabalho, foi escolhido o polisorbato 80 (PS80) e estimada a concentração suficiente para dissolver a vitamina A. Verificou-se que outros excipientes também são adicionados às formulações viabilizadas comercialmente, porém estas na forma de pó liofilizado. Estes excipientes são o manitol e o polisorbato 20. Este último, muitas vezes, não é adicionado às formulações uma vez que tem a mesma finalidade do PS80 e concentração bem inferior. A função do polisorbato 20 é de dar mais estabilidade às emulsões formadas [ANSEL, 2000; ROWE, 2005].

A formulação da emulsão de vitamina A pode ser vista na Tabela 4.3. A seguinte ordem de adição foi seguida: em um béquer dissolveu-se o manitol sob aquecimento em um pouco de água, num outro béquer misturou-se a vitamina A e o PS80. Após diminuir um pouco mais a temperatura da solução de manitol, esta foi vertida pouco a pouco, e sob constante agitação, no béquer contendo a mistura PS80 e vitamina A. A preparação foi colocada em um balão volumétrico e completado o volume com água estéril para injetáveis. Após esta etapa, o balão foi recoberto em folha de alumínio a fim de protegê-lo da luz. Toda a preparação da emulsão foi conduzida num ambiente com pouca luz.

**Tabela 4.3 – Formulação da microemulsão de vitamina A utilizada neste estudo.**

Componente	Concentração %
<b>Manitol</b>	<b>7,5</b>
<b>Polisorbato 80</b>	<b>1,16</b>
<b>Vitamina A</b>	<b>0,24</b>
<b>Água estéril injetável q.s.p.</b>	<b>100</b>

Preparadas as emulsões, as quais foram colocadas como preparações estoque, na concentração de 2.400 µg/mL, as mesmas foram caracterizadas, em triplicata, através de

um analisador de tamanho de partículas e por espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis, realizando-se vários espectros de suas diluições. Os equipamentos utilizados encontram-se descritos na Tabela 3.2 do Capítulo 3.

Através da análise de tamanho de partículas observou-se uma distribuição bimodal com 70% das partículas com tamanho médio de 50  $\mu\text{m}$  e 20% com tamanho de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . Os 10% restante estão distribuídos entre esta faixa ou um pouco acima dela, pressupondo serem partículas dispersas oriundas de impurezas contidas nas matérias primas ou vidrarias.

Foram realizados espectros de absorção eletrônica de diluições a partir das preparações estoque de vitamina A, primeiramente uma preparação intermediária de concentração 120  $\mu\text{g/mL}$ , e diluições entre 1 – 12  $\mu\text{g/mL}$  a fim de verificar o perfil de absorção desta substância, comprimento de onda e intensidade máxima de absorção, e concentrações ideais para determinação da curva padrão. Um espectro representativo pode ser observado na Figura 4.11.

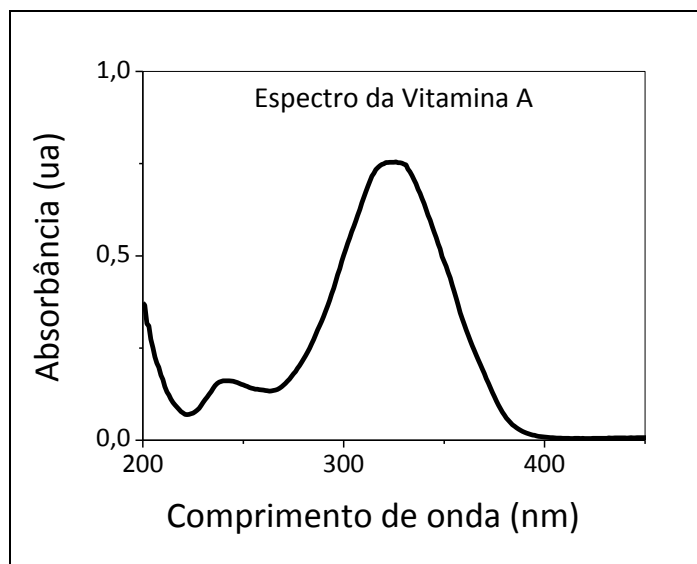


Figura 4.10 – Espectro de absorção eletrônica de microemulsão de vitamina A.

A escolha das concentrações nesta escala assemelha-se à concentração diária recomendada para administração nas misturas de NP, que pode chegar a, no máximo, 6

$\mu\text{g/mL}$ . Na preparação da curva-padrão foram verificados dois pontos acima e dois abaixo deste valor. O comprimento de onda no qual foi monitorada a intensidade máxima de absorção foi  $\lambda = 326 \text{ nm}$  [BALL, 1988]

#### 4.5 Determinação das concentrações da vitamina A através de espectroscopia de absorção eletrônica no UV e visível

Uma vez caracterizadas as microemulsões de vitamina A formadas e determinada a região de trabalho, o passo seguinte foi preparar a curva padrão desta vitamina, conforme ilustrado na Figura 4.12. As concentrações utilizadas variaram entre 1 – 12  $\mu\text{g/mL}$ . Os parâmetros que definem a função da reta de regressão ( $y = a + bx$ ) podem ser vistos na Tabela 4.4.

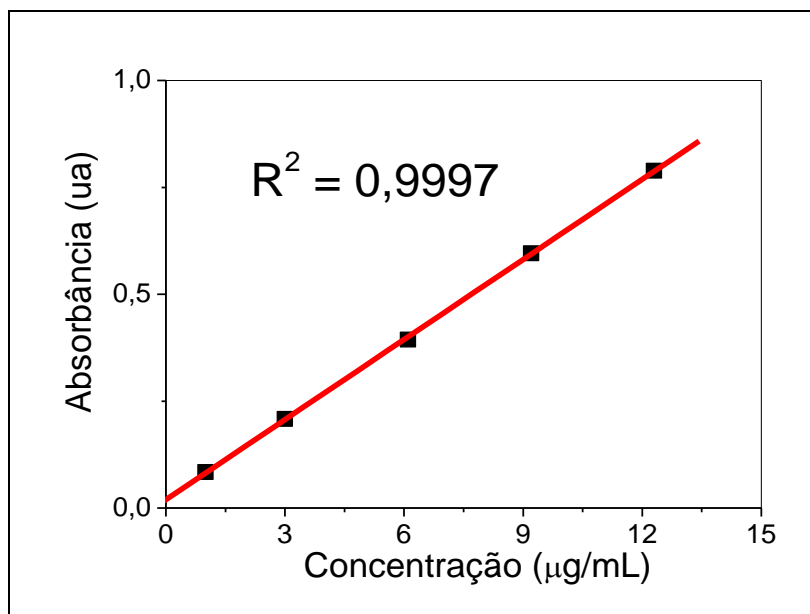


Figura 4.11 – Regressão linear da vitamina A microemulsionada.

**Tabela 4.4 – Parâmetros que definem a função da reta de regressão  $y = a + bx$ .**

PARÂMETRO	VALOR	ERRO
a	0,01685	0,00441
b	0,06263	0,00058

#### **4.6 Estudo da fotodegradação da vitamina A e ação antioxidante do polifosfato de sódio em misturas para nutrição parenteral**

Espectros isolados de cada componente básico da mistura de nutrição parenteral, dentro da faixa de concentração máxima recomendada, foram obtidos isoladamente e comparados com as regiões de absorção da vitamina A e verificou-se que os aminoácidos são potenciais interferentes nestas misturas uma vez que absorvem a luz ultravioleta na mesma região da vitamina A nas concentrações recomendadas. Por isso, foram preparadas misturas de nutrição parenteral sem aminoácidos.

As emulsões lipídicas, apesar de fazerem parte da composição básica das preparações de NP, foram excluídas das preparações, uma vez que a técnica de espectroscopia de absorção na região do UV e visível é dependente de um meio opticamente transparente, e a emulsão tornaria o meio opticamente opaco.

Preparou-se, a partir de uma formulação comumente utilizada pelos hospitais públicos para recém-nascidos, uma mistura de nutrição parenteral utilizando os componentes descritos na Tabela 3.2. Esta formulação foi dividida em dois grupos, o primeiro com o polifosfato em sua composição, substituindo o fosfato de potássio, e o outro grupo sem o polifosfato e utilizando o fosfato de potássio a fim de se investigar a ação antioxidante deste poliânion na formulação de NP contendo a vitamina A. As formulações com e sem o PoliP foram preparadas e colocadas em frascos-ampola



vedados com uma tampa de borracha e expostas na câmara de fotoestabilidade, como mostra a Figura 4.13.



**Figura 4.12 – Exposição das formulações de NP na câmara de fotoestabilidade.**

Com os dados obtidos das medidas de iluminância e irradiância no berçário e UTI neonatal do HC/UFPE, calculou-se o tempo de exposição equivalente à dose nos pontos críticos na situação de maior intensidade, ou seja, a dose quando as janelas estão abertas. Obteve-se para a fonte de radiação UV um tempo de exposição de 15 minutos, e para as lâmpadas BF, uma hora e trinta minutos de exposição. Assim, uma hora de exposição à radiação no berçário e UTI neonatal equivale a 1,5 minutos na luz UV e 15 minutos de exposição à luz visível na câmara de fotoestabilidade.

Após a exposição, tanto à radiação UV como visível, foram obtidos os espectros de cada preparação e medida a intensidade máxima em  $\lambda = 326$  nm, correspondente a absorção máxima da vitamina A. Na Figura 4.14 são mostrados os espectros de vitamina A microemulsionada e na formulação para nutrição parenteral.

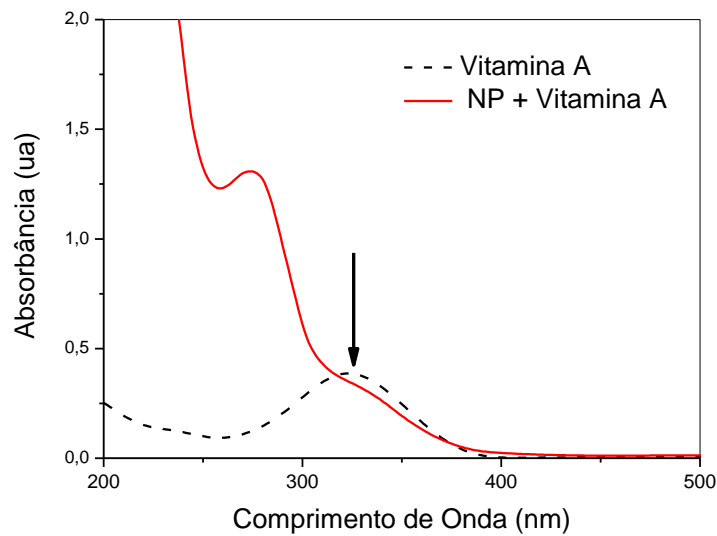


Figura 4.13 – Espectros de absorção da vitamina A (linha tracejada) e da mistura para NP contendo vitamina A (linha cheia). A seta evidencia o comprimento de onda (326 nm) monitorado durante o experimento de fotodegradação.

O perfil fotodegradativo da vitamina A sob a ação de ambas as lâmpadas está descrito na Figura 4.15.

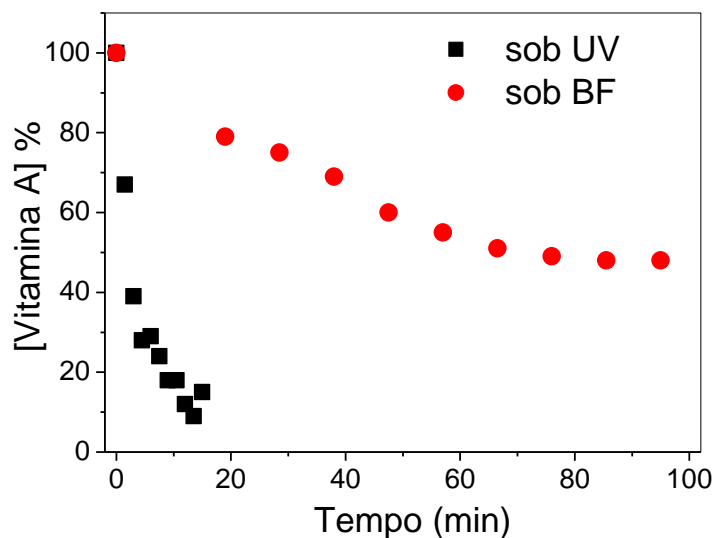


Figura 4.14 – Perfil de fotodegradação acelerada da Vitamina A sob ação das lâmpadas UV (■) e BF (●) sob um tempo equivalente a 10 h de exposição na sala de UTI neonatal do Hospital das Clínicas.

Através do perfil degradativo observa-se que, num mesmo tempo de equivalência de exposição da mistura contendo a vitamina A, a luz UV promove uma

maior extensão de degradação (Figura 4.15). Após 15 min de degradação na câmara a quantidade reminescente de vitamina A foi de 14%. Este valor está próximo aos valores observados na literatura para experimentos degradativos sob a ação da luz solar indireta [ALWOOD & MARTIN, 2000; CARLOTTI et al., 2002]. Já a ação da luz branca fria foi menos expressiva, mas ainda muito acima dos valores esperados e reportados na literatura. Após o tempo de exposição apenas 50% da concentração original foi observada na mistura. A região espectral da lâmpada BF (fornecida pelo fabricante) é de 400 a 700 nm, região onde a vitamina A não absorve (Figura 4.14). Isto mostra que outro fator está relacionado ao desaparecimento da vitamina A no sistema. Revendo os mapas de intensidade de irradiância para esta lâmpada descritos nas Figuras 4.7(d) e 4.8(d) observa-se que existe (na distância lida pelo radiômetro na câmara) uma quantidade diferente de zero na leitura da radiação UV para a lâmpada BF. Calculando a dose média de luz UV que foi produzida e submetida no sistema em estudo observa-se um valor de dose =  $36,5 \text{ W.h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Esta dose, embora pequena, aparenta contribuir como potencial fonte fotodegradativa. Observa-se na literatura que a luz branca fria sempre se apresenta como uma fonte de luz que não contribui para efeito de fotodegradação da vitamina A. Duas hipóteses podem ser formuladas observando-se que ainda assim ocorreu a degradação contínua da vitamina no meio. A primeira envolve efeitos de potencializadores de absorção na região do visível por efeitos não lineares de absorção de luz. Esta possibilidade resta ainda a ser confirmada através de experimentos utilizando óptica não linear, o que transcende o escopo deste trabalho. A outra hipótese é de que a fonte de luz branca também possa estar contribuindo com luz na região do UV. De fato, apesar do fabricante anunciar ausência de emissão luminosa na região do ultravioleta, observa-se leitura positiva nesta região. A proximidade da amostra da fonte de luz também é um parâmetro a ser considerado. Neste caso, uma

distância de 15 cm promove a degradação por parte da luz BF, mas como mostrado na Figura 4.3 a intensidade de luz diminui com o inverso do quadrado da distância, sugerindo que o percentual de degradação também varia com esse parâmetro. Neste caso, torna-se necessário também um estudo posterior para avaliar esta correlação.

Com relação ao efeito antioxidante do polifosfato algumas considerações podem ser feitas. A Figura 4.16 mostra a cinética de degradação da vitamina A em que o PoliP se faz presente ou ausente nas misturas de NP. A Figura 4.16(a) mostra o decaimento da concentração na exposição à luz visível durante 1h e 30 minutos, e a Figura 4.16(b) quando exposta à luz UV, durante 15 minutos.

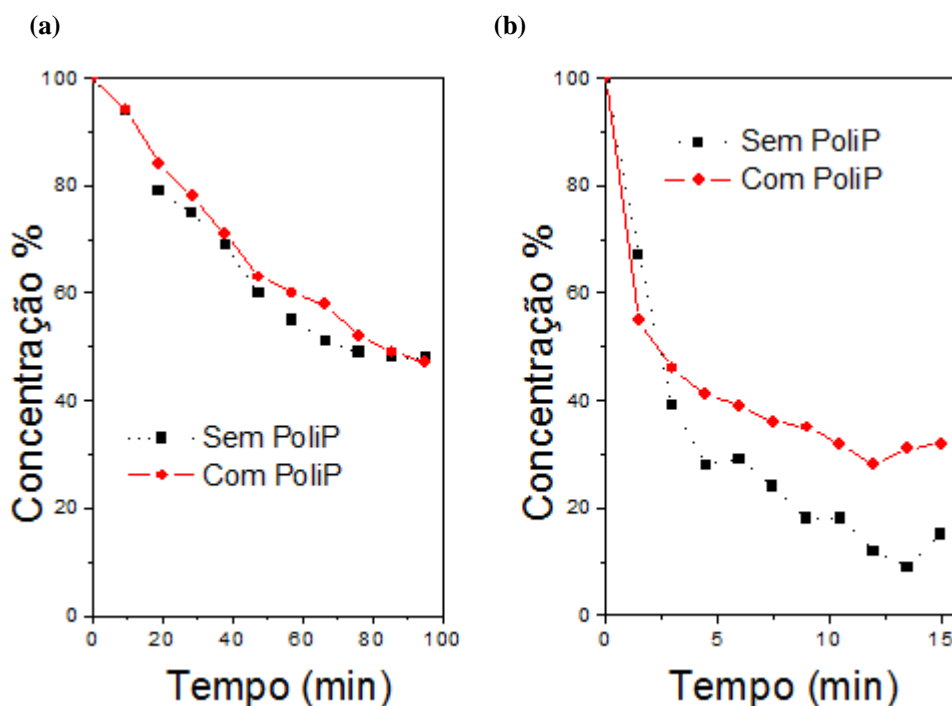


Figura 4.15 – Cinética de degradação da vitamina A em formulações com e sem PoliP (a) usando luz visível e (b) usando luz UV.

Através da análise dos gráficos, verifica-se que a vitamina A quando exposta a luz visível tem uma perda de aproximadamente 50%, tanto nas formulações em que o polifosfato se faz presente ou não, a diferença no perfil fotodegradativo é mínima. A análise deste perfil sugere que o polifosfato não atua como antioxidante sob ação direta

da luz branca. O sutil acréscimo de estabilidade pode-se dever à ação do polifosfato sob a atuação da luz UV residual apresentada pela lâmpada.

O perfil fotodegradativo da vitamina A nas formulações expostas à luz UV são diferentes. Aproximadamente, 68% da vitamina é degradada na presença do polifosfato de sódio, enquanto que 85% se degrada na ausência deste poliânion, uma diferença de 15%. Neste caso surge uma visível atuação do PoliP na interferência da ação fotoquímica da luz. Além disso, sugere-se uma possível relação concentração-dependente no perfil fotodegradativo da vitamina A com PoliP. Isto se deve ao fato de ambos perfis resultarem num declive reduzido em tempos prolongados de iluminação.

A ação antioxidante do polifosfato foi mencionada pela primeira vez na literatura por Watts [WATTS, 1950] que mencionou o efeito sinérgico do hexametáfosfato,  $[\text{NaPO}_3]_n$  com  $n = 5-15$ , em sistemas alimentícios água/óleo. Mais tarde, uma capacidade antioxidante foi mencionada por KIM (2004) exemplificando sua ação na diminuição da oxidação do DNA causada por radicais livres gerados pela radiação UV [KIM et al., 2004]. Dentre as diversas possíveis explicações para a ação do polifosfato pode-se sugerir a seguinte, que leva em consideração a capacidade quelante deste polianion. As gotas de óleo microemulsionadas contendo vitamina A apresentam polisorbato em sua superfície. Este agente surfactante neutro possui um grande número de hidroxilas em cadeias ramificadas, as quais penetram a interface aquosa. Esta cobertura rica em hidroxilas é razoavelmente polar e capaz de atrair os cátions presentes na formulação ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e oligoelementos). Uma vez adicionado o polifosfato no meio, este irá interagir naturalmente através de sua ação seqüestrante, com os cátions próximos à superfície das microgotículas, criando uma estrutura supramolecular ao redor da gota. É razoável pensar-se que a proximidade destes polieletrólitos na superfície das gotas pode atuar como antioxidante de duas formas: a

primeira delas é interferindo na absorção de luz UVB (região de absorção do polifosfato [PEREIRA, 2007]) e a segunda é criando uma camada negativa, repelindo a aproximação dos possíveis radicais peróxidos, que formados através da atuação da luz UV no meio, podem participar como agentes de ação oxidativa sobre a vitamina A. Estas hipóteses deverão ser esclarecidas na continuidade deste trabalho.

# CAPÍTULO V

---

## Conclusões e Perspectivas

## 5.1 Conclusões

1. Em relação à câmara de fotoestabilidade desenvolvida pelo Núcleo de Pesquisas em Nutrição parenteral/UFPE pode-se observar que:
  - ✓ Foi seguramente projetada a fim de oferecer pouco ou nenhum risco nem ao operador nem ao laboratório, uma vez que dispõe de mecanismos de desligamento caso haja uma eventual abertura da tampa enquanto as lâmpadas estiverem ligadas e na falta de energia o equipamento não é mais acionado, prevenindo, desta forma, curto-circuito ou incêndio;
  - ✓ Representou uma forma econômica para estudos de fotoestabilidade, com baixo custo de manutenção, uma vez que, todas as peças podem ser facilmente encontrados no mercado;
  - ✓ Atendeu de forma eficiente aos critérios estabelecidos na opção 2 do ICH, o que foi confirmado a partir do mapeamento da superfície de exposição.
2. Através da radiometria e fotometria foi possível obter uma estimativa da dose as quais as misturas de nutrição parenteral podem ser expostas nos locais de aplicação.
3. A Vitamina A (palmitato de retinila) foi microemulsionada, e caracterizada quanto a seu espectro de absorção no UV-vis, observando-se uma banda característica em  $\lambda = 326$  nm. O tamanho médio das gotas emulsionadas para os sistemas mostrou-se na faixa de 5 – 50  $\mu$ m;
4. Foram obtidos os parâmetros de ajuste do modelo de regressão em relação à aos espectros da vitamina A, confirmando assim a sua linearidade;
5. Os resultados obtidos com a exposição da vitamina A, mostram:



- ✓ Que após uma sessão de luz submetida às emulsões, equivalente à luz UV e BF, a vitamina A sofreu um decréscimo em sua concentração de 85% e 50% respectivamente;
- ✓ Que o uso do polifosfato de sódio com grau de polimerização de 9 diminuiu em 15% a fotodegradação da vitamina A induzida por UV, no entanto não apresentou efeito antioxidante no processo induzido pela luz visível.
- ✓ A eficiência da câmara para estudos de fotoestabilidade de medicamentos expostos à radiação UV e visível, tomando como modelo o perfil fotodegradativo da vitamina A;

### 5.2 Perspectivas

Os resultados obtidos relacionados à fotoestabilidade das misturas para NP contendo nutrientes fotossensíveis são muito importantes para o controle de qualidade destes sistemas, principalmente para garantir a ação terapêutica destes nutrientes e o uso seguro das formulações. Os resultados deste estudo deverão ser veiculados aos farmacêuticos responsáveis por esta área em hospitais da rede pública e privada para que possam garantir um melhor controle de qualidade do produto formulado.

Esta dissertação tem um caráter inovador no que apresenta o polifosfato de sódio (n = 9-12) como agente antioxidante em formulações para NP. Sugere-se que o polifosfato poderá ser utilizado como um novo produto que, ao mesmo tempo servirá como fonte de fósforo na nutrição parenteral e atuará como antioxidante. Espera-se com isto consolidar o campo da pesquisa na área e aproximar o setor científico ao setor de aplicação direta do resultado científico.

Novos experimentos serão realizados a fim de se obter mais informações com relação ao perfil fotodegradativo de outras vitaminas e aminoácidos e o efeito da luz sobre emulsões lipídicas, bem como identificar os derivados formados a partir da exposição à luz de cada um destes componentes.

Por fim, com relação à utilização da câmara de fotoestabilidade, este dispositivo permitirá a consolidação no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE de uma área importante do controle de qualidade de insumos farmacêuticos, adaptando as novas recomendações descritas na Resolução RE 01 [BRASIL, 2005].

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALWOOD, M.C., KEARNEY, M.C.J.; **Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures**; *Nutrition*, v. 14 (9): 697-706; 1998.
- ALWOOD, M.C., MARTIN, H.J.; **The photodegradation of vitamins A and E in parenteral nutrition mixtures during infusion**; *Clinical Nutrition*, v. 19 (5): 339-42; 2000.
- American Society of Health-Systems Pharmacists (ASHP). **Guidelines on Pharmacy-Prepared Ophthalmic Products; Drug Distribution and Control: Preparation and Handling–Guidelines**. disponível; em: [www.ashp.org](http://www.ashp.org), acessado em julho de 2008.
- ANSEL, H. C.; LOYD V. A. e POPOVICH, N. G. **Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- ANTUNES, M. S. **Estudo à microscopia eletrônica da estabilidade física de emulsões lipídicas em soluções nutritivas parenterais**. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 85, n. 3, p. 121-127, 2004.
- ARIZMENDI, A.M.; MONLEÓN, C.; GALLEGO, C. **Conceptos básicos de La nutrición enteral y parenteral. Otros abordajes terapéuticos de la malnutrición**. *Medicine*; v. 87, n. 8, p. 4700 – 4708, 2002.
- ASPEN; **Guideline for use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients**; *Journal of enteral and parenteral nutrition*, v. n.1, 2002.
- BALL, G.F.M.; **Fat Soluble Vitamins Assays in Food Analysis – A comprehensive review**. Elsevier Science Publishers New York, USA, 1988.

- BATHIA J., RIVERA A., MOSLEN M.T., RASSIN D., GOURLEY, W.; **Hepatic function during short-term total parenteral nutrition: effect of exposure of parenteral nutrients to light**; *Pediatrics* 78:321– [45], 1992
- BRASIL Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976. **Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências.** Brasília: Diário Oficial da União, 1976.
- BRASIL. Leis, decretos. Portaria 272 de 08/04/1998. **Dispõe sobre regulamento Técnico e os requisitos mínimos exigidos para terapia de nutrição parenteral.** *Diário Oficial da União*, Brasília, 23 Abr. 1998a. Seção I, p. 1-15.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n.º 01, de 29 de julho de 2005. **Autoriza, ad referendum, a publicação do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade.** Brasília: Diário Oficial da União, 2005.
- BRAWLEY, V.; BHATIA, J.; KARP, W.; **Effect of sodium metabisulfite on hydrogen peroxide production in light-exposed pediatric parenteral amino acid solutions.** *American Journal of Health-System Pharmacy.* v. 55(12), p.1288-1292, 1998.
- CALLIS, C. F.; VAN WAZER, J. R.; ARVAN, P. G. **The inorganic phosphates as polyelectrolytes.** *Chemical Reviews*, v. 54, n. 5, p. 777 – 796, 1954.
- CARLOTTI, M.E., ROSSATTO, V., GALLARATE, M.; **Vitamin A and Vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation.** *Int. J. Pharm.* 240, 85-94, 2002.

- CHESSEX, P., LAVOIE, J-C., BÉLANGER, S., SPALINGER, M.; **Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to *in vitro* generation of peroxides**; *Pediatrics*, 99: 6; 1997.
- CHESSEX, P.; LAVOIE, J-C.; ROULEAU, T.; BROCHU, P.; ST-LOUIS, P.; LÉVY, E.; ALVAREZ, F. **Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition**. *Pediatric Research*, v. 52, n. 6, p. 958-963, 2002.
- CHYTIL, F. **The dairy industry protects milk from photodegradation; why not protect total parenteral nutrition solutions also?**. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 63, p. 404 – 405, 1996.
- COLLARES, F.P., FINZER, J.R.D., **Revisão: A Transição Vítrea em Produtos Alimentícios**. *Braz. J. Food Technol*, v. 5, p. 117-130, 2002.
- DRISCOLL, D.F.; BAPTISTA, R.J.; BISTRAN, B.R. **Practical considerations regarding the use of total nutrient admixtures**. *American Journal of Hospital Pharmacy*, v. 43, p. 416-419, 1986.
- DROTT, P., MEURLING, S., MEURLING, L.; **Clinical adsorption and photodegradation of the fatsoluble vitamins A and E**. v. 10, n. 6, p. 348-351, 1991.
- DUPERTUIS Y. M., MORCHT A., FATHI M., SIERRO C., GENTON L., KYLE U. G, PICHARD C.; **Physical characteristics of total parenteral nutrition bags significantly affect the stability of vitamins C and B1: A controlled prospective study**. *Journal of parenteral and enteral nutrition*; v. 26, n°5, p. 310-316, 2002.

- EDWARDS M.A.; SILVA E. **Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* v. 63, p.126–131, 2001.
- FÜRST, P. **Old and new substrates in clinical nutrition.** *The Journal of Nutrition*, v. 128, n. 5, p. 789–796, 1998.
- GILLIS, J., JONES, G. PENCHARZ, P; **Delivery of vitamins A, D, and E in total parenteral nutrition solutions.** *J. Parent. Enteral Nutr.* 7, 11 – 14, 1983.
- GONÇALVES, L M; **Guia para fotoestabilidade: como se adequar às recomendações do ICH e da Anvisa.** Disponível em: <http://www.nteditorial.com.br>; acesso em 15 de Julho de 2008;
- HAAS, C., GENZEL-BOROVICZE'NY, O., KOLETZKO, B. **Losses of vitamin A and E in parenteral nutrition suitable for premature infants.** *Eur. J. Clin. Nutr.* v. 56, p. 906–912, 2002.
- HANNING, R. M.; ATKINSON, S. A.; WHYTE, R. K. **Efficacy of calcium glycerophosphate vs conventional mineral salts for total parenteral nutrition in low birth-weight infants: A randomized clinical trial.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 54, n. 5, p. 903-908, 1991.
- HERNANDO, V. *et al.* **Evidence for lipids - calcium ions interactions using fluorescent probing in paediatric nutrition admixtures.** *Talanta*, v. 60, n. 2, p. 543 – 554, 2003.
- HOURANT, P. **General properties of the alkaline phosphates: Major food and technical applications.** *Proceedings of IMPHOS, Phosphorus Research Bulletin, The Journal of Inorganic Phosphorous Chemistry.* v. 15, n.esp., p. 85 – 94, 2004.

- ICH (1996). **Guidance for Industry Q1B Photostability Testing of New Drug Substances and Products.**
- ICH. **Stability Testing: Photostability Testing of New Drugs substances and Products Q1B**, 2003d. Disponível em <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 01.10.2007.
- KIM H.Y., CHOI M., HWANG S., SEO I., PARK S.K., LEE H.C., SHIN E.K., PARK E.M.; **Pharmaceutical composition or health food antioxidizing activity comprising polyphosphate as an effective ingredient**; World Intellectual Property Organization - International Publication Number: WO 2004/110462 A1.
- KORNBERG, A.; RAO, N.N.; AULT-RICHÉ, D. **Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions.** Annu. Rev. Bioche, v. 68, p. 89 – 125, 1999.
- KRISTIAN M.; STEINDAL A.E.; POROJNICU A.C.; JUZENIENE A.; VOROBAY A.; JOHNSON A.; MOAN J. **Ultraviolet photodegradation of folic acid.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 80, p.47–55, 2005.
- KRÖGER M.; **Simple models for complex nonequilibrium fluids.** Physics Reports, v. 390, p. 453–551, 2003.
- KUALEV, I. S.; VAGABOV, V. M.; KULAKOVSKAY, T. V. **The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates.** John Wiley & Sons, New York, 2004.
- KUHN, H.J., BRASLAVSKY, S.E., SCHIMIDT, R.; **Chemical actinometry**; Pure Appl. Chem., v. 76, n. 12, p. 2105 – 2146, 2004.
- LABSPHERE; **Integrating Sphere Uniform Light Source Applications**; Disponível em <<http://www.labsphere.com>>. Acesso em: 01.08.2008.



- LANIGAN R.S.; **Final report on the safety assessment of Sodium Metaphosphate, Sodium Trimetaphosphate, and Sodium Hexametaphosphate.** International Journal of Toxicology, v.20 Suppl 3:75-89, 2001.
- LAVOIE J-C., BÉLANGER S., SPALINGER M., CHESSEX P.; **Admixture of a Multivitamin Preparation to Parenteral Nutrition: The Major Contributor to In Vitro Generation of Peroxides;** PEDIATRICS. v. 99, n°3, p. e6, 1997.
- LAVOIE J-C.; CHESSEX P. **Biologic effects of parenteral bisulfite on human vascular tissue.** Pediatric Research, v. 33, p. 347-51, 1983.
- LAVOIE J-C.; CHESSEX P.; ROULEAU T.; MIGNEAULT D.; COMTE B. **Light-induced by products of vitamin c in multivitamin solutions.** Clinical Chemistry, v. 50, n. 1, p. 135–140, 2004.
- LEHNINGER A.L., NELSON D.L., COX M.M.; **Lehninger principles of biochemistry.** New York - NY, 1993.
- LEITE, E.G; **Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos;** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2005.
- LOURENÇO, R.; CAMILO, M. E. **Parenteral Nutrition.** *Business Briefing: Long – Term Healthcare*, Advisory Panels, p. 2-5, 2004.
- MANNING, R.J., AND WASHINGTON, C.; **Chemical stability of total parenteral nutrition mixtures.** Int.J. Pharm. 81, 1-20, 1992.

- MIZUNO, R.; LUCEY, J. A. **Effects of emulsifying salts on the turbidity and calciumphosphate – protein interactions in casein micelles.** *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 3070 – 3078, 2005.
- MOORE, J.W.; **Físico-Química**; tradução da 4ª Ed. Americana, v. 1, São Paulo : Editora Edgard Blücher LTDA, 1976.
- PAIXÃO, J.A., STAMFORD, T.L.M.; **Vitaminas Lipossolúveis Em Alimentos – Uma Abordagem Analítica.** *Química Nova*, Vol. 27, Nº. 1, 96-105, 2004.
- PEREIRA, J.C.B.; **Estudo Físico-Químico do Polifosfato de Sódio Visando sua Aplicação em Formulações para Nutrição Parenteral.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 2007.
- PICAUD J. C., STEGHENS J. P., ( AUXENFANS C., BARBIEUX A., LABORIE S., CLARIS O.; **Lipid peroxidation assessment by malondialdehyde measurement in parenteral nutrition solutions for newborn infants: a pilot study.** v. 93, nº2, p. 241-245, 2004.
- PIECHOCK, J.T., THOMA, K.; **Pharmaceutical Photostability and Stabilization Technology**, Ed .Informa Healthcare USA, Inc., 2007
- PIRONI L., RUGGERI E., ZOLEZZI C., SAVARINO L., INCASA E., BELLUZZI A., MUNARINI A., TOLOMELLI S.P.M., PIZZOFERRATO A., MIGLIOLI M.; **Lipid peroxidation and antioxidant status in adults receiving lipid-based home parenteral nutrition;** *Am J Clin Nutr* ; v. 68, p. 888–93, 1998.
- RIGGLE, M.A., BRANDT, R.B.; **Decrease of available vitamin A in parenteral nutrition solutions.** *J. Parenter. Enteral Nutr.* 10, 388 – 392, 1986.

- ROLLINS C.J. **Peripheral parenteral nutrition**. Newsline, v. 3, n. 6, p. 1-16, 2000.
- ROWE R.C., SHESKEY P.J., OWEN S.C.; **Handbook of Pharmaceuticals Excipients**. Fifth Edition, Ed. Pharmaceutical Press, Nov. 2005.
- SALJOUGHIAN M.; **Pharmacy and parenteral nutrition**. U.S. Pharmacist, v. 28, n. 01, 2003.
- SANTELL, J.P., KAMALICH, R.F.; **National survey of quality assurance activities for pharmacy-prepared sterile products in hospitals and home infusion facilities--1995**. American Journal of Health-System Pharmacy. 53(21):2591-2605. 1996.
- SCHEINER, J.M.; ARAUJO, M.M.; DERITTER, E. **Thiamine destruction by sodium bisulphite in infusion solutions**. American Journal of Hospital Pharmacy, n. 38, p. 1911-1913, 1981.
- SEVERINO, P., ZANCHETTA B., FRANCO L. M., PAGANELLI M.O., TAMASCIA P., CHAUD V.; **Absorção Intestinal e Estabilidade Físico-Química em Preparações Extemporâneas de Fluconazol**; *Lat. Am. J. Pharm.* v. 26, n. 5, p. 744-7, 2007.
- SHENAI, J.P., KENNEDY, K.A., CHYTIL, F., STAHLMAN, M.T.; **Clinical trial of vitamin A supplementation in infants susceptible to bronchopulmonary dysplasia**. J. Pediatr. 111, 269 – 277, 1987.
- SHULMAN R.J. **New developments in total parenteral nutrition for children**; Current Gastroenterology Reports v. 2, p. 253-258, 2000.
- SILVA, E., GONZÁLES, T., EDWARDS, A.M., ZULOAGA, F.; **Visible light induced lipoperoxidation of a parenteral nutrition fat emulsion sensitized by flavins**; Nutritional Biochemistry v. 9, p. 149 – 154, 1998.

- SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.
- SOUZA A.C.S.; FERREIRA C.V.; JUCÁ M.B.; AOYAMA H.; CAVAGIS A.D.M.; Peppelenbosch M.P. **Riboflavina: uma vitamina multifuncional**. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.
- STEINDAL A.E.; VOROBAY P.; KRISTIAN M.; VOROBAY A.; MOAN J. **Influence of human serum albumin on photodegradation of folic acid in solution**. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 82, p. 817–822, 2006.
- **Techguide: Integrating sphere uniform light source applications**; <http://www.labsphere.com>; acesso em 03 de Junho de 2008;
- TEE, E.S.; **Carotenoids and retinoids in human nutrition**. *Crit Rev Food Sci Nutr* v. 3, p.103-163, 1992.
- THOMAS, D.G., JAMES S.L., FUDGE, A., ODGERS, C., TEUBNER, J. SIMMER, K.; **Delivery of vitamin A from parenteral nutrition solutions in neonates**. *J. Paediatr. Child. Health* 27, 180 – 183, 1991.
- TONNESEN, H. H. **Photostability of Drugs and Drug Formulations**. 2ª Ed. CRC Press. p. 134-135, 2004.
- ÜNAL, S. B.; ERDOGDU, F.; EKIZ, H. I. **Effect of temperature on phosphate diffusion in meats**. *Journal of Food Engineering*, v. 76, n. 2, p. 119 – 127, 2006.
- VAN WAZER, J. R.; CALLIS, C.F. **Metal complexing by phosphates**. *Chemical Reviews*, v. 58, n. 6, p. 1011-1046, 1958.
- VAN WAZER, J. R.; CAMPANELLA, D. A. **Structure and properties of the condensed phosphates. IV. Complex ion formation in polyphosphate**

- solutions.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 72, n. 2. p. 655 – 663, 1950.
- **WAITZBERG, D. L. Nutrição oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica.** 3 ed. v. 1. São Paulo: Atheneu, 2002.
  - **WATTS, B. M.; Polyphosphates as Synergistic Antioxidants.** *The J. Am. Oil Chem. Soc.* 48-51, 1950.
  - **WHITE, D. J.; GERLACH, R. W. Anticalculus effects of a novel, dual-phase polypyrophosphate dentifrice: Chemical basis, mechanism, and clinical response.** *The Journal of Contemporary Dental Practice*, v. 1, n. 4, 2000.
  - **WHO. International Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms.** Annex 5, WHO Technical Report Series. 863, 1996.
  - **YOSHIOKA, S., Quinine Actinometry as a Method for Calibrating Ultraviolet Radiation Intensity in Light- stability Testing of Pharmaceuticals,** *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 20, n.13, p. 2049-2062, 1994.

# **ANEXOS**

**ANEXO A – Tabelas de composições de insumos farmacêuticos utilizados neste trabalho.**

**A1:** Tabela de composição da solução de aminoácidos pediátricos 10%. Fórmula similar ao Aminoped® 10%.

<b>AMINOÁCIDO</b>	<b>QUANTIDADE</b>
L-Isoleucina	6,40 g
L-Leucina	10,75 g
L-Lisina	7,09 g
L-Metionina	4,62 g
L-Cisteína	0,38 g
L-Fenilalanina	4,57 g
L-Treonina	5,15 g
L-Triptofano	1,83 g
L-Valina	7,09 g
L-Arginina	6,40 g
L-Histidina	4,14 g
Ácido aminoacético	4,14 g
L-Alanina	7,16 g
L-Serina	9,03 g
L-Prolina	16,19 g
L-Tirosina	5,49 g
L-Ácido málico	4,83 g
<b>Teor total de nitrogênio</b>	<b>14,43 g</b>
<b>Volume total</b>	<b>1000 mL</b>
<b>Osmolaridade teórica</b>	<b>848 mOsm/L</b>
<b>pH</b>	<b>5,7 – 6,3</b>

**A2:** Tabela contendo as vitaminas e seus respectivos valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR).

<b>VITAMINA</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>CRIANÇAS &lt; 11 ANOS</b>	<b>ADULTOS</b>
<b>A</b>	UI	2.300	3.300
<b>Tiamina (B1)</b>	mg	1,2	3
<b>Riboflavina (B2)</b>	mg	1,4	3,6
<b>Nicotinamida (B3)</b>	mg	17	40
<b>Ácido pantotênico (B5)</b>	mg	5	15
<b>Piridoxina (B6)</b>	mg	1	4
<b>Biotina (B7)</b>	mg	20	60
<b>Ácido fólico (B9)</b>	mg	140	400
<b>Cianocobalamina (B12)</b>	mg	1	5
<b>Ácido ascórbico (C)</b>	mg	80	100
<b>D</b>	mg	400	200
<b>E</b>	mg	7,0	10

**ANEXO B:** Especificações técnicas da câmara de fotoestabilidade desenvolvida pelo Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral/UFPE.

<b>ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS</b>	
LÂMPADA TIPO UVA	FLUORESCENTE, UV PRÓXIMO (LUZ NEGRA)
LÂMPADA TIPO VISÍVEL	FLUORESCENTE, BRANCA FRIA (ISO 10977)
IRRADIÂNCIA MÁXIMA DA LUZ UV	1.416 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$
ILUMINÂNCIA MÁXIMA DA LUZ VISÍVEL	14.472 Lux
TEMPO REQUERIDO PARA ALCANÇAR ÀS RECOMENDAÇÕES ICH DE 200 W.h/M <sup>2</sup>	14h 07min 05seg
TEMPO REQUERIDO PARA ALCANÇAR ÀS RECOMENDAÇÕES ICH DE 1.200.000 LUX.h	82h 55min 7seg
TEMPERATURA MÁXIMA ALCANÇADA	28°C
ESCALA DE UMIDADE	DEPENDENTE DA UMIDADE AMBIENTE
TAMANHO DA SUPERFÍCIE DE EXPOSIÇÃO	1,5m
ÁREA ÚTIL TOTAL DA SUPERFÍCIE DE EXPOSIÇÃO	42,3X124,4cm (DISTÂNCIA X COMPRIMENTO)
DIMENSÃO INTERNA	15X52,3X156,4 cm (ALTURA X DISTÂNCIA X COMPRIMENTO)
DIMENSÃO EXTERNA	63,5X158,8X159,4 cm (ALTURA X DISTÂNCIA X COMPRIMENTO)
ESPECIFICAÇÕES ELÉTRICAS	196 Watts; 220 Volts; 0,89 Amper

**ANEXO C:** Definições importantes em fotometria e radiometria.

**Fluxo radiante e fluxo luminoso**

Este termo refere-se à emissão radiante total de uma fonte de luz expressa em watts (radiométrico) e à emissão luminosa total em lumens (fotométrico), estas as mais básicas unidades de fluxo óptico. A taxa com que o fluxo flui é chamada de energia radiante ou energia luminosa, expressa em watt.segundo ou lúmen.segundo, respectivamente.

**Intensidade radiante e luminosa**

O fluxo emitido de uma fonte pontual por unidade de ângulo sólido (sterradiano), numa dada direção. Para a intensidade radiante as unidades de medida utilizadas são watt/sterradiano ( $\text{Wsr}^{-1}$ ), ou lumens por sterradiano ( $1\text{m sr}^{-1} = \text{candela}$ ).



## Irradiância e iluminância

Irradiância ou iluminância refere-se à potência por unidade de área para ambas as intensidades, radiante ou luminosa. Este tipo de medida é dependente da distância. No sistema internacional (SI) as unidades destas medidas são expressas em watt por metro quadrado, para irradiância, e lúmen por metro quadrado para iluminância, ou Lux.

## Radiância e luminância

Refere-se à intensidade radiante ou luminosa de uma fonte projetada em uma superfície. A intensidade é dividida pela área de uma fonte de projeção na superfície. As unidades de medida no SI são watt por steradiano por metro quadrado ( $\text{W sr}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) e candela por metro quadrado ( $\text{cd m}^{-2} = \text{lm sr}^{-1} \text{m}^{-2}$ ).

## Dose

Entende-se por dose como a energia oriunda de uma fonte de radiação que é depositada e absorvida por um determinado objeto. Porém, em testes de fotoestabilidade é comum utilizar a palavra dose, na realidade, para denominar uma densidade de energia, num dado intervalo de tempo, incidida sob um corpo, ou seja, energia multiplicada pelo tempo sobre área, já que tanto a luz visível e a ultravioleta praticamente não têm capacidade de penetração nos corpos (Figura A1).

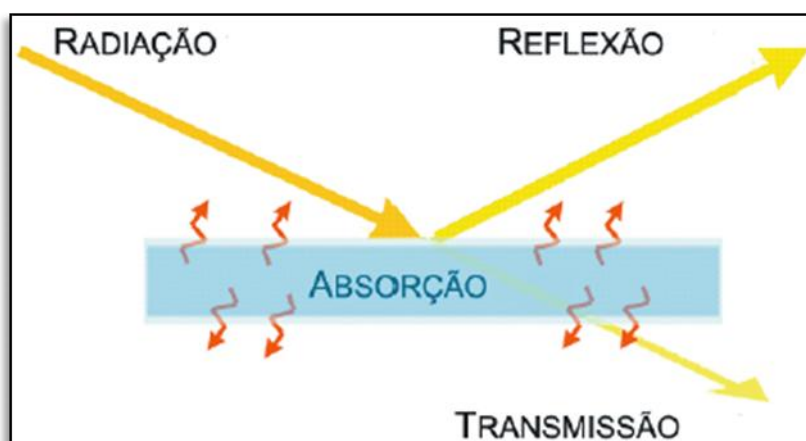


Figura A1 – Interação da luz com a matéria. A luz incidente é a soma de três componentes: a luz refletida, absorvida e transmitida.

**ANEXO D:** Artigo científico submetido ao *International Journal of Pharmaceutics* (Qualis A, internacional).

**Photostability study of parenteral nutrition mixtures containing vitamin A and the antioxidant action of polyphosphate**

Clayton Anderson Azevedo Filho<sup>1</sup>, Daniel de Filgueiras Gomes<sup>2</sup>, Rayana Muniz Falcão Batista<sup>1</sup>, Beate Saegesser Santos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Parenteral Nutrition Laboratory, Dept. Ciências Farmacêuticas, CCS, 50740-120, UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup>Mestrado em Ciências da Computação, CIN, 50740-540, UFPE, Recife, PE, Brazil.

\*Corresponding author: Beate Saegesser Santos, Depto. Ciências Farmacêuticas, UFPE R. Prof. Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária, 50740-120, Recife, PE, Brazil

Email: [beate\\_santos@yahoo.com.br](mailto:beate_santos@yahoo.com.br)

**Abstract**

We report here a systematic investigation of the photodegradation of retinyl palmitate (vitamin A) in PN neonatal formulations in an accelerated study using a photostability chamber. We also evaluate the antioxidant action of sodium polyphosphate within the PN formulations containing vitamin A. The results show that by performing a model study using an UV lamp the relative amount of vitamin A remaining in the after simulating a 10 h incidence of daylight was 14%. After simulating a 10 h period of cool white light, the vitamin A in the same PN composition suffered a 50% degradation. The

addition of a fixed amount of sodium polyphosphate showed a decrease in the photodegradation of vitamin A under UV light exposition, but did not show any influence under the cool white light illumination. These findings are discussed in terms of a possible synergistic antioxidant process in the microemulsions.

Keywords: photostability, vitamin A, parenteral, polyphosphate, antioxidant

## **1. Introduction**

Parenteral Nutrition (PN) admixtures are one of the most complex pharmaceutical formulations prepared by the pharmacist on a daily basis. Its intravenous delivery to the central circulation requires continuous monitoring concerning its sterility, compatibility and physico-chemical stability. The PN formulation represents a complex mixture of aqueous solutions of amino acids, dextrose, electrolytes, vitamins and trace elements. Due to the high concentration of the ingredients, serious and sometimes fatal injuries can occur to patients if there are errors in compounding and delivering this type of intravenous therapy. Preterm neonates are a higher risk class that requires a careful care during IV infusion. Their particular need to supply nutritive elements which are necessary to achieve an adequate maturing of their organs and systems is evident. Thus an adequate supply of vitamins is of great relevance, since they have low body stores at birth (about 50% of adult levels), high growing rate and development and a poor antioxidant defense system [Brandt *et al.*, 1978; Dju *et al.*, 1952; Haas *et al.*, 2002]. For example, vitamin A plays an important role in the growth and differentiation of cells and maintains the integrity of the respiratory epithelium. Also, it is involved in the formation of photosensitive pigment in the retina and in the development of the reproductive function and immunocompetence [Leaf *et al.*, 2004].

Vitamin E is important as an antioxidant in cell membranes, preventing peroxidation of polyunsaturated fatty acids. Several authors reported on the importance of the administration of vitamins A and E to very premature infants, showing that this procedure has been associated with lower incidence and less severity of bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity and intracranial hemorrhage [Johnson *et al.*, 1989, Johnson *et al.* 1995; Papagaroufalidis *et al.*, 1991; Shenai *et al.*, 1987; Speer *et al.*, 1984]. Vitamin D in its active form, 1,25-dihydroxyvitamin D promotes bone mineralization by increasing absorption of calcium and phosphorus from the intestine [Leaf *et al.* 2004]. During the use of PN bags in neonatal nurseries the small volumes of infusates are administered continuously at low flow rates, which end up resulting in a high exposure time of the formulation to light and to the surface of the tubing material. Although all the vitamins are prone to degrade under light exposure, retinol (vitamin A),  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and riboflavin (vitamin B<sub>12</sub>) are the most light-sensitive to photolysis [Alwood *et al.*, 1998; Edwards *et al.* 2001; Drott *et al.* 1991]. Up to date there are several reports showing that photo-induced degradation occur, but only recently more systematic studies were reported by different research groups [Alwood *et al.* 1982; Gillis *et al.* 1983; Riggle *et al.* 1986; Shenai *et al.* 1981; Thomas *et al.* 1991; Manning and Washington, 1992; Alwood *et al.* 1986; Alwood *et al.* 2000; Carlotti *et al.* 2002; Haas *et al.* 2002]. Alwood and Martin in PN recorded the vitamin A losses during simulated infusion of PN admixtures exposing the bags to daylight and the light dose was taken as an average value of 2,000 – 4,000 lux [Alwood *et al.* 2000]. Haas and collaborators also simulated the PN infusions containing vitamin A at low rates during a 24 h period of time. The illumination at the site of the infusion pump and the tubing material was 1,000 – 1,600 Lux during a sunny day in summer and 200 – 600 Lux at night under the artificial lighting conditions of the intensive care unit

[Haas *et al.*, 2002]. They also monitored the degradation during blue phototherapy (lamp spectral region: 410 and 450 – 460 nm, light dose: 9,000 – 11,000 Lux). Carlotti and collaborators performed a more systematic study on the photodegradation of vitamin A in different media using light controlled procedures but not related to parenteral infusions [Carlotti *et al.*, 2002]. All these studies show that the photodegradation of the vitamins in PN formulations are influenced by several different factors, such as the intensity of daylight, the proximity of the bag to the light source and the use of light protection devices. If the light source is an indoor cool white fluorescent lamp the photodegradation rate is described as insignificant, but still occurs, especially for vitamin A. All these different ambient conditions make the collection of reproducible results a hard task reinforcing the need for more systematic studies that may be applied in a more general sense.

The purpose of this report is dual. First of all, we describe a controlled photodegradation experiment, performed for a neonatal PN formulation containing vitamins A inside a photostability chamber, which was used to simulate the real ambient light dose that would be used upon the PN bag in a neonatal nursery facility.

The second goal of the present study is to investigate the antioxidant capacity of sodium polyphosphate -  $[\text{NaPO}_3]_n$  - (PolyP) in vitamin A containing PN formulations. This inorganic polyanion (Figure 1) is used in a great variety of applications ranging from paint and sequestering agents in environmental sciences to the use as a food preservative. Inorganic polyphosphates which may be found in all living systems (bacteria, fungi, protozoa, plants, and mammals) are responsible for a varied number of biological functions (Kornberg *et al.*, 1999). In microorganisms, PolyP acts as a reservoir of energy and phosphate anions, as a chelator of metals (e.g.,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ ), as a buffer against alkali, and, in physiologic adjustments to growth, development,

stress, and deprivation (Kulaev and Kulakovskaya, 2000). Physico-chemical studies prove that hydrolysis of the P–O–P bond in linear PolyP liberates an equivalent of energy of ca. 10 kcal/mol (Kulaev *et al.*, 2004), i.e. the same amount of energy as is liberated in the hydrolysis of the terminal phosphoric anhydride bonds in the adenosine 5'-triphosphate (ATP) molecule.

### **Insert Figure 1**

The application of PolyP in food as antioxidants and masking agents further supports its safe use. Obeying the indicated concentration limits, the reports of the United States Food and Drug Administration (FDA), World Health Organization (WHO) and European Union (UE) consider that the use of PolyP in foods and pharmaceutical products does not offer significant risks to human health [Lanigan, 2001; Weiner *et al.*, 2001] Recently Kim reported the pharmaceutical antioxidant activity of polyphosphates with chain lengths of 25-80 [Kim *et al.*, 2004]. In the report it was mentioned that UV radiation induced damage in bacterial DNA was greatly reduced when using polyphosphate in the culture media. We have recently applied sodium polyphosphate as a phosphorus source in 2-1 PN formulations and in the present study we used polyphosphate chains with  $n = 9$  combined with 2-1 vitamin A and D containing PN formulations in the investigation of its antioxidation capacity in controlled experiments using a photostability chamber.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Materials**

The following reagents were used without further purification: Retinyl palmitate (1,800,000 USP units/g – Vitamin A); Cholecalciferol (Sigma-Aldrich, Vitamin D); KCl (10% w/v) and NaCl (20% w/v) (Isofarma); Glucose (50% w/v, Samtec); Oligoelements solution Ped-Element® ( $Zn^{2+}$  0.125 g/mL;  $Cu^{2+}$   $2.5 \times 10^{-2}$  g/mL;  $Mn^{2+}$

$2.5 \times 10^{-3}$  g/mL;  $\text{Cr}^{3+}$   $2. \times 10^{-4}$  g/mL, Darrow); Calcium gluconate (10 %, Ariston);  $\text{MgSO}_4$  (1 mEq/mL, Darrow);  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 mEq/mL) (Darrow); Sodium Polyphosphate 96% Aldrich; Polysorbate 80 (P.S. VETEC); Mannitol (P.A. CRQ); Sterile water (ABL); Chinin hydrochlorid dihydrat (90%, Aldrich). The neonatal PN formulation used in this study was prepared based on a standardized composition used in our neonatal care unit for a premature newborn weighing 1Kg. Due to the interference of the amino acid solution and the lipid emulsion on the electronic absorption spectra of vitamin A in the mixtures these components were not added and were substituted by the same volume in water. The final formulations had the following composition: glucose 26.0 mL; KCl 0.8 mL; NaCl 0.6 mL; Calcium gluconate 4.0 mL;  $\text{MgSO}_4$  0.3 mL;  $\text{KH}(\text{PO}_4)_2$  1.0 mL or sodium polyphosphate (20 mM) 6.0 mL; Vitamin A (96  $\mu$ g/mL) emulsion, 5.12 mL; oligoelements 0.4 mL and pure water q.s.p. 100 mL. Vitamins A and D show a very low solubility in water so that they were prepared in the presence of polysorbate 80 (1.16% w/v) and mannitol (7.5% w/m) as surfactants [ref]. This mixture results in a micro emulsion system which was characterized by light scattering measurements (Particle Size Analyzer Microtec S3500, using Microtec software Flex 10.4.3). The concentration range used was 1-12.3  $\mu$ g/mL for vitamin A. The mixtures were kept at pH 6.8 (regulated with NaOH(aq) when needed). All the solutions were exposed to light inside the photostability chamber in closed borosilicate glass vials (absorption threshold < 300 nm) using aliquots of 10 mL. We choose to proceed with the photodegradaton monitoring in the glass vials instead of the PN bags due to the fact that some vitamin A losses have been described to occur due to interaction of the vitamin with the the bag polymeric material by adsorption [Henton *et al.* 1990; Drott *et al.* 1991].

## 2.2 Methods

The photodegradation was induced in a validated non-commercial photostability chamber using well controlled light exposure conditions. Chinin hydrochlorid dihydrat in 2% (w/v) solution was used as the internal chemical actinometer in order to determine the light dose inside the chamber [Yoshioka *et al.*, 1994]. This chamber applied the criteria established by the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) and the Food and Drugs Administration (FDA) [ICH, 1996; Piechock and Thoma, 2007], also adopted by the Brazilian National Sanitary Agency where the present study was performed. The lamps where used so as to cover the visible and near ultraviolet (UV) spectral range by using a cool light fluorescent lamp (CWL) (400 – 700 nm, with a light output similar to that specified in ISO 10977) and an UV lamp (320 – 400 nm, with a maximum energy emission between 350 and 370 nm [ICH, 1996]). Following the requirements of the ICH and the FDA the UV dose recommended for photostability tests is 200 Wh/m<sup>2</sup> or 20,000 μWh/cm<sup>2</sup>, where dose in the case of visible and UV light sources, means the energy density per area unit. The photostability chamber applied in the present study utilizes a CLEO Performance 80WR (Philips) fluorescent lamp resulting 22 W of UV power. Taking into account the total dimensions of the lamp, its surface is equivalent to 1,791 cm<sup>2</sup>, so the calculated density is 22 W / 1791 cm<sup>2</sup> which results approximately 12,290 mW/cm<sup>2</sup> of power density. In order to estimate the time equivalence for this radiation source to produce the FDA required dose it is necessary to relate both rates as follows: FDA Recommended Dose / Emitted lamp power = 20,000 μWh/cm<sup>2</sup> / 12,290 μW/cm<sup>2</sup> = 1,62 h or 1 h 37 min. Applying the same relations to the cool white light source L58W/840 Lumilux (OSRAM) we calculate a time equivalence of 82 h 55 min. All these calculations are in agreement with the photodegradation tests



applied by Carlotti et al for vitamin A in ethanolic solutions [Carlotti *et al.* 2002]. In the present study we have applied a reduced stability plan model which is preferably used for very light sensitive pharmaceutical components [Tonnesen, 2004]. The exposure time of the samples inside the photostability chamber used in the present study was determined by deriving the amount of daylight and of commercial halogen lamp light (i.e. the total incident dose) that was exposed to PN formulations in a neonatal unit of a local public hospital. The light dose was measured at different distances from the light sources (daylight open window and indoor halogen lamps) using a radiometer (CESCON MRU-201, spectral sensitivity: 290 – 390 nm) and a Digital Lux Meter (Minipa MLM-1011, with spectral sensitivity: 400 - 700 nm). The samples were kept in a distance of 17 cm from the light source. The photodegradation process of the vitamins was monitored by the decrease of their concentration using electronic absorption spectroscopy (DU 7500 Beckman Spectrophotometer). Standard curves were obtained for solutions of vitamin A in the concentration range covering their required daily amount. The absorption maximum for the analysis of vitamin A was 326 nm. All the measurements were performed in triplicate and the average data were taken as the final result. In order to determine the polyphosphate antioxidant action the formulations were photodegraded with and without an amount of sodium polyphosphate determined elsewhere (data not shown) so that the final formulation presents itself stable against phase separation. The polymerization degree of the polyphosphate chain ( $n$ ) was determined by using the relation described by Greenfield and Clift (Greenfield and Clift, 1974) applied to the  $^{31}\text{P}$  NMR spectra obtained with a Varian spectrometer (300 MHz, Field = 7 T).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Photodegradation of vitamin A (Retinyl palmitate)

Figure 2 shows a representative spectral band profile of aqueous solutions containing vitamin A and its aqueous mixture with all the components of the PN formulation including vitamin D. The absorption spectra of vitamin A employing o/w microemulsions show peak maxima at 324 nm which agree with the results of fat-soluble vitamins dissolved in ethanol and isopropanol media [Ball *et al*, 1988]. In the PN mixture the vitamin wavelength maxima show a small red shift of about 5 nm which does not alter the overall photodegradation analysis. This is considered very advantageous so that electronic absorption spectrophotometry may be applied to monitor the photodegradation directly in the presence of the other PN components.

#### Insert Figure 2

The photoinduced degradation process of vitamin A was monitored in the mixture with an initial concentration of 4,92  $\mu$ g/mL. The relative concentration (%) against time curves obtained under CWL and under UV light are shown in Figure 3.

#### Insert Figure 3

As expected, the UV induced photodegradation is far more pronounced than the one observed using the cool white lamp. The curve that best fits the UV degradation curve shows a first order exponential decay with a half-life of 3.78 min ( $R=0.9792$ ). Regarding the behavior of vitamin A under CWL illumination some observations must be considered. First of all, the measurements of light dose in the photostability chamber show the following correlation with the light dose in the neonatal unit: 15 min of UV = 10 h of ambient sunlight while 90 min of the CWL = 10 h of the indoor fluorescent light. At 15 min of UV illumination the remaining concentration of vitamin A was approximately 14% of the original concentration in the formulation, while after 90 min

of CWL approximately 50% of vitamin A remained in the mixture. These values show that the extension of the degradation may be far greater than it was thought, specially considering the degradation observed in the visible region, that is, under cool white light illumination. Taking into account these findings, we performed a thorough mapping of the light intensities inside the photostability chamber. The light intensities were registered using the radiometer and the luximeter.

Figure 4 shows the intensity maps of the lamps used in the photostability chamber obtained with a radiometer. The level curves for the radiometer measurements (290 – 390 nm) indicate a peak value of  $653 \text{ W/cm}^2$  (average  $607 \pm 5 \text{ W/cm}^2$ ) for the cool white lamp while  $14,613 \pm 50 \text{ W/cm}^2$  (average  $14,166 \pm 49 \text{ W/cm}^2$ ) for the UV lamp. For the measurements performed with a luximeter in the chamber, the average peak value for the UV lamp is  $3,060 \pm 61 \text{ Lux}$  while for the CWL the average value is  $14,472 \pm 97 \text{ Lux}$ . All these values represent the average of ten measurements performed for each curve level.

Examining the photodegradation curves shown in Figure 3 we notice that even though there is a far greater stability of the vitamin under the fluorescent lamp some perceptible degradation is still observed. This finding contrasts with the data reported by Alwood et al (Alwood *et al.* 1982) which stated that artificial light had no detectable effect on the Vitamin A photostability. We measured the light output of the CWL lamp using a radiometer and a luximeter. The results point to the fact that although the spectral range of the characteristic CWL is in the visible range (400-700 nm), where no absorption from the sample is expected to occur (as depicted in Figure 3), there is still some amount of UV radiation coupled to the output of the CWL lamp. The measurements performed using a radiometer (which detects 290-390 nm) inside the photostability chamber and also the measurements performed in the neonatal unit showed that the

readings were different from zero. In fact, UV radiation measured for the CWL inside the chamber was not expected and even though the values observed are very small, its accumulated effect (for instance in a 10h period of PN formulation administration) on the vitamin A is appreciable. These findings corroborate the constant use of a light protection device on the PN bag.

#### **Insert Figure 4**

### **3.2 Antioxidant action of Polyphosphate**

The analysis of the  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of the polyphosphate ion aqueous solution shows an average polymerization degree of  $n = 9$ . In Figure 5 we observe the influence of polyphosphate in the photodegradation curves of vitamin A. Under the UV light the original concentration of vitamin A decreased to a value of approximately 30% after 15 min and the decay curve was best fitted by a second order exponential decay curve ( $R=0.995$ ) (Figure 5(a)). The extension of the photodegradation observed under CWL did not alter significantly as may be observed in Figure 5(b).

#### **Insert Figure 5**

The spectral behavior observed in Figures 5(a) and 5(b) suggests that the polyphosphate interferes in the photodegradation kinetics of vitamin A. The synergistic antioxidant action of polyphosphates (especially hexametaphosphate i.e.  $[\text{NaPO}_3]_n$  with  $n = 5-15$ ) was first observed by Betty Watts in the late forties [Watts, 1950]. She described the antioxidant effective activity of polyphosphates in aqueous fat systems. Taking into account the most probable chemical interactions of PolyP in the present microemulsions there are some possible mechanisms that can be applied to explain its photo-antioxidant action. One of these possibilities takes into account the chelating capacity of this polyelectrolyte to metal cations. First of all, the polysorbate coated microemulsion

droplets would attract the  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and oligoelement ions present in the PN mixture via the hydroxyl groups pointing out of them. By adding polyphosphate to this system, the polyelectrolytes would be expected to form complex-type interactions with the droplet-surface ions. So, creating a supramolecular complex structure, the polyphosphate, which absorbs in the UVB region (threshold  $< 320$  nm) may decrease the light action inside the microparticles. A thorough picture of the antioxidant process still remains to be discussed elsewhere. Still, comparing the curves obtained with and without polyphosphate under CWL illumination it is observed that there is barely any significant change in the photodegradation curves suggesting no antioxidant action. This reinforces the idea of its action in the UV region.

#### **4. Conclusion**

The photodegradation studies performed on neonatal PN formulations containing vitamin A using a photostability chamber showed that the photo induced degradation may be able to simulate an actual incident light dose. In the present report a model type study simulating a 10 h daylight incidence on the PN bag showed a 86% degradation rate while simulating an artificial lighting the observed degradation was of 50%. This last result was discussed showing that although cool white light is supposed to emit light in the visible region (400 – 700 nm) the radiometer measurements showed a UV light dose which would be responsible for an accumulating degradation effect. In this study the antioxidant action of sodium polyphosphate was observed for a fixed amount when irradiating the PN formulations containing vitamin A with UV lamp pointing to its potential as a synergistic antioxidant. This action was although not observed for the photodegradation experiment using a cool white lamp. This suggests that the antioxidant action may result from the polyphosphate UV absorption capacity.

## **Acknowledgements**

The authors are very grateful Prof. José Almiro Paixão and Prof. Adriana Fontes for the helpful discussions; Prof. Cid B. de Araújo and Prof. Waldeciro Colaço for the technical collaboration and to PROPESQ/UFPE, CAPES and CNPq for the financial support.

## **References**

- Allwood, M.C., 1982. The influence of light on vitamin A degradation during administration. *Clin. Nutr.* 1, 63-70.
- Allwood, M. C., Plane, J. H. 1986. The wavelength-dependent degradation of vitamin A exposed to ultraviolet radiation. *Int. J. Pharm.*; 31: 1-7
- Allwood, M.C., Kearney, M.C.J., 1988. Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures. *Nutrition* 14(9), 697-706.
- Allwood, M.C., Martin, H.J., 2000. The photodegradation of vitamins A and E in parenteral nutrition mixtures during infusion. [Clin. Nut.](#) 19(5), 339-42.
- Ball, G.F.M., 1988. *Fat Soluble Vitamins Assays in Food Analysis – A comprehensive review.* Elsevier Science Publishers New York, USA.
- Bathia, J., Rivera, A., Moslen, M.T., Rassin D., Gourley, W., 1992. Hepatic function during short-term total parenteral nutrition: effect of exposure of parenteral nutrients to light. *Pediatrics* 78, 321–340.
- Blanco, D., Pajares, M., Escotet, V.J., Gutiérrez, M.D., 1994. Determination of Fat Soluble Vitamins by Liquid Chromatography in Pediatric Parenteral Nutrition. *J. Liq. Chrom.* 17(20), 4513-4530.
- Brandt, R.B., Mueller, D.G., Schroeder, J.R., Guyer, K.E., Kirkpatrick, B.V., Hutcher, N.E., Ehrlich, F.E., 1978. Serum vitamin A in premature and term neonates. *J. Pediatr.* 92, 101 – 104.

Carlotti, M.E., Rossatto, V., Gallarate, M., 2002. Vitamin A and Vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation. *Int. J. Pharm.* 240, 85-94.

Dju, M.Y., Mason, K.E., Filer, L.I., 1952. Vitamin E (tocopherol) in human fetuses and placentae. *Etudes Neonatales* 1, 49– 62.

Drott, P., Meurling, S., Meurling, L. 1991. [Clinical adsorption and photodegradation of the fatsoluble vitamins A and E](#). 10;6, 348-351.

Edwards, A.M., Silva, E. 2001. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 63, 126–131.

Gillis, J., Jones, G. Pencharz, P. 1983. Delivery of vitamins A, D, and E in total parenteral nutrition solutions. *J. Parent. Enteral Nutr.* 7, 11 – 14.

Greenfield, S., Clift, M., 1974. *Analytical Chemistry of the Condensed Phosphates*. International Series in Analytical Chemistry, 57, Pergamon Press, New York.

Haas, C., Genzel-Borovicze'ny, O., Koletzko, B., 2002. Losses of vitamin A and E in parenteral nutrition suitable for premature infants. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 906–912.

Henton, D. H., Merritt, R. J. 1990. Vitamin A sorption to polyvinyl and polyolefin intravenous tubing. *J. Parenter. Ent. Nutr.* 14, 79– 81.

ICH (1996). *Guidance for Industry Q1B Photostability Testing of New Drug Substances and Products*.

Johnson, L., Quinn, G.E., Abbasi, S., Otis, C., Goldstein, D., Sacks, L., Porat, R., Fong, E., Delivoria Papadopoulos, M., Peckham, G., et al, 1989. Effect of sustained pharmacologic vitamin E levels on incidence and severity of retinopathy of prematurity: a controlled clinical trial. *J. Pediatr.* 114, 827 – 838.

Johnson, L., Quinn, G.E., Abbasi, S., Gerdes, J., Bowen, F.W., Bhutani, V., 1995. Severe retinopathy of prematurity in infants with birth weights less than 1250 grams: incidence and outcome of treatment with pharmacologic serum levels of vitamin E in addition to cryotherapy from 1985 to 1991. *J. Pediatr.* 127, 632 – 639.

Kim, H. Y., Choi, M. J., Hwang, S., Seo, I., Park, S. K., Lee, H. C., Shin, E. K., Park, E.M. 2004. Pharmaceutical composition or health food having antioxidizing activity comprising polyphosphate as an effective ingredient. Patent: WO 2004/110462 A1.

Kornberg, A., Rao, N.N., Ault-Riché, D., 1999. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *Annu. Rev. Bioche.* 68, 89 – 125.

Kulaev I., Kulakovskaya. T., 2000. Polyphosphate and phosphate pump. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 709–734.

Kulaev, I. S., Vagabov, V. M., Kulakovskaya, T. V., 2004. *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*, John Wiley & Sons, New York.

Lanigan, R.S., 2001. Final Report on the safety assessment of sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, and sodium hexametaphosphate. *Int. J. Toxicol.* 20, supl.3, 75 – 89.

Leaf, A., Subramanian, S., Shobha, C., 2004. Vitamins for preterm infants, *Cur. Paedriatics* 14, 298-305.

Manning, R.J., and Washington, C., 1992. Chemical stability of total parenteral nutrition mixtures. *Int.J. Pharm.* 81, 1-20.

Papagaroufalis, C., Megreli, C., Hagjigeorgi, C., Xanthou, M., 1991. A trial of vitamin A supplementation for the prevention of intraventricular hemorrhage in very low birth weight neonates. *J. Perinat. Med.* 19 Suppl. 1, 382 – 387.

Piechocki, J.T., Thoma, K. Eds. 2007. *Pharmaceutical Photostability and Stabilization Technology*, Informa Healthcare USA, Inc.

Riggle, M.A., Brandt, R.B. 1986. Decrease of available vitamin A in parenteral nutrition solutions. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 10, 388 – 392.

Shenai, J.P., Kennedy, K.A., Chytil, F., Stahlman, M.T., 1987. Clinical trial of vitamin A supplementation in infants susceptible to bronchopulmonary dysplasia. *J. Pediatr.* 111, 269 – 277.



Speer, M.E., Blifeld, C., Rudolph, A.J., Chadda, P., Holbein, M.E., Hittner, H.M., 1984. Intraventricular hemorrhage and vitamin E in the very low-birth-weight infant: evidence for efficacy of early intramuscular vitamin E administration. *Pediatrics* 74, 1107 – 1112.

Steindal, A.E., Vorobey, P., Kristian, M., Vorobey, A., Moan, J., 2006. Influence of human serum albumin on photodegradation of folic acid in solution. *J. Photochem. Photobiol.* 82, 817–822.

Thomas, D.G., James S.L., Fudge, A., Odgers, C., Teubner, J. Simmer, K. 1991. Delivery of vitamin A from parenteral nutrition solutions in neonates. *J. Paediatr. Child. Health* 27, 180 – 183.

Tonnesen, H. H., 2004. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*. 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Press. 134-135.

Watts, B. M., 1950. Polyphosphates as Synergistic Antioxidants. *The J. Am. Oil Chem. Soc.* 48-51.

Weiner, M.L., Salminen W.F., Larson, P.R., Barter, R.A., Kranetz, J.L., Simon, G.S. Toxicological review of inorganic phosphates, 2001. *Food and Chemical Toxicology* 39(8), 759–786.

Yoshioka, S., Ishihara, Y., Terazono, T., Tsunakawa, N., Murai, M., Yasuda, T., Kitamura, T., Kunihiro, Y., Sakai, K., Hirose, Y., Tonooka, K., Takayama, K., Imai, F., Godo, M., Matsuo, M., Nakamura, K., Aso, Y., Kojima, S., Takeda, Y., Terao, T., 1994. Quinine actinometry as a method for calibrating ultraviolet radiation intensity in light-stability testing of pharmaceuticals. *Drug Drug Dev. Ind. Farm.* 20(13),

## Figure Captions

Figure 1 – Chemical structure of the polyphosphate anion with  $n = 9$ .

Figure 2 – Electronic absorption spectra of Vitamin A and D and the mixture of vitamin A and D in a parenteral nutrition formulation. The cool white lamp (CWL) and the ultraviolet (UV) radiation region of the lamps used in the photostability chamber are also depicted.

Figure 3 - Time photodegradation profile of Vitamin A in a PN formulation performed in a photostability chamber under UV and cool white lamp illumination (CWL).

Figure 4 – Map intensity of the light power density of (a) CWL and (b) UV lamps measured with a radiometer in the UVA and UVB region (290 – 390 nm).

Figure 5 - Time photodegradation profile of Vitamin A in a PN formulation with and without polyphosphate performed in the photostability chamber. Illumination of (a) UV light and (b) CWL.

**Figure 1**

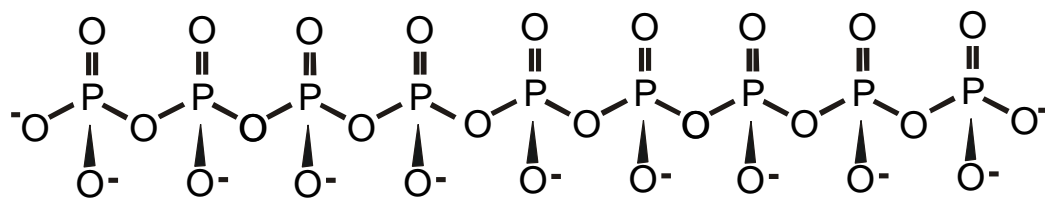


Figure 2

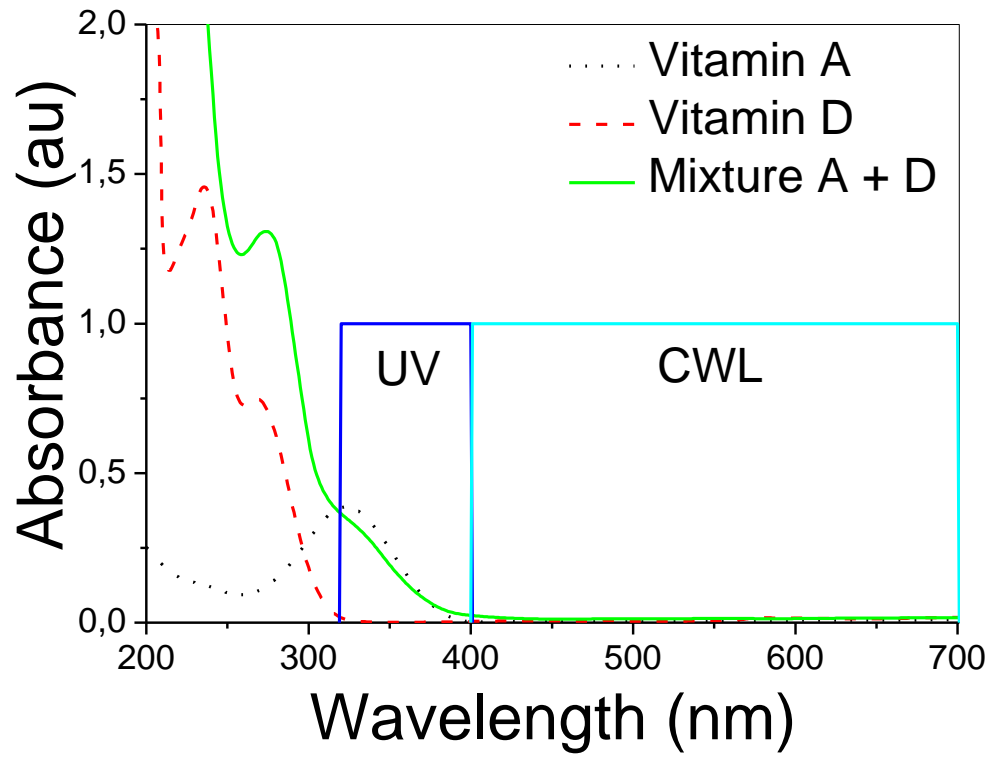
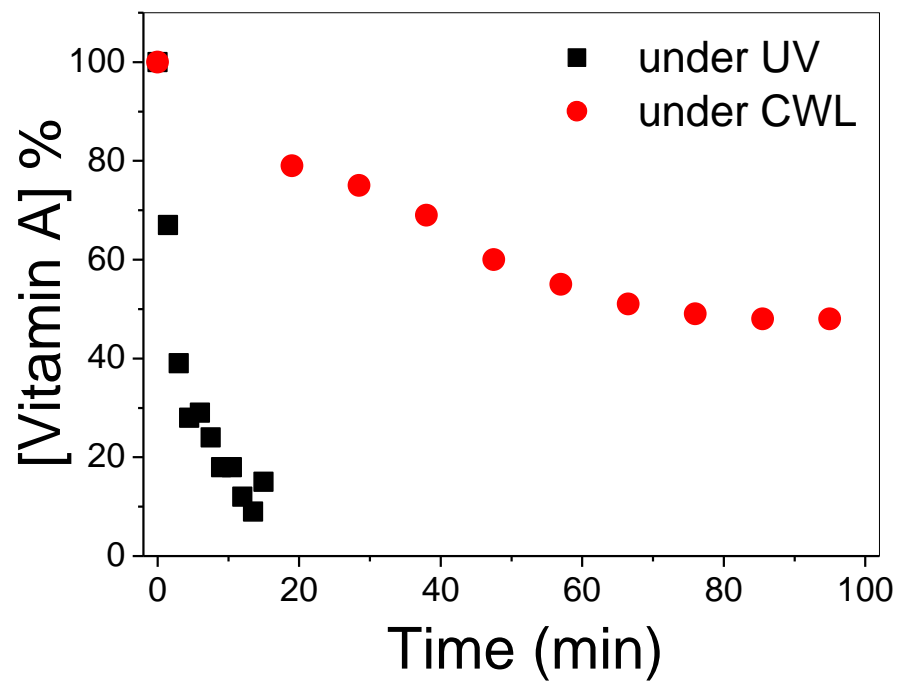


Figure 3



**Figure 4**

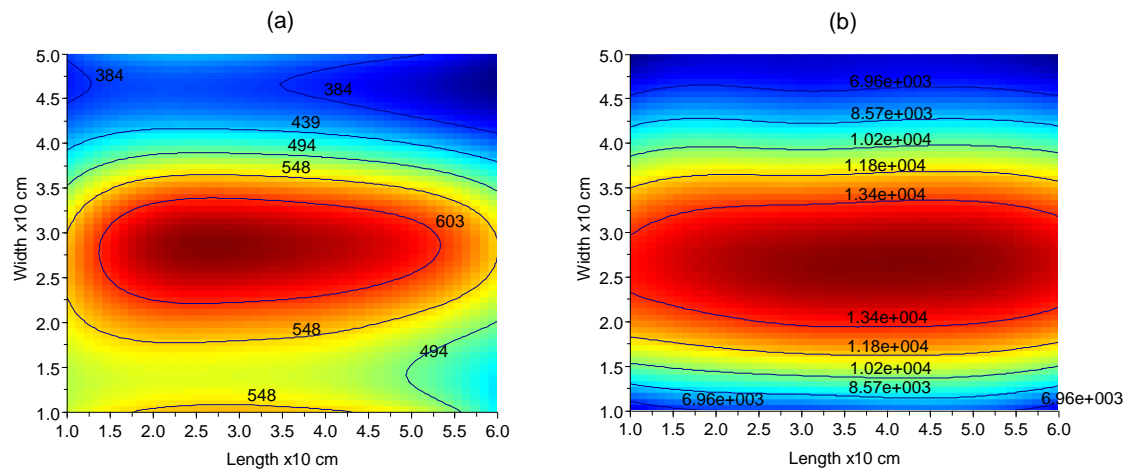
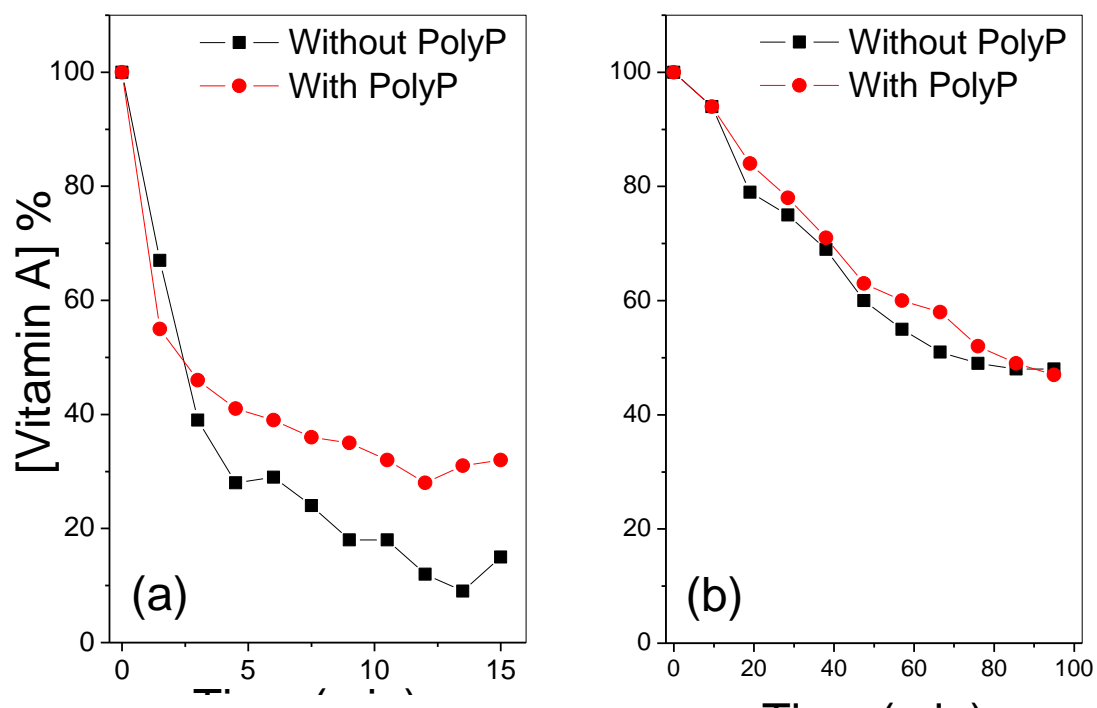


Figure 5



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)