

Avaliação do Óxido de Ferro como Atenuante para Degradação Fotolítica do Fármaco Montelukaste

Evaluation of Iron Oxide as an Attenuant for Photolytic Degradation of Montelukast Drug

Guilherme Mendes Duarte,^a Luciana Rebelo Guilherme^{a,*} 

^aUniversidade Estadual de Goiás, Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Campus Central, CEP 75132-903, Anápolis-GO, Brasil.

*E-mail: luciana.guilherme@ueg.br

Recebido: 12 de Maio de 2020

Aceito: 19 de Maio de 2021

Publicado online: 8 de Junho de 2021

Montelukast sodium (MTK) is a leukotriene receptor antagonist used to treat asthma and relieve symptoms of seasonal allergies in children and adults. MTK is known to be photosensitive, however, to minimize the effects of photodegradation, it is common to sell it in blisters, which considerably increase its final product price. An alternative to blister packs could be the insertion of nanoexcipients capable of promoting a photoprotection effect of MTK in formulations. To elucidate the stability of the drug using appropriate analytical methodology, as well as to suggest the reduction of MTK photodegradation by the nanoexcipient iron oxide, this study was carried out. Two types of iron oxide were used in this study, one of industrial oxide and the other synthesized specifically for this study. The synthesized iron oxide was prepared from the coprecipitation reaction of iron (II) and iron (III) ions, followed by oxidation by adding HNO₃ and Fe(NO₃)₃, obtaining colloidal suspension, purification by dialysis and vacuum oven drying. The characterizations of the synthesized iron oxide and industrial iron oxide, in addition to the evaluation of the degradation profile of the raw material and chewable tablet MTK, were carried out by the techniques of vibrational spectroscopy in the Infrared region with Fourier transformed (FTIR), microscopy transmission electronics (MET), X-ray diffraction (XRD), Mössbauer spectroscopy and high-performance liquid chromatography (HPLC). Toward develop adequate analytical methodology, the raw material and chewable tablet MTK were exposed to degradation pathways in acid (HCl) and basic (NaOH), oxidation (H₂O₂), thermolysis (60 °C) and photolysis. The XRD and Mössbauer spectroscopy techniques indicate that the synthesized iron oxide is maghemite phase (γ -Fe₂O₃) and industrial iron oxide was predicted to be formed by 100 % hematite phase (α -Fe₂O₃). The average size obtained, by means of MET, for the synthesized iron oxide was 8.37 ± (SD = 2.18) nm and for the industrial iron oxide it was 26.66 ± (SD = 53.69) nm. The analytical methodology using the liquid chromatography technique (HPLC) proved to be efficient for elucidating the degradation products and MTK. The observed results indicated an extreme susceptibility of MTK to photodegradation. The synthesized iron oxide was able to attenuate the photolytic effect on the drug, in the chewable formulation of MTK. This study suggests that the use of maghemite iron oxide as a nanoexcipient could act as a photoprotector of photosensitive drugs such as MTK.

Keywords: Iron nanoparticles; forced degradation; photodegradation; Mössbauer

1. Introdução

O montelukaste de sódio (MTK) de fórmula molecular C₃₅H₃₅ClNaNO₃S, conhecido quimicamente como [1-[[[(1R)-1-[3-[-[(E)-2-(7-2-cloroquinolil) etenil] fenil]] 3-[2-(1-hidróxi1metil etil) fenil] propil] sulfanil] metil] ciclopropil] acetato (Figura 1), é um antagonista do receptor de leucotrienos utilizado para o tratamento de asma e alívio dos sintomas de alergias sazonais em crianças e adultos. A avaliação da qualidade do insumo ativo MTK se faz necessária devido a necessidade de garantir a segurança da população que faz uso do MTK nas formulações farmacêuticas. Deste modo, agências reguladoras compõem o ICH (*International Conference on Harmonisation* - Comitê Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano) normatizam e regulamentam o registro do MTK para uso humano. A fim de proteger a população de possíveis danos ao organismo que tal fármaco poderia gerar, como por exemplo a presença de prováveis impurezas genotóxicas advindas do MTK no decorrer de sua estabilidade físico-química¹⁻¹¹

O propósito de um estudo de estabilidade do perfil de degradação de fármacos é fornecer evidências sobre como a qualidade, de um fármaco ou de um produto farmacêutico, pode variar com o tempo. A estabilidade pode variar em função de uma variedade de fatores ambientais e químicos, tais como: temperatura, umidade, luz e a presença de excipientes na

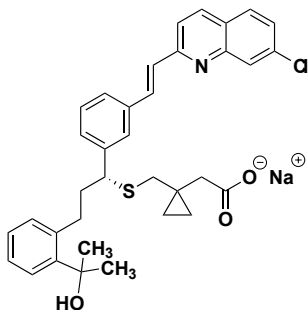


Figura 1. Representação da estrutura química do montelukaste de sódio (MTK)

formulação. As ferramentas de determinação do MTK para monitorar a sua qualidade mais observadas na literatura são as técnicas de: espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (CLAE-EM/HPLC-MS), espectrômetro de massas (EM/MS), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN/NMR) e espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A técnica utilizada neste estudo é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector em fotodiodo (Photodiode Array). Tal técnica é preditiva de avaliar o mecanismo de degradação de fármacos, tais como o MTK.¹²⁻¹⁵

O fármaco MTK é suscetível a degradação em hidrólise sob meio ácido, oxidativo e criticamente instável por meio da fotólise advinda da incidência da luz. Os principais produtos de degradação do MTK observados são as impurezas: 1, 2, 5, 6 e 7 (Figura 2 e Figura 3). Os alvos de ataques dos meios

de degradação são os agrupamentos funcionais que possuem capacidade de interagir com a condição de estresse em que lhes é submetida. A degradação fotolítica do MTK pode proporcionar reações de fotoisomerizações em sua estrutura química, como por exemplo em locais de dupla ligações levando a isomerização da geometria estrutural do MTK. Tais mudanças nas estruturas químicas podem vir a formar impurezas com potenciais danos genotóxicos à saúde. A literatura de Pounikar *et al.* (2020), relatam os principais grupos funcionais de estruturas químicas orgânicas que são destacados como alarmantes por possuírem atividade genotóxica. Dentre os agrupamentos relatados está o grupo dos metilóis, que compõem as estruturas das impurezas 1, 2, 4, 6 e 7 do MTK. Existem vários estudos sobre a identificação, quantificação e caracterização de impurezas em medicamentos. A literatura científica é limitada sobre a investigação de toxicidades das impurezas. No entanto, Emerce *et al.* (2015) relataram que as impurezas 1 e 2 (sulfóxido MTK) são citotóxicas em função da dose aplicada em linfócitos periféricos humanos.^{7,16-20}

Frete a esse cenário a utilização de blísteres ALU/ALU (Alumínio/Alumínio) e dióxido de titânio seriam uma alternativa para resolução do problema de degradação do fármaco e formação de impurezas desconhecidas e conhecidas, porém são recursos com altos dispêndios financeiros.

O MTK apresenta em sua formulação comprimido um promissor atenuante a degradação fotolítica, o óxido de ferro. Esse, no entanto, é utilizado na formulação como apenas como excipiente, com a função de corante em uma proporção de 0,03%. Os óxidos de ferro são compostos amplamente encontrados na: hidrosfera, litosfera, atmosfera e biosfera. São conhecidos como óxidos de ferro os compostos que são constituídos pelos elementos químicos

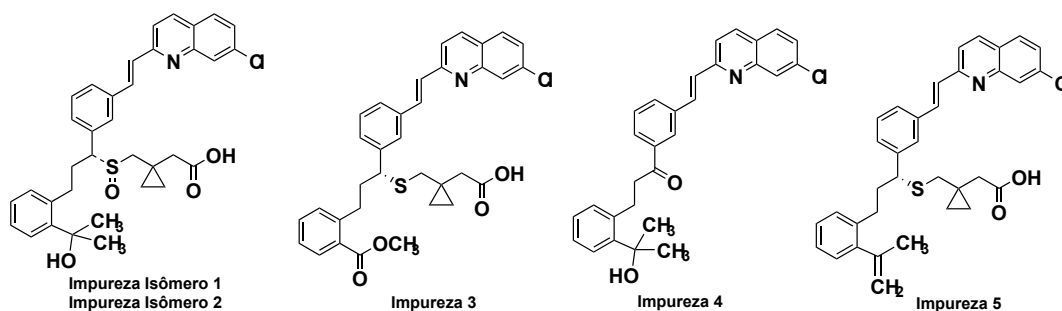


Figura 2. Representação das fórmulas estruturais das impurezas 1 a 5

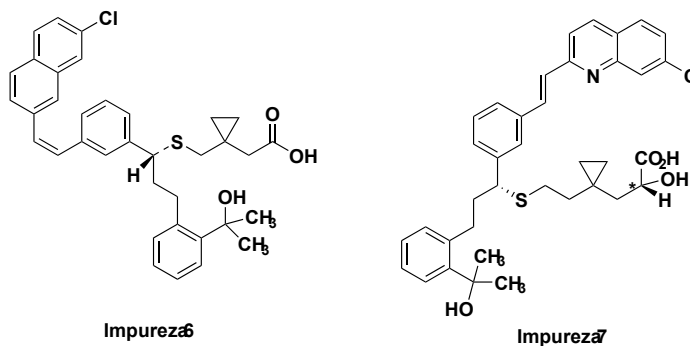


Figura 3. Representação das fórmulas estruturais das impurezas 6 e 7

ferro (Fe) ligados com oxigênio (O), tais como: magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Os óxidos de ferro são candidatos favoráveis para muitas aplicações industriais, tanto para a indústria alimentícia quanto para a farmacêutica, devido às suas exclusivas propriedades físico-químicas (altas áreas de superfície e grandes propriedades eletrônicas) e a alta biodisponibilidade na natureza devido sua baixa toxicidade.²¹⁻²³

Comumente no que se refere em relação a toxicidade de nanopartículas de óxido de ferro, estas não liberam substâncias nocivas ao organismo e são biocompatíveis, tornando-as candidatas atrativas para inserção como nanoexcipiente em aplicações biomédicas. Para fundamentar essa ideia, um estudo conduzido por Lewis RJ (2004) demonstra que a dose letal (DL_{50}), de óxido de ferro para 50 % de uma população de ratos é 5,4 g/Kg, logo a dose letal para um rato de 250 g seria de 1,35 g de óxido de ferro. Isso sugere que, nesta concentração, é ínfima a possibilidade de prejudicar o organismo de um humano.²⁴⁻²⁶

Os estudos dos fatores de degradação mencionados anteriormente, bem como a avaliação do fármaco frente aos excipientes de ferro, possibilitam também estabelecer as condições ideais de armazenamento e os prazos de validade recomendados. Em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, essa interação fármaco *versus* óxido de ferro, apresentaram promissores resultados nesse contexto. Pois, observou-se que, a rifampicina foi protegida da fotodecomposição, na presença do nanoexcipiente óxido de ferro.^{13-14,27-28}

Os objetivos desse estudo foram avaliar o perfil de degradação do MTK matéria-prima e comprimido a fim de elucidar a estabilidade do medicamento, bem como sugerir a redução da fotodegradação do fármaco pela nanopartícula de óxido de ferro empregando uma metodologia analítica desenvolvida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2. Metodologia

2.1. Reagentes, Insumos e Equipamentos

Os reagentes utilizados nesta pesquisa foram: cloreto de ferro(II) tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Marca Sigma-Aldrich); cloreto de ferro(III) hexa hidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Marca Sigma-Aldrich); nitrato de ferro [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$] (Marca Synth); hidróxido de amônio (NH_4OH) (Marca Synth); ácido nítrico (HNO_3) (Marca Synth); metanol (CH_3OH) (Marca JT Baker); ácido clorídrico (HCl) (Marca Synth); hidróxido de sódio (NaOH) (Marca Dinâmica); peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Marca Biograde); ácido fosfórico (H_3PO_4) (Marca JT Baker) e acetona ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$) (Marca Merck).

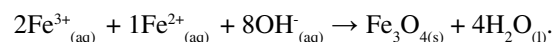
Os insumos empregados no estudo foram: Padrão primário de Montelucaste e Impurezas: Farmacopeia Americana (*USP-United States Pharmacopoeia*) e britânica (*BP- British Pharmacopoeia*); os comprimidos foram adquiridos em drogarias localizadas no município de Anápolis, estado de Goiás. A matéria-prima de MTK (IFA) e o placebo do comprimido mastigável (aroma de

cereja, celulose microcristalina, corante óxido de ferro vermelho, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hiprolose, manitol e aspartamo) foram obtidos através da doação de uma indústria farmacêutica paulista, cujo nome será mantido em sigilo.

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica com capacidade de 220g e precisão de 0,0001g (marca Gehaka modelo AG-200); condutivímetro (marca Gehaka modelo CG2000); estufa a vácuo (marca ethik modelo 440-D); banho ultrassônico (marca SolidStell modelo SSBu); câmara de fotoestabilidade (marca Ethik modelo 424-CF); câmara climatizada (marca B.O.D. modelo EL141); cromatógrafo líquido (marca Agilent Infinity I modelo 1290) e coluna cromatográfica (marca Phenomenex modelo Synergi Hydro-RP).

2.2. Síntese do óxido de ferro (Fe_2O_3)

As nanopartículas de óxido de ferro (Fe_2O_3) foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, baseada nas metodologias de Khalafalla (1980) e van Ewijk (1999). Foram pesados analiticamente, 4,00 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 8,00 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e dissolvidos em 50 mL de água. O cloreto férrico e o cloreto ferroso dissolvidos foram misturados em um béquer de vidro. Foram adicionados 25 mL de NH_4OH sob agitação manual. A reação química de formação de magnetita em meio aquoso é representada pela equação:



Após a etapa de precipitação, o material foi deixado em repouso até sua decantação a temperatura ambiente. O precipitado de coloração preta foi isolado do sobrenadante por decantação utilizando um ímã de neodímio colocado sob o béquer. Foi descartado o líquido sobrenadante que foi lavado com NH_4OH 5 %. A um béquer de 200 mL foram adicionados 40 mL de HNO_3 2 mol L^{-1} em 50 mL da solução de óxido de ferro obtida, sob agitação branda por 5 minutos sendo utilizado um agitador magnético com aquecimento. Em seguida foi adicionado 60 mL $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ao meio reacional sob aquecimento (>100 °C) por 1 hora. Obteve-se uma suspensão coloidal, que foi separada por ímã de neodímio e submetida a lavagens com HNO_3 2 mol L^{-1} , acetona e sendo por fim dispersadas em água destilada. A suspensão coloidal obtida foi dialisada em uma membrana de celulose semipermeável (INLAB – 10000Da). Após dialise, o fluido foi seco em estufa a vácuo a 40 °C.

2.3. Caracterização do Óxido de Ferro Sintetizado e Óxido de Ferro Industrial

2.3.1. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)

As análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram

realizadas em um espectrômetro *Bruker* (Alpha) no intervalo de varredura entre 400 - 4.000 cm^{-1} . As amostras utilizadas nos espectros de infravermelho foram dispersas em KBr, nas proporções de 1 mg de amostra/100 mg de KBr e prensadas na forma de pastilhas. Em seguida, com o auxílio de uma prensa compacta MHP-1 (*Shimadzu*), formou-se uma pastilha de 10 mm de diâmetro. Registraram-se os espectros no intervalo correspondente à região do infravermelho médio.

2.3.2. Espectroscopia Mössbauer

Os espectros Mössbauer foram obtidos no Laboratório de Ciência de Materiais do Instituto de Física da Universidade de Brasília (UnB). As medidas foram realizadas utilizando um transdutor *WEISS* de fabricação alemã que se move com aceleração constante. A fonte de radiação utilizada foi ^{57}Co em matriz de Ródio (Rh), calibrado com uma folha fina de Fe.

2.3.3. Difração de raios X (DRX)

As análises de Difração de raios X (DRX) foram realizadas na Central de Análises do Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os difratogramas de raios X foram obtidos das amostras na forma de pó. Utilizou-se o equipamento Shimadzu modelo DRX-6000, com fonte de radiação $\text{CuK } \alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), voltagem de 40 kV e corrente de 20 mA. As medidas foram feitas em varredura contínua no intervalo de 10° a 80° , a uma velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$.

2.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Microscopia Eletrônica de Transmissão foi realizada no LabMic (Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução) da Universidade Federal de Goiás (UFG). As medidas foram feitas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão da marca Jeol, modelo JEM-2100. As amostras foram diluídas em água ultrapura depositadas sobre uma tela de cobre de 200 mesh, com filme de carbono como cobertura, previamente ionizada por 20 minutos. Aguardou-se então a sua evaporação em câmara de vácuo por 12 horas. A partir das micrografias eletrônicas de transmissão obtidas, com o auxílio dos programas *IPEXP4* e *Excel*, foi possível fazer as contagens, as verificações dos diâmetros médios das nanopartículas e obter os histogramas de distribuição dos tamanhos das partículas utilizadas neste trabalho. A determinação do índice de dispersão (ID) foi realizada segundo as Organizações Internacionais de Padronizações (ISOs). O índice de dispersividade (ID) é definido como o desvio padrão (σ) da distribuição do diâmetro das partículas dividido pelo diâmetro médio das partículas, conforme a Equação 1.^{31,32}

$$ID = \left(\frac{\sigma}{d}\right)^2$$

Equação 1. Equação do índice de dispersividade

2.4. Preparo das soluções – Padrão primário MTK + impurezas, IFA, comprimido e placebo

Foram pesados o equivalente a 20,0 mg de cada amostra (padrão primário MTK e impurezas, IFA, comprimido e placebo) sendo transferidos para balão volumétricos âmbar distintos de 10 mL. Após a pesagem, os insumos foram solubilizados em metanol sendo levados para banho ultrassônico por 10 minutos. A concentração de cada analito correspondia a $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

As soluções foram filtradas em membrana PVDF (Fluoreto de polivinilideno) $0,45 \mu\text{m}$ e injetadas em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), previamente diluindo 1 mL de cada solução para um balão volumétrico âmbar de 10 mL, com concentração de cada analito igual a $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$.

2.5. Preparo dos testes de degradação

As soluções das amostras degradadas foram preparadas conforme descrito anteriormente no preparo das soluções, tanto para a condição controle (sem degradantes) quando para as condições das amostras expostas aos degradantes, vide Tabela 1.

A condição de degradação fotolítica foi realizada através da utilização de uma câmara de fotoestabilidade. A matéria-prima e o comprimido mastigável foram pesados e transferidos para placa de Petri e mantidos a uma distância de 30 cm da radiação da luz. A degradação se deu a partir da incidência de luz fluorescente branca e luz fluorescente ultravioleta com espectro distribuído entre 320 e 400 nm nas respectivas exposições citadas na Tabela 1. Através de dois ciclos de exposição, sendo a segunda exposição o dobro da primeira exposição. O tempo de exposição de 120 horas foi dividido em 96 horas de exposição a luz branca e 24 horas na luz ultravioleta. Os preparos das soluções após exposições seguiram o mesmo protocolo avaliado para as condições controle. Nos testes em que se envolvia a utilização de estufas com controle acurado de temperatura e umidade, foi utilizada uma câmara climatizada.

2.6. Preparo das amostras MTK + óxido de ferro – Teste de atenuante para a fotodegradação

Foram realizados dois testes de fotodegradação. No primeiro teste, foram preparadas pastilhas de 2 mm de espessura de MTK com massa igual a 20 mg. Da mesma forma, foram preparadas as pastilhas de óxido de ferro nas proporções de 8, 16 e 20 mg. As pastilhas de óxido foram colocadas sobre as pastilhas de MTK antes que as amostras fossem levadas à câmara de fotoestabilidade. No segundo teste, foram pesadas as mesmas proporções do primeiro teste, sendo feita uma mistura de MTK e óxido de ferro em grau e pistilo. As pastilhas do primeiro teste e as misturas do segundo teste foram colocadas separadamente em placas de Petri e levadas à câmara de fotoestabilidade para serem expostas a condição de radiação de luz. Após os tempos

Tabela 1. Condições de Degradação do MTK e MTK comprimido mastigável

Condição	Condição Estressante	Volume de Degradante (mL)	Tempo de Exposição (horas)
Hidrólise Ácida	HCl 2,5 mol/L	10,0	48,0
Hidrólise Básica	NaOH 0,1mol/L	10,0	240,0
Oxidativa	H ₂ O ₂ 0,5% (m/v)	10,0	2,0
Térmica Seca	Estufa 60°C	-	240,0
Térmica Úmida	Estufa 45°C/75%UR	-	240,0
Fotólise 1º Ciclo	1200 klux hora e 200 Watt hora/m ²	-	-
Fotólise 2º Ciclo	2x 1200 klux hora e 200 Watt hora/m ²	-	-

de fotólise (Tabela 1), as amostras foram transferidas para balões volumétricos âmbar sendo adicionados metanol com posterior banho de ultrassom. As amostras foram diluídas para a concentração de trabalho de 0,2 mg/mL e filtradas em membranas PVDF 0,45 µm.

2.7. Método cromatográfico

A separação cromatográfica foi conduzida utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (*Agilent 1290*), em uma coluna C18 (*Synergi Hydro-RP* 50 mm x 4,6 mm com diâmetro de partículas de 2,5 µm). O gradiente de eluição empregou a solução A e a solução B como fase móvel. A solução A continha ácido fosfórico 0,1% e a solução B de acetonitrila. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹. O gradiente foi programado da seguinte forma (minutos/porcentagem): Solução A: 0,0/45; 18,0/31,0; 24,0/20,0; 33,0/10,0; 37,0/10,0; 37,1/45,0; Solução B: 0,0/55,0; 18,0/69,0; 24,0/80,0; 33,0/90,0; 37,0/90,0; 37,1/55,0. A temperatura da coluna aferida foi de 30 °C e o comprimento de onda fixo de detecção de 239 nm. O diluente do método utilizado foi o metanol.

3. Resultados e Discussão

Através dos espectros FTIR (Figura 4), para as amostras de óxido de ferro observou-se intensas bandas de absorção

em torno de 3425 cm⁻¹ que são atribuídas aos estiramentos ν(OH) presentes nas superfícies de óxidos hidroxilados; bandas em 1628 cm⁻¹ que são características de vibrações δ(OH) provenientes de moléculas de água adsorvidas de óxidos metálicos. As amostras de óxido de ferro também apresentaram em ambos os espectros uma banda em 628 cm⁻¹ associada a átomos de ferro que estão presentes em sítios tetraédricos e estiramentos em 581 cm⁻¹ pertencentes a sítios octaédricos.³³⁻³⁶

As Figuras 5 e 6 apresentam os resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão. Na micrografia da amostra de óxido de ferro sintetizado pode-se observar partículas de dimensões nanométricas e de formato aproximadamente esférico (Figura 5a). O histograma demonstrado na Figura 5b indica o diâmetro médio igual a 8,37 nm para a amostra de óxido de ferro sintetizado. O índice de dispersão (ID) calculado foi de 0,068 indicando que a amostra de óxido de ferro sintetizada apresenta partículas com distribuição de tamanho homogêneo segundo as Organizações Internacionais de Padronizações (ISO 22.412:201). Este ID, já era esperado para a amostra, tendo em vista que a síntese é amplamente divulgada na literatura.^{29-31,37}

A micrografia da amostra de óxido de ferro industrial pode ser observada na Figura 6a. Observam-se partículas com morfologias distintas coexistindo na amostra. Foram observadas partículas esféricas com diâmetro médio de 15,40 nm (n = 500) e partículas em forma de bastões com diâmetro médio de 134,96 nm (n = 52). O histograma de

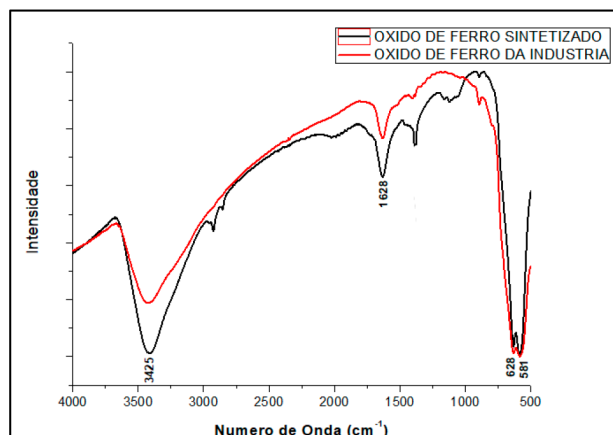


Figura 4. Espectros obtidos das amostras de óxido de ferro sintetizado e óxido de ferro industrial.

distribuição do diâmetro da amostra de óxido industrial pode ser observado na Figura 6b. Observa-se na Figura 6b que os valores da média (26,66 nm), do desvio padrão ($\pm 53,69$ nm) e do ID (4,06) para o diâmetro da amostra foi severamente afetado pelas partículas com diferentes morfologias. O índice de dispersão calculado para a amostra de óxido de ferro industrial é maior que 0,7 e tal valor indica que a amostra é polidispersa.³¹

Na Figura 7 são apresentados os difratogramas dos dados obtidos pela técnica de difração de raios X para as amostras de óxidos de ferro sintetizado e industrial. Na amostra de óxido de ferro industrial é observado um pico de maior intensidade em $33,34^\circ$ (2θ) correspondente a reflexão do plano cristalino (104). Para o difratograma do óxido de ferro sintetizado, o pico de difração mais intenso observado está em $35,74^\circ$ (2θ) ao qual corresponde a reflexão do plano cristalino (311). Pelas análises dos difratogramas é possível prever a existência da fase cristalina de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematita com carta cristalográfica referente a JCPDS-33-0664) que foi evidenciada pelo característico pico de maior intensidade em $33,34^\circ$ para o óxido de ferro industrial, e a presença da fase cristalina referente a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ maghemita (carta cristalográfica igual a JCPDS-391346) atribuído ao pico de maior intensidade em $35,74^\circ$ para o óxido de ferro sintetizado. O tamanho médio dos cristalitos (D_{drx}) das amostras foram calculados a partir da largura a meia altura

do pico de maior intensidade (FWHM). Esses dados foram utilizados na Equação de Scherrer, Equação 2.

$$D_{\text{DRX}} = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Equação 2. Equação de Scherrer

Na equação de Scherrer, k é a constante de proporcionalidade que apresenta valor igual a 0,9, este valor está relacionado com a forma esférica da partícula; λ é o comprimento de onda da radiação CuK α (1,54818Å); β é o resultado da diferença entre a largura à meia altura do pico mais intenso (B) e a largura intrínseca do cristal padrão feito de silício (b), no qual pode representado por $(B^2 - b^2)^{1/2}$; θ é o ângulo de difração de Bragg do pico mais intenso. O óxido de ferro sintetizado e o óxido de ferro industrial apresentaram dimensões médias de cristalitos de 9,15 e 37,84 nm respectivamente. Por apresentarem sinais de difração que se sobrepõem foi necessário a realização de espectroscopia de Mössbauer para realizar a distinção entre as fases magnetita e/ou maghemita, para caracterização do óxido de ferro sintetizado.

Os espectros Mössbauer das amostras de óxido de ferro industrial (Figura 8) e óxido de ferro sintetizado (Figura 9) foram obtidos à temperatura ambiente (298 K) e os parâmetros ajustados foram os valores de deslocamento

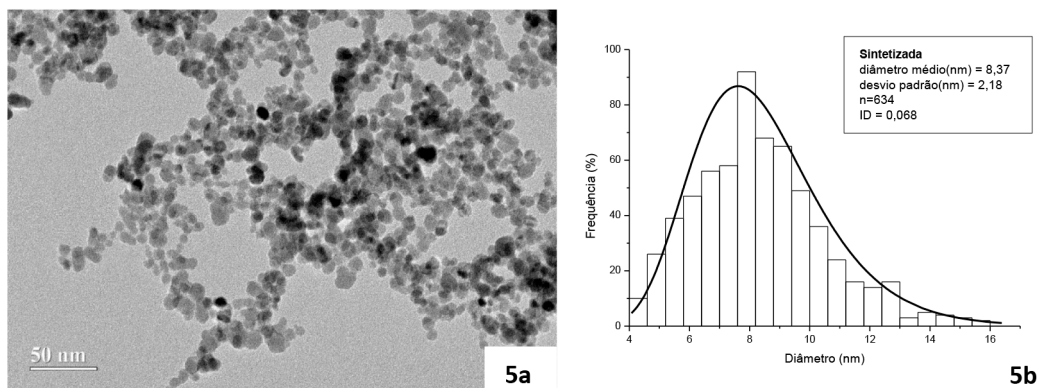


Figura 5. (a) Micrografia obtida por MET e (b) Histograma da amostra de óxido de ferro sintetizado

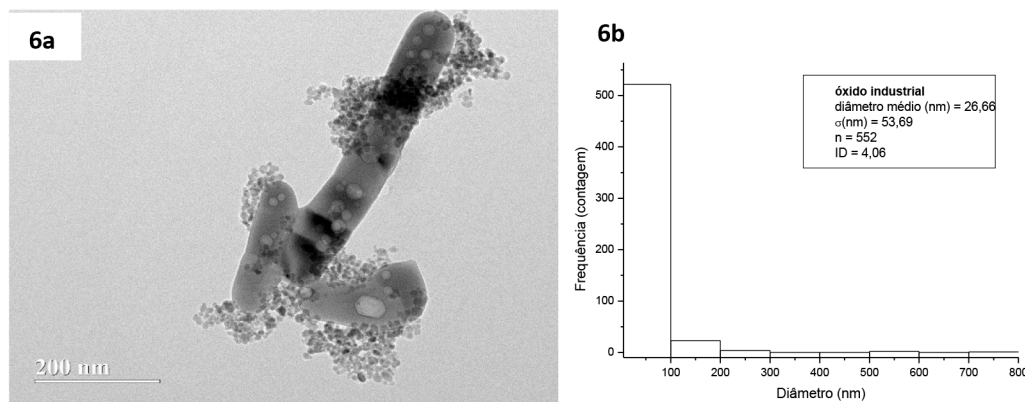


Figura 6. (a) Micrografia obtida por MET e (b) Histograma da amostra de óxido de ferro da indústria

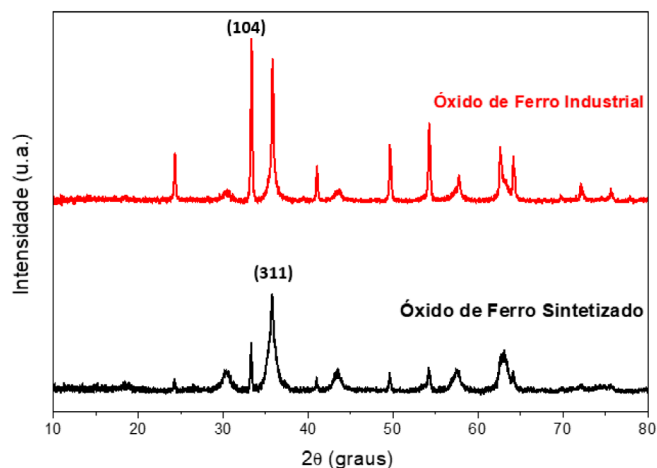


Figura 7. Difragramas das amostras de óxido de ferro sintetizado (---) e óxido de ferro industrial (---)

isomérico (DI), desdobramento quadrupolar (DQ), campo magnético hiperfino (B_{hf}) e área relativa (%).

Por meio da espectroscopia Mössbauer do óxido de ferro industrial foi possível confirmar a presença de 100 % de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) através dos parâmetros ajustados (Tabela 2). À temperatura ambiente, as hematitas ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são magneticamente ordenadas e podem ser reconhecidas por apresentarem campo magnético hiperfino relativamente alto. Na literatura é observado que a hematita pura apresenta $B_{\text{hf}} = 51,8$ T, $DI = 0,37$ mm s⁻¹, e $DQ = -0,22$ mm s⁻¹. Observa-se que não foi identificada nenhuma absorção na parte central do espectro, o que remete afirmar a ausência de fenômenos de superparamagnetismo.^{21,38-40}

A espectroscopia Mössbauer do óxido de ferro sintetizado sugere a presença de fase de maghemita na amostra através dos parâmetros ajustados utilizando dois sextetos (Tabela 2). É possível observar um relaxamento superparamagnético dominante mais intenso, o que sugere a dispersidade do tamanho da amostra com consequente distribuição do campo hiperfino. Em temperatura ambiente o espectro Mössbauer de maghemita consiste em um sexteto de linhas largas, o que indica a existência de múltiplos sítios em sua estrutura. O B_{hf} é característico para íons ferro(III)

spin alto com valores assumidos na faixa de 45 a 52T, $DI = 0,32$ mm s⁻¹ e $DQ = 0,02$ mm s⁻¹. Os parâmetros hiperfinos associados ao segundo sexteto estão dentro da faixa de valores característicos da fase maghemita.³⁹⁻⁴²

Para o método analítico de cromatografia desenvolvido nesse estudo, inicialmente foram testados os parâmetros de adequabilidade ideal do sistema (DPR área, DPR tempo de retenção, assimetria de pico, pratos teóricos) e os parâmetros de validação (seletividade, linearidade, precisão, exatidão) de acordo com o ICH (*International Conference on Harmonisation – Comitê mundial Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano*), RDC 166 ANVISA (Agência Nacional brasileira de Vigilância da Saúde). Os resultados estão mostrados na Tabela 3. Na Figura 10 está representado o cromatograma do MTK na presença de suas impurezas conhecidas.

O cromatograma da Figura 10 apresenta uma satisfatória separação entre MTK e suas impurezas conhecidas pois os resultados dos parâmetros para de adequação do sistema indicaram que o método é adequado para continuidade aos estudos de estabilidade do MTK, devido ao desvio padrão relativo (DPR) das injeções apresentar-se menor

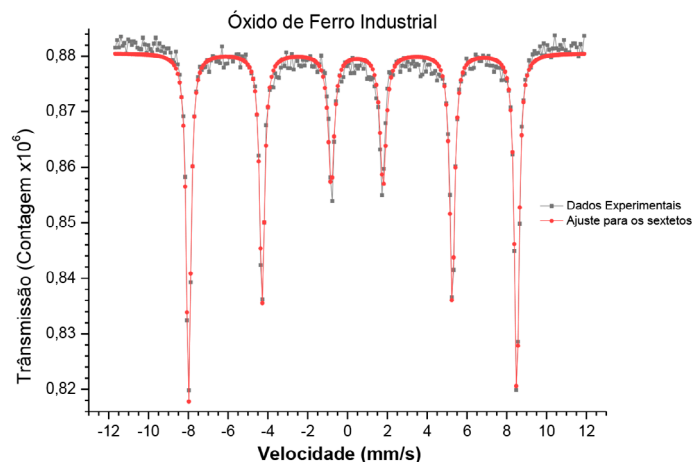


Figura 8. Espectro Mössbauer para a amostra de óxido de ferro industrial

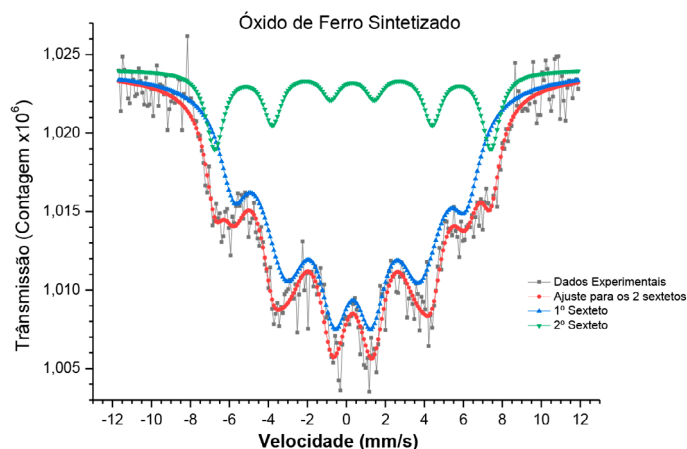


Figura 9. Espectro Mössbauer para a amostra de óxido de ferro sintetizado

Tabela 2. Parâmetros ajustados dos espectros de Mössbauer das amostras de óxido de ferro industrial e óxido de ferro sintetizado.

Amostra	DI (mm/s)	DQ (mm/s)	B _{hf} (Tesla)	Razão A/B	Conclusão
Óxido de Ferro Industrial	0,3738 (±0,0010)	0,2250 (±0,0021)	51,2410 (±0,0081)	100%	Hematita
Óxido de Ferro Sintetizado	0,3194 (±0,0346)	0,0253 (±0,0681)	45,0030 (±0,3351)	74,7% A 25,3% B	Maghemita

que 2 para área e tempo de retenção, assimetria do pico de MTK menor que 2, os pratos teóricos igual 12735 o que está intrinsicamente ligado a alta eficiência da coluna cromatográfica, e a resolução entre os picos das impurezas e do fármaco. O método apresentou-se validado através dos parâmetros de precisão, linearidade e exatidão visto que tais

apresentaram resultados de recuperação e resposta linear com coeficiente de correlação igual a 0,99991.

Para a avaliação do perfil de degradação do MTK analisou-se as amostras submetidas às condições de estresse correlacionando com as amostras controle (sem contato com degradantes). O fármaco foi submetido as condições: hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, calor seco

Tabela 3. Resultados obtidos para os parâmetros de validação

Parâmetro	Critério de Aceitação	Resultado Obtido
Adequabilidade do Sistema	DPR Área < 2,0 %	DPR Área = 0,073
	DRP Tempo Retenção < 2,0 %	DRP Tempo Retenção = 0,087
	Pratos Teóricos > 2000	12735
	Assimetria < 2,0	0,97
Precisão – Repetibilidade	DPR Área < 10 %	Inter DPR = 1,97 Intra DPR = 1,80
	Precisão – Intermediária	DPR Área < 10 %
Linearidade	Coefficiente (r) > 0,99	(r) = 0,99991
Exatidão	Recuperação 90 % - 110 %	Média = 105,45 %

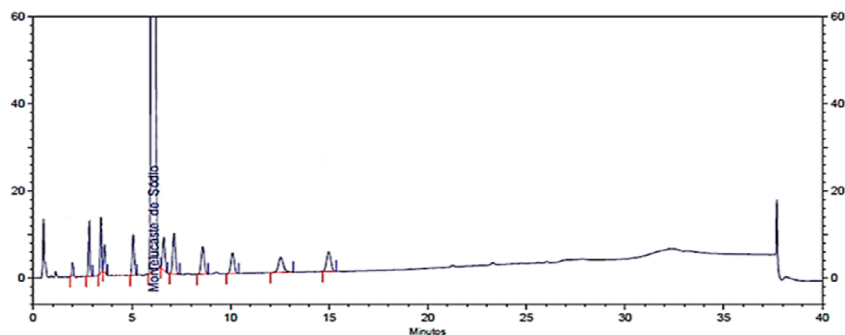


Figura 10. Cromatograma do MTK com as Impurezas

(térmica seca), umidade e fotólise. O MTK apresentou susceptibilidade, decaimento acima de 10 % do teor do fármaco, nas seguintes condições: hidrólise ácida, meio oxidativo e meio fotolítico, sendo esta última condição a mais crítica de degradação do MTK.

Observa-se pela Tabela 4 que na condição ácida houve a redução do teor do fármaco para 87,00 % para matéria-prima e 89,02 % para o comprimido mastigável. As reações de hidrólise são, tipicamente, catalisadas por ácido ou base. Tais condições devem, portanto, ser empregadas para induzir potenciais reações hidrolíticas e isto é especialmente importante quando o composto que está sendo testado possui grupos funcionais ionizáveis, como o MTK, além de poder existir em diferentes estados de ionização em condições aquosas relevantes.¹²

Sob condições ácidas, agrupamentos orgânicos como as hidroxilas podem ser eliminados em uma reação de desidratação. Conforme a literatura, a hidrólise da ligação carbono oxigênio da hidroxila (C-OH) presente na molécula de MTK é a principal transformação prevista para o meio ácido, levando a formação da impureza 5 conforme demonstrado na Figura 11. Contudo a condição ácida do meio promoverá uma desidratação do álcool ternário na qual o degradante ácido (HCl) irá estabelecer uma cisão heterolítica da ligação C-OH levando à formação de sua correspondente olefina, denominada de estireno, mais água.^{5,16}

Observa-se a degradação do princípio ativo em ambas as categorias (matéria-prima e comprimido mastigável), sendo que no comprimido mastigável o MTK degradou-se menos que em relação ao MTK em matéria-prima, fato esse que se explica por meio da proteção que os excipientes do produto acabado conferem ao princípio ativo. A impureza majoritária observada nessa condição foi a impureza 5 com

uma porcentagem de formação de 11,96 % para IFA MTK e 6,54 % para produto acabado.

O MTK mostrou-se suscetível também na condição oxidativa. Nestes estudos de degradação forçada o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é largamente utilizado para avaliar o comportamento do fármaco diante de condições oxidativas. A degradação oxidativa se dá por três etapas: auto-oxidação, oxidação mediada por peróxido e oxidação mediada por transferência de elétrons. A auto-oxidação se dá, principalmente, devido à presença de hidroperóxidos orgânicos existentes em concentrações muito pequenas (nanomol por grama) em alguns excipientes, sendo, também, induzidas pela luz ou por metais. Embora tenha experimentos específicos utilizando iniciador de radicais, observa-se que existe uma relação entre auto-oxidação com oxidação mediado por peróxido, oxidação mediada por transferência de elétrons, fotólise e até termólise.²⁸

Na estrutura química do MTK observa-se a presença de um átomo de enxofre que, segundo a literatura de Dufresne *et al.*, 1996, é suscetível à oxidação por peróxidos, oxigênio molecular e outros processos de oxidação. Tal fato se explica devido este tioéter ser nucleofílico, levando à rápida reação com os locais eletrofílicos disponíveis.^{6,17}

É observado na Tabela 4, que o princípio ativo foi degradado em ambas as condições matéria-prima e comprimido mastigável, com redução de teor de 16,39% e 10,62% respectivamente. Na Figura 12, está demonstrada a representação da estrutura química do principal produto de degradação observado na condição oxidativa, a impureza 1 (MTK Sulfóxido) com 12,19 % de crescimento.

Durante os ensaios em meio fotolítico, constatou-se que o meio degradante mais crítico do fármaco se tratava

Tabela 4. Degradação do MTK IFA e comprimido mastigável nas condições induzidas

Montelucaste de Sódio Matéria Prima							
	Hidrólise ácida	Hidrólise Básica	Oxidação	Térmica Seca	Térmica úmida	Fotólise Ciclo 1	Fotólise Ciclo 2
Teor do fármaco	87,00 %	100,37 %	83,61 %	98,65 %	100,93 %	88,65 %	82,04 %
% de degradação do fármaco	13,00 %	-0,37 %	16,39 %	1,35 %	-0,93%	11,65 %	17,96 %
Montelucaste de Sódio Comprimido Mastigável							
	Hidrólise ácida	Hidrólise Básica	Oxidação	Térmica Seca	Térmica úmida	Fotólise Ciclo 1	Fotólise Ciclo 2
Teor do fármaco	89,02 %	100,50 %	89,38 %	101,00 %	99,33 %	89,36 %	81,01 %
% de degradação do fármaco	10,98 %	-0,50 %	10,62 %	-1,00 %	0,67 %	10,64 %	18,99 %

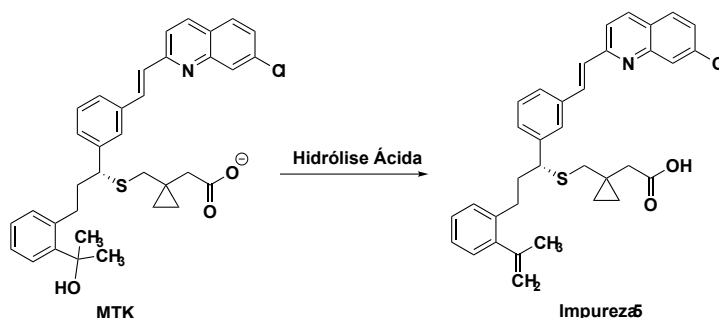
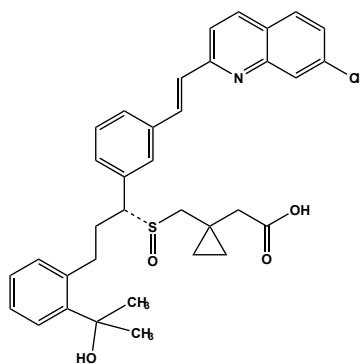


Figura 11. Formação da impureza 5



Impureza 1

Figura 12. Estrutura química da impureza 1 do MTK resultante da degradação oxidativa (MTK Sulfóxido)

de quando as substâncias eram submetidas aos ciclos de incidência de radiação da luz UV e luz branca. O pico do MTK apresentou-se uma queda do teor de MTK mais abrupta para o segundo ciclo do que para o primeiro ciclo de radiação, tanto para matéria-prima quanto produto acabado.

A principal via de degradação dessa condição sob a molécula do MTK é a fotoisomerização da dupla ligação acíclica e no agrupamento tioéter, sendo majoritariamente formadas as impurezas conhecidas 6 e 7, bem como outros produtos de degradação.¹⁶

Na literatura foi observado a formação de produtos de degradação frente à incidência de radiação de luz. Halama *et al.*, relataram a formação de quatro impurezas nomeadas pelos pesquisadores como (Z)-montelukaste, (E)-montelukaste sulfóxido e diastereoisômeros I e II.

Frente a esse cenário de extrema susceptibilidade fotolítica do fármaco MTK na condição comprimido mastigável, o fármaco poderia estar com sua atividade terapêutica comprometida. Medidas de segurança, tais como utilizar atenuantes para a fotodegradação foram tomadas a fim de evitar que o fármaco viesse a perder sua efetividade.

As amostras em MTK + película de óxido de ferro e em mistura com proporções de óxido de ferro variadas, foram sujeitas as mesmas condições fotolíticas idem ao teste de estresse do MTK matéria-prima e comprimido mastigável. Na Tabela 5 estão sendo demonstradas as porcentagens de MTK obtida após a incidência da luz na presença e na ausência de óxido de ferro.

Em sua formulação mastigável, o MTK possui 0,03 % de óxido de ferro, na qual é utilizado como corante, essa quantidade é muito baixa para fins de proteção contra fotodegradação. Em alguns países, tais como o Estados Unidos, a utilização do óxido de ferro como corante é bem limitada, sendo o máximo de ingestão por dia de 5 mg. Frente a essa legislação, foi estabelecido as proporções de óxido de ferro para esse estudo baseando-se na dosagem de fármaco no comprimido, correspondente a 5 mg. É possível observar na Tabela 5 que o MTK puro na ausência de óxido de ferro apresentou-se grande capacidade em se degradar via incidência da luz, com uma média de teor igual a 78,64 % sendo 21,36 % degradado. Esse comportamento nos remete que o fármaco pode então vir a perder sua eficiência em momentos que esteja sob o contato com a luz. Tal fato já havia sido observado também nos testes de estresse mencionados anteriormente.^{12,13}

Na Tabela 5, referente a fotodegradação na presença do óxido de ferro sintetizado, o MTK apresentou-se teores de 99,49 % e 98,59 % para óxido em película pastilhada e em mistura com o MTK respectivamente, o que indica 0,51 % e 1,41 % de redução do teor do fármaco.

A maghemita detém capacidade de refletir e dispersar a radiação UV e visível, estabelecendo assim uma maior proteção ao fármaco. O método pelo processo de recobrimento do fármaco MTK através de uma película pastilhada de óxido de ferro proporcionou maior proteção ao MTK do que em relação ao processo de preparação dos analitos MTK e óxido misturados.⁴³

Na Figura 13a observa-se o cromatograma da solução de MTK na ausência do óxido de ferro, na Figura 13b a solução do MTK na presença do óxido de ferro em película e Figura 13c a mistura entre MTK e óxido. Mesmo devido à baixa degradação do fármaco nas condições citadas houve o aparecimento de algumas impurezas conhecidas, como observado nos cromatogramas. Para a condição sem o óxido de ferro nota-se a formação de um alto percentual de impurezas como observado no cromatograma da Figura 13a.

Deste modo, em ambas as categorias, o fármaco apresentou-se resguardado da fotodegradação em relação a ausência do óxido de ferro. Portanto o óxido de ferro obtido detém uma propriedade eficaz de proteger o MTK na formulação comprimido mastigável em qualquer proporção de Fe₂O₃ (2 mg a 5 mg) respeitando a dosagem máxima diária de 5 mg óxido de ferro.

Tabela 5. Teor de MTK após fotodegradação na presença e na ausência de óxido de ferro.

MTK na presença de óxido de ferro				MTK na ausência do óxido de ferro		
Massa de MTK (mg)	Massa de Óxido de Ferro (mg)	MTK + Película de Óxido de Ferro (%)	MTK + Óxido de Ferro Misturas (%)	Massa de MTK (mg)	Massa de Óxido de Ferro (mg)	MTK (%)
20,00	8,00	99,27	98,70	20,00	0,00	74,41
20,00	16,00	99,01	97,23	20,00	0,00	79,33
20,00	20,00	100,2	99,85	20,00	0,00	82,17
Média	-	99,49	98,59	Média	-	78,64

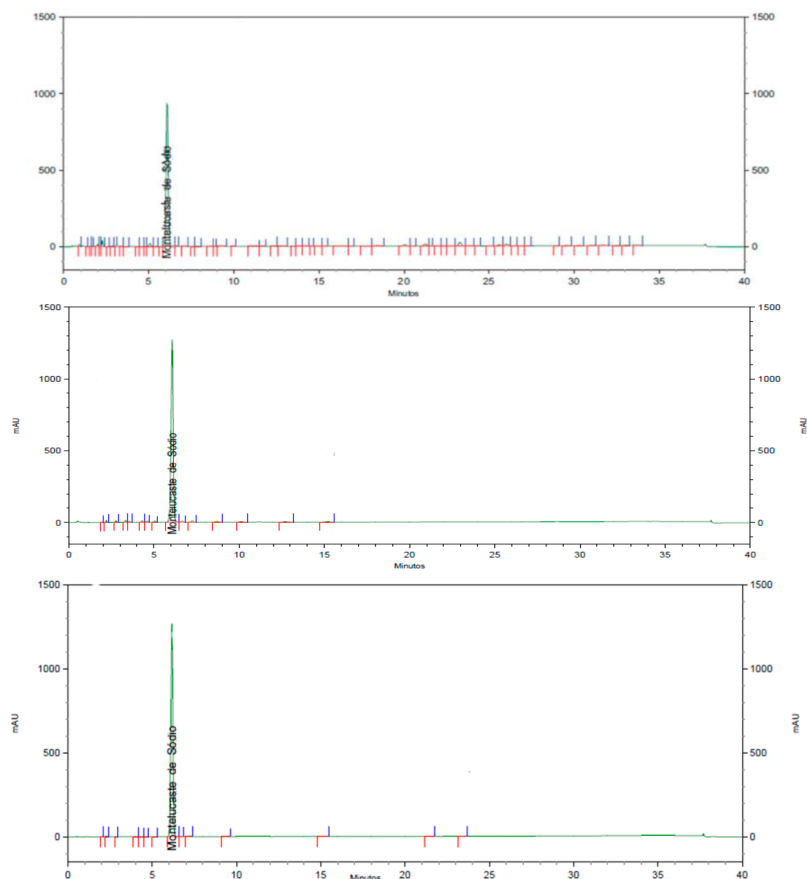


Figura 13. Cromatograma representativo da fotodegradação do MTK (a) na ausência do óxido de ferro; (b) na presença do óxido de ferro formato MTK pastilha + Óxido de Ferro pastilha e (c) na presença do óxido de ferro formato MTK + Óxido de Ferro mistura.

4. Conclusão

Com o intuito de comparar as fases formadas pelo óxido, foi feita a caracterização do óxido de ferro industrial, utilizado na indústria como corante. O óxido de ferro sintetizado foi caracterizado como sendo formado pela fase maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sendo confirmado pela técnica de difração de raios X e espectroscopia de Mössbauer. Conclui-se que o óxido de ferro industrial possui 100 % de fase hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), com partículas de diferentes formas e dimensões o que sugere a falta de controle de tamanho na síntese do corante industrial.

O método analítico cromatográfico utilizado é indicativo de estabilidade para o MTK comprimido mastigável 5 mg, sendo possível observar o perfil de degradação do fármaco frente as condições de estresse elucidando as impurezas formadas majoritariamente em cada condição. As condições em que o fármaco se apresentou suscetível foram por meio das degradações via hidrólise ácida, oxidativa e fotolítica. A condição de degradação mais crítica do MTK foi a fotolítica. A fotodegradação do fármaco em presença de 5 mg de óxido de ferro, sugere que o óxido de ferro sintetizado foi capaz de atenuar o efeito fotolítico sobre o fármaco, na formulação mastigável do MTK.

O uso do óxido de ferro como nanoexcipiente poderia ser uma alternativa para reduzir custos com o acondicionamento de fármacos fotossensíveis como MTK. Frente a este cenário o usuário, do MTK comprimido mastigável 5 mg, deveria ser orientado a não permitir que o medicamento seja mantido ao ar livre ou exposto a luz solar e/ou artificial no modo atualmente acondicionado.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela bolsa concedida. Ao Prof. Dr. Aderbal Carlos de Oliveira e Prof. Dr. Vijayendra Kumar Garg pela realização da espectroscopia Mössbauer na Universidade Nacional de Brasília (UnB). A Dra. Tatiane Oliveira dos Santos pela realização das microscopias no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução situado na Universidade Federal de Goiás (LabMic/UFG).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Referências Bibliográficas

- Blessy, M.; Patel, R.D.; Prajapati, P.N.; Agrawal, Y. K.; Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2014**, *4*, 159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rashmitha, N.; Raj, T. J. S.; Srinivas, C. H.; Srinivas, N.; A Validated RP-HPLC Method for the Determination of Impurities in Montelukast Sodium. *E-journal of Chemistry* **2010**, *2*, 555. [[Link](#)]
- Rasheed, A.; Ahmed, O.; Analytical Separation and Characterisation of Degradation Products and the Development and Validation of a Stability-Indicating Method for the Estimation of Impurities in Montelukast Oral Dosage Formulation. *International Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research* **2013**, *2*, 69. [[CrossRef](#)]
- Krupali, K. P.; Bhumika, S.; Shailesh, V. L.; Sachin B. N.; Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method for Montelukast Sodium and Desloratadine in Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research* **2016**, *3*, 291. [[Link](#)]
- Mokhtari, A. J.; Hosseini, N.; Yavari, I.; Rouhani, M.; Development of an efficient and practical approach for the synthesis of Montelukast Sodium Intermediate. *Science and Research Branch* **2010**, *2*, 12. [[CrossRef](#)]
- Dufresne, C.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Ruel, R.; Trimble, L.; Labelle, M.; Synthesis of Montelukast (MK-0476) Metabolic Oxidation Products. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *2*, 8518. [[CrossRef](#)]
- Al Omari, M. M.; Zoubi, R. M.; Hasan, E. I.; Khader, T. Z.; Badwan, A. A.; Effect of light and heat on the stability of montelukast in solution and in its solid state. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *45*, 465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aboulkhair, M.; Nofal, A.; Mardini, M. A.; Identification of Potential Impurities of Montelukast Imported to Syria by LC-MS and HPLC-UV. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2013**, *1*, 48. [[Link](#)]
- Priyanka, K.; Abdul, H. S. A.; Preparation and Evaluation of Montelukast Sodium Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *Journal of Young Pharmacists* **2015**, *4*, 129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mastanaiah, T.; Jayapal, R. S.; Surya, N.; Rao, P. R. A.; Stability Indicating Assay Method for Montelukast Sodium in Pharmaceutical Formulations by RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2011**, *8*, 1373. [[Link](#)]
- Halama, A.; Bouskova, O.; Gibala, P.; Jirman, J.; CZ. Pardubice EP2260025A2 **2009**.
- Rowe, R. C.; Sheskey, P. J.; Quinn, M. E.; *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6a ed., Alpha: Londres, 2009.
- Monteiro, A. S. C. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade da Beira Interior, 2013. [[Link](#)]
- Yoshioka, S.; Stella, V. J.; *Stability of Drugs and Dosage Forms*, 1a ed., Kluwer Academic: Londres, 2002.
- Saravanan, M.; Siva, K. K.; Pratap, R. P.; Naidu, M. N.; Moses, B. J.; Srivastava, A. K.; Lakshmi, K. T.; Chandra, S. B. V.; Satyanarayana, B.; Identification, synthesis, isolation and spectral characterization of potential impurities of montelukast sodium. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, *48*, 708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Halama, A.; Jirman, J.; Boušková, O.; Gibala, P.; Jarrah, A. K.; Improved Process for the Preparation of Montelukast: Development of an Efficient Synthesis, Identification of Critical Impurities and Degradants. *Organic Process Research & Development* **2010**, *14*, 425. [[CrossRef](#)]
- Baertschi, S. W.; Alsante, K. M.; Reed, R. A.; *Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation*. 2a ed., Informa Healthcare: Londres, 2011.
- Caixeta, D. A.; Ferreira, L. A.; Blister Farmacêutico: A Influência da Cor e dos Tipos de Filmes no Acondicionamento de Medicamentos. *Academic Vision* **2016**, *3*, 91. [[Link](#)]
- Pounikar, A. R.; Umekar, M. J.; Gupta, K. R.; Genotoxic impurities: an important regulatory aspect. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **2020**, *13*. [[CrossRef](#)]
- Emerce, E.; Cok, I.; Degim, I. T.; Determination of the impurities in drug products containing montelukast and in silico/in vitro genotoxicological assessments of sulfoxide impurity. *Toxicology Letters* **2015**, *2*, 238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cornell, R.M.; Schwertmann, U.; *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reaction, Occurrences and Uses*. 2a ed, Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
- Michael, J. B.; Shu, H.; Wonjoong, H.; Rema, Z.; Kyle, C.; Manuel, P. S.; Robert, T.; Bing, G.; Internalization of Carbon Black and Maghemite Iron Oxide Nanoparticle Mixtures Leads to Oxidant Production. *Chemical Research in Toxicology* **2010**, *23*, 1874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Balbani, A. P. S.; Stelzer, L. B.; Montovani, J. C.; Pharmaceutical excipients and the information on drug labels. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* **2006**, *3*, 400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lunin, A. V.; Kolychev, E. L.; Mochalova, E. N.; Cherkasov, V. R.; Nikitin, M. P.; Synthesis of highly-specific stable nanocrystalline goethite-like hydrous ferric oxide nanoparticles for biomedical applications by simple precipitation method. *Journal of Colloid and Interface Science* **2019**, *541*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Domingues, D. D.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual Paulista, 2019. [[Link](#)]
- Lewis, R. J.; *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*. 12a ed, Wiley: London, 2012.
- Baertschi, S. W.; *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*. 5a ed, Taylor&Francis: Indianápolis, 2005.
- Ferreira, Q. S.; Silva, S. W.; Santos, C. M. B.; Ribeiro, G. C.; Guilherme, L. R.; Morais, P. C. Rifampicin adsorbed onto magnetite nanoparticle: sers study and insight on the molecular arrangement and light effect. *Journal of Raman Spectroscopy* **2015**, *46*, 765. [[CrossRef](#)]
- Khalafalla, S.; Reimers, G.; Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. *Ieee Transactions on Magnetics* **1980**, *16*, 178. [[CrossRef](#)]
- van Ewijk, G. A.; Vroege, G. J.; Philipse, A. P.; Convenient preparation methods for magnetic colloids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1999**, *201*, 31. [[CrossRef](#)]
- International Organization for Standardization, United Nations Industrial Development Organization, Particle Size Analysis — Dynamic Light Scattering (DLS). ISO 22412:2017.
- Klein, A. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. [[Link](#)]

33. Li, W.; Qiao, X.; Zheng, Q.; Zhang, T.; One-step synthesis of MFe₂O₄ (M=Fe, Co) hollow spheres by template-free solvothermal method. *Journal of Alloys and Compounds* **2011**, *509*, 6206. [[CrossRef](#)]
34. Ma, M.; Zhang, Y.; Yu, W.; Shen, H.Y.; Zhang, H.Q.; Gu, N.; Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids and Surfaces* **2003**, *212*, 219. [[CrossRef](#)]
35. Maity, D.; Agrawal, D. C.; Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, *308*, 46. [[CrossRef](#)]
36. Ercuta, A.; Chirita, M.; Highly crystalline porous magnetite and vacancy-ordered maghemite microcrystals of rhombohedral habit. *Journal of Crystal Growth* **2013**, *380*, 182. [[CrossRef](#)]
37. Caiado, K. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Goiás, 2014. [[Link](#)]
38. Murad, E.; *Mössbauer Spectroscopy, Handbook of Clay Science*, 2a ed, Elsevier: Marktredwitz, 2013.
39. Gonçalves, C. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Viçosa, 1997. [[Link](#)]
40. Stevens, J. G.; Khasanov, A. M.; Miller, J. W.; Pollak, H.; Li, Z.; *Mössbauer Mineral Handbook*, 1a ed, University of North Carolina: Asheville, 2005.
41. Araújo, P. P.; Garg, V. K.; Oliveira, A. C.; Lima, E. C. O.; Guilherme L. R.; Cintra, D. O. S.; Morais, P. C.; Mössbauer study of magnetic nanoparticles encapsulated in vermiculite. *Revista Mexicana de Física* **2012**, *2*, 4. [[Link](#)]
42. Silva, F. D.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008. [[Link](#)]
43. Kwon-Jai, L.; Jeung-Hee, A. N.; Jae-Soo, S.; Dong-Hee, K., Changman, K.; Hajime, O.; Jae-Gui, K.; Protective effect of maghemite nanoparticles on ultraviolet-induced photo-damage in human skin fibroblasts. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]