

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FERNANDA MACKE HELLWIG

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DA ESTABILIDADE, ENSAIO
DE DISSOLUÇÃO E ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE E
CITOTOXICIDADE DO CIPROFIBRATO EM FORMAS FARMACÊUTICAS**

Uruguiana

2014

FERNANDA MACKE HELLWIG

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DA ESTABILIDADE, ENSAIO
DE DISSOLUÇÃO E ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE E
CITOTOXICIDADE DO CIPROFIBRATO EM FORMAS FARMACÊUTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik

Uruguaiiana

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

H477d Hellwig, Fernanda Macke
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DA
ESTABILIDADE, ENSAIO DE DISSOLUÇÃO E ESTUDO
PRELIMINAR DA ESTABILIDADE E CITOTOXICIDADE
DO CIPROFIBRATO EM FORMAS FARMACÊUTICAS /
Fernanda Macke Hellwig.
98 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2014.
"Orientação: Marcelo Donadel Malesuik".

1. Ciprofibrato. 2. Validação de métodos analíticos. 3.
Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Estabilidade. 5.
Citotoxicidade. I. Título.

FERNANDA MACKE HELLWIG

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DA ESTABILIDADE, ENSAIO
DE DISSOLUÇÃO E ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE E
CITOTOXICIDADE DO CIPROFIBRATO EM FORMAS FARMACÊUTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Dissertação defendida e aprovada em 25 de Julho de 2014.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
Orientador
UNIPAMPA

Profa. Dra. Cássia Virginia Garcia
UFRGS

Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus pais Armando e Rosa Maria e minha irmã Juliana, pelo carinho, exemplo, apoio, oportunidade e incentivo;

Ao Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik pela orientação, paciência, ensinamentos e disponibilidade para resolver qualquer problema relacionado ao trabalho.

Aos colegas do LDCQ, pelo apoio, ideias, convivência e colaboração no desenvolvimento do trabalho, em especial ao acadêmico Rafael Henrique Dias Reis e a farmacêutica Suzana Del Rosso Barbosa.

As colegas de graduação e pós graduação, especialmente as amigas Aryele, Camila G., Camila K. e Marí, pelas horas de estudo e discussões, pela convivência, incentivo e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Michel Mansur Machado, a mestre Camila Guez, ao acadêmico Raul Oliveira de Souza e a todo pessoal do Laboratório Nubiotoxim pela disponibilidade e ajuda na realização dos testes de citotoxicidade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Desenvolvimento de método indicativo da estabilidade, ensaio de dissolução e estudo preliminar da estabilidade e citotoxicidade do ciprofibrato em formas farmacêuticas

O ciprofibrato é um fármaco hipolipemiante amplamente utilizado para o tratamento de hipertrigliceridemia. Encontra-se comercialmente disponível na forma de comprimidos e cápsulas manipuladas, e, até o momento, não existem monografias oficiais para o controle de qualidade em suas formas farmacêuticas. O presente trabalho objetivou o desenvolvimento e validação de método cromatográfico indicativo de estabilidade para análise quantitativa do ciprofibrato nas formas farmacêuticas comerciais, desenvolvimento de ensaio de dissolução, avaliação da estabilidade do fármaco em condições de degradação forçada, contemplando a determinação da cinética de fotodegradação e o estudo da citotoxicidade do fármaco em presença dos produtos de degradação. A validação do método analítico foi realizada de acordo os principais Guias Oficiais, considerando os seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. O método cromatográfico descrito nesse trabalho demonstrou-se adequado para determinação de ciprofibrato em comprimidos e cápsulas manipuladas. O método de dissolução foi desenvolvido e validado para avaliação da liberação do fármaco em comprimidos seguindo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. O meio utilizado foi ácido clorídrico com adição de 1 % de lauril sulfato de sódio, aparato pás, rotação de 50 rpm e quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta. A cinética de fotodegradação em acetonitrila, frente à luz UVC 254 nm apresentou reação de segunda ordem para a matéria-prima e ambas as formas farmacêuticas. A avaliação da citotoxicidade indicou que a amostra de ciprofibrato na presença dos produtos de degradação obtidos na fotólise não aumenta seu efeito tóxico quando comparado ao fármaco intacto. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância do aprofundamento dos estudos nesta área para garantir a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos comercializados.

Palavras-chave: ciprofibrato, validação de métodos analíticos, cromatografia líquida de alta eficiência, estabilidade, método de dissolução, citotoxicidade.

ABSTRACT

Development of a stability-indicating method, dissolution assay and preliminary study of ciprofibrate stability and cytotoxicity in pharmaceutical formulations

Ciprofibrate is a hypolipidemic drug widely used to treat hypertriglyceridemia. It is commercially available as tablets and capsules, and, nowadays, there are no official monographs regarding the quality control to this drug in its pharmaceutical forms. The present study aimed to develop and validate a stability indicating chromatographic method for quantitative analysis of ciprofibrate in commercial pharmaceutical forms, development of the dissolution test, to evaluate the drug stability under forced degradation, comprising the determination of the photodegradation kinetics and the study of drug cytotoxicity in the presence of the degradation products. The validation of the analytical method was performed according to parameters described in the Official Guides considering the following analytical parameters: specificity, linearity, precision, accuracy and robustness. The method described in this work had demonstrated to be adequate for ciprofibrate determination in tablets and capsules. The dissolution study was conducted by paddle method (50 rpm) at $37 \pm 0,5$ °C in 900 mL of hydrochloric acid with addition of 1 % sodium lauryl sulfate, and quantification by spectrophotometry in the ultraviolet. The photodegradation kinetics in acetonitrile under UVC light showed a second-order kinetics for the raw material and both dosage forms. The cytotoxicity evaluation indicated that the ciprofibrate sample in the presence of the degradation products obtained under photolysis does not increase its toxic effect when compared to the intact drug. The results demonstrate the importance of this type of study to ensure the safety and efficacy of marketed pharmaceutical products.

Keywords: ciprofibrate, validation of analytical methods, high-performance liquid chromatography, stability, dissolution method, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura química do CPF	20
Figura 3.1 – Cromatogramas da solução SQR de CPF nas fases móveis testadas com 65 % de ACN e 35 % de: a) ácido <i>o</i> -fosfórico 0,1 % (v/v) pH 5,0; b) ácido <i>o</i> -fosfórico 0,1 % (v/v) pH 4,0; c) ácido <i>o</i> -fosfórico 0,1 % (v/v) pH 3,0; d) ácido <i>o</i> -fosfórico 0,1 % (v/v) pH 2,0; e) água purificada e f) metanol.....	31
Figura 3.2 – Cromatogramas da solução SQR de CPF utilizando como fase móvel ACN e ácido <i>o</i> -fosfórico 0,1 % (v/v) pH 2,0 nas seguintes proporções: a) 80:20, b) 65:35 e c) 50:50	31
Figura 3.3 – Cromatogramas sobrepostos da solução de SQR (a), ASE de comprimidos (b) e ASE de cápsulas (c).....	32
Figura 3.4 – Cromatograma da solução de matéria-prima de CPF em HCl 1 M, na concentração teórica de 20,0 µg mL ⁻¹ , após 4 h em refluxo.....	33
Figura 3.5 – Cromatograma da solução de matéria-prima de CPF em NaOH 1 M, na concentração teórica de 20,0 µg mL ⁻¹ , após 7 h em refluxo.....	34
Figura 3.6 – Cromatograma da solução de matéria-prima de CPF em H ₂ O ₂ 30 V, na concentração teórica de 20,0 µg mL ⁻¹ , após 3 h em refluxo.....	34
Figura 3.7 – Cromatograma da solução de matéria-prima de CPF em ACN, na concentração teórica de 20,0 µg mL ⁻¹ , após 90 minutos de exposição a luz UV 254 nm.....	35
Figura 3.8 – Representação gráfica da curva padrão do CPF.....	36
Figura 4.1 – Perfis de dissolução de comprimidos de CPF nos meios: a) tampão acetato pH 4,0; b) tampão fosfato pH 5,8; c) tampão fosfato pH 6,0; d) tampão fosfato pH 6,5; e) tampão fosfato pH 6,8 e f) tampão fosfato pH 7,4	54
Figura 4.2 – Perfis de dissolução de comprimidos de CPF nos meios: a) HCl 0,01 M + LSS 0,5 % (900 mL de meio), b) HCl 0,01 M + LSS 0,5 % (1000 mL de meio); c) HCl 0,01 M + LSS 0,75 %; d) HCl 0,01 M + LSS 1 % (50 rpm); e) HCl 0,01 M + LSS 1 % (75 rpm); f) HCl 0,1 M + LSS 0,5 % e g) LSS 0,025 M.....	54
Figura 4.3 – Sobreposição dos espectros de absorção na região do UV das soluções: a) CPF SQR e b) ASE, no meio de dissolução HCl 0,01 M + LSS 1 %	56
Figura 4.4 – Representação gráfica da curva padrão do CPF.....	57

Figura 4.5 – Representação gráfica das porcentagens dissolvidas dos comprimidos de CPF, empregando aparato pás, 50 rpm, em meio HCl 0,01 M + LSS 1 % a 37 °C ± 0,5 °C avaliados por espectrofotometria na região do UV (n = 12)	60
Figura 5.1 – Cromatogramas obtidos das soluções de matéria-prima (a), comprimidos (b) e cápsulas (c) na concentração teórica de 20,0 µg mL ⁻¹ no tempo zero.....	72
Figura 5.2 – Cromatogramas obtidos das soluções de matéria-prima (a), comprimidos (b) e cápsulas (c) na concentração teórica de 20,0 µg mL ⁻¹ após exposição a luz UV 254 nm, por 90 minutos	72
Figura 5.3 – Representação gráfica da cinética de ordem zero para degradação de CPF matéria-prima, comprimidos e cápsulas, em condições fotolíticas	76
Figura 5.4 – Representação gráfica da cinética de primeira ordem para degradação de CPF matéria-prima, comprimidos e cápsulas, em condições fotolíticas	77
Figura 5.5 – Representação gráfica da cinética de segunda ordem para degradação de CPF matéria-prima, comprimidos e cápsulas, em condições fotolíticas	78
Figura 6.1 – Efeito do CPF e da mistura de produtos de degradação, formados nas condições fotolíticas, na proliferação celular em cultura de leucócitos humanos (n = 3).....	88
Figura 6.2 – Efeito do CPF e da mistura de produtos de degradação, formados nas condições fotolíticas, na viabilidade celular em cultura de leucócitos humanos (n = 3)	89
Figura 6.3 – Efeito do CPF e da mistura de produtos de degradação, formados nas condições fotolíticas, no teste de MN em cultura de leucócitos humanos (n = 3)	89
Figura 6.4 – Efeito do CPF e da mistura de produtos de degradação, formados nas condições fotolíticas, no ensaio cometa em cultura de leucócitos humanos (n = 3).....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Parâmetros para execução do método por CLAE	26
Tabela 3.2 – Resultados da estabilidade do CPF nos estudos de degradação forçada e em condições regulares de análise	33
Tabela 3.3 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão do CPF	35
Tabela 3.4 – ANOVA das áreas obtidas para a determinação da curva padrão do CPF	36
Tabela 3.5 – Valores experimentais referentes à determinação de CPF em comprimidos	37
Tabela 3.6 – Valores experimentais referentes à determinação de CPF em cápsulas	37
Tabela 3.7 – Valores experimentais obtidos referentes à precisão intermediária na determinação de CPF em comprimidos e cápsulas por CLAE	38
Tabela 3.8 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado em ASE de comprimidos de CPF	38
Tabela 3.9 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado em ASE de cápsulas de CPF	39
Tabela 3.10 – Valores experimentais obtidos na análise da robustez do método realizado em comprimidos e cápsulas de CPF (n = 3)	39
Tabela 4.1 – Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos contendo CPF	47
Tabela 4.2 – Preparo da curva padrão para avaliação da linearidade do método analítico, por espectrofotometria na região do UV, para o método de dissolução dos comprimidos de CPF	51
Tabela 4.3 – Parâmetros estabelecidos para o ensaio de dissolução	55
Tabela 4.4 – Resultados referentes à determinação da influência dos filtros na determinação das soluções de SQR e amostras dos comprimidos de CPF em HCl 0,01 M + LSS 1 % (n = 3)	55
Tabela 4.5 – Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade das soluções de SQR e amostras dos comprimidos de CPF em HCl 0,01 M + LSS 1 % (n = 3)	56

Tabela 4.6 – Valores de absorvância obtidos na determinação da curva padrão do CPF SQR	57
Tabela 4.7 – ANOVA das absorvâncias obtidas para a determinação da curva padrão do CPF SQR	58
Tabela 4.8 – Valores experimentais referentes à determinação da porcentagem dissolvida de CPF em comprimidos	58
Tabela 4.9 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado em ASE de comprimidos de CPF	59
Tabela 4.10 – Valores experimentais obtidos na análise da robustez do método de dissolução	59
Tabela 4.11 – Valores de eficiência de dissolução (%), DPR e ANOVA de comprimidos de CPF	61
Tabela 4.12 – Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para os comprimidos de CPF	61
Tabela 5.1 – Áreas obtidas no tempo zero e após exposição da solução matéria-prima de CPF à luz UV 254 nm	73
Tabela 5.2 – Áreas obtidas no tempo zero e após exposição da solução de comprimidos de CPF à luz UV 254 nm	73
Tabela 5.3 – Áreas obtidas no tempo zero e após exposição da solução de cápsulas de CPF à luz UV 254 nm	74
Tabela 5.4 – Valores de C, Log C e 1/C obtidos na análise da solução de matéria-prima para construção dos gráficos e definição da ordem da reação	74
Tabela 5.5 – Valores de C, Log C e 1/C obtidos na análise da solução de comprimidos para construção dos gráficos e definição da ordem da reação	75
Tabela 5.6 – Valores de C, Log C e 1/C obtidos na análise da solução de cápsulas para construção dos gráficos e definição da ordem da reação	75
Tabela 5.7 – Parâmetros cinéticos calculados para comprimidos e cápsulas	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ASE	Amostra simulada de excipientes
C	Concentração
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPF	Ciprofibrato
DAD	Diode array detector
DNA	Deoxyribonucleic acid
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
FB	Farmacopeia Brasileira
FDA	Food and Drug Administration
GL	Graus de liberdade
h	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	High density lipoprotein
ICH	International Conference on Harmonisation
LDL	Low density lipoprotein
LMP	Low melting point
LSS	Lauril sulfato de sódio
M	Molar
MN	Micronúcleo
nm	Nanometro
PBS	Tampão fosfato pH 7,2

pH	Potencial hidrogenionico
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPREs	Peroxisome proliferator response elements
rpm	Rotações por minuto
RXR	Retinoic X receptor
SQR	Substância química de referência
TG	Triglicerídeos
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
VIS	Vísivel
VLDL	Very low density lipoprotein
°C	Grau centígrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Objetivos.....	19
1.1.1	Objetivo geral	19
1.1.2	Objetivos específicos	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	Ciprofibrato.....	20
2.1.1	Descrição (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2013):.....	20
2.1.2	Mecanismo de ação.....	21
2.1.3	Farmacocinética	21
2.1.4	Efeitos adversos	22
2.1.5	Métodos de análise para determinação quantitativa	22
3	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO CIPROFIBRATO	24
3.1	Introdução	24
3.2	Substância química de referência (SQR).....	24
3.3	Matéria-prima	24
3.4	Produtos farmacêuticos.....	24
3.5	Solventes e reagentes	25
3.6	Equipamentos e acessórios	25
3.7	Desenvolvimento do método	26
3.8	Validação do método analítico	27
3.8.1	Especificidade.....	27
3.8.2	Linearidade	29
3.8.3	Precisão.....	29

3.8.4	Exatidão (Teste de Recuperação)	30
3.8.5	Robustez	30
3.9	Resultados.....	30
3.9.1	Desenvolvimento do método	30
3.9.2	Validação do método	32
3.10	Discussão	40
3.10.1	Desenvolvimento	40
3.10.2	Validação do método	41
4	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS DE CIPROFIBRATO	44
4.1	Introdução	44
4.2	Substância química de referência (SQR).....	45
4.3	Produtos farmacêuticos.....	45
4.4	Solventes e reagentes	46
4.5	Equipamentos e acessórios	46
4.6	Desenvolvimento do método para o teste de dissolução	46
4.7	Validação do método de análise	48
4.7.1	Condições <i>sink</i>	48
4.7.2	Avaliação da influência do filtro	48
4.7.3	Avaliação da estabilidade de soluções de SQR e amostras no meio de dissolução	49
4.7.4	Especificidade.....	50
4.7.5	Linearidade	50
4.7.6	Precisão.....	51
4.7.7	Exatidão	51
4.7.8	Robustez	52
4.8	Comparação do perfil de dissolução de produtos comerciais.....	52

4.8.1	Produtos farmacêuticos.....	52
4.8.2	Metodologia empregada	53
4.9	Resultados.....	53
4.9.1	Desenvolvimento do método de dissolução	53
4.9.2	Validação do ensaio de dissolução	55
4.9.3	Comparação dos perfis de dissolução.....	60
4.10	Discussão	62
5	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO CIPROFIBRATO EM CONDIÇÕES FOTOLÍTICAS.....	66
5.1	Introdução	66
5.2	Substância química de referência (SQR).....	68
5.3	Matéria-prima	68
5.4	Produtos farmacêuticos.....	68
5.5	Solventes e reagentes	68
5.6	Equipamentos e acessórios	68
5.7	Avaliação da cinética de degradação das soluções de CPF matéria-prima, comprimidos e cápsulas em condições fotolíticas	69
5.7.1	Preparo das soluções.....	69
5.7.2	Condições de fotólise.....	70
5.7.3	Definição da ordem de reação	71
5.8	Resultados.....	71
5.9	Discussão	79
6	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DO CIPROFIBRATO NA PRESENÇA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM CONDIÇÕES FOTOLÍTICAS	82
6.1	Introdução	82
6.1.1	Azul de tripan	82

6.1.2	Teste de Micronúcleos (MN).....	83
6.1.3	Ensaio Cometa	84
6.2	Matéria-prima	85
6.3	Solventes e reagentes	85
6.4	Equipamentos e acessórios	85
6.5	Desenvolvimento da análise	86
6.5.1	Preparo da Solução de CPF com 4 % de ACN	86
6.5.2	Preparo da Solução de CPF	86
6.5.3	Preparo da Solução de CPF degradado.....	86
6.5.4	Preparo da Cultura de Leucócitos Humanos	87
6.5.5	Análise de parâmetros genotoxicológicos	87
6.5.6	Análise estatística	88
6.6	Resultados.....	88
6.7	Discussão	90
7	CONCLUSÕES.....	92

1 INTRODUÇÃO

Com as mudanças no estilo de vida observadas a partir da segunda metade do século XX, que incluíram mudanças nos hábitos alimentares e adoção de um estilo de vida sedentário, tem se observado uma elevação da incidência de doenças crônicas como obesidade e hipertensão arterial (POZZAN *et al.*, 2004). As dislipidemias, que são intimamente relacionadas com tais doenças, caracterizam-se por concentrações anormais de lipídios ou lipoproteínas no sangue, sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares. De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia, cerca de 40 % da população brasileira têm colesterol elevado (FRANCA e ALVES, 2006; ROMALDINI *et al.*, 2004; SPOSITO, 2007).

Os fibratos são uma das classes de medicamentos utilizados no tratamento de dislipidemias, pois diminuem a concentração plasmática de triglicerídeos (TG), aumentam a concentração de lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoprotein* - HDL) e potencializam a eliminação de lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein* - LDL). Com o aumento da incidência deste tipo de doença, cresce também a utilização dos medicamentos dessa classe terapêutica, como o ciprofibrato (CPF) (BIGHETTI *et al.*, 2009). O CPF é derivado do ácido 2-metoxi-2-metilpropanóico e, atualmente, é comercializado no mercado nacional sob as formas farmacêuticas de comprimidos, sendo o Oroxadin[®] da Sanofi-Aventis o medicamento referência, e cápsulas manipuladas, podendo ser encontrado na dose de 100 mg. Estudos publicados no ano de 2011, demonstram que o mercado nacional do CPF movimentava 2 milhões de unidades, com um faturamento anual de R\$ 92,6 milhões (IMS Health - PMB, 2011).

Para garantir a eficácia e segurança dos medicamentos comercializados, a legislação determina certas especificações que devem ser cumpridas, tornando assim, o desenvolvimento e validação de métodos para a avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos um processo fundamental (BRASIL, 2003a; USP 35, 2012).

O controle de qualidade atua desde a avaliação da matéria-prima até a análise do produto final, no desenvolvimento e validação de métodos, estudo de estabilidade de formulações, avaliação dos produtos de degradação e padronização de procedimentos de produção (NASCIMENTO, *et al.*, 2005). Vários métodos analíticos estão disponíveis para utilização no controle de qualidade de rotina, e a sua escolha deve ser feita de acordo com os

objetivos da análise a ser efetuada. Entre os fatores a ser considerados estão a identidade e pureza das amostras, o grau de precisão e exatidão necessários, a disponibilidade de reagentes e equipamentos, e o custo total da análise (RIBANI, *et. al.*, 2004).

O CPF não possui, até o momento, monografia em códigos oficiais para a determinação do fármaco em formas farmacêuticas. A Farmacopeia Européia (2013) disponibiliza monografia para a análise do fármaco em matéria-prima. Na literatura científica, atualmente, existem poucos métodos para a análise do CPF em formas farmacêuticas. Muitos desses procedimentos analíticos propostos são onerosos, possuem execução complexa, demandam elevado tempo de análise e utilizam solventes com alto potencial tóxico, sendo de difícil aplicação no controle de qualidade de rotina. Estudos sobre sua estabilidade, cinética de degradação e avaliação da citotoxicidade do fármaco na presença dos produtos de degradação formados em condições fotolíticas não estão, ainda, apresentados.

Considerando o exposto, o presente trabalho busca desenvolver e validar metodologia analítica simples e exequível por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de CPF em formas farmacêuticas, bem como realizar estudo preliminar da estabilidade da matéria-prima e formas farmacêuticas em condições forçadas de armazenamento e, avaliar a citotoxicidade do fármaco e da mistura dos produtos de degradação formados em condições fotolíticas. Considerando, também, que o CPF somente é comercializado em formas de uso oral, justifica-se o desenvolvimento de método de dissolução para que possa contribuir com a qualidade biofarmacotécnica dos produtos comerciais disponíveis no mercado nacional.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar metodologia analítica para avaliar a qualidade de comprimidos e cápsulas manipuladas de CPF e realizar estudo preliminar da estabilidade e citotoxicidade.

1.1.2 Objetivos específicos

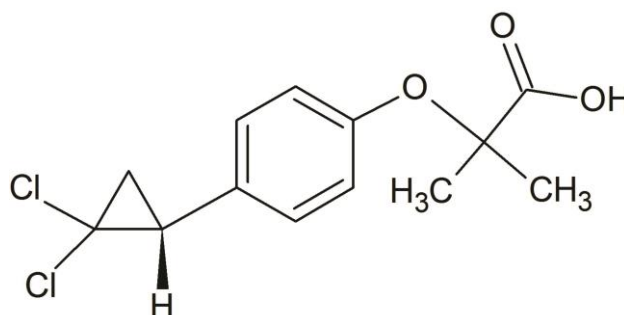
- Desenvolver e validar técnica cromatográfica indicativa da estabilidade por CLAE para determinação do CPF em formas farmacêuticas;
- Realizar estudo de estabilidade do CPF na matéria-prima e em formas farmacêuticas, com avaliação do perfil de degradação do fármaco em diferentes condições: luz, hidrólise e oxidação;
- Desenvolver e validar ensaio de dissolução dos comprimidos de CPF e avaliar o perfil de dissolução de amostras disponíveis comercialmente;
- Determinar a cinética de degradação do CPF na matéria-prima e em formas farmacêuticas;
- Realizar estudo de citotoxicidade do CPF na presença dos produtos de degradação, formados na degradação fotolítica, avaliando viabilidade celular pelo método de azul de tripan, proliferação celular, mutagenicidade pelo método de micronúcleos e genotoxicidade pelo ensaio cometa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ciprofibrato

Os fibratos são uma classe de fármacos amplamente utilizados para o tratamento da hipertrigliceridemia (BIGHETTI *et al.*, 2009; PIRELA *et al.*, 2005). São fármacos derivados do ácido 2-metoxi-2-metilpropanóico (KOMSTA e MISZTAL, 2004), sendo o clofibrato o primeiro a ser descrito, em 1963. Atualmente existem diversos análogos disponíveis no mercado, entre eles: clofibrato, bezafibrato, genfibrozil, etofibrato, fenofibrato e CPF (Figura 2.1) (KUBLIN *et al.*, 2010).

Figura 2.1 – Estrutura química do CPF



Fonte: EUROPEAN PHARMACOPEIA (2013)

O CPF é um modulador lipídico de largo espectro. É um complemento eficaz da dieta no controle de concentrações elevadas do colesterol LDL e lipoproteína de muito baixa densidade (*very low density lipoprotein* - VLDL) e dos triglicerídeos (TG) (BIGHETTI *et al.*, 2009; GOODMAN e GILMAN, 2012; KUBLIN *et al.*, 2010).

2.1.1 Descrição (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2013):

- Nome químico: ácido 2-(4-(2,2-diclorociclopropil)fenoxi)-2-metil-propanóico;
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): 52214-84-3;
- Fórmula molecular: $C_{13}H_{14}Cl_2O_3$;
- Massa molecular: 289,2;
- Faixa de fusão: 114 - 116° C;
- Apresentação e solubilidade: pó cristalino branco ou levemente amarelado, praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em etanol anidro, solúvel em tolueno;
- Valor de pKa: 3,65 (HÜTTEMANN e BLASCHKE, 1999).

2.1.2 Mecanismo de ação

Os fibratos diminuem as concentrações plasmáticas de TG, ativando enzimas responsáveis pela β - oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa, reduzindo a síntese de TG, ativando a lipase lipoproteica (que acelera o catabolismo) e reprimindo a expressão de apolipoproteína (apo) CIII (inibe a lipoproteína lipase) (BIGHETTI *et al.*, 2009; PARZIANELLO, 2007; PIRELA *et al.*, 2005). Eles aumentam a eliminação de frações do colesterol LDL do organismo e modificam sua estrutura por meio do aumento de suas dimensões e diminuição de sua densidade (KUBLIN *et al.*, 2010). Além disso, os compostos deste grupo influenciam no aumento da fração HDL e no transporte reverso do colesterol, devido a expressão aumentada de apoA-I e apoA-II, envolvidas na transformação de HDL nascente em maduro e na ativação da lipoproteína lipase e da lecitina colesterol acil transferase (KUBLIN *et al.*, 2010; PARZIANELLO, 2007; PIRELA *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação específico baseia-se na sua interação com receptores nucleares, chamados receptores ativados por proliferados de peroxissomas (*peroxisome proliferator-activated receptor* - PPAR), que são transmissores cruciais de estímulos para os genes que controlam o metabolismo dos lipídeos (BIGHETTI *et al.*, 2009; KUBLIN *et al.*, 2010; PIRELA *et al.*, 2005). Após a ativação por ligantes, tais como ácidos graxos, eicosanóides e hipolipemiantes (compostos que imitam os ligantes naturais), o PPAR forma um heterodímero com o receptor do ácido 9-*cis* retinóico (*retinoic X receptor* - RXR), que se liga a elementos responsivos específicos (*peroxisome proliferator response element* - PPREs) e modula a transcrição gênica. Três isoformas de PPAR, α , β e γ foram identificadas. A expressão humana de PPAR é maior no músculo esquelético, seguido pelo fígado, rins e adrenais. No fígado, a PPAR- α é a forma predominante e desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo lipídico (PIRELA *et al.*, 2005; TAVARES *et al.*, 2007). Como resultado de sua ação, há uma diminuição no nível de triglicerídeos de 20-50 %, um aumento do colesterol HDL de 10-15 % e uma diminuição do colesterol LDL (GOODMAN e GILMAN, 2012; KUBLIN *et al.*, 2010).

2.1.3 Farmacocinética

Os fibratos são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal, mais de 90 % quando no estado alimentado. A concentração plasmática máxima é alcançada em cerca de 1 a 4 horas. Possuem alta ligação proteica, sendo que mais de 95 % do fármaco no plasma está ligado a proteínas. O volume de distribuição estimado na fase de equilíbrio é de

aproximadamente $11,7 \pm 1,97$ litros. A principal via de excreção do CPF é o rim, a depuração plasmática está entre 1,35 e 1,55 mL/h/Kg. É excretado inalterado ou como conjugado glucurônico, entre $80,22 \pm 2,9$ % da dose administrada por via oral é recuperada na urina no período de 10 dias. A meia-vida de eliminação é de aproximadamente 80 horas (BIGHETTI *et al.*, 2009; GOODMAN e GILMAN, 2012; KUBLIN *et al.*, 2010).

2.1.4 Efeitos adversos

Os principais efeitos colaterais são: distúrbios gastrointestinais e do sono, diminuição da libido, erupção cutânea e fraqueza muscular. Podem aumentar a litogenicidade da bile, aumentando os cálculos biliares de colesterol (SPOSITO *et al.*, 2007).

2.1.5 Métodos de análise para determinação quantitativa

O desenvolvimento de métodos analíticos bem como a modificação ou complementação de métodos conhecidos necessita de um processo de avaliação a qualidade dos resultados obtidos. A validação é processo pelo qual se obtêm garantia experimental documentada de que o método gera informações confiáveis para a utilização pretendida (BRASIL, 2003a).

Alguns guias e órgãos oficiais contendo diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos estão disponíveis atualmente, como a Conferência Internacional de Harmonização (*International Conference on Harmonisation – ICH*) e a Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia - USP*), respectivamente. (BRASIL, 2003a).

Devido à importância da avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos em todas as etapas do processo de fabricação o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis é um passo limitante para a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos (NASCIMENTO *et al.*, 2005; RIBANI *et al.*, 2004).

Na literatura científica existem poucos relatos sobre a determinação quantitativa dos derivados do ácido 2-metoxi-2-metilpropanóico em preparações farmacêuticas e em material biológico (KUBLIN *et al.*, 2010). MASNATTA *et al.*, (1996) desenvolveram método para determinação plasmática de CPF e outros fibratos por CLAE, utilizando coluna guarda Shim-pack G-ODS (100 × 4 mm, 5 µm), coluna Shim-pack CLC-ODS RP-C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila (ACN) e tampão fosfato 0,02 M (55:45) e gradiente de fluxo. KUBLIN *et al.* (2010) também utilizaram CLAE, onde desenvolveram e validaram método para quantificação e identificação de fibratos, incluindo o CPF, em cápsulas e comprimidos. Os autores utilizaram coluna Symmetry C18 (250 x 4,6

mm, 5 µm tamanho de partícula), fase móvel composta por ACN e água pH 2,5 (70:30, v/v), temperatura de 35 °C, fluxo de 1,2 mL min⁻¹, volume de injeção de 10 µL e detecção por Ultravioleta (UV).

NASCIMENTO *et al.* (2011) desenvolveu e validou um método espectrofotométrico para análise de ciprofibrato em comprimidos, utilizando metanol como solvente, e concentração de trabalho de 10 µg mL⁻¹. O método mostrou-se específico, preciso, exato e robusto frente a diferentes fabricantes de metanol. As Farmacopeias Britânica e Européia apresentam um método por CLAE para análise de substâncias relacionadas utilizando coluna C8, fluxo de 1,5 mL min⁻¹, detecção em 230 nm, volume de injeção de 10 µL e eluição em gradiente da fase móvel composta por solução de dihidrogenofosfato de potássio, na concentração de 1,36 g L⁻¹, e pH ajustado para 2,2 com ácido fosfórico e ACN.

JAIN *et al.* (2012) desenvolveram e validaram método cromatográfico para análise de CPF em comprimidos, utilizando metanol e água como solvente, concentração de trabalho de 20 µg mL⁻¹, coluna C18, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, detecção em 232 nm, volume de injeção de 20 µL e eluição isocrática da fase móvel composta por água acidificada com ácido fosfórico pH 3,7 e metanol (10:90, v/v). O último sendo, também, o único relato encontrado na literatura científica referente a estudos de estabilidade do CPF, utilizando a degradação forçada para o desenvolvimento de método de quantificação indicativo de estabilidade. As condições utilizadas foram: ácido clorídrico 3 M, por 1 hora; hidróxido de sódio 0,5 M, por 1 hora; peróxido de hidrogênio 30 %, por 4 horas; aquecimento a 100 °C, por 48 horas; e fotólise (254 e 366 nm), por 48 horas. Os resultados obtidos, em percentual de degradação foram de 7,54 % para degradação ácida, 4,88 % para degradação básica e 58,70 % para degradação oxidativa. Na degradação térmica e fotólise não ocorreu degradação nas condições testadas. Não foram encontrados trabalhos na literatura relatando estudos de estabilidade no que diz respeito à determinação da cinética de fotodegradação desse fármaco.

Durante o desenvolvimento deste trabalho a Farmacopeia Britânica publicou consulta pública sugerindo um teste de dissolução para o CPF com as seguintes condições: 900 mL de meio tampão fosfato pH 6,5 a 37 °C; aparato 2 com velocidade de rotação de 50 rpm; volume de amostragem de meio de 10 mL; 45 minutos de análise e análise das amostras por espectrometria na região do UV em 230 nm.

3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO CIPROFIBRATO

3.1 Introdução

Os métodos cromatográficos são comumente utilizados em laboratórios de análise para a avaliação qualitativa e quantitativa de fármacos em matérias-primas e produtos acabados, sua popularidade deriva da sua versatilidade, pois além da quantificação permitem a separação de componentes, podendo ser utilizados na avaliação da estabilidade, quando devidamente desenvolvidos e validados (WATSON, 2005).

Os métodos analíticos têm por objetivo fornecer informações confiáveis quanto à natureza e à composição dos materiais submetidos à análise. Porém, certo grau de variabilidade está atrelado a todas as avaliações. A validação busca assegurar que o desempenho analítico do método é adequado para a aplicação pretendida (BRASIL, 2003a).

Os principais parâmetros a serem avaliados na validação de um método analítico são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação e limite de detecção. No entanto, é de responsabilidade do analista a seleção de quais parâmetros devem ser analisados, uma vez que a necessidade de avaliação depende do tipo de método e da finalidade de sua utilização (BRASIL, 2003a; USP 35, 2012).

3.2 Substância química de referência (SQR)

Utilizou-se SQR de CPF, com teor declarado de 100 %, identificado pelo lote n° 1156-032AI, de Purity Grade Standards (Durham, USA), gentilmente doado pela Multilab[®] - a Takeda Company.

3.3 Matéria-prima

Matéria-prima de CPF, adquirida de Pharma Nostra, com teor declarado de 98,8 %.

3.4 Produtos farmacêuticos

- Cápsulas na concentração de 100 mg de CPF, obtidas em farmácia magistral.

Excipientes: estearato de magnésio, dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e amido.

- Comprimidos na concentração de 100 mg de CPF, com o nome comercial de Oroxadin[®], fabricado pela Sanofi-Aventis.

Excipientes: amido, celulose microcristalina, dióxido de silício, hipromelose, lactose monoidratada, laurilsulfato de sódio, óleo vegetal hidrogenado e água purificada.

3.5 Solventes e reagentes

- Acetonitrila grau CLAE - Tedia[®]
- Ácido clorídrico – Química Moderna[®]
- Ácido orto-fosfórico 85 %, Merck[®]
- Água destilada
- Água ultrapurificada
- Etanol – Quemis[®]
- Hidróxido de sódio - Dinâmica[®]
- Metanol grau CLAE - Merck[®]
- Peróxido de hidrogênio - Fmaia[®]
- Trietilamina - Vetec[®]

3.6 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético com aquecimento – Fisatom[®]
- Balança analítica Shimadzu[®] ay 220
- Bomba a Vácuo e Ar Comprimido Logen[®] - 131
- Coluna cromatográfica Shim-pack[®] CLS-ODS (M) (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm), Shimadzu[®]
- Cromatógrafo líquido equipado com degaseificador DGU-20A₅; bomba LC-20AT; injetor automático SIL-20A; detector de arranjo de diodos SPD-M20A; forno CTO-20A; controlador CBM-20A e software LC Solution, marca Shimadzu[®]
- Lavadora ultra-sônica Unique[®]
- Manta de aquecimento Nalgon[®]
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm
- Lâmpada ultravioleta TUV 30W/G30 T8, 254 nm, Starlux[®]

- Papel filtro quantitativo faixa preta (Quanty[®] - JP41)
- Potenciômetro Hanna[®] pH 21
- Termômetro Químico para laboratório HG[®]

3.7 Desenvolvimento do método

As condições cromatográficas foram otimizadas, de modo a proporcionar um bom desempenho do ensaio. A fim de encontrar a fase móvel mais apropriada para a determinação de CPF foram analisadas algumas misturas de solventes. ACN e metanol são os solventes orgânicos habitualmente utilizados em CLAE, de modo que várias misturas de ACN, metanol, água e ácido *o*-fosfórico 0,1 % (v/v) foram testadas. Antes da mistura com o solvente orgânico, o pH da solução de ácido *o*-fosfórico foi verificado num intervalo de 2,0 a 5,0. Diferentes proporções de fases orgânicas e aquosas foram utilizadas para determinar os melhores parâmetros de tempo de análise e adequação do sistema. O teste de adequabilidade do sistema cromatográfico foi realizado antes de cada execução de validação usando cinco injeções repetidas de uma solução da SQR. Pratos teóricos, fator de cauda e repetibilidade de injeção foram determinados.

As condições experimentais estabelecidas para a análise do CPF por CLAE encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Parâmetros para execução do método por CLAE

Características	Descrição
Coluna	Shim-pack [®] CLS-ODS (M) (250 mm X 4,6 mm d.i.) 5 µm
Fase móvel	Ácido fosfórico 0,1 % (v/v) pH 3,0 (ajustado com trietilamina): ACN (35:65)
Vazão	1 mL min ⁻¹
Comprimento de onda	233 nm
Volume de injeção	20 µL

A fase móvel foi preparada e filtrada, sob vácuo, em membrana de nylon com porosidade de 0,45 µm, e desgaseificada em banho ultrassônico por 30 minutos. A fase móvel

foi bombeada pela coluna, com vazão de 1 mL min^{-1} , durante cerca de 20 minutos para prévia estabilização da mesma. Antes da análise, todas as amostras foram filtradas em minifiltros com porosidade de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.

3.8 Validação do método analítico

A validação foi conduzida de acordo com USP 35 (2012) e ICH - Q2 (R1) (2005), sendo os parâmetros avaliados: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

3.8.1 Especificidade

A especificidade do método analítico foi avaliada através da verificação da interferência dos excipientes da formulação e dos produtos formados através do estudo de degradação forçada da matéria-prima.

- Preparo da amostra simulada de excipientes (ASE)

Avaliou-se a especificidade do método analítico através da preparação de uma solução de ASE das formulações. Estas foram preparadas através da pesagem de quantidades propostas de cada excipiente, determinadas através da quantidade usual relatada em ROWE (2009).

A solução ASE foi preparada a partir da pesagem da ASE equivalente a quantidade dos excipientes transferidas na pesagem do *pool* dos comprimidos e cápsulas. O pó foi então transferido para balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 10 mL de etanol absoluto e, aproximadamente, 8 mL de água destilada. As soluções foram submetidas à agitação em ultrassom, por 5 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente e filtrou-se. Transferiu-se uma alíquota de 2 mL dessa solução para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água destilada.

- Preparo da SQR em condições normais (tempo zero)

Pesou-se 12,5 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Foram adicionados 10 mL de etanol absoluto e, aproximadamente, 8 mL de água destilada. As soluções foram submetidas à agitação em ultrassom, por 5 minutos. O volume foi completado com água destilada, obtendo-se a concentração de $500 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Alíquotas de 2 mL foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, o volume foi completado com água destilada, obtendo-se a concentração teórica de $20 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

- Preparo da matéria-prima em condições de degradação forçada

- Hidrólise ácida

Pesou-se 25 mg da matéria-prima e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 4 mL de etanol absoluto e, aproximadamente, 4 mL de ácido clorídrico 1 M, as soluções foram então submetidas à agitação em ultrassom, por 5 minutos. O volume foi completado com ácido clorídrico 1 M, obtendo-se concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução foi deixada em refluxo, por 4 horas. Alíquotas de 2 mL foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, neutralizadas com hidróxido de sódio 1 M e o volume completado com água destilada, obtendo-se soluções com concentrações teóricas de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- Hidrólise básica

Pesou-se 25 mg da matéria-prima e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 4 mL de etanol absoluto e, aproximadamente, 4 mL de hidróxido de sódio 1 M, as soluções foram então submetidas à agitação em ultrassom, por 5 minutos. O volume foi completado com hidróxido de sódio 1 M, obtendo-se concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução foi deixada em refluxo, por 7 horas. Alíquotas de 2 mL foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, neutralizadas com ácido clorídrico 1 M e o volume completado com água destilada, obtendo-se soluções com concentrações teóricas de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- Oxidação Química

Pesou-se 25 mg da matéria-prima e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 4 mL de etanol absoluto e, aproximadamente, 4 mL de peróxido de hidrogênio 30 V, as soluções foram então submetidas à agitação em ultrassom, por 5 minutos. O volume foi completado com peróxido de hidrogênio 30 V, obtendo-se concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução foi deixada em refluxo, por 3 horas. Alíquotas de 2 mL foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e o volume completado com água destilada, obtendo-se soluções com concentrações teóricas de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- Fotólise

Pesou-se 50 mg da matéria-prima e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 20 mL de etanol absoluto e, aproximadamente, 20 mL de ACN, as soluções foram então submetidas à agitação em ultrassom, por 5 minutos. O volume foi completado com ACN, obtendo-se concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução filtrada com minifiltros de porosidade $0,45 \mu\text{m}$ e transferida para cubetas de quartzo, sendo irradiada por

luz UV 254 nm por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. Alíquota de 1 mL foi transferida para balões volumétricos de 50 mL e o volume completado com água destilada, obtendo-se soluções com concentrações teóricas de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.8.2 Linearidade

Para obtenção da curva pesou-se analiticamente 25 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 20 mL de etanol absoluto e, aproximadamente, 10 mL de água destilada, a solução foi então submetida à agitação em ultrassom, por 5 minutos. Completou-se o volume com água destilada, obtendo-se a concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir dessa solução, com auxílio de bureta, foram transferidas alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL para balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram completados com água destilada, obtendo-se as concentrações de 10, 15, 20, 25 e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Com os valores das áreas do pico, em função da concentração de CPF, foram calculados a equação da reta e o coeficiente de correlação. Os resultados foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA).

3.8.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) obtido na determinação do CPF em comprimidos e cápsulas manipuladas nos testes de repetibilidade (intra-dia, $n = 6$) em dois dias diferentes e com diferente analista e precisão intermediária (inter-dia, $n = 18$).

- Preparo da SQR

Pesou-se 12,5 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Foram adicionados 10 mL de etanol absoluto e, aproximadamente, 8 mL de água destilada, a solução foi então submetida à agitação em ultrassom, por 5 minutos. Completou-se o volume com água destilada, obtendo-se a concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Alíquota de 2 mL dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com água destilada, obtendo a concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- Preparo das amostras

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos e o peso de conteúdo de 20 cápsulas manipuladas, conforme a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010). Os comprimidos foram triturados até a formação de um pó homogêneo. Os conteúdos das cápsulas foram

homogeneizados em gral de porcelana. Pesaram-se, dos pós, quantidades equivalentes a 12,5 mg de CPF e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Foram adicionados 10 mL de etanol absoluto e, aproximadamente, 8 mL de água destilada, as soluções foram então submetidas à agitação em ultrassom, por 5 minutos. Completou-se os volumes com água destilada, obtendo-se concentrações de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram filtradas em papel filtro quantitativo faixa preta, os primeiros mililitros desprezados, e alíquotas de 2 mL dos filtrados foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram completados com água destilada, obtendo concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Foram realizadas determinações no mesmo dia, em diferentes dias e com diferente analista.

3.8.4 Exatidão (Teste de Recuperação)

Pesaram-se, 25 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 20 mL de etanol absoluto e, aproximadamente, 20 mL de água destilada, a solução foi então submetida à agitação em ultrassom, por 5 minutos. Completou-se o volume com água destilada, obtendo-se a concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Alíquotas de 1,0; 2,0 e 3,0 mL da solução da SQR foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e a estes foram acrescentados 2 mL das soluções de ASE contidos nos comprimidos e cápsulas, obtendo-se concentrações finais de 10, 20 e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.8.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada levando em consideração pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas como: variações no pH da fase móvel de 3,0 para 2,7 e 3,3; mudança na proporção da fase móvel variando $\pm 5 \%$ a proporção da fase orgânica; alterações no fluxo $\pm 0,2 \text{ mL min}^{-1}$; mudança da temperatura de análise para $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e utilização de coluna de diferente fabricante com as mesmas dimensões e especificações. O preparo da SQR e das amostras foi realizado como descrito no item 3.8.3, alterando apenas o parâmetro avaliado na robustez.

3.9 Resultados

3.9.1 Desenvolvimento do método

As Figuras 3.1 e 3.2 apresentam os cromatogramas das condições de análise testadas.

Figura 3.1 – Cromatogramas da solução SQR de CPF nas fases móveis testadas com 65 % de ACN e 35 % de: a) ácido *o*-fosfórico 0,1 % (v/v) pH 5,0; b) ácido *o*-fosfórico 0,1 % (v/v) pH 4,0; c) ácido *o*-fosfórico 0,1 % (v/v) pH 3,0; d) ácido *o*-fosfórico 0,1 % (v/v) pH 2,0; e) água purificada e f) metanol

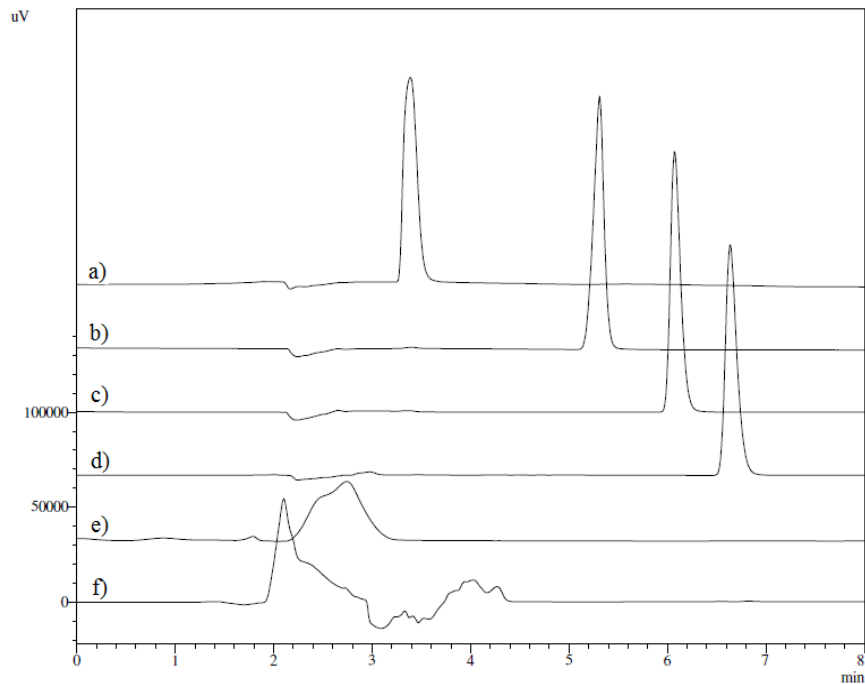
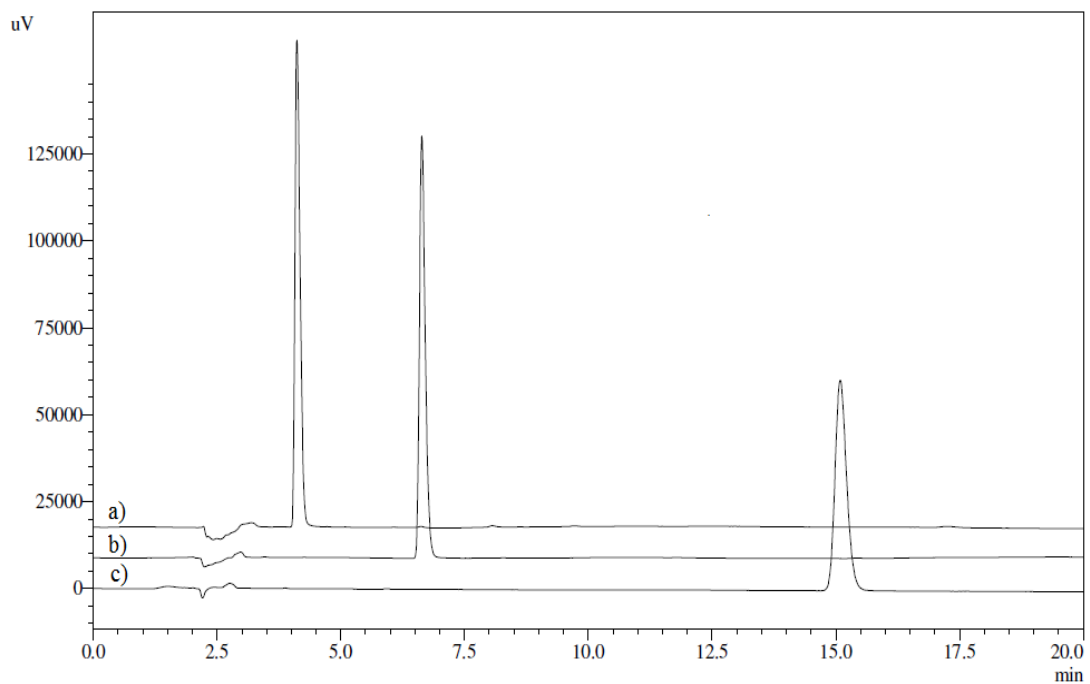


Figura 3.2 – Cromatogramas da solução SQR de CPF utilizando como fase móvel ACN e ácido *o*-fosfórico 0,1 % (v/v) pH 2,0 nas seguintes proporções: a) 80:20, b) 65:35 e c) 50:50

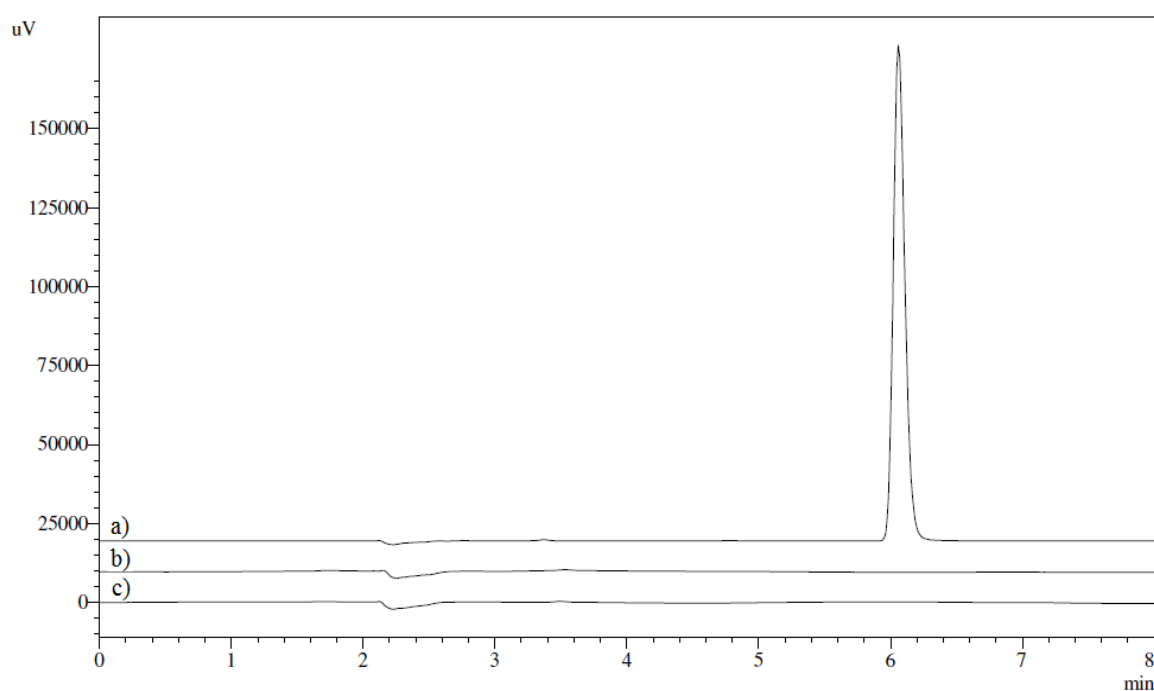


Os resultados aproximados obtidos na análise dos parâmetros de conformidade do sistema, nas condições experimentais escolhidas para análise (Tabela 3.1), foram: pratos teóricos ($N = 6800$), o fator de cauda ou assimetria do pico ($T = 1,2$) e repetibilidade de injeção ($DPR = 0,36 \%$, $n = 5$).

3.9.2 Validação do método

A Figura 3.3 apresenta os cromatogramas sobrepostos das soluções de ASE de comprimidos e cápsulas e SQR de CPF, obtidos por CLAE.

Figura 3.3 – Cromatogramas sobrepostos da solução de SQR (a), ASE de comprimidos (b) e ASE de cápsulas (c)



A Tabela 3.2 apresenta a extensão da degradação do CPF sob condições forçadas de degradação e em condições regulares. As Figuras 3.4 a 3.7 apresentam os cromatogramas das soluções submetidas à degradação forçada, na concentração teórica de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, obtidos após o período de degradação.

Tabela 3.2 – Resultados da estabilidade do CPF nos estudos de degradação forçada e em condições regulares de análise

Condição	Tempo (horas)	% degradação
Hidrólise ácida (HCl 1 M)	4	60,47
Hidrólise básica (NaOH 1 M)	7	70,87
Oxidação (H ₂ O ₂ 30 V)	3	60,14
Fotólise (254 nm)	1,5	55,64
Diluyente (etanol:água)	2	Não ocorreu degradação
	6	
	8	
	24	

Figura 3.4 – Cromatograma da solução de matéria-prima de CPF em HCl 1 M, na concentração teórica de 20,0 µg mL⁻¹, após 4 h em refluxo

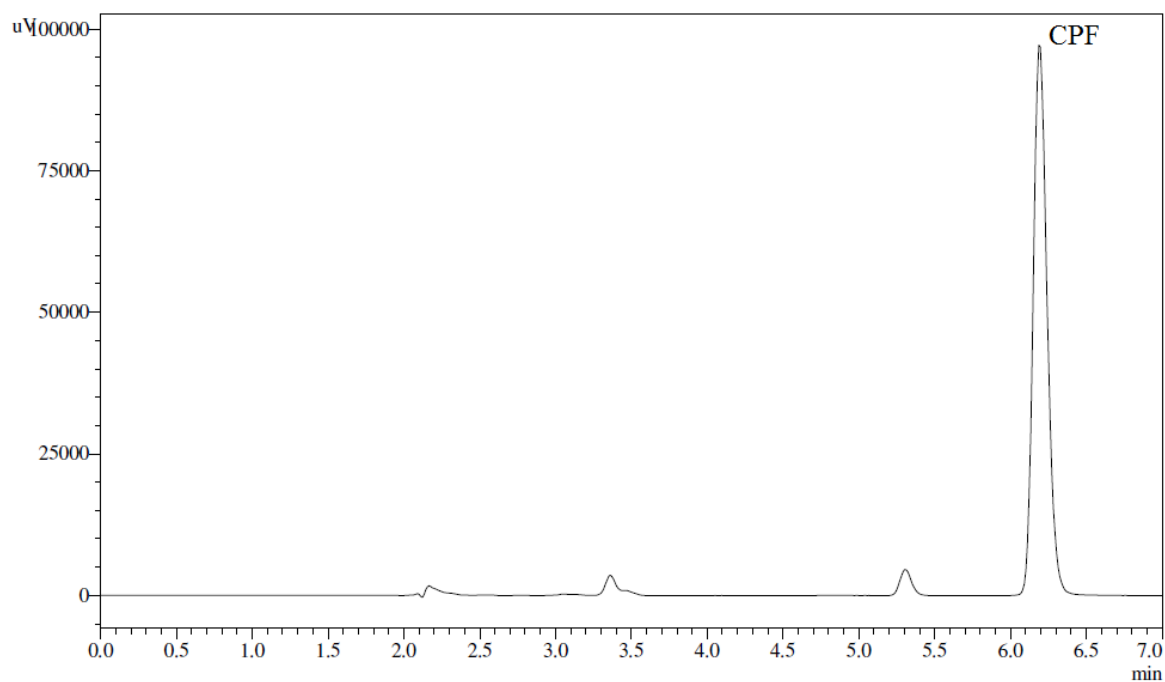


Figura 3.5 – Cromatograma da solução de matéria-prima de CPF em NaOH 1 M, na concentração teórica de $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 7 h em refluxo

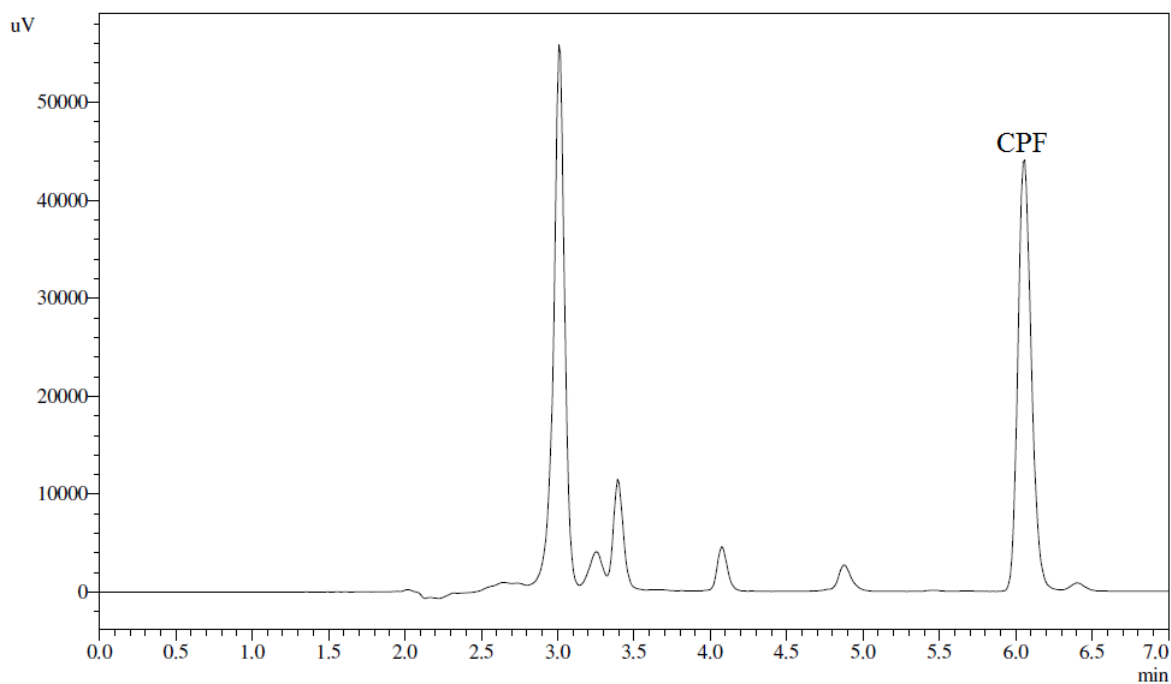
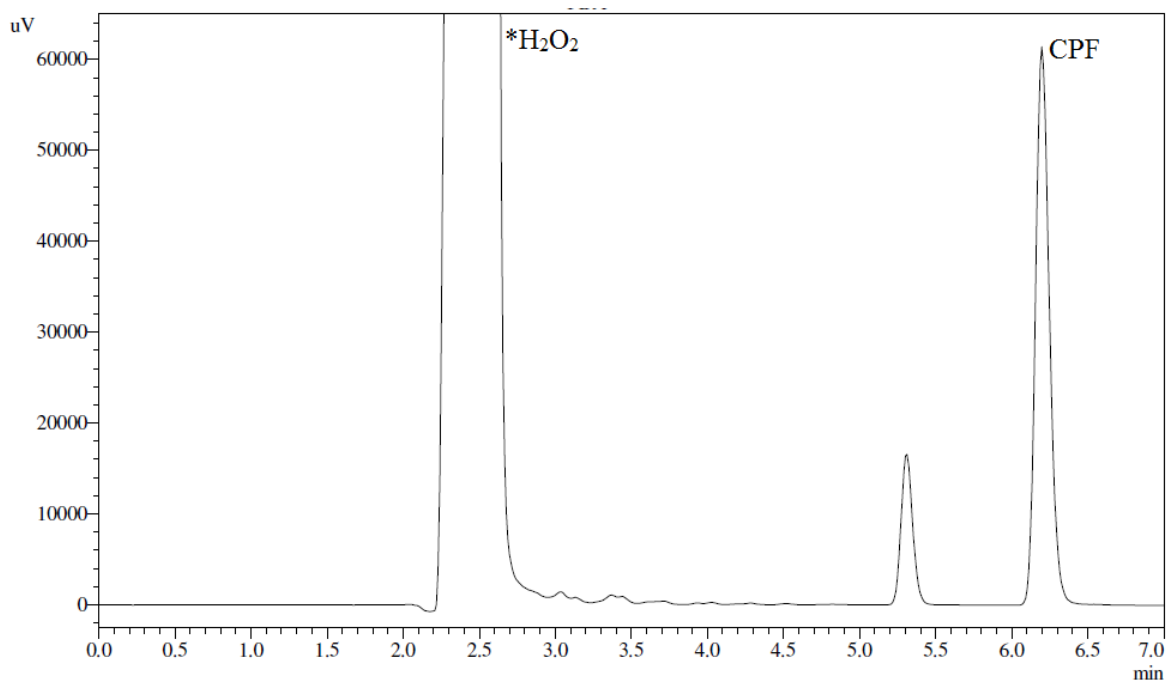
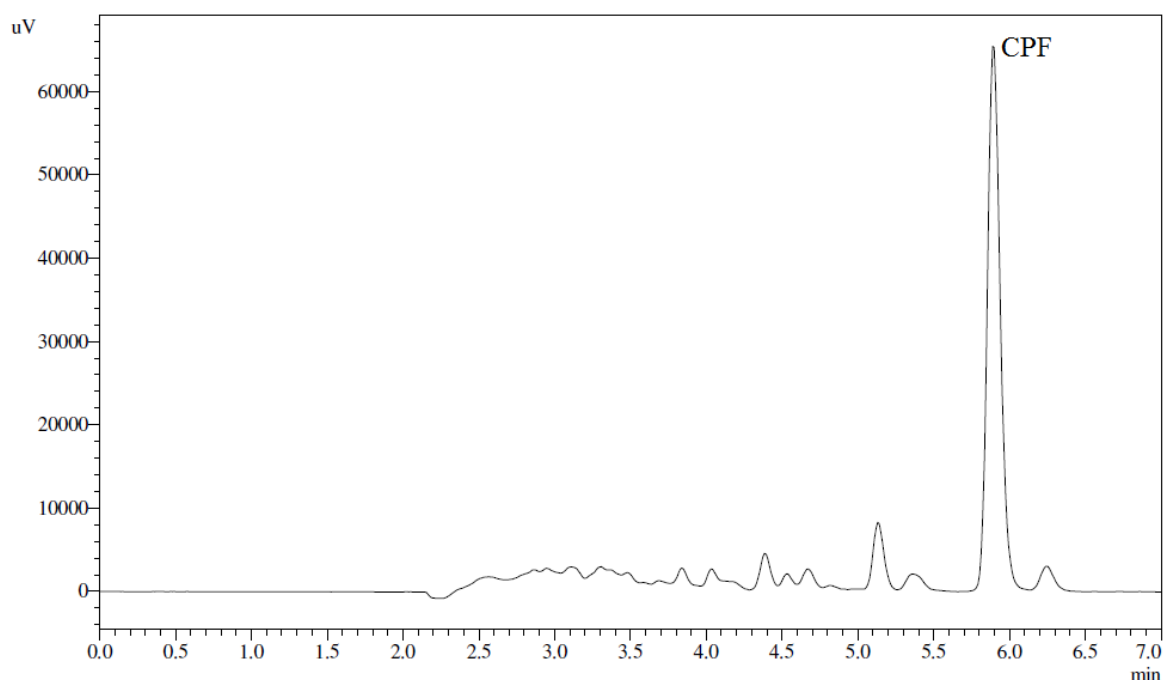


Figura 3.6 – Cromatograma da solução de matéria-prima de CPF em H_2O_2 30 V, na concentração teórica de $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 3 h em refluxo



*H₂O₂ – Pico referente ao estabilizante do produto (fenacetina)

Figura 3.7 – Cromatograma da solução de matéria-prima de CPF em ACN, na concentração teórica de $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 90 minutos de exposição a luz UV 254 nm

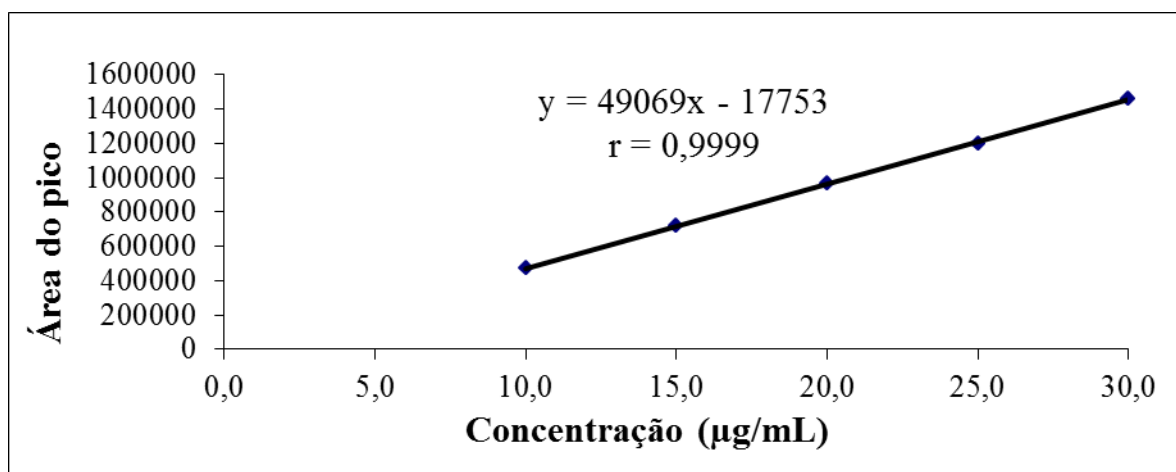


A Tabela 3.3 apresenta os valores experimentais obtidos na construção da curva padrão do CPF e a Figura 3.8 refere-se a representação gráfica correspondente.

Tabela 3.3 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão do CPF

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Áreas absolutas			Média	DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
10	457434	482441	479305	473060	2,88
15	716702	726925	717890	720506	0,78
20	961733	961529	969736	964333	0,49
25	1207384	1203541	1190325	1200420	0,75
30	1454128	1455358	1470009	1459832	0,61

Figura 3.8 – Representação gráfica da curva padrão do CPF



A Tabela 3.4 apresenta os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão.

Tabela 3.4 – ANOVA das áreas obtidas para a determinação da curva padrão do CPF

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F
Entre	4	1806163374606	451540843651,5	5687* (3,48)
- regressão linear	1	1805836356485	1805836356485	22746* (4,96)
- desvio da linearidade	3	327018121,00	109006040,3333	1,4 (3,71)
Resíduo	10	793917282,00	79391728,20000	
Total	14	1806957291888		

* Significativo para $p < 0,05$. Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F tabelado.

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos dos comprimidos e cápsulas de CPF, referentes à precisão do método, encontram-se nas Tabelas 3.5 e 3.6, respectivamente.

Tabela 3.5 – Valores experimentais referentes à determinação de CPF em comprimidos

Amostras	Teor de CPF					
	Primeiro dia		Segundo dia		Diferente analista	
	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(%)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(%)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(%)
1	24,33	104,65	19,87	100,3	20,01	99,44
2	21,86	102,61	20,61	101,68	19,99	100,14
3	20,18	100,77	20,24	100,25	21,52	96,83
4	21,32	102,01	20,65	101,87	20,67	98,13
5	21,56	101,99	19,60	100,15	20,37	101,23
6	22,22	103,25	20,06	100,14	20,58	101,96
Média	21,91	102,55	20,17	100,73	20,52	99,62
DPR	1,28		0,81		1,92	

Tabela 3.6 – Valores experimentais referentes à determinação de CPF em cápsulas

Amostras	Teor de CPF					
	Primeiro dia		Segundo dia		Diferente analista	
	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(%)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(%)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(%)
1	21,23	96,72	20,01	99,35	20,29	99,66
2	20,21	97,77	20,26	99,55	20,29	98,11
3	20,29	97,64	20,42	98,27	20,35	101,55
4	20,38	97,06	20,00	98,72	20,18	100,15
5	20,95	98,4	20,73	98,25	19,26	97,12
6	21,27	99,81	19,72	97,9	19,08	96,73
Média	20,72	97,90	20,19	98,67	19,91	98,89
DPR	1,12		0,67		1,90	

A Tabela 3.7 apresenta os DPR referentes aos três dias de análise.

Tabela 3.7 – Valores experimentais obtidos referentes à precisão intermediária na determinação de CPF em comprimidos e cápsulas por CLAE

	Média dos teores (%)	
	Comprimidos	Cápsulas
Primeiro dia	102,55	97,90
Segundo dia	100,73	98,67
Diferente analista	99,62	98,89
DPR	1,47	0,53

Os resultados obtidos no teste de recuperação de CPF estão apresentados nas Tabelas 3.8 e 3.9.

Tabela 3.8 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado em ASE de comprimidos de CPF

Amostra	Quantidade de SQR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		% de Recuperação
	Adicionada	Recuperada	
ASE de comprimidos	10,08	10,22	101,39
	10,08	10,34	102,58
	10,08	10,14	100,59
	20,15	20,17	100,10
	20,15	20,34	100,94
	20,15	20,45	101,49
	30,23	30,11	99,60
	30,23	29,77	98,48
	30,23	30,13	99,67
	Média (%)		100,54
	DPR		1,22

Tabela 3.9 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado em ASE de cápsulas de CPF

Amostra	Quantidade de SQR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		% de Recuperação
	Adicionada	Recuperada	
ASE de cápsulas	10,04	10,28	102,39
	10,04	9,76	97,21
	10,04	9,92	98,8
	20,08	20,06	99,9
	20,08	20,15	100,35
	20,08	19,99	99,55
	30,11	30,04	99,77
	30,11	30,34	100,76
	30,11	29,52	98,04
		Média (%)	
	DPR		1,53

Os resultados obtidos na avaliação da robustez estão apresentados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 – Valores experimentais obtidos na análise da robustez do método realizado em comprimidos e cápsulas de CPF (n = 3)

Condições analisadas	Teor de CPF % \pm DPR	
	Comprimidos	Cápsulas
Diferente fabricante de coluna	98,75 \pm 0,67	95,78 \pm 0,58
Temperatura 30 ° C	102,91 \pm 2,28	96,87 \pm 0,22
Fluxo 0,8 mL min ⁻¹	98,86 \pm 0,59	95,72 \pm 0,62
Fluxo 1,2 mL min ⁻¹	101,28 \pm 1,12	97,76 \pm 0,87
70 % ACN	99,16 \pm 0,38	95,43 \pm 0,83
60 % ACN	99,16 \pm 0,38	95,28 \pm 0,94
pH 2,7	99,26 \pm 0,31	95,43 \pm 0,83
pH 3,3	98,72 \pm 0,69	94,93 \pm 1,20
Sem modificação	99,70	96,57

3.10 Discussão

3.10.1 Desenvolvimento

O desenvolvimento de um método por CLAE utiliza a combinação entre polaridade do analito, fase estacionária e fase móvel para obtenção de adequada separação em tempos razoáveis. Assim, o procedimento foi otimizado para desenvolver um método indicativo de estabilidade capaz de determinar o fármaco na presença de seus produtos de degradação. A ACN e o metanol são solventes comumente utilizados em CLAE de fase reversa, apresentando máximos de absorção em comprimentos de onda relativamente baixos (190 e 205 nm, respectivamente). Estes solventes são miscíveis com soluções aquosas, por isso a cromatografia de fase reversa foi realizada com diversas misturas de solventes orgânicos e aquosos (Figuras 3.1 e 3.2).

Durante a fase de desenvolvimento, a utilização de ACN e metanol em diferentes proporções na fase móvel resultou num pico assimétrico com um elevado fator de cauda ($T > 2$) e um tempo de retenção muito baixo (Figura 3.1 f). A mudança de metanol por água não melhorou a separação e o pico ainda não se apresentava bem resolvido em relação ao volume morto (Figura 3.1 e). Para conseguir uma melhor separação, o pH da fase aquosa foi testado na faixa de 2,0 a 5,0 (Figura 3.1 a, b, c e d). Diferentes proporções de fase orgânica foram analisadas (Figura 3.2). A proporção de ACN teve influência direta no tempo de retenção do CPF e verificou-se que a diminuição do pH da água afetou positivamente os parâmetros de conformidade do sistema, no entanto, fases móveis com pH abaixo de 3,0 podem provocar diminuição no tempo de vida útil das colunas cromatográficas.

Finalmente, uma fase móvel consistindo de uma mistura de ácido *o*-fosfórico 0,1 % (v/v) pH 3,0 (ajustado pela adição de trietilamina a 10 % v/v) e ACN (35:65, v/v) foi escolhida por apresentar baixo fator de cauda, bom fator de capacidade, adequado tempo de retenção e capacidade de separar os produtos de degradação do CPF (Figuras 3.4 a 3.7). O tempo de retenção obtido em, aproximadamente, 6 minutos mostrou-se adequado para análises de rotina em controle de qualidade. O comprimento de onda de 233 nm foi escolhido por representar o comprimento de onda de máxima de absorção (mAU) do fármaco.

A adequabilidade do sistema cromatográfico foi realizada antes de cada etapa da validação. O teste de adequabilidade do sistema é uma parte integrante do método analítico e verifica a adequação e eficácia do sistema operacional. Também, foi realizado para avaliar a confiabilidade e reprodutibilidade do sistema para a análise a ser realizada, utilizando-se cinco

injeções repetidas de uma solução da SQR de CPF, na concentração de trabalho ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores de pratos teóricos ($N = 6800$), fator de cauda ou assimetria do pico ($T = 1,2$) e repetibilidade de injeção ($\text{DPR} = 0,36 \%$, $n = 5$) foram satisfatórios de acordo com a literatura (RIBANI *et al.*, 2004). Os testes garantem que o método de CLAE gera resultados confiáveis. Assim, estabeleceu-se que o sistema e processo de CLAE são capazes de proporcionar dados de qualidade aceitável.

3.10.2 Validação do método

A sobreposição dos cromatogramas da solução SQR e das soluções de ASE de comprimidos e cápsulas (Figura 3.3) demonstrou que não houve interferência dos excipientes da formulação no tempo de retenção atribuído ao CPF, no comprimento de onda de absorção máxima (233 nm).

Os estudos de degradação forçada foram conduzidos para avaliar a capacidade indicativa de estabilidade e a especificidade do método cromatográfico proposto. As Figuras 3.4 até 3.7 apresentam os cromatogramas das soluções matéria-prima, após os períodos de degradação. Constatou-se que em todas as condições testadas ocorreu uma redução na área do pico do CPF e o aparecimento de picos adicionais referentes a produtos de degradação, porém o pico do fármaco permanece resolvido, apresentando resolução apropriada ($R > 2$) e seletividade ($a > 1$), em relação aos produtos formados. As soluções degradadas foram analisadas em diferentes tempos e os resultados apresentados foram os que demonstraram a melhor visualização dos produtos de degradação formados. O perfil cromatográfico manteve-se constante apesar do maior tempo de exposição, sem o surgimento de novos picos. Os resultados obtidos nos estudos de degradação forçada mostram que o fármaco é sensível à hidrólise, oxidação e fotólise. Por conseguinte, a estabilidade de CPF em etanol anidro e água foi avaliada para verificar se qualquer degradação espontânea poderia ocorrer entre a preparação e análise da amostra. Os dados obtidos (apresentados na Tabela 3.2) demonstraram que as soluções permaneceram estáveis durante, pelo menos 24 horas, quando armazenadas à temperatura ambiente (Farmacopeia Brasileira 5^o Edição, 2010).

A RE 899 (BRASIL, 2003a) sugere o teste de pureza do pico para assegurar que o sinal cromatográfico pertence a um único componente. Assim, o pico do CPF foi avaliado em todas as condições de degradação quanto à pureza com auxílio do software do equipamento, sendo que este permaneceu puro nas condições testadas sugerindo que os produtos formados não co-eluíram com o fármaco. O método possui a capacidade de determinar o CPF na

presença de produtos de degradação obtidos por degradação forçada (condições ácidas, alcalinas, oxidativas e fotolíticas), sugerindo capacidade indicativa de estabilidade, ou seja, pode ser aplicado para verificação e monitoramento da estabilidade do fármaco nas formas farmacêuticas em estudo.

A linearidade foi avaliada através da construção da curva padrão, na faixa de 10 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A equação da reta, obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foi $y = 49069x - 17753$ e o valor do coeficiente de correlação de $r = 0,9999$ indicaram a existência de relação linear entre as áreas obtidas e a concentração da SQR de CPF. Os resultados da ANOVA (Tabela 3.4) demonstraram regressão linear significativa, sem desvio significativo da linearidade, para um nível de significância de 5 %, confirmando a linearidade do método proposto.

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária, analisando seis amostras por dia, em três dias diferentes. Como pode ser observado nas Tabelas 3.5 e 3.6, os DPR foram inferiores a 2 % para comprimidos e cápsulas, demonstrando a repetibilidade do método. Os resultados da precisão intermediária foram de 1,5 e 0,5 % para comprimidos e cápsulas, respectivamente, e estão demonstrados na Tabela 3.7. Em todos os casos, o DPR foi inferior a 1,9 %, caracterizando elevada precisão do método analítico.

As porcentagens médias obtidas no teste de recuperação (Tabelas 3.8 e 3.9) foram de 100,54 % (DPR = 1,15 %) e 99,64 % (DPR = 1,44 %) para comprimidos e cápsulas, respectivamente, demonstrando boa exatidão do método proposto.

Pequenas modificações nas condições de análise foram testadas a fim de avaliar a robustez do método. Em alguns casos houve alteração do tempo de retenção e na intensidade do sinal analítico da SQR e das amostras, porém a quantificação do fármaco apresentou teores similares (DPR < 2 %) em todas as condições analisadas (Tabela 3.10), demonstrando que tais modificações não apresentaram efeitos importantes na análise.

Considerando os resultados dos parâmetros analíticos avaliados, concluiu-se que o método por CLAE foi adequado para determinação quantitativa de CPF em comprimidos e cápsulas. Além disso, o método apresenta uma redução na utilização de solventes orgânicos, quando comparado com os métodos de Jain (2012) que utiliza grandes volumes de metanol. Também, apresenta-se mais simples na comparação com o método da Farmacopeia Britânica para análise da matéria-prima, que utiliza ACN e solução tampão como fase móvel em eluição gradiente, uma vez que a utilização de sais de potássio dissolvidos na fase móvel pode

acarretar a precipitação dos mesmos ocasionando danos no sistema e diminuindo a vida útil da coluna cromatográfica.

4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS DE CIPROFIBRATO

4.1 Introdução

As formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral são amplamente prescritas na prática médica, e para que o fármaco possa ser absorvido a partir das mesmas é necessário que este se dissolva sob condições fisiológicas e seja permeável através do trato gastrointestinal (AZEVEDO, 2007; BRASIL, 2003b).

O ensaio de dissolução é um requisito fundamental para assegurar a qualidade das formas farmacêuticas sólidas de uso oral, sendo utilizado para garantir a qualidade lote-a-lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento. Permite, também, a otimização das formulações na fase de desenvolvimento, estudos de estabilidade, monitoramento dos processos de fabricação, bem como o estabelecimento de correlações *in vivo/in vitro* (AZEVEDO, 2007).

Quando o teste de dissolução não está definido na monografia da forma farmacêutica, ou se a monografia não está disponível, existe a necessidade de se desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos fármacos, sendo recomendada a avaliação de perfis de dissolução (porcentagem de fármaco dissolvido *versus* tempo) em diferentes meios de dissolução. A seleção das condições de ensaio deve objetivar o alcance do máximo poder discriminatório, que possibilite a detecção de eventuais desvios nos padrões de qualidade. O perfil de liberação também deve ser avaliado, pois a dissolução muito rápida não demonstra poder discriminativo, e para fármacos de liberação imediata, um tempo de análise de até 45 ou 60 minutos é recomendado, então quando a dissolução é muito lenta, alterações no tipo de aparelhagem, velocidade de rotação e meio de dissolução podem ser realizadas (AZEVEDO, 2007; CAZEDEY, 2012).

A seleção do meio de dissolução e do volume utilizado deve levar em consideração a solubilidade e a faixa de dosagem do fármaco para evitar que a proximidade da saturação influencie na velocidade da dissolução. Os meios de dissolução tipicamente utilizados são: ácido clorídrico (entre 0,1 e 0,001 M), tampão acetato 0,05 M (pH entre 4,1 e 5,5), tampão fosfato 0,05 M (pH entre 5,8 e 8,0), água purificada e fluídos gástrico e intestinal simulados. Para aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis, uma porcentagem de agente tensoativo, como polissorbatos e lauril sulfato de sódio pode ser adicionada ao meio de dissolução. Segundo recomendação do *Food and Drug Administration* (FDA), concentrações

de até 5 % (p/v) de tensoativos podem ser utilizadas no meio de dissolução (AZEVEDO, 2007; FDA, 1997; USP 35, 2012). A escolha do meio ideal para ensaios de rotina deve estar relacionada com a capacidade discriminativa, estabilidade do fármaco no meio e, quando possível, com a relevância do desempenho *in vivo/in vitro* (USP 35, 2012).

Os aparelhos rotineiramente utilizados para comprimidos e cápsulas são pás e cestas, respectivamente, com velocidade de rotação variando de 50 a 100 rpm e volume de meio de dissolução de 500 mL até 1000 mL, sendo 900 mL o mais utilizado. O volume pode ser aumentado para 2 ou 4 litros, quando a concentração e/ou as condições *sink* do princípio ativo justifiquem a alteração (USP 35, 2012).

O local de coleta das alíquotas deve estar em conformidade com as especificações dos compêndios oficiais (FB 5, 2010; USP 35, 2012). A filtração das amostras é uma etapa importante nos testes de dissolução e deve ser avaliada durante o desenvolvimento do método, pois esta previne que partículas do fármaco e/ou adjuvantes não dissolvidos sejam transferidas junto com a amostra e se dissolvam posteriormente distorcendo os resultados do teste (CAZEDEY, 2012).

A espectrofotometria na região do UV e a CLAE são técnicas bastante utilizadas na análise das amostras do ensaio de dissolução. As determinações espectrofotométricas são mais comumente utilizadas, devido a rapidez, simplicidade e menor consumo de solventes, em comparação com os métodos cromatográficos, o que diminui o valor da análise e a formação de resíduos (CAZEDEY, 2012).

A validação de métodos analíticos utilizados para determinação de características de desempenho, como a dissolução, deve incluir a avaliação da linearidade, precisão e exatidão, especificidade e estabilidade do fármaco no meio de dissolução (USP 35, 2012).

4.2 Substância química de referência (SQR)

Utilizou-se a mesma SQR descrita no item 3.2.

4.3 Produtos farmacêuticos

- Comprimidos na concentração de 100 mg de CPF, com o nome comercial de Oroxadin[®], fabricado pela Sanofi-Aventis.

Excipientes: amido, celulose microcristalina, dióxido de silício, hipromelose, lactose monoidratada, laurilsulfato de sódio, óleo vegetal hidrogenado e água purificada.

4.4 Solventes e reagentes

- Ácido acético glacial - Vetec[®]
- Ácido clorídrico – Química Moderna[®]
- Água destilada
- Etanol - Quemis[®]
- Fosfato de potássio monobásico – Química Moderna[®]
- Hidróxido de sódio - Dinâmica[®]
- Lauril sulfato de sódio - Synth[®]

4.5 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Shimadzu[®] ay 220
- Centrífuga Logen[®]
- Cubetas de quartzo
- Dissolutor Varian[®] VK 7000, com monitor VK 750D
- Espectrofotômetro UV/VIS lambda 35 da Perkin Elmer[®]
- Lavadora ultra-sônica Unique[®]
- Papel de filtro quantitativo faixa preta (Quanty[®]-JP41)
- Potenciômetro Hanna[®] pH 21
- Termômetro Químico para laboratório HG[®]

4.6 Desenvolvimento do método para o teste de dissolução

Com a finalidade de desenvolver um método com melhor poder discriminatório para determinação da liberação de CPF em comprimidos, diversas condições de dissolução foram testadas, variando-se a velocidade de agitação e o meio utilizado.

O volume dos meios de dissolução utilizados foi de 900 mL. Os meios foram previamente desaerados em ultrassom, por 20 minutos, e mantidos à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi utilizado somente o aparato 2 (pás), por ser este o mais indicado para a avaliação de comprimidos. A velocidade de agitação foi selecionada de acordo com faixa recomendada para pás de 50 e 75 rpm (USP 35, 2012). Para o desenvolvimento do ensaio de dissolução

foram realizados testes iniciais em três comprimidos. As condições testadas estão apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos contendo CPF

Condição	Meio	Velocidade de agitação	Volume do meio
I	Tampão Acetato pH 4,0	50 rpm	900 mL
II	Tampão Fosfato pH 5,8	50 rpm	900 mL
III	Tampão Fosfato pH 6,0	50 rpm	900 mL
IV	Tampão Fosfato pH 6,5*	50 rpm	900 mL
V	Tampão Fosfato pH 6,8	50 rpm	900 mL
VI	Tampão Fosfato pH 7,4	50 rpm	900 mL
VII	HCl 0,01 M + LSS 0,5 %	50 rpm	900 mL
VIII	HCl 0,01 M + LSS 0,5 %	50 rpm	1000 mL
IX	HCl 0,01 M + LSS 0,75 %	50 rpm	900 mL
X	HCl 0,01 M + LSS 1 %	50 rpm	900 mL
XI	HCl 0,01 M + LSS 1 %	75 rpm	900 mL
XII	HCl 0,1 M + LSS 0,5 %	50 rpm	900 mL
XIII	LSS 0,025 M	50 rpm	900 mL

* Meio utilizado na consulta pública da Farmacopeia Britânica.

Nos intervalos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos foram retiradas, manualmente, alíquotas de 5 mL do meio de dissolução, efetuando-se a reposição do mesmo volume de meio, a $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As alíquotas foram filtradas em papel de filtro quantitativo faixa preta, em seguida, 2 mL do filtrado foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o meio, de modo a obter solução na concentração de $22,22 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. A porcentagem dissolvida do fármaco foi determinada por espectrofotometria na região do UV.

Nos cálculos da porcentagem dissolvida levou-se em consideração o teor do fármaco, as concentrações nas alíquotas retiradas e as devidas correções relacionadas às alíquotas retiradas de fármaco e reposições do meio em cada tempo.

4.7 Validação do método de análise

A validação do ensaio de dissolução incluiu a avaliação da especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (PAIM, 2010; USP 35, 2012).

4.7.1 Condições *sink*

A solubilidade do fármaco deve ser considerada na escolha do meio de dissolução. Para avaliar as condições *sink* a solubilidade do CPF no meio de dissolução HCl 0,01 M + LSS 1 % foi determinada. Foram preparadas soluções da SQR de CPF em concentrações crescentes até o máximo de cinco vezes a concentração máxima atingida na cuba de dissolução. As soluções foram analisadas por CLAE.

4.7.2 Avaliação da influência do filtro

A fim de eliminar interferentes como excipientes insolúveis e partículas não dissolvidas, a filtração do meio é uma etapa necessária antes da quantificação. A avaliação da influência do filtro é necessária para determinar se este poderia ser usado no ensaio de dissolução sem adsorção do fármaco e se este remove excipientes insolúveis que poderiam causar interferências e turbidez (CAZEDEY, 2012). Com este intuito, foram preparadas soluções da SQR e da amostra dos comprimidos, nas mesmas condições do método de dissolução desenvolvido, comparando a concentração antes e após a filtração, empregando para quantificação a espectrofotometria na região do UV, em 229 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

- Preparação da solução da SQR de CPF

Pesou-se o equivalente a 11,11 mg da SQR de CPF e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se o meio de dissolução e a solução foi mantida em ultrassom, por 15 minutos. O volume foi completado com o meio de dissolução e homogeneizado (Solução A). Transferiu-se alíquota de 2 mL dessa solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o meio, obtendo-se uma solução com concentração de $22,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPF. A leitura da absorvância dessa solução, em 229 nm, foi utilizada como referência (sem filtração).

Para determinar a interferência dos filtros utilizados, a Solução A foi filtrada em papel de filtro quantitativo faixa preta, diluída no meio de dissolução a $22,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPF (solução filtrada). Realizou-se nova leitura da absorvância dessa solução e comparou-se o resultado com o obtido com a leitura da solução sem filtração.

- Preparação da solução amostra

Pesou-se, o equivalente a 11,11 mg de CPF, a partir do peso médio dos comprimidos, e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio do meio de dissolução. A solução foi mantida em ultrassom, por 15 minutos, o volume foi ajustado com o mesmo solvente e homogeneizado (Solução A). Centrifugou-se a 3000 rpm por 10 minutos, transferiu-se uma alíquota de 2 mL dessa solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o meio de dissolução, de modo a obter uma solução com concentração de $22,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPF. A leitura da absorvância dessa solução, em 229 nm, foi utilizada como referência (sem filtração).

Para a verificação da interferência do filtro utilizado, a Solução A foi filtrada papel de filtro quantitativo faixa preta, posteriormente diluída no meio de dissolução a $22,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPF, realizou-se a leitura da absorvância, em 229 nm, e comparou-se o resultado com o obtido com a leitura da solução sem filtração.

4.7.3 Avaliação da estabilidade de soluções de SQR e amostras no meio de dissolução

Foram preparadas soluções da SQR de CPF e da amostra dos comprimidos nas mesmas condições do método de dissolução, comparando as absorvâncias obtidas das soluções mantidas à temperatura de $37,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, por 2 horas, e à temperatura ambiente, por 24 horas, com a mesma solução obtida no tempo zero. A determinação da estabilidade foi realizada empregando a espectrofotometria na região do UV, em 229 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

- Preparação da solução da SQR de CPF

Pesou-se o equivalente a 11,11 mg da SQR de CPF e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se o meio de dissolução e a solução foi mantida em ultrassom, por 15 minutos. O volume foi completado com o meio de dissolução e homogeneizado (Solução A). Transferiu-se alíquota de 2 mL dessa solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o meio, obtendo-se solução com concentração de $22,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPF (Solução B). A leitura da absorvância dessa solução, em 229 nm, foi utilizada como tempo zero no estudo da estabilidade.

Para verificar a estabilidade da Solução A, estocou-se, ao abrigo da luz, uma alíquota de 10 mL dessa solução, a $37,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 2 horas. Posteriormente, realizou-se uma

diluição no meio de dissolução, de modo a obter uma solução com concentração de $22,22 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A estabilidade da Solução B foi verificada após 24 horas de preparo. A solução foi mantida em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

- Preparação da solução amostra

Pesou-se o equivalente a 11,11 mg de CPF, a partir do peso médio dos comprimidos, e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio do meio de dissolução. A solução foi mantida em ultrassom por 15 minutos, o volume foi completo com o mesmo solvente e homogeneizado (Solução A). Essa solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo faixa preta e uma alíquota de 2 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com o meio de dissolução, de modo a obter uma solução com concentração de $22,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPF (Solução B). A leitura da absorvância dessa solução, em 229 nm, foi utilizada como tempo zero no estudo da estabilidade.

Para verificar a estabilidade da Solução A, estocou-se, ao abrigo da luz, uma alíquota de 10 mL dessa solução, a $37,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 2 horas. Posteriormente, esta solução foi filtrada e diluída no meio, de modo a obter uma solução com concentração de $22,22 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A estabilidade da Solução B foi verificada após 24 horas da preparação. A solução foi mantida em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

4.7.4 Especificidade

Transferiu-se o equivalente a 10 mg da mistura dos excipientes, para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com o meio de dissolução selecionado. A mistura foi homogeneizada, filtrada, utilizando papel de filtro quantitativo faixa preta, e diluída no meio de dissolução a concentração teórica de $22,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ e analisada por espectrofotometria na região do UV. As amostras foram preparadas em triplicata.

4.7.5 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através da construção de três curvas padrão, preparadas em um mesmo dia, contendo sete concentrações do CPF SQR.

Pesou-se analiticamente 10 mg da SQR de CPF e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com HCl 0,01 M + LSS 1 %, de modo a obter solução na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir desta foram preparadas soluções, diluídas em ácido

clorídrico 0,01 M + LSS 1 %, nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Preparo da curva padrão para avaliação da linearidade do método analítico, por espectrofotometria na região do UV, para o método de dissolução dos comprimidos de CPF

Amostra	Volume da solução estoque (mL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	1,0	100	1,0
2	0,5	10	5,0
3	1,0	10	10,0
4	1,5	10	15,0
5	2,0	10	20,0
6	2,5	10	25,0
7	3,0	10	30,0

Com os valores das absorvâncias, em função da concentração de CPF, foram calculados a equação da reta e o coeficiente de correlação. Os resultados foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA).

4.7.6 Precisão

Para análise da precisão do método de dissolução foram utilizados os valores da concentração obtidos no perfil de dissolução do medicamento referência Oroxadin[®] no tempo de 60 minutos. Foram calculados os percentuais médios de fármaco dissolvido e os valores de DPR.

4.7.7 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida da SQR adicionada a ASE dos comprimidos.

Pesou-se, 11,11 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Foi adicionado um volume do meio de dissolução e a solução foi então submetida à agitação em ultrassom, por 10 minutos. Completou-se o volume com o meio, obtendo-se a concentração de 111,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Alíquotas de 2,0 e 2,5 mL da solução da SQR foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e 2 mL para balão volumétrico de 100 mL e a estes foram

acrescentados alíquotas das soluções de ASE contidos nos comprimidos, obtendo-se concentrações finais de 100, 125 e 10 %, respectivamente. As soluções foram então filtradas em papel de filtro quantitativo faixa preta e analisadas por espectrofotometria na região do UV. Preparou-se, simultaneamente, soluções de CPF SQR na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.7.8 Robustez

A robustez do método foi avaliada levando em consideração pequenas modificações na concentração de LSS utilizada no meio de dissolução, foram analisados os percentuais de dissolução dos comprimidos após 1 hora de análise, utilizando como meio de dissolução HCl 0,01 M com adição de LSS nas concentrações de 0,9; 1,0 (condição normal) e 1,1 %.

4.8 Comparação do perfil de dissolução de produtos comerciais

A equivalência farmacêutica entre dois medicamentos se relaciona à comprovação de que ambos contêm o mesmo fármaco, na mesma dosagem e forma farmacêutica, o que pode ser avaliado por meio de testes *in vitro*. Para comparação de produtos de diferentes fabricantes ou quando ocorre uma modificação considerável na formulação recomenda-se a comparação dos perfis de dissolução, obtidos em condições idênticas, entre um produto referência e um produto teste, ou entre a formulação alterada e a original (BRASIL, 2010, BRASIL, 2003d).

Vários são os métodos para se comparar os perfis de dissolução, tais como, métodos de ANOVA, modelo-dependente (modelo de primeira ordem, modelo de Weibull, entre outros) e modelo-independente simples (área sob a curva/AUC e fator semelhança, f_2).

A eficiência de dissolução (ED %), sugerida inicialmente por Khan (1975), pode ser definida como a área sob a curva de dissolução até um tempo t , expressa como porcentagem da área do retângulo que corresponderia a 100 % de dissolução no mesmo tempo (AZEVEDO, 2007).

4.8.1 Produtos farmacêuticos

- Comprimidos na concentração de 100 mg de CPF, com o nome comercial de Oroxadin[®], fabricado pela Sanofi-Aventis (Produto A / Referência).

Excipientes: amido, celulose microcristalina, dióxido de silício, hipromelose, lactose monoidratada, laurilsulfato de sódio, óleo vegetal hidrogenado e água purificada.

- Comprimidos na concentração de 100 mg de CPF, com o nome comercial de Cibrato[®], fabricado pela Mantecorp (Produto B / Similar).

Excipientes: amido, celulose microcristalina, dióxido de silício, hipromelose, lactose monoidratada, laurilsulfato de sódio, óleo vegetal hidrogenado e água purificada.

- Comprimidos na concentração de 100 mg de CPF, com o nome comercial de Ciprofibrato Genérico, fabricado pela Neo Química (Produto C / Genérico).

Excipientes: amido, celulose microcristalina, hipromelose, croscarmelose sódica, lactose, laurilsulfato de sódio, óleo vegetal hidrogenado.

4.8.2 Metodologia empregada

A avaliação do perfil de dissolução foi realizada utilizando doze unidades de comprimidos, de cada fabricante, na Condição X (descrita na Tabela 4.1). Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos intervalos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos, repondo-se o mesmo volume com o meio a $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ e filtradas em filtro quantitativo faixa preta. Alíquotas de 2 mL dessa soluções foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi ajustado com o meio de dissolução. A leitura das amostras foi realizada por espectrofotometria na região do UV, em 229 nm.

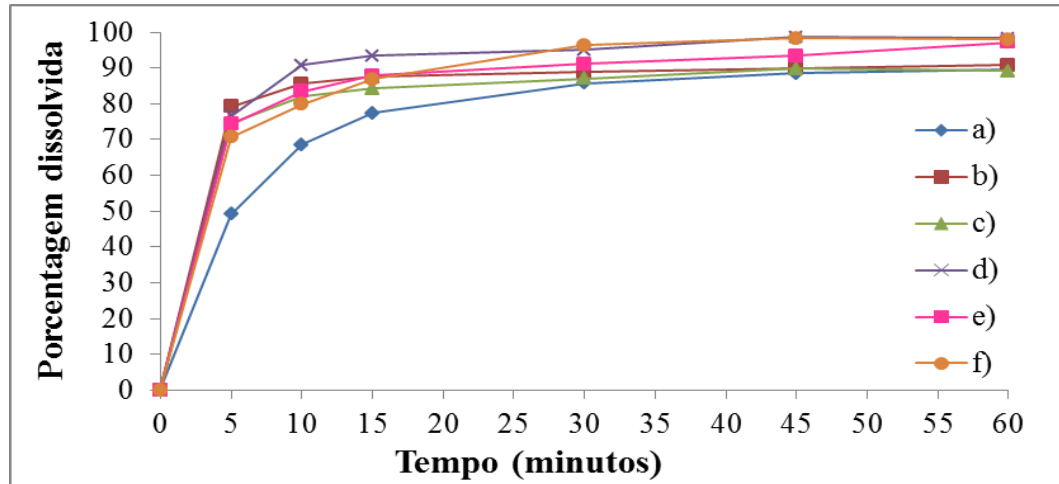
Para a comparação dos perfis foram determinadas as áreas sob a curva da porcentagem de dissolução de CPF *versus* tempo através do programa Microsoft Excel, individualmente, para as doze unidades de comprimidos de cada fabricante (referência, similar e genérico). A eficiência de dissolução foi então calculada e os resultados foram comparados por ANOVA e pelo teste de Tukey.

4.9 Resultados

4.9.1 Desenvolvimento do método de dissolução

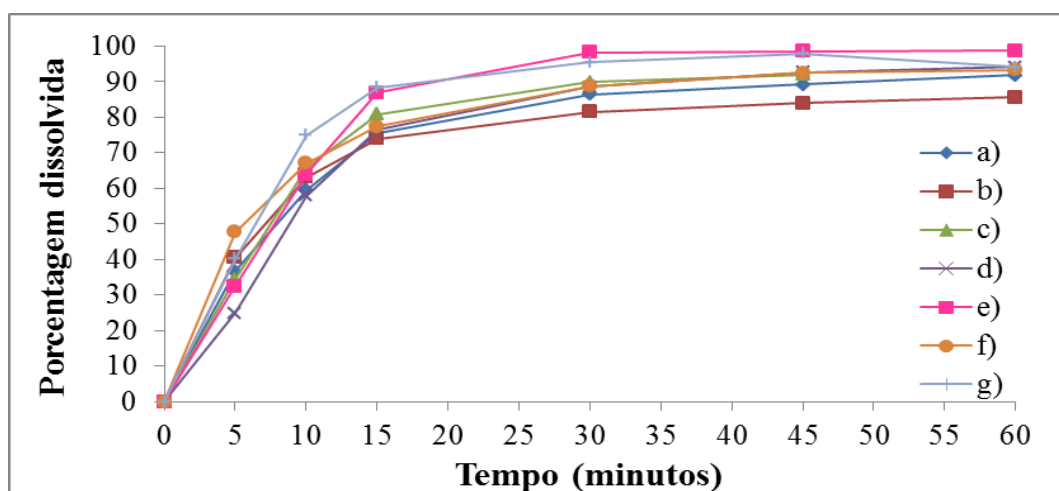
Os perfis de dissolução obtidos nas condições I a VI (descritas na Tabela 4.1) estão apresentados na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Perfis de dissolução de comprimidos de CPF nos meios: a) tampão acetato pH 4,0; b) tampão fosfato pH 5,8; c) tampão fosfato pH 6,0; d) tampão fosfato pH 6,5; e) tampão fosfato pH 6,8 e f) tampão fosfato pH 7,4



A Figura 4.2 apresenta os perfis de dissolução obtidos nas condições VII até XIII (descritas na Tabela 4.1).

Figura 4.2 – Perfis de dissolução de comprimidos de CPF nos meios: a) HCl 0,01 M + LSS 0,5 % (900 mL de meio), b) HCl 0,01 M + LSS 0,5 % (1000 mL de meio); c) HCl 0,01 M + LSS 0,75 %; d) HCl 0,01 M + LSS 1 % (50 rpm); e) HCl 0,01 M + LSS 1 % (75 rpm); f) HCl 0,1 M + LSS 0,5 % e g) LSS 0,025 M



A Tabela 4.3 apresenta as condições experimentais estabelecidas para a análise da dissolução do CPF.

Tabela 4.3 – Parâmetros estabelecidos para o ensaio de dissolução

Características	Descrição
Meio	HCl 0,01 M + LSS 1 %
Volume do meio	900 mL
Aparelho	Pá
Velocidade de rotação	50 rpm
Tempo de coleta	5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos
Temperatura do banho	37,5 °C

4.9.2 Validação do ensaio de dissolução

O CPF apresentou-se solúvel até, pelo menos, cinco vezes a concentração máxima obtida na cuba de dissolução.

Os resultados referentes à influência dos filtros estão descritos na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Resultados referentes à determinação da influência dos filtros na determinação das soluções de SQR e amostras dos comprimidos de CPF em HCl 0,01 M + LSS 1 % (n = 3)

Condição	Teor em % ± DPR	
	SQR	Comprimidos
Sem filtração	-	100,00 ± 0,24
Filtrada	99,60 ± 0,75	99,63 ± 0,55

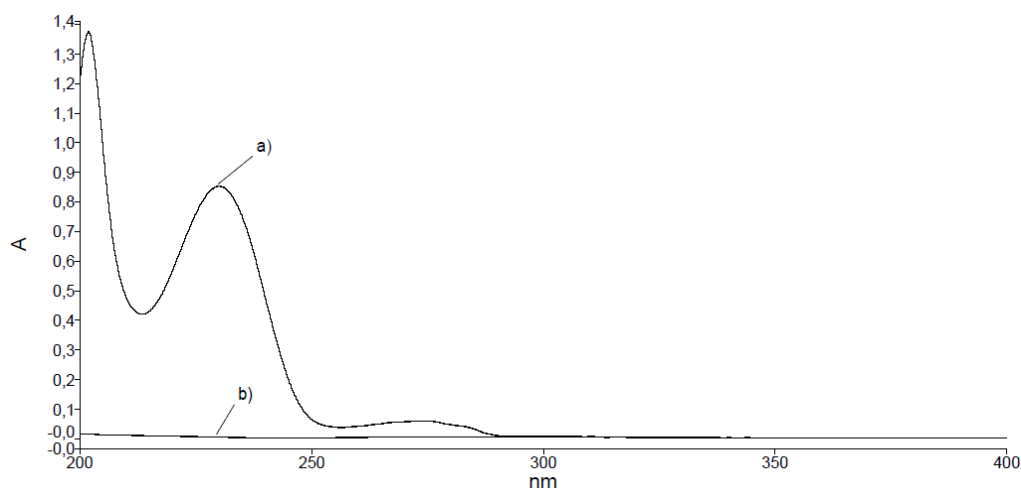
Os resultados referentes à estabilidade das soluções da SQR de CPF e da solução amostra dos comprimidos estão descritos na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade das soluções de SQR e amostras dos comprimidos de CPF em HCl 0,01 M + LSS 1 % (n = 3)

Condição	Teor em % ± DPR	
	SQR	Comprimidos
Recém preparada	-	100,03 ± 0,21
2 horas, a 37,0 ± 0,5 °C	99,52 ± 0,89	99,47 ± 0,70
24 horas, à temperatura ambiente	99,68 ± 0,38	100,59 ± 0,16

A sobreposição dos espectros de absorção na região do UV das soluções de CPF SQR e ASE no meio de dissolução HCl 0,01 M + LSS 1 %, na faixa de 200 a 400 nm, está apresentada na Figura 4.3.

Figura 4.3 – Sobreposição dos espectros de absorção na região do UV das soluções: a) CPF SQR e b) ASE, no meio de dissolução HCl 0,01 M + LSS 1 %



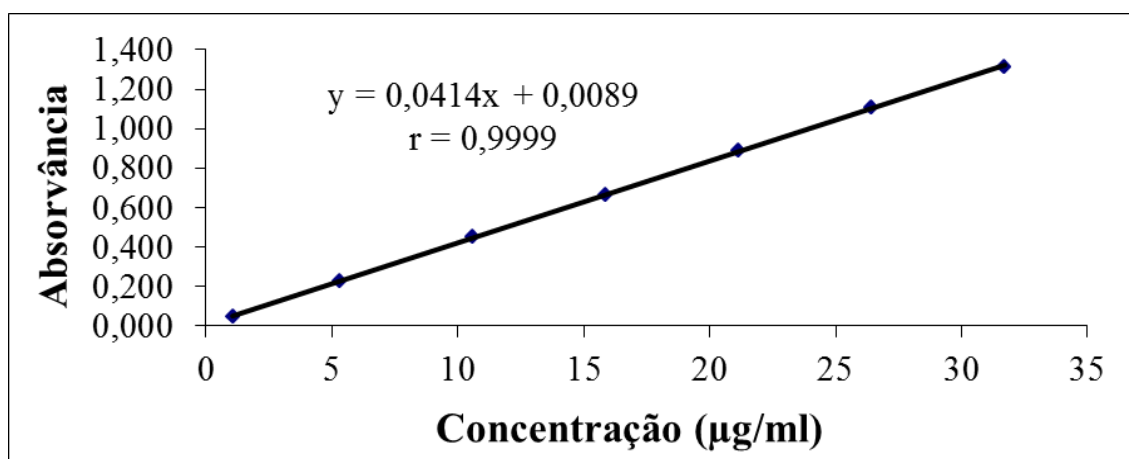
Os valores experimentais obtidos na construção da curva padrão do CPF SQR no meio de dissolução, em 229 nm, estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Valores de absorvância obtidos na determinação da curva padrão do CPF SQR

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Absorvância			Média	DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
1,0	0,045	0,048	0,049	0,047	4,40
5,0	0,227	0,224	0,233	0,228	2,01
10,0	0,453	0,454	0,442	0,450	1,48
15,0	0,675	0,658	0,663	0,665	1,31
20,0	0,886	0,882	0,898	0,889	0,94
25,0	1,121	1,106	1,099	1,109	1,01
30,0	1,313	1,310	1,313	1,312	0,13

A partir das áreas obtidas foram calculados a equação da reta e o coeficiente de correlação (r), descritos na Figura 4.4.

Figura 4.4 – Representação gráfica da curva padrão do CPF



A Tabela 4.7 apresenta os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão.

Tabela 4.7 – ANOVA das absorvâncias obtidas para a determinação da curva padrão do CPF SQR

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F
Entre	6	3,8521	0,6420	13039,10* (2,85)
- regressão linear	1	3,8516	3,8516	78223,17* (4,6)
- desvio da linearidade	5	0,0006	0,0001	2,28 (2,96)
Resíduo	14	0,0007	0,000	
Total	20	3,8528		

* Significativo para $p < 0,05$. Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F tabelado.

Os valores experimentais obtidos na determinação da porcentagem dissolvida de CPF, em comprimidos, referentes a precisão do método de dissolução encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Valores experimentais referentes à determinação da porcentagem dissolvida de CPF em comprimidos

Amostras	% dissolvida de CPF	
	Primeiro dia	Segundo dia
1	97,94	97,16
2	96,67	93,35
3	96,08	97,47
4	95,68	89,36
5	94,90	91,87
6	88,60	97,18
Média	94,98	94,40
DPR	3,46	3,60

A Tabela 4.9 apresenta os resultados referentes ao teste de recuperação realizado através do método de adição de padrão.

Tabela 4.9 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado em ASE de comprimidos de CPF

Quantidade de SQR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		% de Recuperação
Adicionada	Recuperada	
	2,27	102,71
2,21	2,21	100,00
	2,23	100,90
	22,74	102,76
22,13	22,47	101,54
	22,52	101,76
	27,38	98,99
27,66	27,70	100,14
	27,73	100,25
	Média (%)	101,01
	DPR	1,27

A Tabela 4.10 apresenta os resultados referentes a robustez do método.

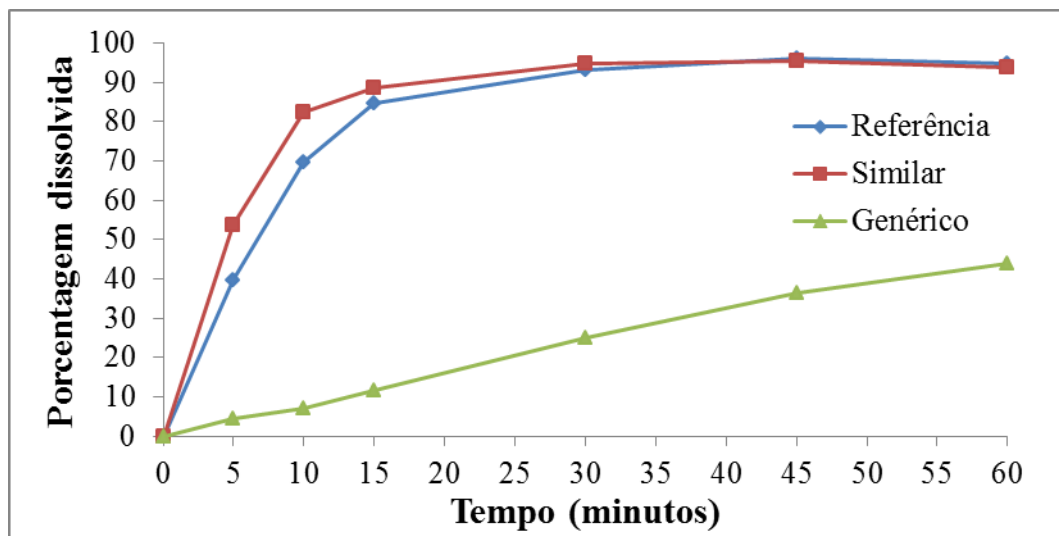
Tabela 4.10 – Valores experimentais obtidos na análise da robustez do método de dissolução

Condições analisadas	Teor médio em % \pm DPR
0,9 % de LSS	99,45 \pm 1,69
1,1 % de LSS	98,97 \pm 1,42
Sem modificação	97,36 \pm 1,95

4.9.3 Comparação dos perfis de dissolução

Os resultados dos perfis de dissolução *in vitro* dos comprimidos de CPF de diferentes fabricantes encontram-se na Figura 4.5.

Figura 4.5 – Representação gráfica das porcentagens dissolvidas dos comprimidos de CPF, empregando aparato pás, 50 rpm, em meio HCl 0,01 M + LSS 1 % a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ avaliados por espectrofotometria na região do UV (n = 12)



A Tabela 4.11 apresenta os valores de eficiência de dissolução dos perfis realizados, com análise estatística comparativa por ANOVA e a Tabela 4.12 o teste de Tukey.

Tabela 4.11 – Valores de eficiência de dissolução (%), DPR e ANOVA de comprimidos de CPF

Amostra	Referência	Similar	Genérico
1	81,8	83,47	24,18
2	79,63	88,13	22,09
3	85,21	86,74	20,12
4	86,49	82,13	24,53
5	86,4	86,03	23,02
6	81,86	84,51	24,48
7	86,75	85,5	23,96
8	84,49	85,37	22,85
9	85,1	85,87	25,74
10	72,01	83,49	24,67
11	75,47	87,81	24,59
12	82,6	84,59	24,82
Média	82,32	85,30	23,75
DPR	5,62	2,09	6,38
ANOVA	F calculado		F tabelado
	1612,19*		3,275

* Significativo para $p < 0,05$.

Tabela 4.12 – Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para os comprimidos de CPF

Produtos	Média (X)	X – 23,75	X – 82,32
Similar	85,30	61,55*	2,99*
Referência	82,32	58,56*	
Genérico	23,75		

* Significativo para $p < 0,05$ (Q tabelado 2,88)

4.10 Discussão

A avaliação da qualidade dos medicamentos é fundamental para garantir a qualidade dos produtos liberados para comercialização, dentre os ensaios que se aplicam às formas farmacêuticas sólidas, a dissolução é o de maior importância na avaliação da capacidade da forma farmacêutica liberar seu princípio ativo (BRUM, 2012).

O CPF não possui monografia farmacopeica oficial para análise de formas farmacêuticas. No entanto, a Farmacopeia Britânica publicou consulta pública de um teste de dissolução utilizando 900 mL de meio tampão fosfato pH 6,5 a 37 °C, aparato 2 com velocidade de rotação de 50 rpm, alíquota de 10 mL retirada após 45 minutos de análise, e análise por espectrofotometria na região do UV 230 nm.

Durante o desenvolvimento deste trabalho o meio de dissolução indicado na Farmacopeia Britânica foi testado, bem como meios com valores de pH próximos a este, porém, por apresentarem uma dissolução muito rápida do fármaco (mais de 70 %, em 5 minutos) outros meios que pudessem apresentar um caráter mais discriminativo foram testados.

Os perfis de dissolução obtidos com as soluções tampão acetato e fosfato (Figura 4.1) apresentaram velocidade de dissolução rápida, assim outros meios foram testados utilizando HCl com a adição de LSS a fim de desenvolver um método mais discriminativo. A utilização de HCl com adição de LSS (Figura 4.2) apresentou velocidade de dissolução mais lenta, quando comparada às soluções com tampão acetato e fosfato, devido a baixa solubilidade do CPF em meios ácidos, sendo esta auxiliada pela ação do tensoativo no aumento da molhabilidade. Os resultados da determinação dos perfis de dissolução realizados em diferentes concentrações de LSS demonstraram a existência de uma relação de proporcionalidade entre o aumento da solubilidade e o aumento da concentração de tensoativo. Com base nestes resultados, as condições otimizadas para a análise de comprimidos, demonstradas na Tabela 4.3, foram: 900 mL de HCl 0,01 M + LSS 1 %, pás e rotação de 50 rpm (condição X da Tabela 4.1).

A utilização de solução de HCl com adição de LSS 1 % apresentou o perfil com a maior poder discriminativo entre os meios testados, pois alcançou uma velocidade de dissolução lenta, o que possibilita detectar desvios de fabricação, garantir reprodutibilidade lote a lote e a comparação de perfis de dissolução de formulações diferentes.

O método deve cumprir com os parâmetros de validação, tais como especificidade, linearidade, precisão e exatidão, além da avaliação do filtro, estabilidade do fármaco no meio de dissolução e condições *sink* (USP 35, 2012). Neste trabalho optou-se por escolher a espectrofotometria na região do UV como método de quantificação devido a sua facilidade, eficiência e rapidez na análise.

A solubilidade do CPF foi testada em diferentes concentrações e verificou-se que volume de 900 mL de HCl 0,01 M + LSS 1 % foi suficiente para garantir as condições *sink*.

A avaliação da influência do filtro no método proposto é muito importante e deve ser feita antes de qualquer ensaio de dissolução das amostras, sendo realizada visando verificar possíveis alterações na concentração do fármaco ou liberação de material para a solução (CAZEDEY, 2012). Na análise dos resultados obtidos (Tabela 4.4) verificou-se que não houve alteração significativa no teor da SQR e dos comprimidos antes e após a filtração com filtro quantitativo.

Os valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade de soluções da SQR e amostras de comprimidos apresentaram teores próximos a 100 %, demonstrando que o CPF mantém suas propriedades nas condições de análise empregadas, conforme Tabela 4.5. De acordo com a literatura, o intervalo aceitável para a estabilidade da solução é de 98 a 102 % do valor inicial (USP 35, 2012).

Na avaliação da especificidade (Figura 4.3), verificou-se que os excipientes da formulação não interferiram na determinação do fármaco no comprimento de onda de máxima absorção do CPF (233 nm). A porcentagem de interferência, quando comparada à absorvância da SQR, foi de 1,16 %, portanto, inferior ao valor estabelecido de até 2 %, conforme a literatura (USP 35, 2012).

A linearidade do método analítico foi determinada a partir do coeficiente de correlação (r) (Figura 4.4) e da ANOVA (Tabela 4.7). A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ($y = 0,414x + 0,0089$) e o valor do coeficiente de correlação ($r = 0,9999$) indicaram a existência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. Os resultados obtidos na ANOVA demonstram que a regressão foi significativa ($F = 78223,17$) e o valor de F calculado para o desvio da linearidade ($F = 2,28$) foi inferior ao valor de F tabelado para $p < 0,05$, demonstrando linearidade na faixa de concentração estudada ($1 - 30 \mu\text{g mL}^{-1}$).

As análises de precisão de um método avaliam a proximidade entre os resultados de várias medidas efetuadas na mesma amostra, os resultados apresentados na Tabela 4.8 demonstram uma baixa variação, apresentando coeficiente de variação menor que 5 % (BRASIL, 2003b).

A exatidão do método de dissolução foi determinada através do teste de recuperação, no qual quantidades conhecidas da SQR de CPF em solução foram adicionadas a ASE da formulação em balões volumétricos. O teste de recuperação não foi realizado diretamente nas cubas de dissolução devido a grande quantidade de SQR necessária a análise (aproximadamente 1 grama). As porcentagens médias de recuperação (Tabela 4.9) demonstraram a exatidão do método proposto.

A avaliação da robustez do método demonstrou que uma pequena variação na concentração do tensoativo utilizado no meio ($\pm 0,1$ %) não causa interferência importante na análise, uma vez que os valores encontrados na determinação do CPF após 60 minutos de dissolução, em ambos os meios testados, foram muito próximos aos encontrados utilizando o meio sem modificação (Tabela 4.10).

O perfil de dissolução é obtido determinando-se a quantidade de fármaco dissolvido no meio de dissolução, através da coletada de alíquotas em intervalos de tempo pré-determinados. A partir dos dados obtidos, constrói-se uma curva de porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo (BRUM, 2012). A representação gráfica dos perfis de dissolução, obtidos na análise dos comprimidos de CPF, está apresentada na Figura 4.5. Em primeira análise foi possível verificar que os perfis demonstraram baixa variabilidade entre as doze cubas testadas de cada fabricante, apresentando DPR inferior a 20 % nos primeiros 15 minutos, e inferior a 10 % nos tempos posteriores.

A comparação de perfis de dissolução é útil para selecionar formulações durante o processo de desenvolvimento farmacotécnico, avaliar a estabilidade, aperfeiçoar formulações, avaliar o efeito de determinadas alterações em produtos já em comercialização, como ferramenta no controle de qualidade lote-a-lote e, também para estabelecer a semelhança entre formulações (BRUM, 2012).

A partir dos perfis de dissolução foi possível calcular a eficiência de dissolução, que foi avaliada estatisticamente por ANOVA. Os resultados apresentados na Tabela 4.11 demonstraram que os perfis apresentaram diferenças significativas entre si ($p = 0,05$). Assim, aplicou-se o teste de Tukey (Tabela 4.12), no qual se pode observar que todas as amostras

analisadas apresentavam eficiências de dissolução estatisticamente diferentes, principalmente as amostras comerciais de medicamento genérico, que apresentaram um perfil de dissolução muito lento quando comparado aos demais.

O medicamento genérico é o único que apresenta excipientes diferentes em sua formulação, pois não tem dióxido de silício e tem croscarmelose sódica descritos em sua bula. Uma vez que a croscarmelose é utilizada como desintegrante (ROWE, 2009) e por isso deveria facilitar a dissolução da forma farmacêutica, a diferença observada do genérico em relação aos demais comprimidos analisados pode estar relacionada com seu processo de fabricação (VIÇOSA, 2003). Diversas etapas no processo de fabricação podem influenciar no perfil de liberação do fármaco, como a quantidade e características dos agentes agregantes, desintegrantes e lubrificantes adicionados, tempos de mistura, a força de compressão empregada, processos de fabricação de comprimidos (granulação via úmida, granulação via seca ou compressão direta), umidade, entre outros (LIMA, 2006; VIÇOSA, 2003).

Não se pode concluir um desvio de qualidade baseado apenas nos ensaios de liberação *in vitro*, uma vez que estes testes frequentemente apresentam-se mais sensíveis na diferenciação de formulações do que os ensaios *in vivo*, podendo indicar possíveis alterações na qualidade antes que o desempenho *in vivo* seja modificado. Assim, segundo a RE 901 (BRASIL, 2003b) os medicamentos genéricos geralmente tem a mesma especificação de dissolução do referencial, porém se apresentarem dissolução diferente pode-se utilizar outra especificação de dissolução para o genérico, desde que um estudo *in vivo* tenha comprovado a bioequivalência entre ambos.

O método de dissolução desenvolvido e validado utilizando espectrofotometria na região do UV para determinação da quantidade dissolvida de CPF em solução de HCl com adição de LSS 1 % apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, ou seja, apresentou-se adequado para análise de controle de qualidade de rotina dos comprimidos à base de CPF.

5 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO CIPROFIBRATO EM CONDIÇÕES FOTOLÍTICAS

5.1 Introdução

O controle de qualidade é responsável pela avaliação de todos os insumos, materiais de embalagem, produtos em processo e produtos finais e, além de realizar análises físico-químicas e microbiológicas, monitora a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos fornecidos a população. Uma vez que estas características devem permanecer constantes, desde a produção até o término do seu prazo de validade, o estudo de estabilidade torna-se relevante dentro do controle de qualidade de medicamentos (BRASIL, 2003c; MANFIO, 2005).

O estudo de estabilidade objetiva demonstrar a variação da qualidade de um fármaco em função do tempo sob influência de uma variedade de fatores, podendo assim estabelecer um período para realização de novos testes, determinar prazos de validade e recomendar as condições de estocagem (ICH, 2003).

Além dos fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, outros fatores relacionados ao próprio produto, podem afetar a estabilidade de produtos farmacêuticos como propriedades físicas e químicas da substância ativa, interação entre a substância ativa e excipientes, processo de produção, forma farmacêutica e materiais de embalagem (BRASIL, 2005; LEITE, 2005).

A degradação de um produto farmacêutico pode ocasionar inúmeras alterações em suas características, com sérias consequências a sua qualidade, tais como: redução ou aumento da sua atividade, alteração da biodisponibilidade, perda da uniformidade de conteúdo, perda da qualidade microbiológica, formação de produtos de toxicidade elevada, entre outras. Assim, a avaliação da estabilidade dos medicamentos, de forma a assegurar a identidade, eficácia, segurança e pureza até o momento de seu uso é de extrema importância (SILVA *et al.*, 2009).

Os testes de estabilidade consistem da avaliação de testes acelerados e testes confirmatórios. Os estudos acelerados permitem determinar os fatores que afetam a estabilidade dos produtos, elucidar produtos e rotas de degradação e são bastante utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade. Os estudos confirmatórios de longa duração são realizados a fim de verificar as características físicas, químicas,

biológicas e microbiológicas do produto durante e depois do prazo de validade esperado (ICH, 2003; SILVA *et al.*, 2009).

A avaliação da estabilidade também pode ser efetuada pelo ensaio de estresse, que permite determinar o efeito de condições extremas de degradação sobre o produto farmacêutico (excedendo aquelas utilizadas em estudos acelerados), verificar o perfil de degradação da molécula e identificar os produtos gerados (SILVA *et al.*, 2009). Segundo o ICH (2003), o fármaco deve ser submetido à degradação por aquecimento convencional em diferentes meios reacionais e à degradação frente à luz.

A cinética é o estudo da velocidade em que as reações ocorrem. Entre os objetivos dos estudos de cinética de degradação estão a obtenção experimental dos dados cinéticos, a proposição do mecanismo de reação e o estabelecimento de condições para aumentar ou diminuir a velocidade de reação conforme necessidade. Em geral, as reações de degradação de produtos farmacêuticos são de ordem zero e de primeira ordem e, mais raramente, de segunda ordem (LEITE, 2005).

As reações de ordem zero são aquelas em que a velocidade independe da concentração dos reagentes. Nas reações de primeira ordem, a velocidade da reação é proporcional à concentração de um dos reagentes. As reações de segunda ordem se caracterizam por uma velocidade de reação proporcional à concentração de dois reagentes ou à segunda potência de um deles (LEITE, 2005).

Para a avaliação das amostras obtidas nos estudos de estabilidade se faz necessária a utilização de métodos indicativos de estabilidade. Estes métodos devem permitir a quantificação exata da substância ativa, além de distinguir a mesma dos produtos de degradação. Uma técnica muito empregada para identificação do fármaco inalterado e de seus possíveis produtos de alteração é a CLAE (SILVA *et al.*, 2009).

A luz é um fator ambiental capaz de fornecer energia necessária para desencadear reações de degradação de acordo com o comprimento de onda (λ) emissor da radiação luminosa. Quanto menor o λ da radiação, maior energia é absorvida por mol de reagente, e com isso, mais rápida a degradação (LACHMAN *et al.*, 2001). Uma série de reações pode ser iniciada fotoquimicamente, tais como: hidrólise, oxidação, isomerização, abertura de anel, polimerização ou remoção de vários substituintes, como halogênios ou grupos carboxílicos (TØNNESEN, 2001).

A fotossensibilidade do CPF, foi verificada a partir dos resultados obtidos nos estudos de degradação forçada realizados no desenvolvimento do método indicativo da estabilidade e, devido à extensa degradação encontrada, buscou-se obter dados sobre a velocidade de degradação fotoquímica do fármaco nas formas farmacêuticas de comprimidos e cápsulas em solução. A cinética de degradação foi calculada em condições fotolíticas para definir a ordem e a velocidade da reação de degradação da solução de CPF em ACN.

5.2 Substância química de referência (SQR)

- Utilizou-se a mesma SQR descrita no item 3.2.

5.3 Matéria-prima

- Utilizou-se a mesma matéria-prima descrita no item 3.3.

5.4 Produtos farmacêuticos

- Cápsulas na concentração de 100 mg de CPF, obtidas em farmácia magistral.

Excipientes: estearato de magnésio, dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e amido.

- Comprimidos na concentração de 100 mg de CPF, com o nome comercial de Oroxadin[®], fabricado pela Sanofi-Aventis.

Excipientes: amido, celulose microcristalina, dióxido de silício, hipromelose, lactose monoidratada, laurilsulfato de sódio, óleo vegetal hidrogenado e água purificada.

5.5 Solventes e reagentes

- Acetonitrila - Tedia[®]
- Ácido *o*-fosfórico - Merck[®]
- Água ultrapurificada
- Etanol - Quemis[®]
- Trietilamina - Vetec[®]

5.6 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Shimadzu[®] ay 220
- Bomba a Vácuo e Ar Comprimido Logen[®] - 131

- Coluna cromatográfica Shim-pack[®] CLS-ODS (M) (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm), Shimadzu[®]
- Cromatógrafo líquido equipado com desgaseificador DGU-20A₅; bomba LC-20AT; injetor automático SIL-20A; detector de arranjo de diodos SPD-M20A; forno CTO-20A; controlador CBM-20A e software LC Solution, marca Shimadzu[®]
- Lavadora ultra-sônica Unique[®]
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm
- Lâmpada ultravioleta TUV 30W/G30 T8, 254 nm, Starlux[®]
- Potenciômetro Hanna[®] pH 21
- Termômetro Químico para laboratório HG[®]

5.7 Avaliação da cinética de degradação das soluções de CPF matéria-prima, comprimidos e cápsulas em condições fotolíticas

5.7.1 Preparo das soluções

5.7.1.1 Preparação da solução da SQR de CPF

Pesou-se o equivalente a 25 mg de CPF SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, com o auxílio de 10 mL de etanol. Agitou-se até completa dissolução e completou-se o volume com ACN. Transferiu-se 1 mL dessa solução para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com ACN, para obter a concentração final de 20 µg mL⁻¹.

5.7.1.2 Preparação das soluções para fotólise

- Matéria-prima

Pesou-se 25 mg de CPF matéria-prima e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, com o auxílio de 10 mL de etanol. Submeteu-se a amostra a agitação em ultrassom, por 5 minutos, e completou-se o volume com ACN. A solução, na concentração final de 1000 µg mL⁻¹, foi filtrada em membrana de nylon de 0,45 µm e 2 mL da mesma foram transferidos para cubetas de quartzo, posteriormente vedadas com *para-film*[®].

- Comprimidos

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira V Edição (2010). Os mesmos foram triturados para obtenção de um pó homogêneo. Pesou-se o equivalente a 50 mg de CPF e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL com auxílio de 10 mL de etanol. Submeteu-se a amostra a agitação em ultrassom, por 5 minutos, e completou-se o volume com ACN. A solução, na concentração final de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi filtrada em membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ e 2 mL da mesma foram transferidos para cubetas de quartzo, posteriormente vedadas com *para-film*[®].

- Cápsulas

Determinou-se o peso do conteúdo de 20 cápsulas conforme determina a Farmacopeia Brasileira V Edição (2010) e homogeneizou-se. Pesou-se o equivalente a 50 mg de CPF e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de 10 mL de etanol. Submeteu-se a amostra a agitação em ultrassom, por 5 minutos, e completou-se o volume com ACN. A solução, na concentração final de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi filtrada em membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ e 2 mL da mesma foram transferidos para cubetas de quartzo, posteriormente vedadas com *para-film*[®].

5.7.2 Condições de fotólise

A determinação da cinética de degradação das soluções de CPF matéria-prima, comprimidos e cápsulas foi realizada utilizando lâmpada TUV 30W/G30 T8, 254 nm, Starlux[®] (254 nm) de 30 W, mantida em câmara horizontal de vidro espelhada internamente (80 x 25 x 35 cm). As soluções amostras foram colocadas em cubetas de quartzo, com 1 cm de caminho óptico.

As amostras permaneceram sob exposição da luz durante os seguintes tempos: 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. Em cada intervalo de tempo foram retiradas duas cubetas contendo as amostras. Transferiu-se, quantitativamente, alíquotas de 1 mL de cada cubeta para balões volumétricos de 50 mL e completou-se o volume com ACN, de modo a obter duas soluções, em cada intervalo de tempo, na concentração teórica de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPF.

Uma cubeta contendo a amostra, porém protegida da radiação luminosa com papel alumínio, foi colocada na câmara de vidro espelhada para verificação da influência da temperatura na degradação da amostra.

Para a realização da determinação quantitativa foram utilizadas as condições cromatográficas descritas no item 3.

5.7.3 Definição da ordem de reação

A ordem de reação foi determinada pelo método gráfico, através dos resultados de concentração de CPF, obtidos em cada tempo de exposição, para construção dos gráficos de:

- Ordem zero: tempo de exposição da amostra a radiação UV (min.) *versus* concentração – C ($\mu\text{g mL}^{-1}$);
- Primeira ordem: tempo de exposição da amostra a radiação UV (min.) *versus* logaritmo da concentração – $\text{Log } C$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$);
- Segunda ordem: tempo de exposição da amostra a radiação UV (min.) *versus* inverso da concentração – $1/C$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

5.8 Resultados

As sobreposições dos cromatogramas das soluções de CPF matéria-prima e amostras no tempo zero (sem exposição) e após exposição à radiação UV, por 90 minutos, estão apresentadas na Figura 5.1 e 5.2, respectivamente.

Figura 5.1 – Cromatogramas obtidos das soluções de matéria-prima (a), comprimidos (b) e cápsulas (c) na concentração teórica de $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ no tempo zero

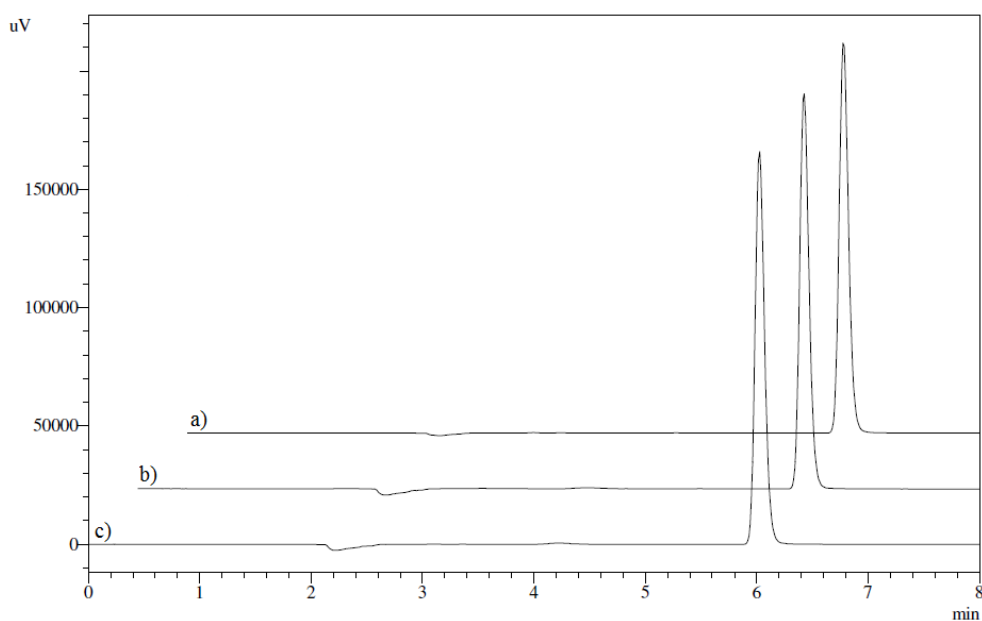
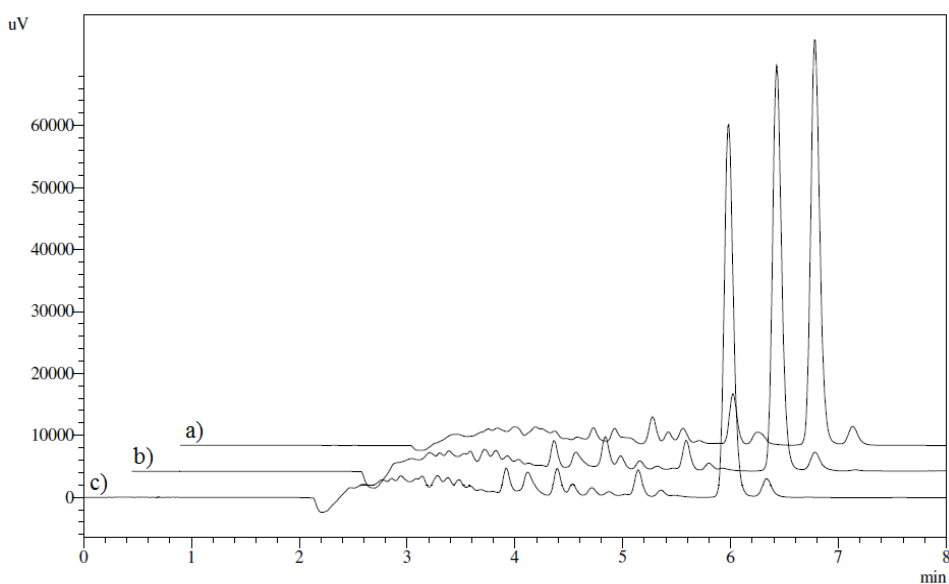


Figura 5.2 – Cromatogramas obtidos das soluções de matéria-prima (a), comprimidos (b) e cápsulas (c) na concentração teórica de $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ após exposição a luz UV 254 nm, por 90 minutos



As Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3 apresentam as áreas obtidas após exposição das soluções matéria-prima, comprimidos e cápsulas de CPF à luz UV 254 nm, em diferentes tempos, respectivamente.

Tabela 5.1 – Áreas obtidas no tempo zero e após exposição da solução matéria-prima de CPF à luz UV 254 nm

Tempo (minutos)	Área	Área média	DPR
0	971392	972965	0,23
	974538		
15	739778	735456	0,83
	731135		
30	637668	634384	0,73
	631103		
45	497663	517197	5,34
	536732		
60	469653	469320	0,10
	468988		
75	441984	412594	10,07
	383204		
90	420670	406595	4,90
	392521		

Tabela 5.2 – Áreas obtidas no tempo zero e após exposição da solução de comprimidos de CPF à luz UV 254 nm

Tempo (minutos)	Área	Área média	DPR
0	985336	984334	0,14
	983333		
15	775114	762341	2,37
	749569		
30	656924	649382	1,64
	641841		
45	569231	553506	4,02
	537781		
60	436700	457579	6,45
	478459		
75	411263	411076	0,06
	410889		
90	425023	398321	9,48
	371620		

Tabela 5.3 – Áreas obtidas no tempo zero e após exposição da solução de cápsulas de CPF à luz UV 254 nm

Tempo (minutos)	Área	Área média	DPR
0	985505	985107	0,06
	984710		
15	778182	774193	0,73
	770205		
30	668515	673944	1,14
	679373		
45	576174	585302	2,21
	594431		
60	493468	495361	0,54
	497254		
75	414699	414549	0,05
	414399		
90	402612	401797	0,29
	400982		

As Tabelas 5.4, 5.5 e 5.6 apresentam os valores de C, Log C e 1/C utilizados para construção dos gráficos e definição da ordem da reação.

Tabela 5.4 – Valores de C, Log C e 1/C obtidos na análise da solução de matéria-prima para construção dos gráficos e definição da ordem da reação

Tempo (minutos)	C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Log C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1/C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
0	19,9971	1,3010	0,0500
15	15,1156	1,1794	0,0662
30	13,0383	1,1152	0,0767
45	10,6298	1,0265	0,0941
60	9,6458	0,9843	0,1037
75	8,4799	0,9284	0,1179
90	8,3566	0,9220	0,1192

Tabela 5.5 – Valores de C, Log C e 1/C obtidos na análise da solução de comprimidos para construção dos gráficos e definição da ordem da reação

Tempo (minutos)	C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Log C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1/C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
0	20,0074	1,3012	0,0500
15	15,4952	1,1902	0,0645
30	13,1992	1,1205	0,0758
45	11,2505	1,0512	0,0889
60	9,3007	0,9685	0,1075
75	8,3555	0,9220	0,1197
90	8,0962	0,9083	0,1235

Tabela 5.6 – Valores de C, Log C e 1/C obtidos na análise da solução de cápsulas para construção dos gráficos e definição da ordem da reação

Tempo (minutos)	C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Log C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1/C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
0	19,7818	1,2963	0,0506
15	15,5464	1,1916	0,0643
30	13,5334	1,1314	0,0739
45	11,7533	1,0702	0,0851
60	9,9473	0,9977	0,1005
75	8,3245	0,9204	0,1201
90	8,0684	0,9068	0,1239

As Figuras 5.3, 5.4 e 5.5 apresentam as representações gráficas das cinéticas de degradação de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem, respectivamente.

Figura 5.3 – Representação gráfica da cinética de ordem zero para degradação de CPF matéria-prima, comprimidos e cápsulas, em condições fotolíticas

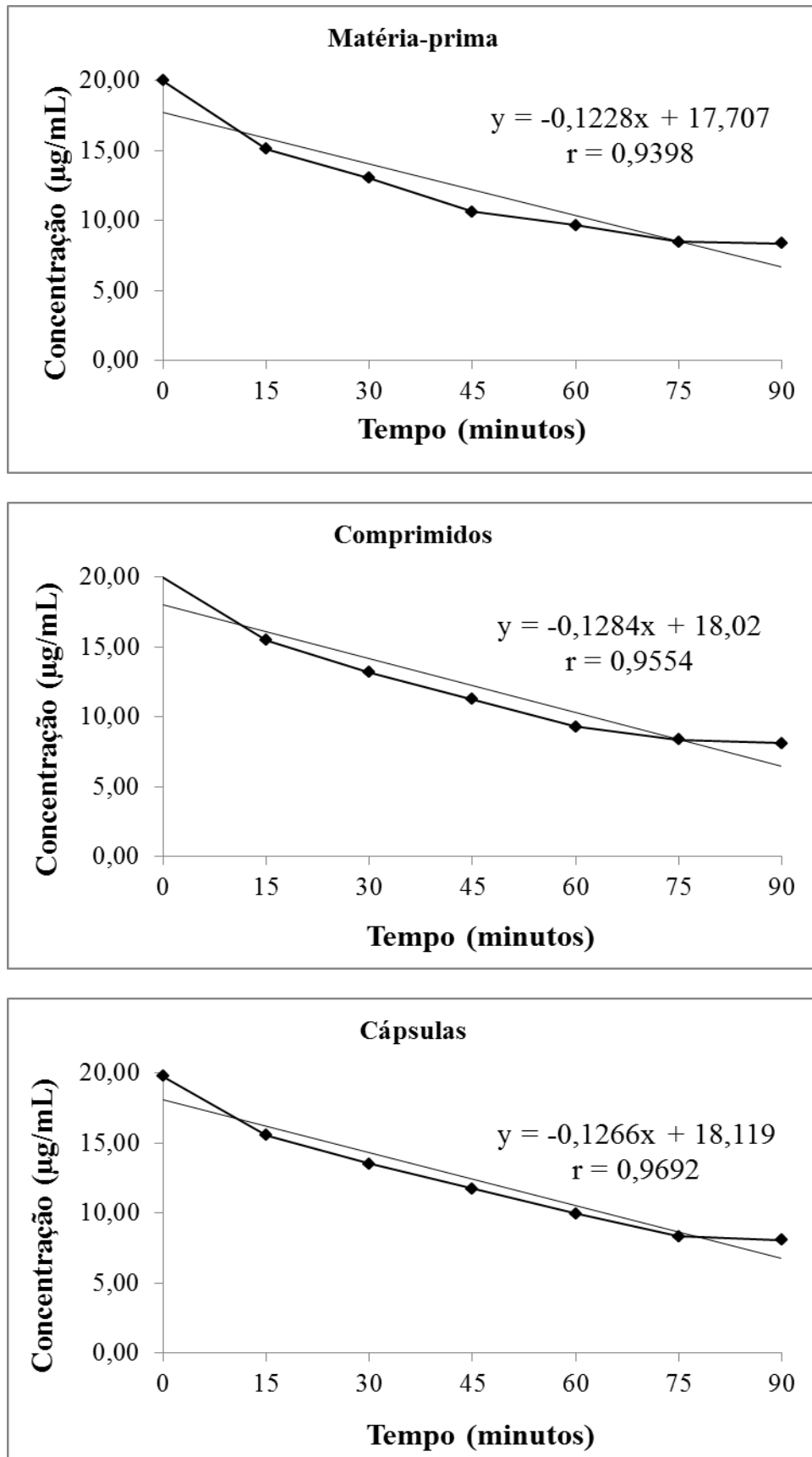


Figura 5.4 – Representação gráfica da cinética de primeira ordem para degradação de CPF matéria-prima, comprimidos e cápsulas, em condições fotolíticas

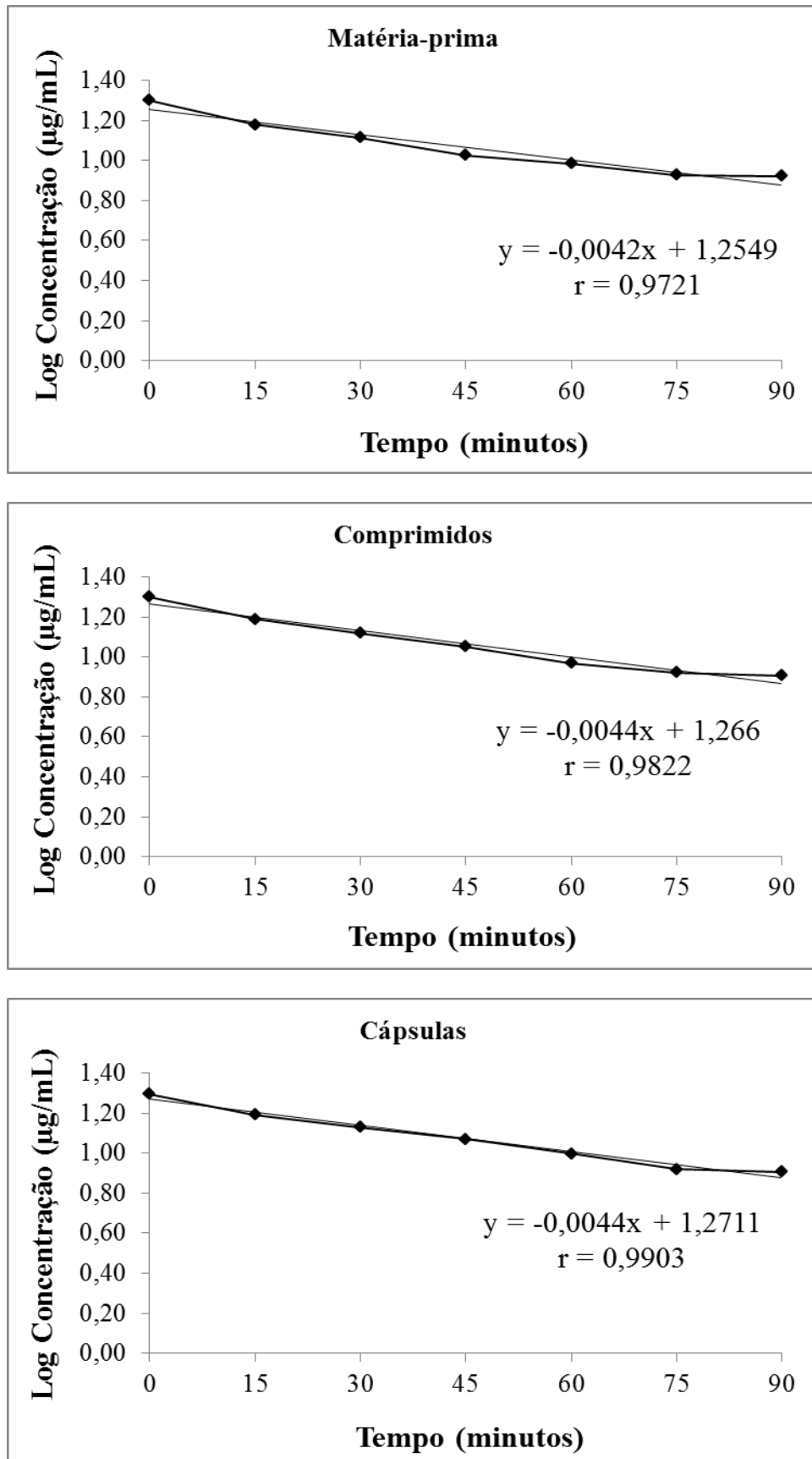
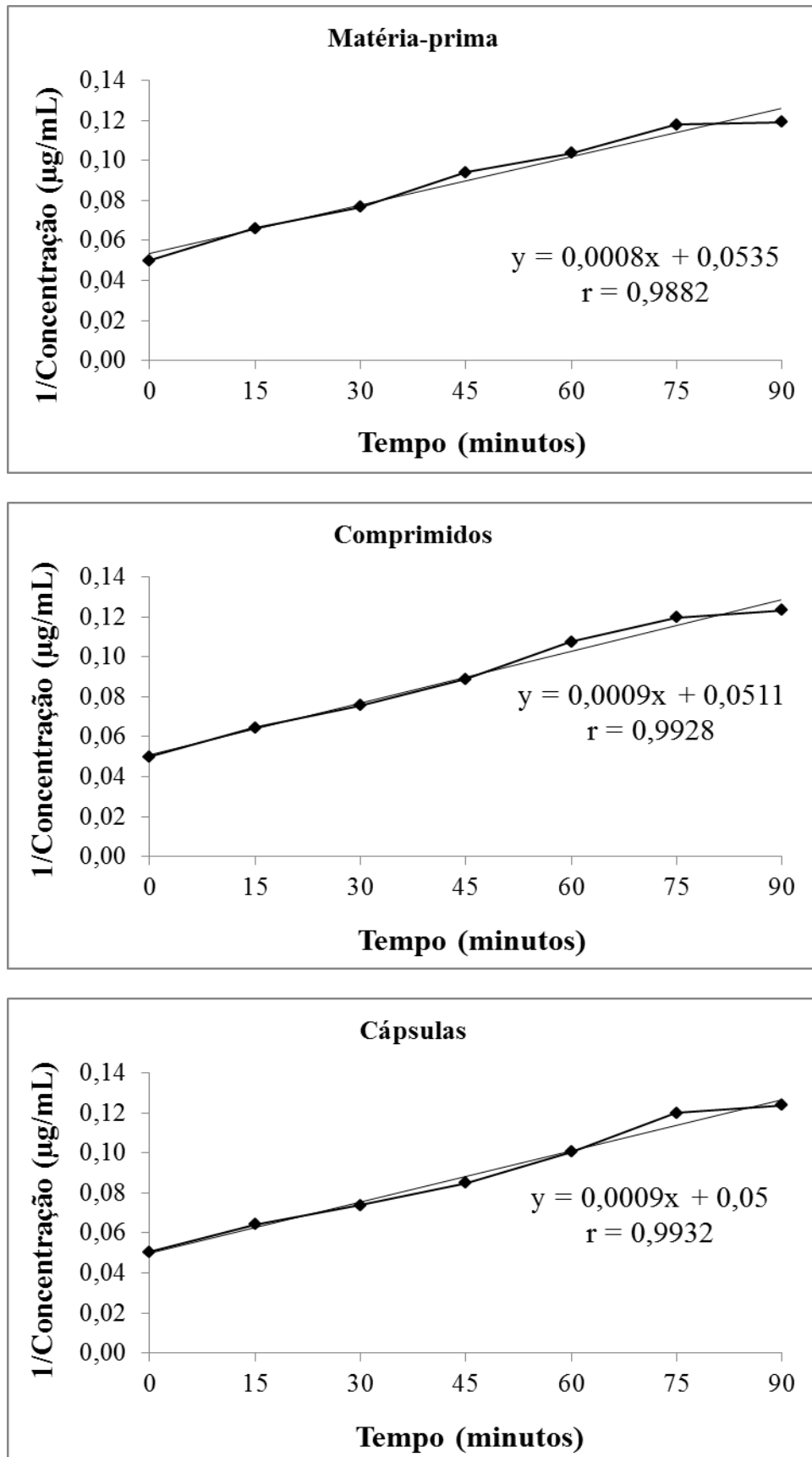


Figura 5.5 – Representação gráfica da cinética de segunda ordem para degradação de CPF matéria-prima, comprimidos e cápsulas, em condições fotolíticas



Observando os gráficos e analisando os coeficientes de correlação (r) obtidos para cada combinação de valores, sugere-se que a cinética de reação que melhor descreve a redução da concentração de CPF em função do tempo, é a de segunda ordem, ou seja, a redução no teor de CPF depende da concentração de dois reagentes ou a segunda potência da concentração de um deles, sendo neste caso possivelmente relacionada com a segunda potência da radiação incidida.

Após a determinação da ordem de reação foram calculadas as constante de decaimento (k), $T_{90\%}$ e tempo de meia vida ($T_{1/2}$), conforme os modelos cinéticos apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Modelos cinéticos de reação de segunda ordem

k	$T_{90\%}$	$T_{1/2}$
$1/C = 1/C_0 + kt$	$1/9 kC_0$	$1/kC_0$

Os valores obtidos no cálculo dos parâmetros cinéticos para reação de segunda ordem estão apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Parâmetros cinéticos calculados para comprimidos e cápsulas

Parâmetros cinéticos	Matéria-prima	Comprimidos	Cápsulas
k ($\mu\text{g min}^{-1}$)	0,0009	0,0009	0,0008
$t_{1/2}$ (min)	54,36	55,58	60,31
t_{90} (min)	6,04	6,18	6,70

5.9 Discussão

A avaliação da estabilidade em condições forçadas permite determinar o efeito de condições extremas de degradação sobre o produto farmacêutico. É um recurso muito

utilizado para pesquisa de mecanismos de degradação dos fármacos e avaliação dos potenciais produtos de degradação (CARSTENSEN e RHODES, 2000).

A finalidade dos estudos de fotoestabilidade é proporcionar dados sobre a mudança da qualidade de um fármaco através do tempo quando exposto a uma fonte de luz UV. A reação de fotólise é iniciada após absorção de radiação eletromagnética. A maioria dos princípios ativos empregados na preparação de medicamentos apresenta máximos de absorção na região do UV do espectro eletromagnético. A radiação UV é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo degradação da molécula. Normalmente, a fotodegradação de um composto químico é causada por oxidação ou quebra de ligações químicas, sendo que ambos os fenômenos estão relacionados com a energia incidida, pois quanto maior a intensidade da luz, maior a velocidade da reação (ANSEL, 2007; SILVA, 2009).

Guias como o ICH (2003) preconizam que os testes de degradação forçada devem ser realizados para elucidar as características de estabilidade inerentes a substância ativa e os estudos de degradação pela luz são partes integrantes desses testes. A presença de grupos cromóforos na estrutura química do CPF, tais como, ligações duplas conjugadas, sugerem que o fármaco é suscetível à radiação UV (254nm).

A determinação quantitativa do CPF para determinação da cinética de fotodegradação foi realizada utilizando o método validado e indicativo de estabilidade proposto no item 3 deste estudo. Os resultados apresentados nas Tabelas 5.4 a 5.6 demonstram a extensa degradação do fármaco, após à exposição a radiação. Na análise dos cromatogramas obtidos (Figura 5.2) pode-se verificar que ocorreu, para a matéria-prima e ambas as formas farmacêuticas, uma queda acentuada no pico referente ao fármaco e o aparecimento de picos adicionais. A análise por arranjo de fotodiodos (*diode array detector* – DAD) demonstrou que o pico do fármaco manteve-se puro em todos os casos.

A avaliação dos resultados, ilustrados nas Figuras 5.3, 5.4 e 5.5, demonstrou que a reação de segunda ordem apresentou os melhores coeficientes de correlação (0,9882, 0,9928 e 0,9932 para matéria-prima, comprimidos e cápsulas, respectivamente), sugerindo que a degradação das soluções de CPF em condições fotolíticas obedece a cinética de segunda ordem nas condições utilizadas no estudo. Quanto aos parâmetros cinéticos, tais como tempo de $T_{1/2}$, $T_{90\%}$ e k , a sua determinação é dependente da ordem da reação, tendo em vista que as

equações cinéticas dependem dessa informação. Os resultados dos cálculos dos parâmetros cinéticos estão apresentados na Tabela 5.7 e apresentam $t_{90\%}$ de aproximadamente 6 minutos para todos os casos, demonstrando a suscetibilidade do fármaco às condições testadas.

A temperatura interna da câmara de vidro manteve-se em torno de 30 °C e a área da solução amostra, utilizada como controle térmico, manteve-se estável durante o período de tempo do estudo. Esse resultado demonstra que a degradação do fármaco, nas condições do estudo, não foi influenciada pela temperatura.

6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DO CIPROFIBRATO NA PRESENÇA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM CONDIÇÕES FOTOLÍTICAS

6.1 Introdução

A avaliação da toxicidade de uma substância é realizada com o objetivo de prever os efeitos nocivos que a mesma poderá desencadear quando da exposição humana. Por esta razão, estes estudos são solicitados desde o desenvolvimento dos produtos até seu registro e comercialização (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

Os modelos animais são os mais utilizados nos testes de avaliação da toxicidade, sendo utilizados para o diagnóstico (< 5 %), educação, principalmente nas Universidades (25 %), desenvolvimento e testes de toxicidade de medicamentos e de produtos biológicos (30 a 40 %) e de novos produtos (10 %) (BHANUSHALI et al., 2010; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

Entretanto, com o surgimento de um programa internacionalmente reconhecido denominado de 3 Rs, o uso de animais na pesquisa levantou discussões principalmente sobre o grande número de animais utilizados e o sofrimento causado durante alguns experimentos. A proposta deste programa cujo nome deriva das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos: 1) redução (*Reduction*), 2) refinamento (*Refinement*) e 3) substituição (*Replacement*), é de reduzir o número de animais utilizados na pesquisa, diminuir o sofrimento ao mínimo possível, e buscar métodos alternativos que substituam os testes *in vivo* (BHANUSHALI et al., 2010; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004; ROGERO et al., 2003).

Os estudos *in vitro*, utilizando cultura de células primárias tem apresentado resultados satisfatórios. Através da observação da morfologia celular, dos efeitos na membrana, da atividade celular e do índice de proliferação, pode-se avaliar o dano celular. A realização de ensaios em culturas de células também apresenta resposta imediata ou de curto prazo, tais como alterações na permeabilidade de membrana ou perturbação de vias metabólicas; e sobrevivência em longo prazo (MARTINES, 2003).

6.1.1 Azul de tripan

O teste de exclusão de corante é usado para determinar o número de células viáveis presentes numa suspensão de células. Baseia-se no princípio de que as células vivas possuem

membranas celulares intactas que excluem determinados corantes, tais como o azul de tripan. Assim, quando a integridade da membrana das células está comprometida, há absorção do corante para as células, que apresentam cor azul escura sem anel refringente em torno, já as células viáveis não são coradas, apresentando um aspecto transparente com um anel refringente em torno delas. O teste de exclusão com azul de tripan é um método rápido, simples e pouco dispendioso para avaliar a viabilidade celular em resposta a agressões ambientais (LOUIS; SIEGEL, 2011).

6.1.2 Teste de Micronúcleos (MN)

MN é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, sua formação se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais ou, ainda, a falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (CARRARD et al., 2007; CHEQUER, 2008).

O princípio do teste está baseado no fato de que, durante a anáfase, as cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para pólos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero sim. Após a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas. Elementos que não foram transportados pelo fuso também podem ser englobados pelos núcleos recém formados. No entanto, alguns destes elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos novos núcleos e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como MN (FERRARO, 2009; SCHMID, 1975).

Para ser caracterizados como MN as alterações celulares devem preencher os seguintes critérios:

- Estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal;
- Borda evidente, sugerindo membrana nuclear;
- Formato arredondado;
- Localização intracitoplasmática;
- Diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal (BOHRER, 2003; CARRARD et al., 2007).

O teste só pode ser realizado com populações de células que tenham a capacidade de entrarem em divisão e deve ser feita, preferencialmente, após um único ciclo de divisão, pois existe a incerteza da permanência destas estruturas por mais de um ciclo de divisão (FERRARO, 2009).

A vantagem desse teste é basicamente a simplicidade, sendo de fácil execução, e permite que um grande número de células possa ser analisado em um curto espaço de tempo (SANTOS, 2011).

6.1.3 Ensaio Cometa

O DNA contido em células de organismos eucariotos possui alguns centímetros de comprimento, para que o mesmo seja acomodado no interior do núcleo que possui entre 5 μ m e 10 μ m de largura, este tem que ser fortemente condensado. Danos impostos à molécula de DNA provocam um relaxamento desta condensação e ocasionalmente quebras na estrutura molecular (FERRARO, 2009; PAOLO, 2006).

No ensaio cometa, as células nas quais se deseja verificar o dano ocasionado ao seu DNA, são suspensas em gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e então colocadas em lâminas de vidro para microscopia previamente recobertas com uma camada de agarose normal. Através de soluções apropriadas, as membranas da célula, núcleo e organelas são rompidas; os componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares são retidos; e o material genético restante é submetido a eletroforese. O DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo. Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos, que conseqüentemente apresentarão diferentes velocidades de migração. Ocorrendo um dano muito intenso em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (FERRARO, 2009; PAOLO, 2006; RAMSDORF, 2009).

O Ensaio Cometa é uma técnica sensível, que avalia danos ao DNA de células individuais. Qualquer tipo celular pode ser avaliado, bastando que haja presença de núcleo, e uma característica importante do ensaio é a de precisar de apenas uma pequena quantidade de células. Este ensaio é de fácil execução, custo relativamente baixo, com boa reprodutibilidade, rapidez e sensibilidade, além de não depender da proliferação celular (FERRARO, 2009; PAOLO, 2006).

6.2 Matéria-prima

Utilizou-se a mesma matéria-prima descrita no item 5.3.

6.3 Solventes e reagentes

- Acetonitrila
- Ácido acético
- Ácido tricloroacético
- Agarose de alto ponto de fusão
- Agarose de baixo ponto de fusão
- Água destilada
- Azul de Tripán 2 %
- Cloreto de sódio
- Corante Panótico
- DMSO
- EDTA
- Glicerol
- Hidróxido de sódio
- Líquido de Turk
- Nitrato de prata
- Peróxido de Hidrogênio
- Sulfato de zinco heptahidratado
- Tampão fosfato pH 7,2 - PBS
- Tris base
- Triton X-100

6.4 Equipamentos e acessórios

- Câmara de Neubauer

- Cuba de eletroforese
- Eppendorf
- Pipeta automática
- Ponteiras
- Lâmina de vidro
- Lamínula de vidro
- Microscópio

6.5 Desenvolvimento da análise

6.5.1 Preparo da Solução de CPF com 4 % de ACN

Pesou-se 100 mg da matéria-prima de CPF e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se ACN e a solução foi mantida em ultrassom, por 15 minutos. O volume foi completado com ACN e homogeneizado. Transferiu-se alíquota de 1 mL dessa solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com tampão fosfato pH 7,2 (PBS), obtendo-se uma solução com concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPF. Realizou-se nova diluição transferindo 4 mL para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com PBS, obtendo-se uma solução com concentração final de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

6.5.2 Preparo da Solução de CPF

As soluções foram preparadas como no item 6.5.1, utilizando, porém, apenas PBS como solvente.

6.5.3 Preparo da Solução de CPF degradado

Pesou-se 250 mg da matéria-prima de CPF e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se ACN e a solução foi mantida em ultrassom, por 15 minutos. O volume foi completado com ACN e homogeneizado. Essa solução foi filtrada em membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ e 2 mL da mesma foram transferidos para cubetas de quartzo, posteriormente vedadas com *para-film*[®] e mantidas em câmara horizontal de vidro espelhada internamente (80 x 25 x 35 cm) equipada com lâmpada TUV 30W/G30 T8, 254 nm, Starlux[®] (254 nm) de 30 W. O decaimento da concentração do CPF foi acompanhado por CLAE (método desenvolvido no item 3) até cerca de 50 %. Transferiu-se alíquota de 1 mL dessa solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com PBS, obtendo-se uma solução com

concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPF. Realizou-se nova diluição transferindo 4 mL para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se uma solução com concentração final de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

6.5.4 Preparo da Cultura de Leucócitos Humanos

As culturas de leucócitos foram preparadas utilizando 0,5 mL de sangue venoso coletado por venopunção de voluntário (pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria, Carta de aprovação nº 23.081) e imediatamente transferido para o meio de cultura contendo 10 mL de RPMI 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de estreptomicina / penicilina, conforme descrito por SANTOS MONTAGNER (2010). As células foram colocadas em estufa a 37°C por 72 horas.

6.5.5 Análise de parâmetros genotoxicológicos

Para os testes de avaliação da genotoxicidade, foram avaliados os seguintes grupos:

- Controle negativo: 1000 μL da cultura de células e 1000 μL de PBS;
- Controle negativo (2 % de ACN): 1000 μL da cultura de células e 1000 μL de PBS com ACN 4 %;
- Controle positivo: 1000 μL da cultura de células e peróxido de hidrogênio 100 μM ;
- CPF: 1000 μL da cultura de células e solução de CPF em PBS nas concentrações finais de 200, 100, 50, 25 e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- CPF (2 % de ACN): 1000 μL da cultura de células e solução de CPF em PBS com ACN 4 % nas concentrações finais de 200, 100, 50, 25 e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- Degradado (2 % de ACN): 1000 μL da cultura de células e solução de CPF degradado (em condições fotolíticas) em PBS nas concentrações finais de 200, 100, 50, 25 e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Cada grupo era composto por três frascos de cultura.

A proliferação e viabilidade foram avaliadas através da perda da integridade da membrana, utilizando o método do Azul de Tripam (SANTOS-MONTAGNER, et al, 2010). A genotoxicidade foi avaliada através dos testes de MN, segundo a técnica descrita por SCHMID (1975), e Teste Cometa (SINGH, 1995).

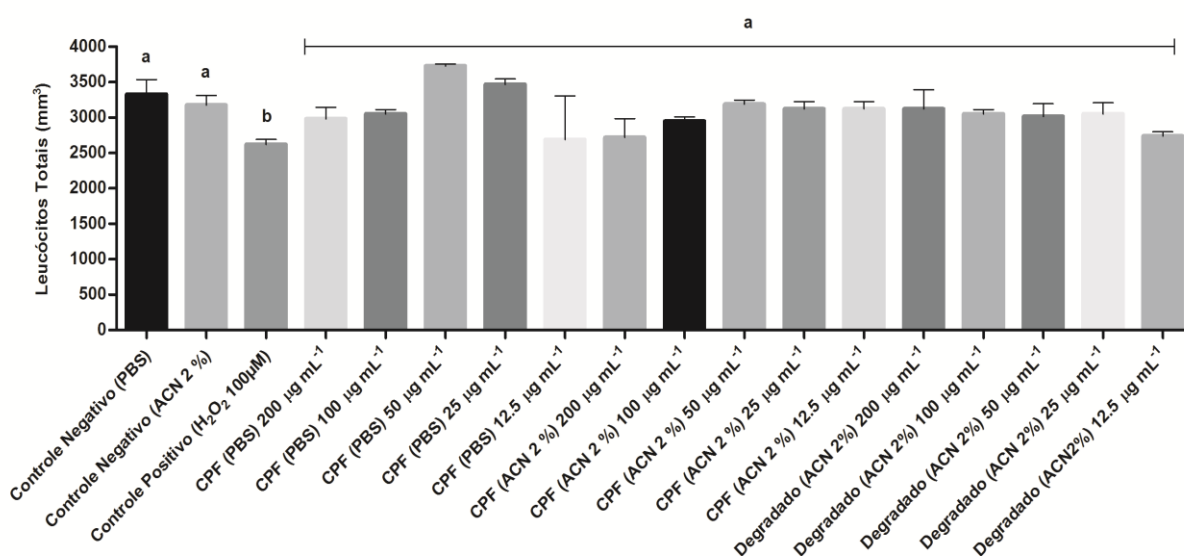
6.5.6 Análise estatística

Os dados foram avaliadas por ANOVA seguida de teste *Post-Hoc* de Bonferroni. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

6.6 Resultados

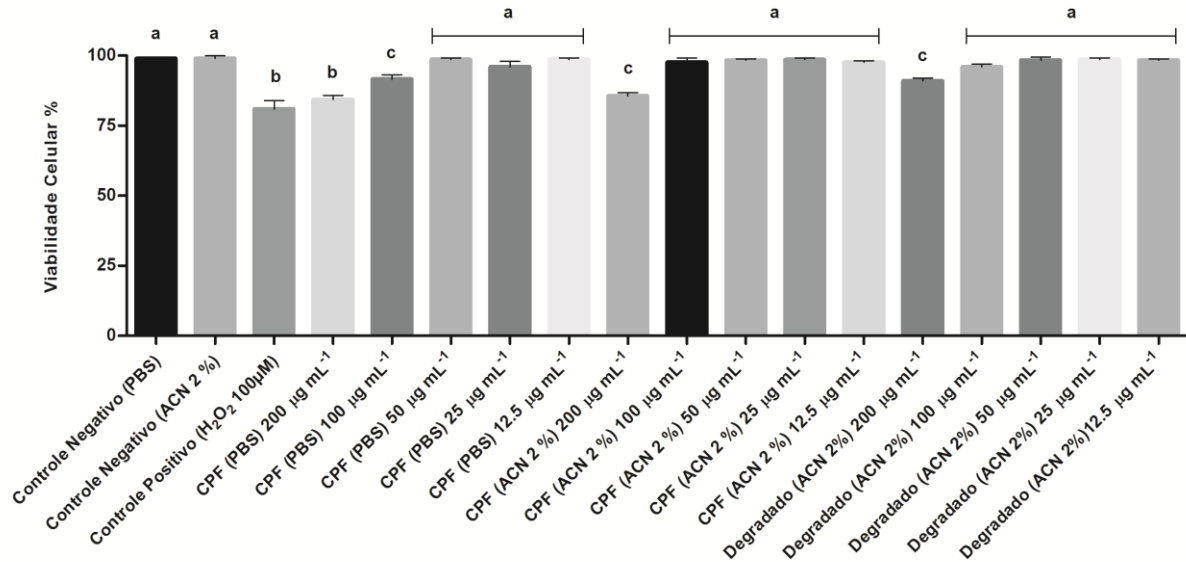
Os resultados da avaliação dos efeitos do CPF e da solução de degradado de CPF em cultura de leucócitos humanos, avaliando parâmetros anti-genotóxicos como, proliferação celular, viabilidade celular, índice de dano ao DNA e frequência de MN estão demonstrados nas Figuras 6.1 a 6.4 .

Figura 6.1 – Efeito do CPF e da mistura de produtos de degradação, formados nas condições fotolíticas, na proliferação celular em cultura de leucócitos humanos (n = 3)



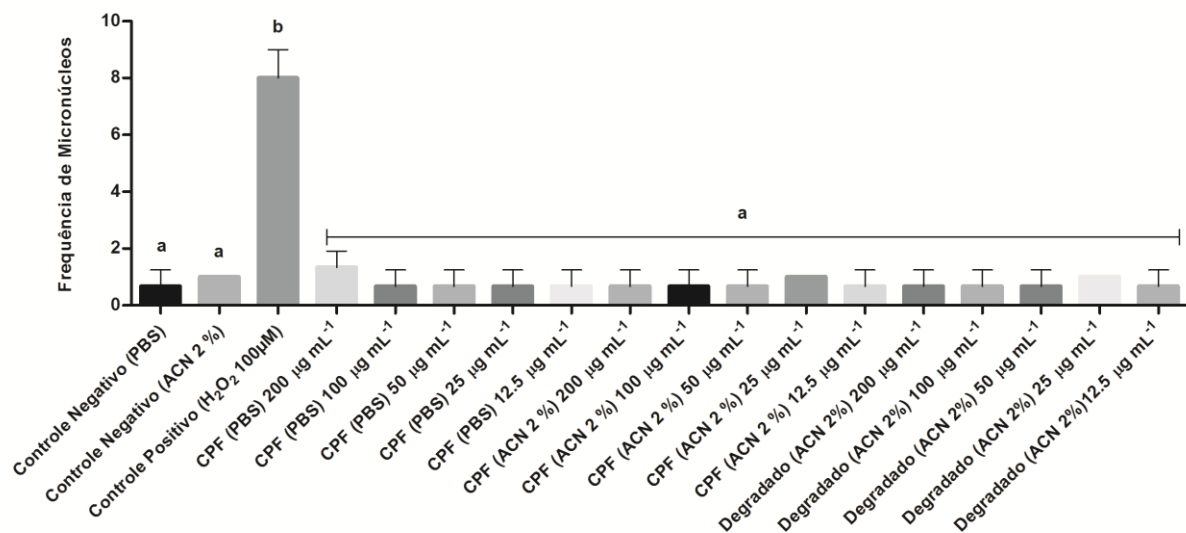
Resultados expressos como média \pm DP. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Figura 6.2 – Efeito do CPF e da mistura de produtos de degradação, formados nas condições fotolíticas, na viabilidade celular em cultura de leucócitos humanos (n = 3)



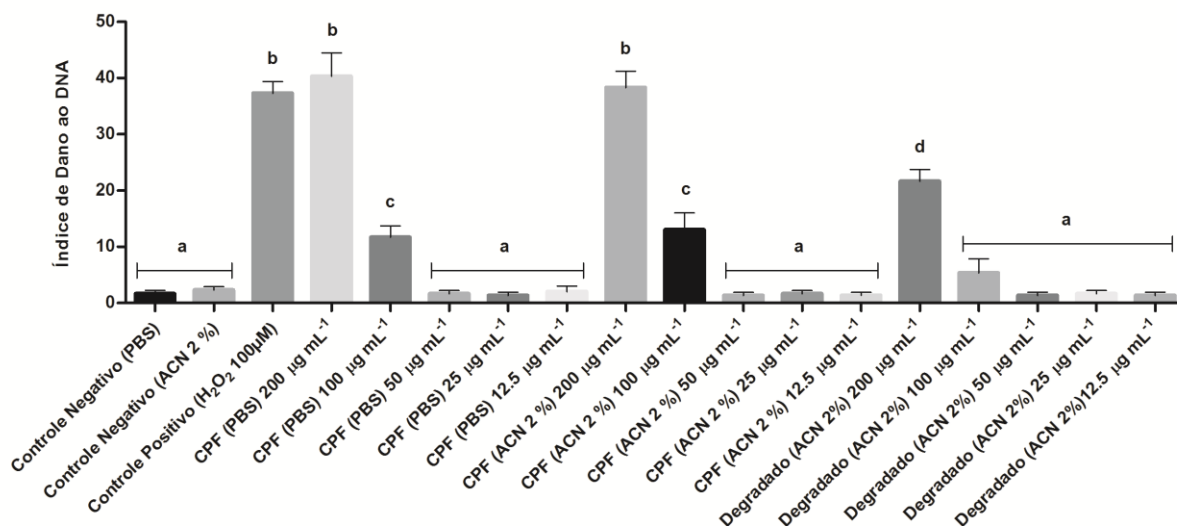
Resultados expressos como média ± DP. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Figura 6.3 – Efeito do CPF e da mistura de produtos de degradação, formados nas condições fotolíticas, no teste de MN em cultura de leucócitos humanos (n = 3)



Resultados expressos como média ± DP. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Figura 6.4 – Efeito do CPF e da mistura de produtos de degradação, formados nas condições fotolíticas, no ensaio cometa em cultura de leucócitos humanos (n = 3)



Resultados expressos como média ± DP. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (p < 0.05).

6.7 Discussão

A avaliação da citotoxicidade permite avaliar os efeitos tóxicos ou anti-proliferativos de uma amostra teste em culturas celulares. Através da observação da morfologia celular, dos efeitos na membrana, da atividade celular e do índice de proliferação, pode-se avaliar o dano celular (ROGERO, 2003).

A Figura 6.1 apresenta os resultados da avaliação da proliferação celular, pode-se observar em todos os grupos um aumento celular similar aos controles negativos e estatisticamente diferente em relação ao controle positivo (peróxido de hidrogênio), ou seja, não houve diminuição na proliferação celular nos grupos analisados.

A Figura 6.2 mostra a porcentagem de células viáveis para os grupos testados. Os controles negativo apresentaram média de 99 % de viabilidade celular, enquanto o controle positivo apresentou 81 %. Os grupos CPF na maior concentração testada, 200 µg mL⁻¹, obtiveram cerca de 85 % de viabilidade celular, ou seja, comparável com o controle positivo. Já as concentrações de 100 µg mL⁻¹ dos grupos CPF e de 200 µg mL⁻¹ do grupo degradado também apresentaram uma diminuição na viabilidade celular, porém em menor intensidade, com valores de 91,67 e 91 %, respectivamente. Os demais grupos apresentaram viabilidade celular maior que 96 %, semelhante aos valores obtidos nos controles negativos. Os resultados

indicam uma diminuição na viabilidade celular dose dependente tanto nos grupos CPF quanto nos degradados, menos acentuada, porém, nas amostras expostas a luz.

O teste do MN detecta tanto os eventos clastogênicos como defeitos no fuso da célula. Assim, os efeitos de substâncias que provoquem quebras cromossômicas ou que afetem os componentes do fuso ou da região centromérica podem ser detectados a partir da presença de MN (FERRARO, 2009). Na Figura 6.3, pode-se observar que todos os grupos analisados apresentaram resultados semelhantes aos controles negativos, indicando que os compostos testados não apresentam efeito mutagênico.

O Ensaio Cometa é um método de estudo genotoxicológico sensível, que avalia danos ao DNA de células individuais (COLLINS, 2008). A Figura 6.4 apresenta os resultados obtidos no ensaio cometa, onde pode-se observar que os grupos CPF na maior concentração testada, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentaram índice de dano ao DNA comparável com o controle positivo. O grupo degradado na maior concentração testada e as concentrações de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos grupos CPF também apresentaram dano ao DNA, porém em menor intensidade. Os demais grupos apresentaram índice de dano ao DNA semelhante aos controles negativos. Os resultados indicam ação genotóxica dose dependente tanto do CPF quanto da amostra degradada, sendo menos acentuado nas amostras expostas a luz, resultado possivelmente relacionado a diminuição da concentração de CPF e/ou formação de produtos de degradação com menor potencial genotóxico.

Na realização destes estudos foram analisados grupos controle negativo e CPF utilizando concentração final de ACN de 2 %, para avaliar se a concentração residual do solvente orgânico utilizado na preparação das amostras degradadas causaria interferência. Como pôde ser observado nos resultados apresentados o grupo controle negativo com adição de ACN apresentou valores semelhantes ao controle negativo que utilizou apenas PBS, indicando que a baixa concentração de solvente orgânico não prejudicou o andamento das análises. O grupo tratado com concentrações de CPF diluídas em PBS com adição de ACN foi avaliado para assegurar que o fármaco na presença do solvente orgânico não apresentaria efeitos diferentes dos apresentados pelo fármaco apenas em PBS, os resultados apresentados também demonstraram valores semelhantes em ambos os grupos tratados com o CPF.

7 CONCLUSÕES

- O método indicativo de estabilidade por CLAE foi validado, demonstrou-se adequado para análise quantitativa de CPF e pode ser utilizado para o controle de qualidade de rotina de comprimidos e cápsulas;
- O método de dissolução desenvolvido e validado utilizando espectrofotometria na região do UV para determinação da quantidade dissolvida de CPF em solução de HCl 0,01 M com adição de 1 % de LSS foi considerado adequado para o controle de qualidade de rotina dos comprimidos do fármaco.
- A degradação da matéria-prima e das amostras de comprimidos e cápsulas de CPF em condições fotolíticas obedeceu a cinética de segunda ordem;
- Na avaliação dos parâmetros genotoxicológicos, pode-se observar que o CPF e as amostras degradadas em condições fotolíticas apresentaram efeitos negativos dose-dependentes no testes de viabilidade celular e ensaio cometa, e não apresentaram efeito na proliferação celular e teste dos MN.

REFERÊNCIAS

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª Ed. Porto Alegre : ARTMED, 2007.

AZEVEDO, R.C.P. **Estudo da Liberação *In Vitro* de Captopril Cápsulas Magistrais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. 2007. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2007.

BHANUSHALI, M. et al. An *in-vitro* toxicity testing - a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 15-31, 2010.

BIGHETTI, E.J.B. et. al. Ciprofibrate increases cholesteryl ester transfer protein gene expression and the indirect reverse cholesterol transport to the liver. **Lipids in Health and Disease**, v. 8, p. 50, 2009.

BOHRER, P.L. **Avaliação das alterações citopatológicas da mucosa bucal clinicamente normal exposta a carcinógenos**. 2003. 95 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Autoriza a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 901, de 29 de maio de 2003. Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003. Regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 ago. 2003c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 ago. 2003d.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 01, de 29 de julho de 2005. Autoriza ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 ago. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 ago. 2010.

BRUM, T.F. et al. Equivalência farmacêutica e estudo comparativo dos perfis de dissolução de medicamentos genéricos contendo paracetamol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 373-378, 2012.

CARRARD, V.C. et al. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, jan./dez. 2007.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability Principles and Practices**. Third Edition, Revised and Expanded, Ed. Marcel Dekker, New York, p. 773, 2000.

CAZARIN, K.C.C.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 40, n. 3, p. 289-299, jul./set., 2004.

CAZEDEY, E.C.L. **Análise químico-farmacêutica e estudos de estabilidade e de dissolução de comprimidos de orbifloxacino**. 2012. 283f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

CHEQUER, F.M.D. **Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azos corantes Disperse Red1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**. 2008. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

COLLINS, A. R., OSCOZ, A. A., BRUNBORG, G., GAIVÃO, I., GIOVANNELLI, L., KRUSZEWSKI, M., SMITH, C. C., STETINA, R., “The comet assay: Topical issues,” **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.143-151, 2008.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7th Ed, Council of Europe. Strasbourg: EDQM, p.1547 – 1548, 2013.

FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010. Volume I.

FDA. Guidance for industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Disponível em:

<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064964.htm>. Acesso em: junho de 2014. P. 14, 1997.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos**. 2009. 189 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FRANCA, E.; ALVES, J.G.B. Dislipidemia entre Crianças e Adolescentes de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 722-727, 2006.

GOODMAN e GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 12^a Ed., p. 901-903. Porto Alegre: ARTMED, 2012.

HÜTTEMANN, H; BLASCHKE, G. Achiral and chiral determination of ciprofibrate and its glucuronide in human urine by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 729, n. 1-2, p. 33-41, 1999.

ICH – International Conference on Harmonization. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). ICH Steering Committee, Switzerland, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization. Validation of analytical methods: text and methodology Q2(R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

IMS Health, Pharmaceutical Market Brasil – PMB 2011, dados de julho de 2011.

JAIN et al. Stability-indicating HPLC determination of ciprofibrate in bulk drug and pharmaceutical dosage form. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 18, n. 1, p. 95-101, 2012.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **Journal Pharmaceutical Pharmacology**, v. 28, p. 48-49, 1975.

KOMSTA, L.; MISZTAL, G. Application of UV-derivate spectra for determination of four antihyperlipidaemic drugs in pharmaceutical formulations. **Acta Polonica Pharmaceutica – Drug Research**, v. 61, n. 1, p. 9-13, 2004.

KUBLIN, E. *et. al.* Methods of Chromatographic Determination of Medicines Decreasing the Level of Cholesterol. **Acta Polonica Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 5, p. 455-461, 2010.

LACHMAN, L.; DE LUCA, P.; AKERS, M. J. **Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química.** In LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Cauloste Gulbenkian, v. 2, p 1277-1355, 2001.

LEITE, E.G. **Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos.** 2005. 199 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LIMA, A.C. et al. Força de Compressão e Umidade no Perfil de Dissolução da Hidroclorotiazida. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 104-107, 2006.

LOUIS K.S.; SIEGEL A.C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. **Methods in Molecular Biology**, v.740, p. 7-12, 2011.

MANFIO, J.L. Determinação do prazo de validade do medicamento carbocisteína xarope. 2005. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MARTINES, N.S. **Avaliação do Processo de Morte Celular Após Terapia Fotodinâmica.** 2003. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2003.

MASNATTA, L.D.; CUNIBERTI, L.A.; REY, R.H.; WERBA, J.P. Determination of bezafibrate, ciprofibrate and fenofibric acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography. Biomedical Applications**; Dec 13;687(2):437-42, 1996.

NASCIMENTO, V.T. *et al.* Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.) **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v.7, n.3, p.56-64, 2005.

PAIM, C.S. *et al.* LC Determination of Entacapone in Tablets: In Vitro Dissolution Studies. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 9, p. 755-759, 2010.

PAOLO, C.D. **Aplicação do Ensaio Cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona.** 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PARZIANELLO, L. **Polimorfismo da apolipoproteína C-III (APOC-III) e níveis de triacilgliceróis em japoneses residentes no sul do Brasil**. 2007. 93 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

PIRELA, V.B. *et. al.* Ciprofibrate diminishes NON-HDLc and improves HDLc in patients with Frederickson type IV dyslipidemia phenotype. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v. 24, n. 2, p. 10-16, 2005.

POZZAN, R. *et. al.* Dislipidemia, Síndrome Metabólica e Risco Cardiovascular. **Revista da SOCERJ**, v. 17, n. 2, p. 97-104, Abr/Mai/Jun 2004.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. Altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda cangüiri – ufpr)**. 2007. 127 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RIBANI, M. *et.al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

ROGERO, S.O. *et al.* Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROMALDINI, C.C., *et. al.* Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de doença arterial coronariana premature. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 135-140, 2004

ROWE, R. C., SHESKEY, P. J., QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th edition. 2009 London, UK: Pharmaceutical Press e Washington, DC: American Pharmacists Association.

SANTOS, M.F. **Estudo do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) em ratos wistar, através do teste de micronúcleos**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SANTOS MONTAGNER, G.F.F., *et al.* Toxicological Effects Of Ultraviolet Radiation On Lymphocyte Cells With Different Manganese Superoxide Dismutase Ala16val Polymorphism Genotypes. **Toxicology In Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1410-1416, Abril 2010.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 09-15, 1975.

SINGH, N. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1995.

SILVA, K.E.R., et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30; n. 2, p. 129-135, 2009.

SPOSITO, CA; CARAMELLI, B.; FONSECA F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**; 88(S1): 2-18, 2007.

TAVARES, V. *et.al.* Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 51, n. 4, p. 526-533, 2007.

TØNNESEN, H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 1-14, 2001.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 35 ed. Rokville, United States Convention, 2012.

VIÇOSA, A.L. **Estudo da utilização de incrementadores de dissolução para compressão direta: enfoque no desenvolvimento de medicamentos genéricos.** 2003. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

WATSON, G. D. High pressure liquid chromatography. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists.** London: Churchill Livingstone. Cap. 12, p. 237-276, 2005.