

FARMANGUINHOS
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS
CURSO EM TECNOLOGIAS INDUSTRIAIS FARMACÊUTICAS

DANIELLA PERROTTA GONÇALVES COSTA

ESTUDO DE CASO SOBRE VALIDAÇÃO DE DISSOLUÇÃO DE
COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA E
LIBERAÇÃO RETARDADA

RIO DE JANEIRO

2013

DANIELLA PERROTTA GONÇALVES COSTA

**ESTUDO DE CASO SOBRE VALIDAÇÃO DE
DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO
PROLONGADA E LIBERAÇÃO RETARDADA**

Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas. Sob a orientação da MSc. Erika Bachini Fonseca

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

C837e

Costa, Daniella Perrotta Gonçalves

Estudo de caso sobre validação de dissolução de comprimidos de liberação prolongada e liberação retardada / Daniella Perrotta Gonçalves Costa . – Rio de Janeiro, 2013.

XVI, 79f. : il. 30 cm.

Orientadora: Erika Bachini Fonseca

Monografia (especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, 2013.

Bibliografia: f. 78-79

1. Validação. 2. Dissolução. 3. Liberação prolongada. 4. Liberação retardada I.Título.

CDD 615.1

DANIELLA PERROTTA GONÇALVES COSTA

Monografia apresentada junto ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* do Instituto de Tecnologia de Fármacos – Farmanguinhos/FIOCRUZ, como requisito final à obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientadora: MSc. Erika Bachini Fonseca

Analista do Laboratório de Desenvolvimento Analítico

da Merck SA site Rio de Janeiro

BANCA EXAMINADORA

MSc. Thiago Bousquet Bandini, Farmanguinhos/FIOCRUZ

MSc. Érico Daemon de Oliveira, Farmanguinhos/FIOCRUZ

MSc. Leandro Vinicius Soares Oliveira, Merck

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado uma família maravilhosa, pois sem eles não teria conseguido nada em minha vida;

A minha família pelo apoio e imenso impulso as minhas conquistas;

Aos professores do curso de Especialização, que muito contribuíram para minha formação e pelos ensinamentos;

Aos demais amigos que sem eles a vida não teria a menor graça.

RESUMO

Em contraste às formas de liberação imediata, os produtos de liberação modificada permitem a liberação retardada ou prolongada do fármaco. Os produtos de liberação retardada muitas vezes são comprimidos ou cápsulas com revestimento entérico desenvolvidos de modo a passarem intactos através do estômago e liberar o fármaco no trato intestinal. Produtos de liberação prolongada são desenvolvidos para liberar o ativo de maneira controlada, em velocidade, tempo e local predeterminados, para alcançar e manter os níveis sanguíneos terapêuticos ótimos. O objetivo deste trabalho é apresentar um estudo de caso de validação de dissolução de comprimidos de liberação prolongada e liberação retardada seguindo os parâmetros baseado pela Legislação Brasileira RE nº 899/03, tais como: seletividade/especificidade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo e robustez uma vez que o estudo de validação comprova, de maneira documentada, que um método é adequado e confiável.

Palavras chaves: Validação, dissolução, liberação prolongada, liberação retardada.

ABSTRACT

In contrast to the forms of immediate release, modified release products allow for delayed or prolonged release of the drug. The products are often delayed release tablets or enteric coated capsules designed so as to pass intact through the stomach and release the drug in the intestinal tract. Extended-release products are designed to release the active controlled manner in speed, time and place predetermined to achieve and maintain optimum therapeutic blood levels. The objective of this paper is to present a case study for validation of the dissolution of sustained-release tablets and delayed release. To discuss the theoretical aspects of dosage forms with modified release , therapeutic interest and its validation following parameters based on the Brazilian legislation (RE No 899 / 03) , such as selectivity / specificity , linearity , precision, accuracy , range and robustness since the validation study proves so documented , a method is adequate and reliable.

Keywords: Validation, dissolution, extended release, delayed release.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO..... | v |
| ABSTRACT..... | vi |
| LISTA DE FIGURAS..... | xiii |
| LISTA DE QUADROS..... | xiv |
| LISTA DOS GRÁFICOS..... | xvi |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 Definição dos parâmetros da validação..... | 19 |
| 1.1.1 Especificidade e Seletividade..... | 21 |
| 1.1.2 Linearidade..... | 21 |
| 1.1.3 Intervalo..... | 21 |
| 1.1.4 Precisão..... | 22 |
| 1.1.5 Exatidão..... | 22 |
| 1.1.6 Robustez..... | 23 |
| 2. OBJETIVO..... | 23 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 23 |
| 3.1 Material..... | 23 |
| 3.1.1 Substâncias químicas de referência e amostras..... | 23 |
| 3.1.2 Itens..... | 24 |
| 3.1.3 Reagentes..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 3.1.4 Equipamentos..... | 25 |
| 3.2 Métodos..... | 25 |
| 3.2.1 Para análise indapamida..... | 25 |
| 3.2.1.1 Preparo das soluções..... | 25 |
| 3.2.1.1.1 Preparo do meio de dissolução solução tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,8..... | 25 |
| 3.2.1.1.2 Fase móvel..... | 26 |
| 3.2.1.1.3 Preparo da solução padrão..... | 26 |
| 3.2.1.1.3.a Preparo da solução padrão estoque de indapamida..... | 26 |
| 3.2.1.1.3.b Preparo da solução padrão de trabalho de indapamida..... | 26 |
| 3.2.1.1.4 Preparo da solução amostra..... | 27 |
| 3.2.1.1.5 Lavagem da seringa..... | 28 |
| 3.2.1.2 Sistema de adequação..... | 28 |
| 3.2.1.3 Cálculo do percentual dissolvido de indapamida..... | 28 |
| 3.2.2 Parâmetros de validação da indapamida..... | 29 |
| 3.2.2.1 Seletividade/ especificidade..... | 29 |
| 3.2.2.2 Linearidade..... | 30 |
| 3.2.2.3 Precisão..... | 32 |
| 3.2.2.3.a Precisão Intracorrída..... | 32 |
| 3.2.2.3.b Precisão Intercorrídas..... | 32 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2.4 Exatidão..... | 33 |
| 3.2.2.5 Intervalo..... | 34 |
| 3.2.2.6 Robustez..... | 35 |
| 3.2.2.6.a Estabilidade das Soluções..... | 35 |
| 3.2.2.6.b Variação da temperatura do forno..... | 35 |
| 3.2.2.6.c Variação do fluxo da fase móvel..... | 37 |
| 3.2.2.6.d Variação do lote da coluna cromatográfica..... | 38 |
| 3.2.3 Para análise da mesalazina..... | 38 |
| 3.2.3.1 Preparo das soluções..... | 38 |
| 3.2.3.1.1 Preparo do tampão pH 6,0..... | 38 |
| 3.2.3.1.2 Preparo da solução de hidróxido de sódio..... | 38 |
| 3.2.3.1.3 Preparo do tampão pH 7,2..... | 38 |
| 3.2.3.1.4 Preparo das soluções estágio ácido..... | 38 |
| 3.2.3.1.4.a Preparo do padrão..... | 39 |
| 3.2.3.1.4.b Preparo da amostra..... | 39 |
| 3.2.3.1.5 Preparo das soluções estágio tampão 1..... | 40 |
| 3.2.3.1.5.a Preparo do padrão..... | 40 |
| 3.2.3.1.5.b Preparo da amostra..... | 40 |
| 3.2.3.1.6 Preparo das soluções estágio tampão 2..... | 41 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3.1.6.a Preparo do padrão..... | 41 |
| 3.2.3.1.6.b Preparo da amostra..... | 41 |
| 3.2.3.2 Procedimento..... | 42 |
| 3.2.3.2.1 Estágio ácido..... | 42 |
| 3.2.3.2.2 Estágio tampão 1..... | 42 |
| 3.2.3.2.3 Estágio tampão 2..... | 42 |
| 3.2.3.3 Cálculos..... | 42 |
| 3.2.3.3.1 Cálculos estágio ácido..... | 42 |
| 3.2.3.3.2 Cálculos estágio tampão 1..... | 43 |
| 3.2.3.3.3 Cálculos estágio tampão 2..... | 43 |
| 3.2.4 Parâmetros de validação da mesalazina..... | 44 |
| 3.2.4.1 Seletividade/ especificidade..... | 44 |
| 3.2.4.2 Precisão..... | 45 |
| 3.2.4.2.a Precisão Intracorrida..... | 45 |
| 3.2.4.2.a.1 Estágio ácido..... | 45 |
| 3.2.4.2.a.2 Estágio tampão 1..... | 46 |
| 3.2.4.2.a.3 Estágio tampão 2..... | 46 |
| 3.2.4.2.b Precisão Intercorridas..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 3.2.4.3 Exatidão..... | 48 |
| 3.2.4.3.1 Estágio ácido..... | 48 |
| 3.2.4.3.2 Estágio tampão 1..... | 48 |
| 3.2.4.3.3 Estágio tampão 2..... | 48 |
| 3.2.4.4 Robustez..... | 50 |
| 3.2.4.4.1 Estabilidade das Soluções..... | 50 |
| 3.2.4.4.1.a Solução padrão..... | 50 |
| 3.2.4.4.1.b Solução amostra..... | 51 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 51 |
| 4.1 Resultados e discussão para indapamida..... | 52 |
| 4.1.1. Seletividade / Especificidade..... | 52 |
| 4.1.2. Linearidade..... | 59 |
| 4.1.3. Precisão..... | 60 |
| 4.1.3.1. Precisão intracorrida..... | 60 |
| 4.1.3.2. Precisão intercorridas..... | 61 |
| 4.1.4. Exatidão..... | 62 |
| 4.1.5. Intervalo..... | 64 |
| 4.1.6. Robustez..... | 64 |
| 4.1.6.1. Estabilidade das soluções..... | 64 |

| | |
|--|----|
| 4.1.6.2. Variação da temperatura do forno..... | 65 |
| 4.1.6.3. Variação do fluxo da fase móvel..... | 66 |
| 4.1.6.4. Variação da coluna cromatográfica..... | 66 |
| 4.2. Resultados e discussão para mesalazina..... | 67 |
| 4.2.1. Seletividade / Especificidade..... | 67 |
| 4.2.2. Precisão..... | 71 |
| 4.2.2.1. Precisão intracorrída..... | 71 |
| 4.2.2.2. Precisão intercorridas..... | 72 |
| 4.2.3. Exatidão..... | 73 |
| 4.2.4. Robustez..... | 76 |
| 4.2.4.1. Estabilidade das soluções..... | 76 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 77 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 78 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Pureza pico solução padrão conc 0,5µg/mL..... | 56 |
| Figura 2- Pureza pico solução padrão conc 1,5µg/mL..... | 56 |
| Figura 3- Pureza pico solução padrão conc 2,0µg/mL..... | 57 |
| Figura 4- Pureza pico solução padrão conc 3,0µg/mL..... | 57 |
| Figura 5- Pureza pico solução padrão conc 3,5µg/mL..... | 57 |
| Figura 6- Pureza pico solução amostra 24 ^a hora..... | 58 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1- Classificação dos testes..... | 20 |
| Quadro 2- Ensaio para validação..... | 20 |
| Quadro 3- Tabela com diluição para linearidade indapamida..... | 31 |
| Quadro 4- Tabela com preparo das amostras exatidão indapamida..... | 33 |
| Quadro 5- Tabela com preparo padrão estágio ácido mesalazina..... | 39 |
| Quadro 6- Tabela com preparo padrão estágio tampão 1 mesalazina..... | 40 |
| Quadro 7- Tabela com preparo padrão estágio tampão 2 mesalazina..... | 41 |
| Quadro 8- Tabela com preparo amostra para exatidão mesalazina..... | 49 |
| Quadro 9- Tabela com critério de aceitação para seletividade indapamida..... | 52 |
| Quadro 10- Tabela com critério de aceitação para precisão intracorrída indapamida..... | 61 |
| Quadro 11- Tabela com resultados exatidão indapamida..... | 63 |
| Quadro 12- Tabela com resultados robustez variação temperatura indapamida..... | 65 |
| Quadro 13- Tabela com resultados robustez variação fluxo indapamida..... | 66 |
| Quadro 14- Tabela com critério de aceitação para seletividade mesalazina..... | 67 |
| Quadro 15- Tabela com resultados absorbância estágio ácido..... | 68 |
| Quadro 16- Tabela com resultados absorbância estágio tampão 1..... | 70 |
| Quadro 17- Tabela com resultados absorbância estágio tampão 2..... | 71 |

| | |
|---|----|
| Quadro 18- Tabela com critério de aceitação para precisão intracorrida mesalazina..... | 72 |
| Quadro 19- Tabela com critério de aceitação para precisão intercorridas mesalazina..... | 73 |
| Quadro 20- Tabela com resultados exatidão mesalazina estágio ácido..... | 74 |
| Quadro 21- Tabela com resultados exatidão mesalazina estágio tampão 1..... | 74 |
| Quadro 22- Tabela com resultados exatidão mesalazina estágio tampão 2..... | 75 |

LISTA DOS GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1- Cromatograma representativo do branco..... | 52 |
| Gráfico 2- Cromatograma representativo da solução placebo | 53 |
| Gráfico 3- Cromatograma representativo da solução padrão indapamida com concentração 0,5 µg/mL..... | 53 |
| Gráfico 4- Cromatograma representativo da solução padrão indapamida com concentração 1,5 µg/mL..... | 54 |
| Gráfico 5- Cromatograma representativo da solução padrão indapamida com concentração 2,0 µg/mL..... | 54 |
| Gráfico 6- Cromatograma representativo da solução padrão indapamida com concentração 3,0 µg/mL..... | 55 |
| Gráfico 7- Cromatograma representativo da solução padrão indapamida com concentração 3,5 µg/mL..... | 55 |
| Gráfico 8- Cromatograma representativo da solução amostra 24 ^a hora..... | 56 |
| Gráfico 9- Curva linearidade indapamida..... | 60 |
| Gráfico 10- Gráfico resíduos indapamida..... | 60 |
| Gráfico 11- Sobreposição espectros varredura do branco estágio ácido..... | 68 |
| Gráfico 12- Sobreposição espectros varredura do branco estágio tampão 1.... | 69 |
| Gráfico 13- Sobreposição espectros varredura do branco estágio tampão 2.... | 70 |

1. INTRODUÇÃO

Os medicamentos são muito utilizados atualmente com finalidade profilática ou terapêutica. Podem conter uma ou mais substâncias ativas que devem ser administradas ao paciente através de uma das vias possíveis, sejam elas uma forma farmacêutica sólida, semi-sólida ou líquida. As formas farmacêuticas sólidas de uso oral são as mais usadas (PEZZINI, SILVA, FERRAZ, 2007).

Para que um fármaco seja absorvido e exerça a ação farmacológica esperada, ele deve primeiramente ser dissolvido no fluido do sítio de absorção. Se administrado oralmente em comprimidos ou cápsulas, este não pode ser absorvido até que as partículas sólidas sejam dissolvidas pelos fluidos no trato gastrointestinal. Se um fármaco for solúvel em meio ácido ou básico, ele se dissolverá no estômago ou intestino respectivamente (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2007). As formas farmacêuticas sólidas de uso oral podem ser classificadas, de acordo com o tipo de liberação do fármaco, em produtos com liberação convencional ou modificada, sendo esta última subdividida em dois grupos: liberação retardada e liberação prolongada (PEZZINI, SILVA, FERRAZ, 2007; NOEL, 2004).

As formas farmacêuticas sólidas de uso oral com liberação convencional ou liberação imediata são desenvolvidas para liberar o fármaco rapidamente após a administração, sendo utilizados nessas formulações diluentes solúveis, desintegrantes e/ou outros recursos que favoreçam os processos de liberação e dissolução do fármaco. Por outro lado, as formas farmacêuticas sólidas de uso oral de liberação modificada (liberação retardada e liberação prolongada) são elaboradas para modular a liberação do fármaco, retardando ou prolongando a sua dissolução. Os objetivos dessas formulações podem ser: tornar a forma farmacêutica gastrorresistente, prolongar o efeito farmacológico, liberar o fármaco em um sítio específico do trato gastrointestinal ou após um período definido de tempo (PEZZINI, SILVA, FERRAZ, 2007; NOEL, 2004).

Os termos liberação prolongada ou lenta são aplicados às formas farmacêuticas desenvolvidas para liberarem o fármaco aos poucos, ou seja, gradualmente, mantendo a concentração plasmática em níveis terapêuticos, por período de tempo prolongado (PEZZINI, SILVA, FERRAZ, 2007). Essas formas farmacêuticas permitem administrações com uma frequência menor quando comparadas às convencionais, aumentando a adesão do paciente ao tratamento. Também diminuem as oscilações do fármaco na concentração sanguínea, evitando níveis subterapêuticos ou tóxicos (PEZZINI, SILVA, FERRAZ, 2007).

A forma farmacêutica de liberação retardada é desenvolvida para liberar o fármaco num tempo diferente daquele imediatamente após a administração. O atraso pode ser determinado pelo tempo ou pela influência das condições do meio, como pH gastrintestinal (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2007).

Para formas farmacêuticas administradas oralmente, a ação prolongada do fármaco é alcançada ao modificar a velocidade de dissolução do mesmo através do controle do acesso aos fluidos biológicos por meio do uso de revestimentos, controle da velocidade de difusão da forma farmacêutica e reação química ou interação física entre a substância ativa ou adjuvante e os fluidos biológicos no sítio específico (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2007).

A liberação de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica pode ser intencionalmente retardada até que ela alcance o intestino, por várias razões. São elas: proteger um fármaco da inativação pelos fluidos gástricos, reduzir o desconforto gástrico causado por substâncias que costumam irritar a mucosa estomacal ou para facilitar o trânsito gastrintestinal de fármacos que são melhor absorvidos no intestino. Os comprimidos especialmente revestidos para permanecerem intactos no estomago e liberarem seu conteúdo no intestino, são chamados entéricos. Esses revestimentos podem ser pH-dependentes, desintegrando num meio menos ácido do intestino (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2007).

Indapamida SR é um comprimido de liberação prolongada que contém indapamida como seu princípio ativo. A indapamida é um diurético e a maioria dos diuréticos aumenta a quantidade de urina produzida pelos rins. A atividade anti-hipertensiva da Indapamida SR, é máxima na primeira hora após a administração de uma dose única e é mantida por no mínimo 24 horas (BULA NATRILIX SR, 2013)

A substancia ativa mesalazina é indicada para o tratamento das doenças inflamatórias do intestino e também é indicada para o tratamento sintomático da doença diverticular do cólon. O revestimento dos comprimidos evita a sua degradação no trato digestivo superior permitindo a liberação da mesalazina apenas no íleo e no cólon, onde o pH é maior que 7. A maior parte, aproximadamente 75% da dose administrada via oral de mesalazina não é absorvida, sendo eliminada com as fezes de forma inalterada, estando disponível para exercer uma atividade antiinflamatória local (BULA MESACOL, 2013).

1.1 Definição dos parâmetros da validação

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, os órgãos reguladores do Brasil exigem a validação da metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (BRASIL, 2003).

Um processo de validação bem definido e documentado através de seu protocolo e relatório de validação oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003).

A validação foi baseada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através da resolução 899 que é o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos que especifica quais os parâmetros a serem avaliados de acordo com a categoria de cada estudo (III) e seus respectivos critérios de aceitação.

Os parâmetros de validação estão descritos no guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE Nº899, documento publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003). O quadro 1 descreve a classificação dos testes de acordo com a sua finalidade, onde para cada categoria será exigido um conjunto de testes relacionados no quadro 2.

Quadro 1: Classificação dos testes, segundo sua finalidade (BRASIL, 2003).

| Categoria | Finalidade do teste |
|------------------|---|
| I | Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas |
| II | Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas |
| III | Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo) |
| IV | Testes de identificação |

Quadro 2: Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo a finalidade de cada teste (BRASIL, 2003).

| Parâmetro | | Categoria I | Categoria II | | Categoria III | Categoria IV |
|-------------------------|----------------|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | | | Quantitativo | Ensaio limite | | |
| Especificidade | | Sim | Sim | Sim | * | Sim |
| Linearidade | | Sim | Sim | Não | * | Não |
| Intervalo | | Sim | Sim | * | * | Não |
| Precisão | Repetibilidade | Sim | Sim | Não | Sim | Não |
| | Intermediária | ** | ** | Não | ** | Não |
| Limite de detecção | | Não | Não | Sim | * | Não |
| Limite de quantificação | | Não | Sim | Não | * | Não |
| Exatidão | | Sim | Sim | * | * | Não |
| Robustez | | Sim | Sim | Sim | Não | Não |

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Para atender a finalidade a que se destina o método analítico a ser validado neste trabalho, este é classificado como pertencente à categoria III, “testes de performance”, e serão avaliados os seguintes parâmetros: seletividade/especificidade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo e robustez para validação total e os parâmetros: especificidade, precisão, exatidão e robustez para o método farmacopeico (validação parcial).

1.1.1 Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

1.1.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

1.1.3 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003).

1.1.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis (BRASIL, 2003).

- Repetibilidade (precisão intracorrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003).

- Precisão intermediária (precisão intercorridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003).

- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro (BRASIL, 2003).

1.1.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

1.1.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

2. OBJETIVO

O presente trabalho objetivou-se em validar a metodologia analítica utilizada para determinação do percentual dissolvido de indapamida em comprimidos de liberação prolongada contendo 1,5 mg de ativo por comprimido e validar, a metodologia para determinação do percentual dissolvido de mesalazina em comprimidos revestidos de liberação retardada contendo 400 mg de ativo por comprimido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1 Substâncias químicas de referência e amostras

- Indapamida, matéria-prima lote 3ND0210, teor 98,0% declarado pelo fabricante Refarmed
- Indapamida, substância referência lote 4, teor 97,6% declarado pela Farmacopéia Européia

- Comprimidos de liberação prolongada de Indapamida 1,5 mg, lote 11G014, fabricado pela Merck
- Placebo do produto Indapamida SR 1,5 mg fabricado pela Merck
- Mesalazina, matéria-prima lote B31765, teor 99,5% declarado pelo fabricante Pharmazell
- Mesalazina, substância referência lote IOF121, teor 100,0% declarado pela Farmacopéia Americana
- Comprimidos de Mesalazina 400 mg, lotes 12G182 e 12G203
- Placebo do produto Mesalazina 400 mg fabricado pela Merck

3.1.2 Itens

- Pipetas graduadas (Brand)
- Pipetas volumétricas (Brand)
- Balões volumétricos (Brand)
- Provetas (Brand)
- Becher (Brand)
- Seringa de vidro (Arti Glass)
- Filtro de seringa com membrana de PVDF de 0,45 µm (Whatman)
- Filtro de seringa com membrana de acetato celulose 0,45 µm
- Coluna cromatográfica de fase reversa Lichrospher® 100 RP-18 endcapped (250 x 4 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Merck)

3.1.3 Reagentes

- Água purificada por osmose reversa (Milli-Q Millipore)
- Fosfato de potássio monobásico anidro PA (Merck)
- Hidróxido de sódio PA (Merck)

- Acetonitrila grau HPLC (Merck)
- Metanol grau HPLC (Merck)
- Ácido acético glacial (Merck)
- Ácido clorídrico 37% (Merck)
- Ácido fosfórico 85% (Merck)

3.1.4 Equipamentos qualificados

- Balança analítica AG 245 (Mettler Toledo)
- Dissolutor VK7000 (Vankel)
- Aparato I (cesta) e II (pá)
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno, injetor automático e detector de arranjo diodos (DAD) Elite Lacrhom (Merck)
- Espectrofotômetro UV-1650 PC (Shimadzu)
- Placa agitadora KS 260 (IKA)
- Termômetro
- Banho ultrassônico 8510 (Branson)
- Potenciômetro medidor de pH 330 SET-1 (WTW)

3.2. Métodos

3.2.1 Para análise do percentual de dissolução da indapamida

3.2.1.1 Preparo das soluções

3.2.1.1.1 Preparo do meio de dissolução solução tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,8

Dissolver 6,8g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e 0,89g de hidróxido de sódio em 1000,0 mL de água purificada por osmose reversa/Milli-Q e checar o pH. Ajustar o pH com ácido fosfórico concentrado ou hidróxido de potássio 0,5M. O valor de pH deve estar entre 6,75 e 6,85.

3.2.1.1.2 Fase móvel

Preparar uma mistura de solução de água purificada por osmose reversa: metanol grau HPLC: acetonitrila grau HPLC: ácido acético na proporção de (650:175:175:1) v/v/v/v,

3.2.1.1.3 Preparo da solução padrão

3.2.1.1.3.a Preparo da solução padrão estoque de indapamida

Pesar acuradamente, cerca de, 10 mg de Indapamida padrão de referência para balão volumétrico âmbar de 100 mL. Dissolver em 5 mL de metanol. Após completa dissolução da substância, completar o volume com meio de dissolução (conc. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Filtrar uma porção da solução obtida em filtro de seringa com membrana de PVDF 0,45 μm , descartando os primeiros mililitros filtrados. Preparar em duplicata para cálculo do fator de similaridade.

3.2.1.1.3.b Preparo da solução padrão de trabalho de indapamida (curva de calibração)

- Diluir 1,0 mL da solução padrão estoque para 200,0 mL com meio de dissolução (conc. 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

- Diluir 3,0 mL da solução padrão estoque para 200,0 mL com meio de dissolução (conc. 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$);

- Diluir 2,0 mL da solução padrão estoque para 100,0 mL com meio de dissolução (conc. 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Preparar em duplicata para o cálculo de fator de similaridade;

- Diluir 3,0 mL da solução padrão estoque para 100,0 mL com meio de dissolução (conc. 3,0 μ g/mL);

- Diluir 7,0 mL da solução padrão estoque para 200,0 mL com meio de dissolução (conc. 3,5 μ g/mL).

3.2.1.1.4 Preparo da solução amostra

Colocar um comprimido em cada uma das 6 cubas, contendo 900 mL do meio de dissolução previamente aquecido à 37°C \pm 0,5°C. Iniciar a dissolução. Retirar uma alíquota de 10 mL de cada cuba em cada tempo especificado e filtrar em filtro de seringa com membrana de PVDF 0,45 μ m, desprezando os 2 primeiros mililitros. Repor o volume de 10 mL em cada cuba com meio de dissolução previamente aquecido à 37°C \pm 0,5°C.

Parâmetros da dissolução:

Aparato: I (cesta)

Volume de meio: 900 mL

Velocidade: 100 rpm

Temperatura: 37°C \pm 0,5°C

Meio de dissolução : Tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,8

Duração: 24 horas

Tempo de retirada das alíquotas: 2h, 12 h e 24h

Condições cromatográficas:

Coluna: C18 endcapped 250 cm x 4,0 mm 5 μ m

Temperatura do forno: 40°C

Comprimento de onda: 240 nm

Fluxo: 2,0 mL/min com eluição isocrática

| | |
|--------------------|------------|
| Volume de injeção: | 100 µL |
| Tempo de corrida: | 12 minutos |

3.2.1.1.5 Lavagem da seringa

Preparar uma mistura de água purificada por osmose reversa / Milli-Q: Acetonitrila (900:100) v/v.

3.2.1.2 Sistema de adequação

- Injetar as soluções padrão de trabalho de Indapamida 2 vezes, e o desvio padrão relativo entre os valores das áreas do pico referente à Indapamida deve ser menor ou igual a 2,0 %.

- Injetar a duplicata da solução padrão de trabalho 2 vezes para calcular o fator de similaridade, que deve estar entre 98 e 102%, inclusive.

- Injetar as soluções amostra, em cada tempo, 2 vezes, e o desvio padrão relativo entre os valores das áreas do pico referente à Indapamida deve ser menor ou igual a 2,0 %.

- A assimetria para o pico de Indapamida deve estar entre 0,8 e 2,0 inclusive (ICH, 1994).

- Construir a curva de calibração fator resposta x concentração, determinar a equação da reta, encontrando valor de $r \geq 0,99$.

- Calcular o coeficiente linear e angular de cada curva.

3.2.1.3 Cálculo do percentual dissolvido de indapamida

2ª hora: $((\text{Área } 2^{\text{a}}\text{H}-\text{coef linear})/\text{coef ang}) * 900 * 100 / (\text{TD} * 1000)$

12ª hora: $\left(\frac{\text{Área}_{12^a\text{H}} - \text{coef. linear}}{\text{coef. ang}}\right) * 900 + \left(\frac{\text{Área}_{2^a\text{H}} - \text{coef. linear}}{\text{coef. ang}}\right) * 10 * 100 / (\text{TD} * 1000)$

24ª hora: $\left(\frac{\text{Área}_{24^a\text{H}} - \text{coef. linear}}{\text{coef. ang}}\right) * 900 + \left(\frac{\text{Área}_{12^a\text{H}} - \text{coef. linear}}{\text{coef. ang}}\right) * 10 + \left(\frac{\text{Área}_{2^a\text{H}} - \text{coef. linear}}{\text{coef. ang}}\right) * 10 * 100 / (\text{TD} * 1000)$

Onde:

Área 2ªH = Área encontrada da amostra com 2 horas de dissolução;

Área 12ªH = Área encontrada da amostra com 12 horas de dissolução;

Área 24ªH = Área encontrada da amostra com 24 horas de dissolução;

TD = Teor declarado (mg/comprimidos)

3.2.2 Parâmetros de validação da indapamida

Por tratar-se de uma validação total, os parâmetros avaliados foram: seletividade/ especificidade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo e robustez.

3.2.2.1 Seletividade/ especificidade

Avaliou-se a partir da capacidade do método de distinguir o sinal emitido pelo princípio ativo de interesse, em presença de possíveis interferentes tais como: placebo, impurezas e produtos de degradação. Em decorrência da técnica analítica empregada na metodologia, considerou-se como sinal emitido, o valor de área.

O meio de dissolução foi utilizado para avaliação do branco. Ele foi injetado nas condições do método para ser desconsiderado algum pico proveniente dele.

Para o placebo, colocou-se quantidade equivalente ao peso médio de um comprimido em uma cuba de dissolução contendo 900 mL de meio de dissolução aquecido à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com agitação de 100 rpm. No final da 24ª

hora de dissolução, retirou-se uma alíquota de 10 mL, filtrou-se através de filtro de seringa com membrana PVDF 0,45 µm, desprezando-se os primeiros dois mililitros e colocou-se para injetar.

Preparou-se uma amostra conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.4, utilizou-se a amostra do produto.

Para o ativo preparou-se a curva do padrão, utilizou-se substância padrão de referência, conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.3.b.

Injetou-se todas as soluções, nas condições cromatográficas do método de acordo com o item 3.2.1.1.4.

Avaliou-se a pureza espectral do pico referente à indapamida no comprimento de onda especificado no método.

Para ser considerado seletivo/ específico verificou-se se o método atendeu aos seguintes critérios de aceitação: Não haver interferentes das soluções do branco e placebo sob o tempo de retenção da indapamida e a resolução entre picos adjacentes a indapamida for maior que 1,5.

3.2.2.2 Linearidade

Foi avaliada em função das respostas das soluções do ativo nas concentrações de aproximadamente 5, 29, 88, 118, 176 e 206% da concentração de Indapamida estabelecida na metodologia.

Preparou-se uma solução padrão estoque de Indapamida, conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.3.a.

A partir da solução estoque preparou-se as soluções conforme descrito na tabela 1, avolumou-se com o meio de dissolução e homogeneizou-se.

Quadro 3: Alíquotas da solução estoque de Indapamida e volume final para o ensaio de linearidade

| Concentração (%) | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Alíquota da solução indapamida (mL) | Diluição (mL) | Alíquota da solução indapamida (mL) | Diluição (mL) |
|------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------|---------------|
| 5 | 0,08 | 8 | 100,0 | 1,0 | 100,0 |
| 29 | 0,5 | 1,0 | 200,0 | NA | NA |
| 88 | 1,5 | 3,0 | 200,0 | NA | NA |
| 118 | 2,0 | 2,0 | 100,0 | NA | NA |
| 176 | 3,0 | 3,0 | 100,0 | NA | NA |
| 206 | 3,5 | 7,0 | 200,0 | NA | NA |

Injetou-se todas as soluções em triplicata nas condições cromatográficas do método e verificou-se se o desvio padrão relativo entre as áreas do pico referente à indapamida, entre as injeções de cada solução, foi igual ou menor a 2 %.

Construiu-se um gráfico contemplando a concentração de indapamida ($\mu\text{g/mL}$) x área do pico do ativo.

Calculou-se o coeficiente angular, linear e de correlação (r), os resíduos e o gráfico da distribuição dos resíduos para a curva elaborada através da análise da regressão linear com auxílio do software Excel.

Para ser considerado linear foi verificado se o método atendeu aos seguintes critérios de aceitação: O coeficiente de correlação for > que 0,99; O desvio padrão relativo entre as respostas de cada concentração deve ser < a 2%; Os resíduos se apresentarem dentro do intervalo de \pm duas vezes o erro padrão.

3.2.2.3 Precisão

3.2.2.3.a Precisão Intracorrida

Foi avaliada em função do coeficiente de variação (CV %) calculado entre os resultados obtidos.

Preparou-se duas soluções padrão de trabalho de indapamida, provenientes de pesagens distintas, utilizando substância referência, conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.3.

Injetou-se as soluções em duplicata nas condições cromatográficas do método e verificou-se se a variação percentual das áreas do pico referentes à indapamida, entre as injeções de cada solução foi igual ou menor a 2 %.

Calculou-se o fator de similaridade entre as duas soluções padrão de concentração 2,0 µg/mL e verificou-se se o valor deveria estar na faixa de 0,98 a 1,02.

Preparou-se 6 (seis) amostras, conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.4.

Injetou-se as amostras em duplicata nas condições cromatográficas do método e verificou-se se a variação percentual das áreas do pico referente à indapamida, entre as injeções de cada amostra foi igual ou menor a 2 %.

Calculou-se o percentual dissolvido de indapamida em cada amostra.

Calculou-se o coeficiente de variação (CV %) entre os resultados do percentual dissolvido de indapamida e verificou-se se o percentual dissolvido de indapamida na 2^a e 12^a hora foi menor ou igual a 10% e na 24^a hora menor ou igual a 5%.

3.2.2.3.b Precisão Intercorridas

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item da precisão intracorrida, porém com outro analista e em dia diferente.

Calculou-se o coeficiente de variação (CV %) entre as concentrações obtidas pelo analista 2 e pelo analista 1 no item da precisão intracorrida e foi verificado se atendeu ao critério de aceitação.

Avaliou-se se o método analítico foi preciso baseando-se no critério de aceitação adotado onde o coeficiente de variação entre os resultados do percentual dissolvido de indapamida encontrados pelos analistas 1 e 2 em todos os tempos de amostragem for menor ou igual a 10%.

3.2.2.4 Exatidão

Avaliou-se em função dos resultados do percentual de recuperação das soluções de amostras, nas concentrações de aproximadamente 5, 100 e 120 % da concentração de indapamida estabelecida na metodologia.

Preparou-se duas soluções padrão de trabalho, utilizando substância referência, conforme procedimento descrito no item 3.2.1.1.3.

Pesou-se 2,045g do placebo, transferiu-se para balão volumétrico e foi adicionado volume de meio de dissolução para completar o volume de 9L.

Preparou-se amostras em triplicata para cada concentração onde foi utilizado matéria-prima de indapamida, conforme descrito no quadro 4.

Quadro 4: Dados do preparo das amostras para o ensaio de exatidão

| Concentração (%) | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Massa de indapamida (mg) | Diluição (mL) | Alíquota da solução indapamida (mL) | Diluição placebo (mL) |
|------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 5 | 0,08 | 15,0 | 200,0 | 1,0 | 900 |
| 100 | 1,7 | 15,0 | 200,0 | 20,0 | 900 |
| 120 | 2,04 | 15,0 | 200,0 | 25,0 | 900 |

Adicionou-se 900 mL do meio de dissolução, contendo quantidade de placebo correspondente a 204,5 mg, em balão de 1000,0 mL. Transferiu-se as alíquotas da solução do ativo correspondentes a cada concentração e agitou-se. Filtrou-se uma porção da solução através de filtro PVDF 0,45 μm , desprezando os primeiros 2 mL do filtrado.

Injetou-se todas as soluções em duplicata, nas condições cromatográficas do método e verificou-se se a variação percentual das áreas dos picos referente à indapamida.

Construiu-se a curva de calibração resposta x concentração, determinou-se a equação da reta e o valor de r foi $\geq 0,99$.

Calculou-se a concentração teórica de indapamida ($\mu\text{g/mL}$) de cada amostra em cada concentração.

Calculou-se as áreas médias dos picos referentes à indapamida de cada solução de amostra, a concentração real de indapamida ($\mu\text{g/mL}$) correspondente às áreas médias de cada solução de amostra e o percentual de recuperação de indapamida, de cada amostra em cada concentração.

Avaliou-se se o método analítico foi considerado exato, através do percentual de recuperação de indapamida de cada amostra em cada concentração dentro do intervalo de 95 – 105 %.

3.2.2.5 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Este parâmetro foi avaliado através dos estudos da linearidade, precisão e exatidão.

Verificou-se se o método apresentava exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicado às amostras contendo quantidade da substância ativa dentro do intervalo de 5% a 206% para linearidade e 5% a 120% para exatidão.

3.2.2.6 Robustez

Avaliou-se a capacidade do método a ser validado, em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

3.2.2.6.a Estabilidade das Soluções

Avaliou-se a partir do monitoramento de injeções da solução do padrão e da amostra recém-preparadas, por um período de 48 horas.

Preparou-se uma solução do ativo, utilizando substância padrão de referência, conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.3.b.

Preparou-se uma solução de amostra, utilizando amostra do produto, conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.4, porém foi retirada alíquota somente no tempo final de amostragem;

Injetou-se as soluções do ativo e amostra em duplicata, de 2 em 2 horas, nas condições cromatográficas do método, por um período de 48 horas;

Calculou-se a variação percentual da área do pico de interesse no instante testado em relação à área deste mesmo no instante zero (primeira injeção).

Avaliou-se a estabilidade das soluções baseando-se no critério de aceitação: As soluções dos ativos e da amostra serão consideradas estáveis, até o tempo em que a variação percentual da área encontrada no instante testado em relação à área encontrada no tempo zero, for de $\pm 2\%$. Caso ocorra em determinado tempo uma variação maior que $\pm 2\%$, considerar as soluções estáveis até o tempo anterior à variação maior que $\pm 2\%$.

3.2.2.6.b Variação da temperatura do forno

Avaliou-se em função da comparação entre os percentuais liberados indapamida em duas amostras, analisadas sob a condição do forno do CLAE

nas temperaturas de 38 e 42°C e a temperatura estabelecida na metodologia em estudo (40°C).

Preparou-se duas soluções do padrão, utilizando substância de referência, conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.3.b.

Preparou-se duas amostras, utilizando amostra do produto, conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.4, porém foi retirada alíquota somente no tempo final de amostragem.

Injetou-se as soluções das amostras e padrões em duplicata, nas condições cromatográficas do método; Reinjetou-se as soluções aplicando-se as temperaturas do forno de 38 e 42°C e verificou-se se a variação percentual entre as injeções de cada solução em cada temperatura é igual ou menor a 2%.

Calculou-se o fator de similaridade entre as duas soluções do padrão, em cada temperatura aplicada e verificou-se se o valor estava no intervalo de 0,98 a 1,02.

Calculou-se os percentuais liberados de indapamida em cada amostra, em cada temperatura do forno aplicada, utilizando-se as áreas médias e a solução padrão injetada na condição correspondente.

Calculou-se a variação percentual, entre os percentuais liberados de indapamida nas condições de 38°C e 42°C em relação aos percentuais liberados do ativo na análise aplicando a temperatura estabelecida na metodologia em estudo (40°C).

Verificou-se a robustez das soluções nas temperaturas do forno de 38°C e 42°C baseando-se no seguinte critério de aceitação: O método será considerado robusto às variações de temperatura no forno do CLAE entre 38°C e 42°C, se as variações percentuais dos percentuais liberados de indapamida nas amostras, variarem em até $\pm 2\%$ em relação aos percentuais liberados deste ativo nas amostras utilizando a temperatura estabelecida na metodologia em estudo (40°C).

3.2.2.6.c Variação do fluxo da fase móvel de 1,9 mL/min e 2,1 mL/min

Avaliou-se em função da comparação entre os percentuais liberados de indapamida em duas amostras, analisadas com fluxos de 1,9mL/min e 2,1mL/min e o fluxo estabelecido na metodologia em estudo (2,0mL/min).

Preparou-se duas soluções do padrão, utilizando substância de referência, conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.3.b.

Preparou-se duas amostras, utilizando amostra do produto, conforme o procedimento descrito no item 3.2.1.1.4, porém foi retirada alíquota somente no tempo final de amostragem.

Injetou-se as soluções das amostras e padrões em duplicata, nas condições cromatográficas do método; Reinjetou-se as soluções alterando-se o fluxo para 1,9 e 2,1mL/min e verificou-se se a variação percentual entre as injeções de cada solução em cada fluxo é igual ou menor a 2 %.

Calculou-se o fator de similaridade entre as duas soluções do padrão, em cada temperatura aplicada e foi verificado se o valor estava no intervalo de 0,98 a 1,02.

Calculou-se os percentuais liberados de indapamida em cada amostra, para cada fluxo aplicado, utilizando-se as áreas médias e a solução padrão injetada na condição correspondente.

Calculou-se a variação percentual, entre os percentuais liberados de indapamida nas condições de fluxos da fase móvel de 1,9 e 2,1 mL/min em relação aos percentuais liberados do ativo na análise com o fluxo estabelecido na metodologia em estudo (2,0 mL/min).

Verificou-se se a robustez das soluções às variações de fluxo da fase móvel entre 1,9 e 2,1 mL/min, através das variações percentuais entre os percentuais liberados de indapamida encontradas nas amostras variassem em até ± 2 % em relação aos percentuais liberados destes ativos nas amostras utilizando o fluxo estabelecido na metodologia em estudo (2,0 mL/min).

3.2.2.6.d Variação do lote da coluna cromatográfica

Avaliou-se no item da precisão, utilizando dois lotes de colunas distintas utilizando-se os mesmos critérios da precisão onde: O método será considerado robusto à variação do lote de coluna cromatográfica se atender ao critério de aceitação da precisão intercorridas.

3.2.3 Para análise da mesalazina

3.2.3.1 Preparo das soluções

3.2.3.1.1 Preparo do tampão pH 6,0

Transferir cerca de 43,35 g de fosfato de potássio monobásico e 1,65 g de hidróxido de sódio para balão volumétrico de 2 L. Dissolver e avolumar com água purificada por osmose reversa/Milli-Q e homogeneizar. Ajustar ao pH 6,0 com hidróxido de sódio 1N ou ácido fosfórico concentrado, homogeneizar.

3.2.3.1.2 Preparo da solução de hidróxido de sódio

Transferir 133,6 g de hidróxido de sódio para balão volumétrico de 2 L, dissolver e avolumar com água purificada por osmose reversa/Milli-Q. Homogeneizar.

3.2.3.1.3 Preparo do tampão pH 7,2 (utilizado apenas para diluição das soluções padrão e amostra do estágio tampão 2)

Preparar uma mistura de 850 mL de tampão pH 6,0 e 50 mL da solução de hidróxido de sódio e homogeneizar. Ajustar ao pH 7,2 com solução hidróxido de sódio ou ácido fosfórico, homogeneizar.

3.2.3.1.4 Preparo das soluções estágio ácido

3.2.3.1.4.a Preparo do padrão

Pesar, acuradamente, cerca de 20 mg de mesalazina, substância de referência ou padrão de trabalho e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 30 mL de ácido clorídrico 0,1N e levar ao ultrassom por 5 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, avolumar com ácido clorídrico 0,1N, homogeneizar e filtrar parte da solução através de filtro com membrana de acetato celulose 0,45 μm . Transferir, com auxílio de pipeta volumétrica, alíquota do filtrado para seu respectivo balão volumétrico conforme quadro 5. Avolumar com ácido clorídrico 0,1N, homogeneizar.

Quadro 5: Dados do preparo do padrão estágio ácido

| Apresentação | Alíquota (mL) | Diluição (mL) |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| 400 mg | 2,0 | 50,0 |

3.2.3.1.4.b Preparo da amostra

Transferir 500 mL de ácido clorídrico 0,1N para cada uma das 6 cubas e aquecer o meio até atingir a temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Transferir 1 comprimido para cada cuba e iniciar a dissolução. Após 2 horas retirar uma alíquota de 20 mL de cada cuba, filtrar através de filtro de seringa com membrana de acetato de celulose 0,45 μm , descartando os primeiros 2 mL filtrados. Descartar a solução remanescente e reter os comprimidos em ordem apropriada, de forma que cada um será devolvido a sua respectiva cuba em estágio posterior.

Parâmetros da dissolução:

Aparato: II (pá)

Velocidade: 50 rpm

3.2.3.1.5 Preparo das soluções estágio tampão 1

3.2.3.1.5.a Preparo do padrão

Pesar, acuradamente, cerca de 22 mg de mesalazina, substância de referência ou padrão de trabalho e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 30 mL de tampão fosfato pH 6,0 e levar ao ultrassom por 5 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, avolumar com tampão fosfato pH 6,0, homogeneizar e filtrar parte da solução através de filtro de seringa com membrana de acetato celulose 0,45 µm. Transferir, com auxílio de pipeta volumétrica, alíquota do filtrado para seu respectivo balão volumétrico conforme quadro 6. Avolumar com tampão fosfato pH 6,0, homogeneizar.

Quadro 6: Dados do preparo do padrão estágio tampão 1

| Apresentação | Alíquota (mL) | Diluição (mL) |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| 400 mg | 2,0 | 100,0 |

3.2.3.1.5.b Preparo da amostra

Transferir 900 mL de tampão fosfato pH 6,0 previamente aquecido a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para cada uma das 6 cubas. Transferir cada comprimido do estágio ácido para sua respectiva cuba e iniciar a dissolução. Após 1 hora, retirar uma alíquota de 50 mL de cada cuba, e prosseguir imediatamente como descrito no estágio tampão 2.

Filtrar as soluções amostra do estágio tampão 1 através de filtro de seringa com membrana de acetato de celulose 0,45 µm, descartando os primeiros 2 mL filtrados.

Parâmetros da dissolução:

Aparato: II (pá)

Velocidade: 100 rpm

3.2.3.1.6 Preparo das soluções estágio tampão 2

3.2.3.1.6.a Preparo do padrão

Pesar, acuradamente, cerca de 22 mg de mesalazina, substância de referência ou padrão de trabalho e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 30 mL de tampão fosfato pH 7,2 e levar ao ultrassom por 5 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, avolumar com tampão fosfato pH 7,2, homogeneizar e filtrar parte da solução através de filtro com membrana de acetato celulose 0,45 μ m. Transferir, com auxílio de pipeta volumétrica, uma alíquota de 2 mL para balão volumétrico de 20 mL, avolumar com tampão fosfato pH 7,2 e homogeneizar.

3.2.3.1.6.b Preparo da amostra

Adicionar 50 mL de solução de hidróxido de sódio em cada cuba, ajustar a pH 7,2 e continuar a dissolução por 90 minutos a 50 rpm com o aparato II (pá). Após minutos, retirar uma alíquota de 10 mL de cada cuba filtrar através de filtro de seringa com membrana de acetato de celulose 0,45 μ m, descartando os primeiros 2 mL filtrados. Transferir, com auxílio de pipeta volumétrica, alíquota do filtrado para seu respectivo balão volumétrico conforme quadro 7. Avolumar com tampão fosfato pH 7,2, homogeneizar.

Quadro 7: Dados do preparo da amostra estágio tampão 2

| Apresentação | Alíquota (mL) | Diluição (mL) |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| 400 mg | 1,0 | 20,0 |

3.2.3.2 Procedimento

3.2.3.2.1 Estágio ácido

Fazer leituras das soluções dos padrões e das amostras, utilizando um espectrofotômetro adequado, em 302 nm, utilizando ácido clorídrico 0,1N para zerar o equipamento.

3.2.3.2.2 Estágio tampão 1

Fazer leituras das soluções dos padrões e das amostras, utilizando um espectrofotômetro adequado, em 330 nm, utilizando o tampão fosfato pH 6,0 para zerar o equipamento.

3.2.3.2.3 Estágio tampão 2

Fazer leituras das soluções dos padrões e das amostras, utilizando um espectrofotômetro adequado, em 332 nm, utilizando o meio de dissolução para zerar o equipamento.

3.2.3.3 Cálculos

3.2.3.3.1 Cálculos estágio ácido

% mesalazina dissolvido =

$$\frac{A_{am}}{A_{pd}} \times \frac{M_{pd}}{100} \times \frac{Aliq}{50} \times \frac{T_{pd}}{100} \times \frac{500}{1} \times \frac{100}{TD}$$

Onde:

A_{am} = Absorbância da amostra

A_{pd} = Absorbância do padrão

T_{pd} = Teor do padrão (%)

M_{pd} = Massa do padrão (mg)

Aliq = Alíquota da solução padrão estoque (mL)

TD = Teor declarado

3.2.3.3.2 Cálculos estágio tampão 1

% mesalazina dissolvido =

$$\frac{A_{am}}{A_{pd}} \times \frac{M_{pd}}{100} \times \frac{2}{V_{dil}} \times \frac{T_{pd}}{100} \times \frac{900}{1} \times \frac{100}{TD} + \% \text{ácido}$$

Onde:

A_{am} = Absorbância da amostra

A_{pd} = Absorbância do padrão

T_{pd} = Teor do padrão (%)

M_{pd} = Massa do padrão (mg)

V_{dil} = Volume de diluição final do padrão (mL)

TD = Teor declarado

% ácido = % liberado no estágio ácido

3.2.3.3.3 Cálculos estágio tampão 2

% mesalazina dissolvido =

$$\frac{A_{am}}{A_{pd}} \times \frac{M_{pd}}{100} \times \frac{2}{20} \times \frac{T_{pd}}{100} \times \frac{900}{1} \times \frac{V_{dil}}{Aliq} \times \frac{100}{TD} + \% \text{ácido} + \frac{\%tp1 \times 50}{900}$$

Onde:

A_{am} = Absorbância da amostra

A_{pd} = Absorbância do padrão

T_{pd} = Teor do padrão (%)

M_{pd} = Massa do padrão (mg)

Vdil = Volume de diluição final da amostra (mL)

Aliq = Alíquota da amostra (mL)

TD = Teor declarado

% ácido = % liberado no estágio ácido

% tp1 = % liberado no estágio tampão 1

3.2.4 Parâmetros de validação da mesalazina

Por tratar-se de um método farmacopeico, realizou-se uma validação parcial.

3.2.4.1 Seletividade/ especificidade

Em decorrência da técnica analítica empregada na metodologia, considerou-se como sinal emitido, o valor de absorbância.

Para o preparo do branco filtrou-se parte dos meios de dissolução (HCl 0,1N, tampão fosfato pH 6,0 e tampão fosfato pH 7,2) através de filtro de seringa com membrana de acetato celulose 0,45 µm e foi colocado para injetar.

Para o placebo, colocou-se quantidade equivalente ao peso médio de um comprimido em uma cuba de dissolução e seguiu-se o procedimento conforme descrito nos itens 3.2.3.1.4.b, 3.2.3.1.5.b e 3.2.3.1.6.b.

Preparou-se uma amostra conforme o procedimento descrito nos itens 3.2.3.1.4.b, 3.2.3.1.5.b e 3.2.3.1.6.b.

Preparou-se as soluções do padrão conforme o procedimento descrito nos itens 3.2.3.1.4.a, 3.2.3.1.5.a e 3.2.3.1.6.a.

Determinou-se as absorbâncias das soluções, em seus respectivos comprimentos de onda, conforme descrito nos itens 3.2.3.2.1, 3.2.3.2.2 e 3.2.3.2.3 .

Realizou-se a varredura das soluções na região de 200 a 400nm.

O método foi considerado seletivo/ específico pois atendeu aos critério de aceitação: O sinal emitido pela solução do placebo for menor ou igual a 2% do sinal emitido pela solução do ativo.

3.2.4.2 Precisão

3.2.4.2.a Precisão Intracorrída

Foi avaliada em função do coeficiente de variação (CV %) calculado entre os resultados obtidos.

3.2.4.2.a.1 Estágio ácido

Preparou-se duas soluções padrão, provenientes de pesagens distintas, utilizando substância referência, conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.1.4.a.

Realizou-se a leitura das soluções em duplicata conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.2.1.

Calculou-se o fator de similaridade entre as duas soluções padrão e verificou-se se o valor deveria estar na faixa de 0,98 a 1,02.

Preparou-se a amostra (placebo fortificado), e foi avaliado a precisão a partir de seis amostras na concentração equivalente a 1% do ativo dissolvido.

Realizou-se a leitura das amostras em duplicata conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.2.1.

Calculou-se a absorbância média em cada duplicata de amostra, a concentração teórica de mesalazina ($\mu\text{g/mL}$) em cada amostra (placebo fortificado) e a concentração real de mesalazina ($\mu\text{g/mL}$) em cada amostra (placebo fortificado).

Calculou-se o percentual de recuperação de mesalazina (%) em cada amostra (placebo fortificado).

Calculou-se o coeficiente de variação (CV %) entre as recuperações obtidas de mesalazina e verificou-se se atende ao critério de aceitação.

3.2.4.2.a.2 Estágio tampão 1

Preparou-se duas soluções padrão, provenientes de pesagens distintas, utilizando substância referência, conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.1.5.a.

Realizou-se a leitura das soluções em duplicata conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.2.2.

Calculou-se o fator de similaridade entre as duas soluções padrão e verificou-se se o valor deveria estar na faixa de 0,98 a 1,02.

Preparou-se a amostra (placebo fortificado), e foi avaliado a precisão a partir de seis amostras na concentração equivalente a 1% do ativo dissolvido.

Realizou-se a leitura das amostras em duplicata conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.2.2.

Calculou-se a absorbância média em cada duplicata de amostra, a concentração teórica de mesalazina ($\mu\text{g/mL}$) em cada amostra (placebo fortificado) e a concentração real de mesalazina ($\mu\text{g/mL}$) em cada amostra (placebo fortificado).

Calculou-se o percentual de recuperação de mesalazina (%) em cada amostra (placebo fortificado).

Calculou-se o coeficiente de variação (CV %) entre as recuperações obtidas de mesalazina e verificou-se se atende ao critério de aceitação.

3.2.4.2.a.3 Estágio tampão 2

Preparou-se duas soluções padrão, provenientes de pesagens distintas, utilizando substância referência, conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.1.6.a.

Realizou-se a leitura das soluções em duplicata conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.2.3.

Calculou-se o fator de similaridade entre as duas soluções padrão e verificou-se se o valor deveria estar na faixa de 0,98 a 1,02.

Preparou-se seis amostras conforme procedimento descrito nos itens 3.2.3.1.4.b, 3.2.3.1.5.b e 3.2.3.1.6.b, utilizando o produto.

Realizou-se a leitura das amostras em duplicata conforme o procedimento descrito nos itens 3.2.3.2.1, 3.2.3.2.2 e 3.2.3.2.3.

Calculou-se a absorbância média em cada duplicata de amostra.

Calculou-se o percentual dissolvido de mesalazina de cada amostra.

Calculou-se o coeficiente de variação (CV %) entre as concentrações de mesalazina (% dissolvido) obtidas e foi verificado se atende ao critério de aceitação.

Avaliou-se se o método analítico era preciso baseando-se no critério de aceitação adotado onde o coeficiente de variação (CV %) entre as concentrações de mesalazina obtidas for menor ou igual a 5%.

3.2.4.2.b Precisão Intercorridas

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item da precisão intracorrida, porém com outro analista e em dia diferente.

Calculou-se o coeficiente de variação (CV %) entre as concentrações obtidas pelo analista 2 e pelo analista 1 no item da precisão intracorrida e foi verificado se atende ao critério de aceitação.

Avaliou-se se o método analítico era preciso baseando-se no critério de aceitação adotado onde o coeficiente de variação entre as concentrações de mesalazina obtidas for menor que 5%.

3.2.4.3 Exatidão

Avaliou-se em função dos resultados do percentual de recuperação de mesalazina das soluções de amostras (placebo fortificado) nas seguintes concentrações:

1. Concentração de 1% da concentração de ativo no produto (8 µg/mL) em HCl 0,1N.
2. Concentração de 1% da concentração de ativo no produto (4,4 µg/mL) em tampão fosfato pH 6,0.
3. Concentrações de 20%, 100% e 120% da concentração de ativo no produto em tampão fosfato pH 7,2.

3.2.4.3.1 Estágio ácido

Verificou-se se o % de recuperação de mesalazina obtido no item da precisão intracorrída atende ao critério de aceitação.

3.2.4.3.2 Estágio tampão 1

Verificou-se se o % de recuperação de mesalazina obtido no item da precisão intracorrída atende ao critério de aceitação.

3.2.4.3.3 Estágio tampão 2

Preparou-se duas soluções padrão de trabalho, utilizando substância referência, conforme procedimento descrito no item 3.2.3.1.6.a.

Realizou-se a leitura das soluções em duplicata conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.2.3.

Calculou-se o fator de similaridade entre as duas soluções padrão e verificou-se se o valor deveria estar na faixa de 0,98 a 1,02.

Transferiu-se as massas de mesalazina e placebo, referentes a cada nível de concentração para erlenmeyers contendo o meio de dissolução (tampão fosfato pH 7,2) conforme descrito na tabela 7. Preparou-se em triplicata.

Quadro 8: Dados com preparo das amostras de exatidão

| Concentração aproximada (%) | Massa de mesalazina (mg) | Massa de placebo (mg) | Volume de meio (mL) |
|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 20 | 80,0 | 257,5 | 900 |
| 100 | 400,0 | 257,5 | 900 |
| 120 | 480,0 | 257,5 | 900 |

Manteve-se sob agitação magnética por 90 minutos. Retirou-se uma alíquota de 10 mL e filtrou-se através de filtro de seringa com membrana acetato celulose 0,45 μm .

Transferiu-se, com auxílio de pipeta volumétrica, uma alíquota de 1 mL do filtrado para balão volumétrico de 20 mL. Avolumou-se com tampão fosfato pH 7,2 e homogeneizou-se.

Realizou-se a leitura das amostras em duplicata conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.2.3.

Calculou-se a absorbância média em cada duplicata de amostra, a concentração teórica de mesalazina ($\mu\text{g/mL}$) em cada amostra (placebo fortificado) e a concentração real de mesalazina ($\mu\text{g/mL}$) em cada amostra (placebo fortificado).

Calculou-se o percentual de recuperação de mesalazina (%) em cada amostra (placebo fortificado).

Calculou-se o coeficiente de variação (CV %) entre as recuperações obtidas de mesalazina e verificou-se se atende ao critério de aceitação.

Avaliou-se se o método analítico foi considerado exato, se o percentual de recuperação de mesalazina em cada concentração, estiver dentro do intervalo de 95 – 105 %.

3.2.4.4 Robustez

3.2.4.4.1 Estabilidade das Soluções

Avaliou-se a partir da monitoração dos resultados de similaridade da solução do ativo e do percentual dissolvido de mesalazina da amostra recém-preparada, por um período de 24 horas.

3.2.4.4.1.a Solução padrão

Preparar duas soluções padrão, provenientes de pesagens distintas, conforme procedimento descrito no item 3.2.3.1.6.a.

Realizou-se a leitura das soluções em duplicata conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.2.3.

Calculou-se o fator de similaridade entre as duas soluções padrão.

Por um período de 24 horas, realizou-se nova leitura do padrão e calculou-se novamente o fator de similaridade frente a um padrão preparado recentemente.

Calculou-se a variação percentual (%) dos resultados no instante testado em relação ao tempo inicial.

3.2.4.4.1.b Solução amostra

Preparou-se duas soluções padrão, provenientes de pesagens distintas, utilizando substância referência, conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.1.6.a.

Preparou-se a solução amostra conforme procedimento descrito no item 3.2.3.1.6.b, utilizando o produto.

Realizou-se a leitura das amostras em duplicata conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.2.3.

Calculou-se o percentual liberado de mesalazina de cada amostra.

Por um período de 24 horas, realizou-se nova leitura da amostra e calculou-se novamente o percentual de mesalazina liberado frente a um padrão preparado recentemente.

Calculou-se a variação percentual do resultado no instante testado em relação ao tempo inicial.

Avaliou-se a estabilidade das soluções baseando-se no critério de aceitação: As soluções do ativo e da amostra serão consideradas estáveis se a variação percentual dos resultados obtidos no instante testado em relação ao tempo inicial for menor ou igual a 2%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se os testes de acordo com os parâmetros propostos para a categoria III e seus respectivos critérios de aceitação para avaliar se a metodologia analítica proposta atenderiam aos requisitos estabelecidos pela resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária N^o do ano de 2003.

Tais requisitos foram definidos, mediante a avaliação da metodologia analítica a ser validada através do guia de validação para produtos analíticos e bioanalíticos publicado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

4.1. Resultados e discussão para indapamida

4.1.1. Seletividade / Especificidade

O quadro 9 apresenta o resultado encontrado no teste utilizado no estudo de validação da indapamida e seu respectivo critério de aceitação.

Quadro 9: Critério de aceitação e resultados de seletividade/ especificidade da indapamida.

| TESTE | CRITÉRIO | RESULTADO |
|---|---|--|
| SELETIVIDADE/ ESPECIFICIDADE | <ul style="list-style-type: none">- Ausência de interferentes no tempo de retenção da indapamida.- Resolução entre sinais adjacentes à indapamida maior que 1,5. | Corresponde ao critério de aceitação, conforme demonstra as figuras 1 a 6 e os gráficos 1 a 8. |

Gráfico 1: Cromatograma representativo do branco (meio de dissolução)

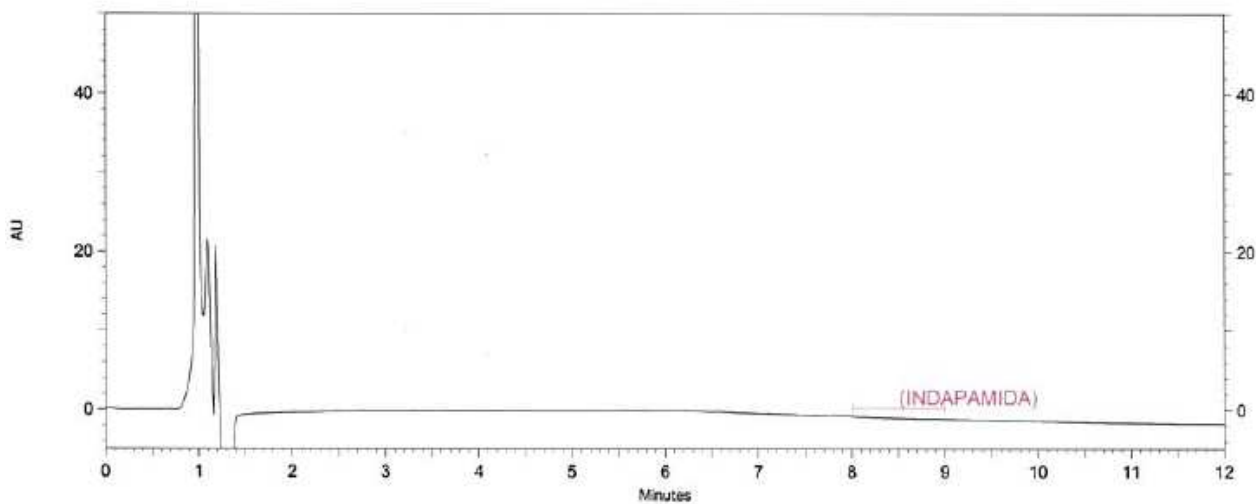


Gráfico 2: Cromatograma representativo da solução placebo

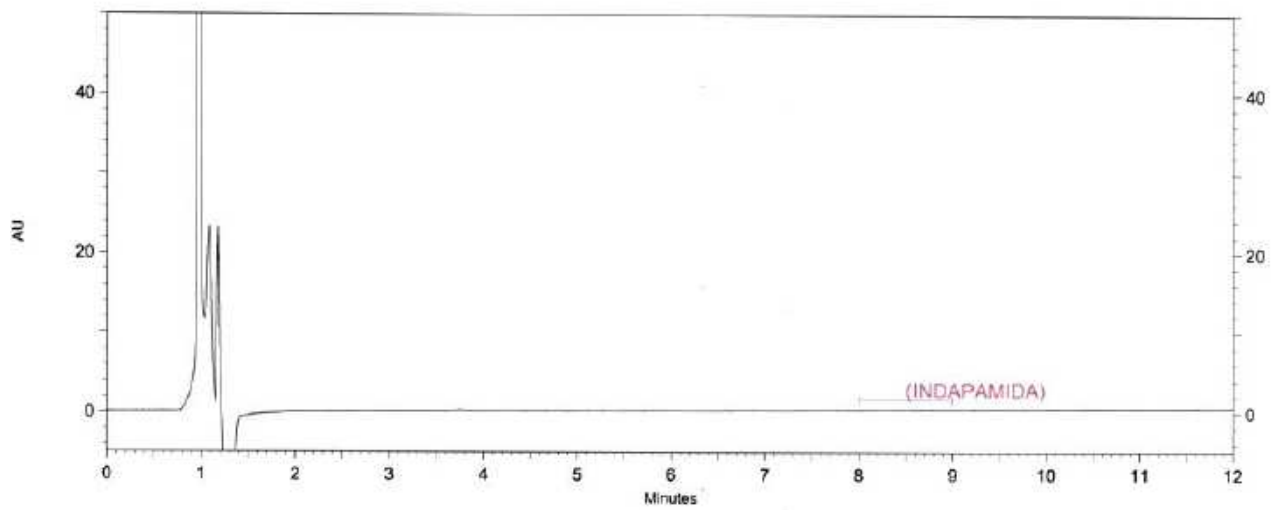


Gráfico 3: Cromatograma representativo da solução padrão de trabalho de indapamida com concentração 0,5 µg/mL

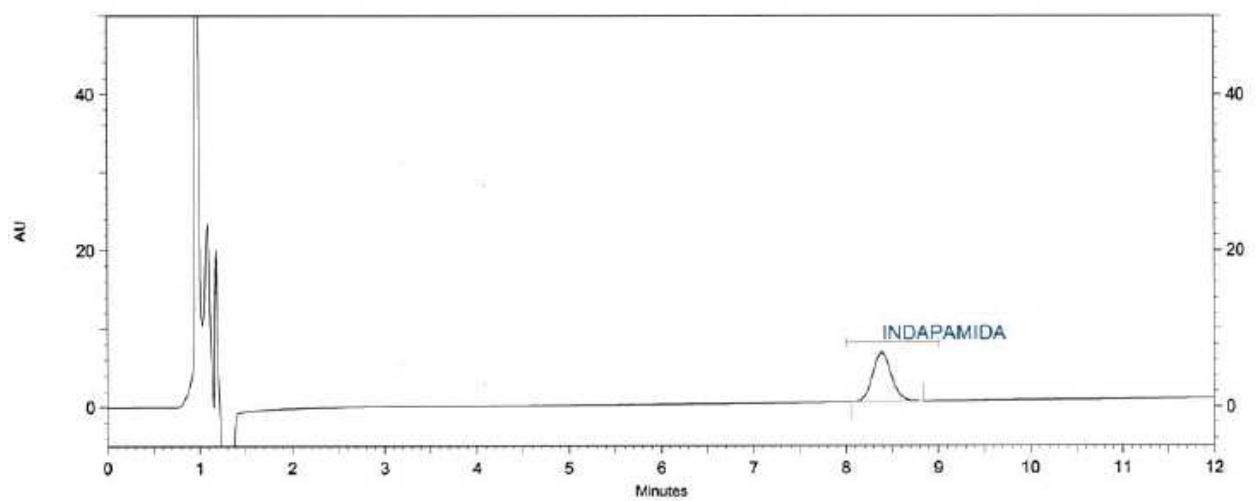


Gráfico 4: Cromatograma representativo da solução padrão de trabalho de indapamida com concentração 1,5 µg/mL

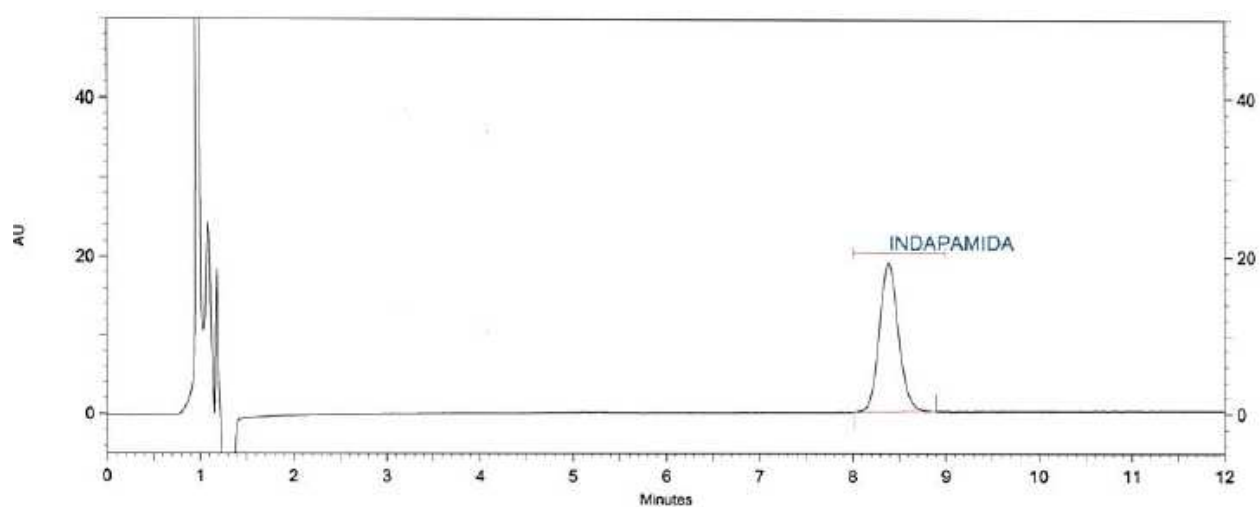


Gráfico 5: Cromatograma representativo da solução padrão de trabalho de indapamida com concentração 2,0 µg/mL

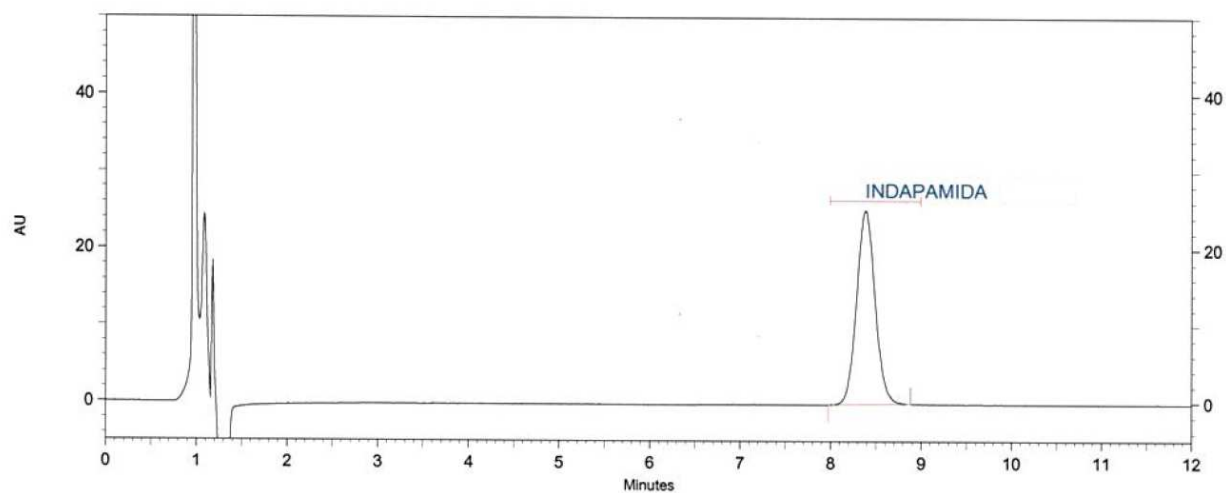


Gráfico 6: Cromatograma representativo da solução padrão de trabalho de indapamida com concentração 3,0 µg/mL

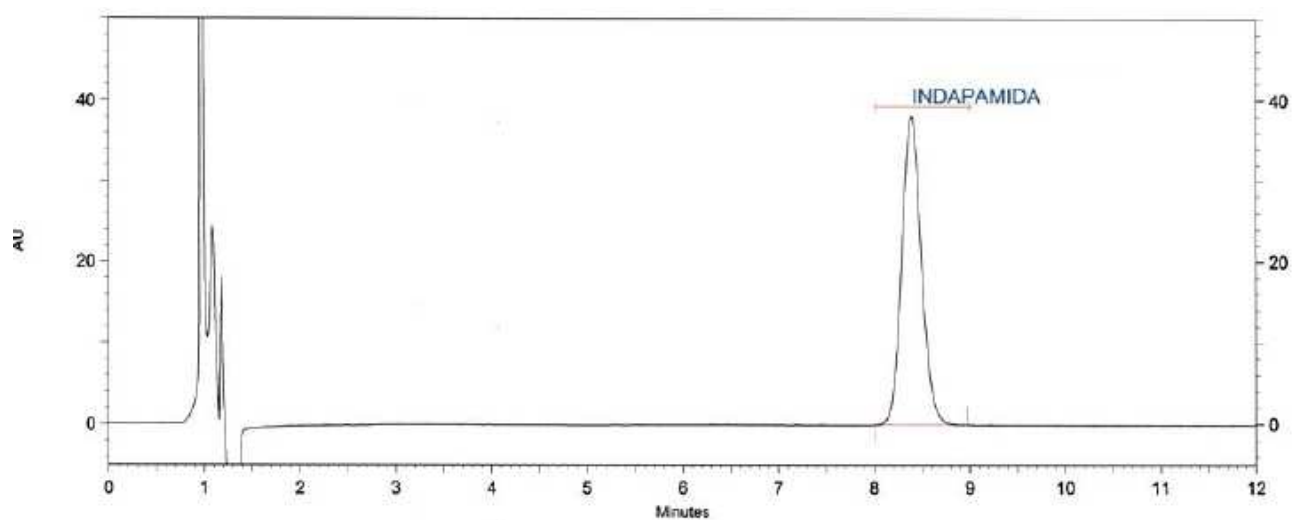


Gráfico 7: Cromatograma representativo da solução padrão de trabalho de indapamida com concentração 3,5 µg/mL

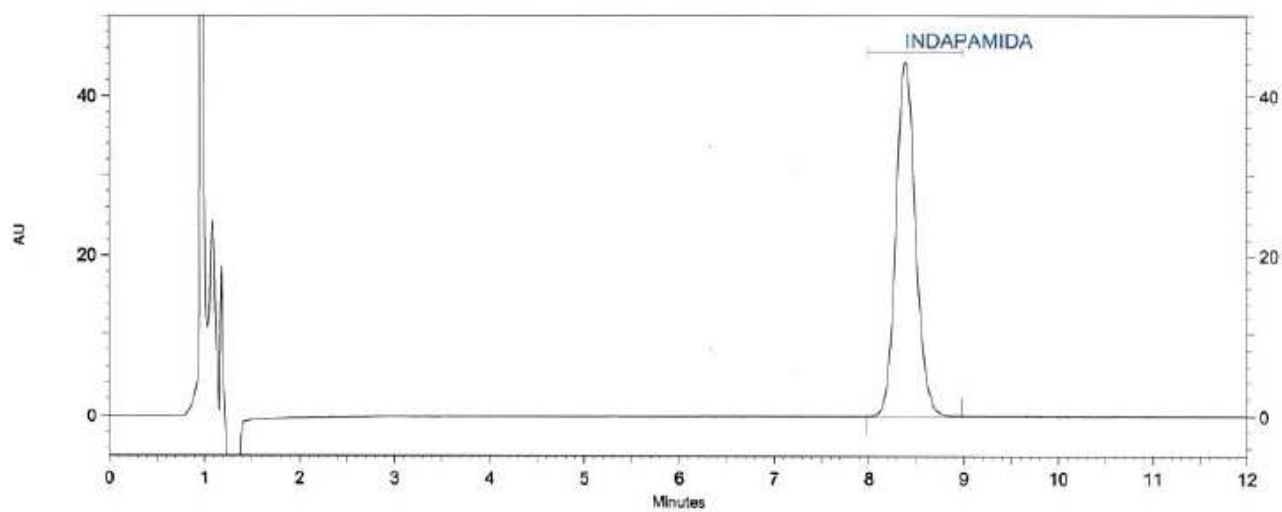


Gráfico 8: Cromatograma representativo da solução amostra 24ª hora

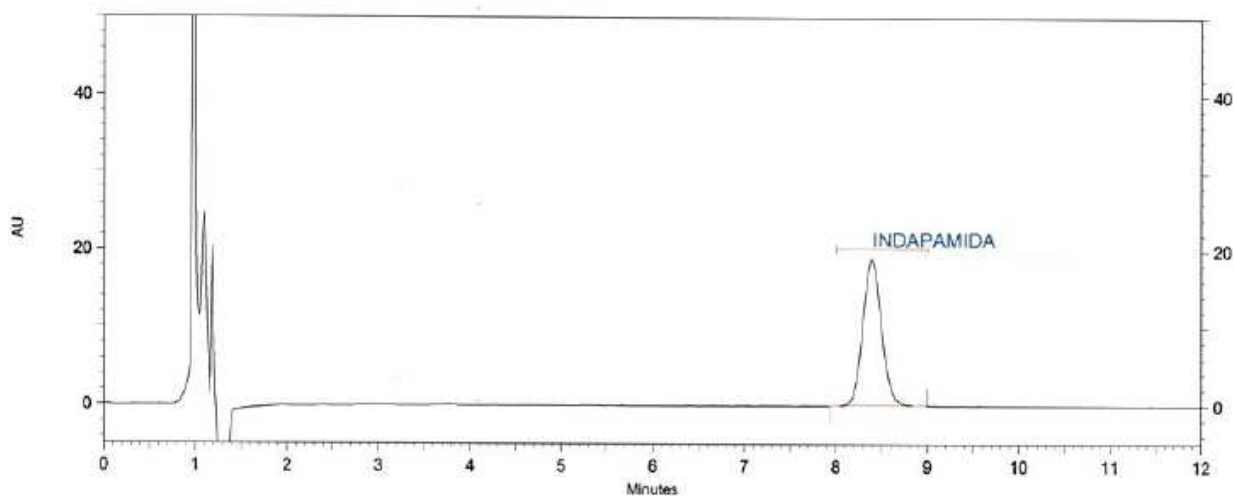


Figura 1: Pureza de pico da solução padrão de trabalho conc 0,5 µg/mL

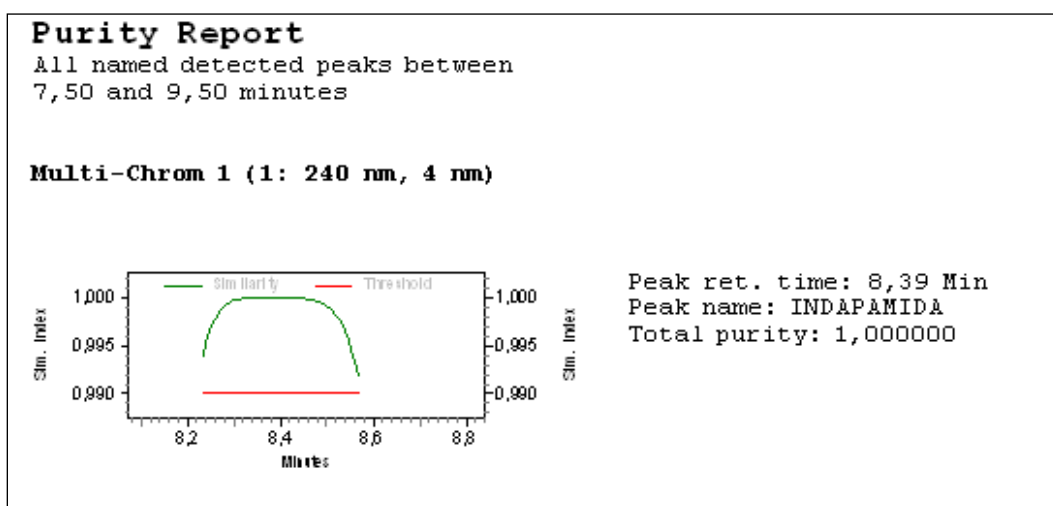


Figura 2: Pureza do pico da solução padrão de trabalho conc 1,5 µg/mL

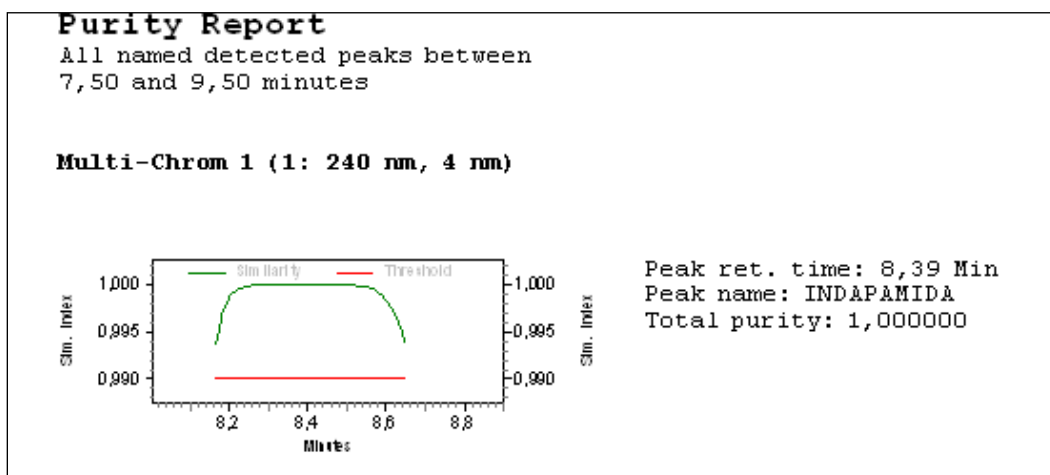


Figura 3: Pureza do pico da solução padrão de trabalho conc 2,0 µg/mL

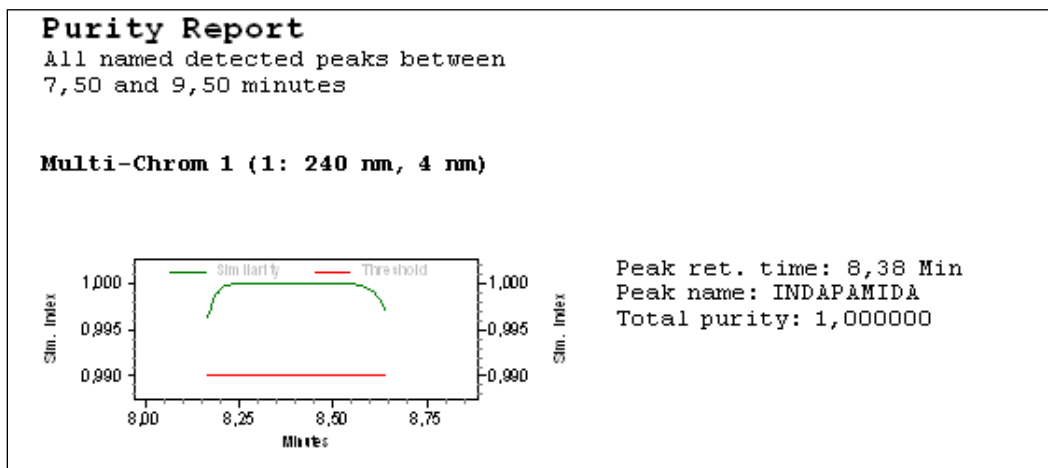


Figura 4: Pureza do pico da solução padrão de trabalho conc 3,0 µg/mL

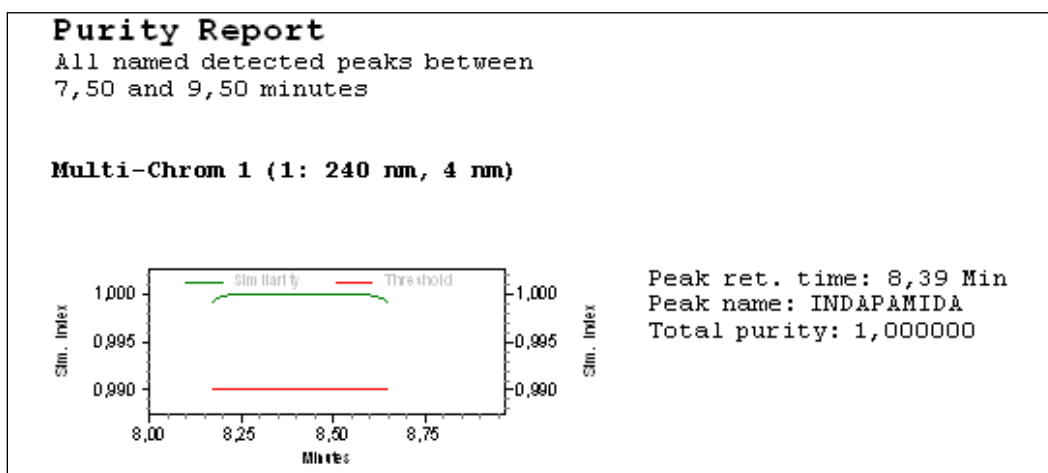


Figura 5: Pureza do pico da solução padrão de trabalho conc 3,5 µg/mL

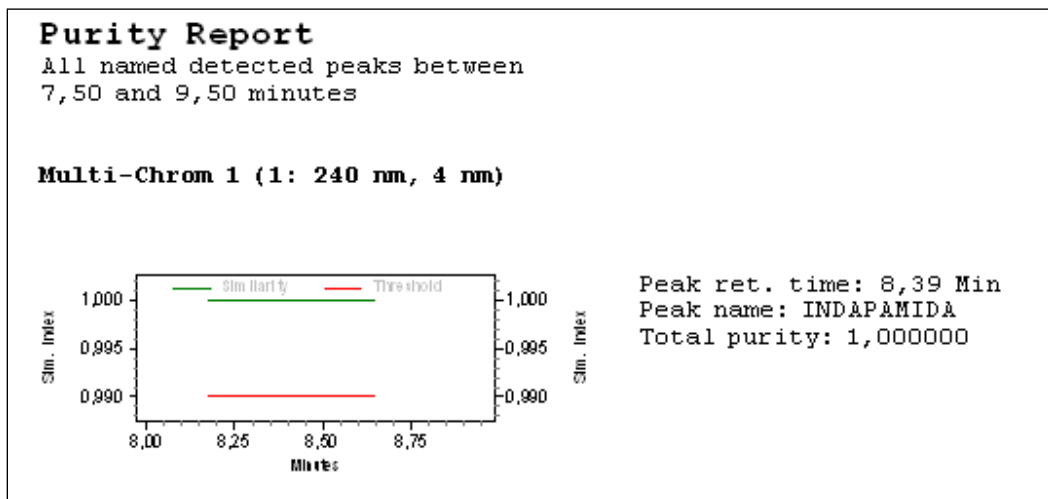
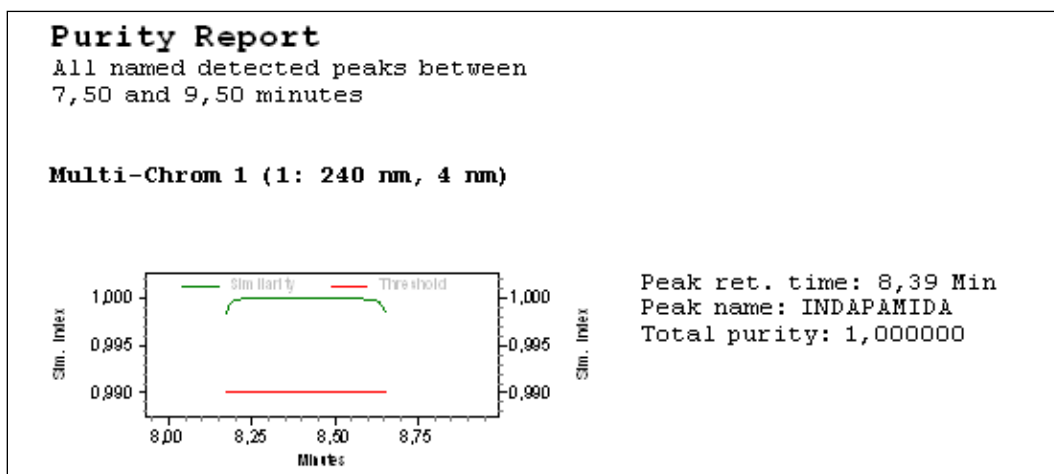


Figura 6: Pureza do pico da solução amostra 24^a hora

A comparação dos espectros nos gráficos de pureza representa um índice de semelhança/ similaridade, quanto mais próximo o número de 1,00, mais semelhante os espectros são. O *purity threshold* é usado para eliminar espectros que não se correspondem. Se o índice de similaridade é maior que o *purity threshold*, o espectro poderá ser considerado puro. Em geral, um espectro com o índice de similaridade maior que 0,99 teria uma elevada probabilidade de ser o mesmo espectro. Os espectros com valores de similaridade maiores que 0,90 e menores que 0,99 poderiam mostrar mesma semelhança, mas precisam ser avaliados com cuidado. Valores menores que 0,90 não são considerados semelhantes.

A ANVISA não estabelece valor de referência para o critério de aceitação para este item (BRASIL, 2003). Sendo assim, estabeleceu-se o critério de aceitação a partir do conceito de seletividade/ especificidade de um método analítico que é caracterizado como sendo o parâmetro onde é verificado se a metodologia foi capaz de distinguir o sinal emitido pelo princípio ativo de interesse, em presença de possíveis interferentes tais como: placebo, impurezas e produtos de degradação (ERMER, MILLER, 2005). Em decorrência da técnica analítica empregada na metodologia, considerou-se como sinal emitido, o valor de área e para o cálculo de resolução entre os sinais e utilizou-se a fórmula de resolução estabelecida pela farmacopéia

americana e calculada automaticamente pelo “*software*” de cromatografia. (ERMER, MILLER, 2005).

De acordo com as figuras de 1 a 6 pode-se ratificar que o método analisado foi considerado seletivo/ específico porque comprovou que não só foi possível identificar o sinal do fármaco, como também garantir que no tempo de retenção deste, encontrou-se uma pureza espectral acima de 0,999 o que garantiu que a metodologia analítica permitiu a separação do analito e a certeza de que apenas este poderá ser identificado e quantificado em seu respectivo tempo de retenção.

4.1.2. Linearidade

Segundo a RDC da ANVISA, o método é considerado linear se atender ao critério de aceitação que estabelece que o coeficiente de correlação deve ser igual ou maior que 0,99 e deve-se avaliar os resíduos da curva (BRASIL, 2003).

Encontrou-se o valor de 1,000 para o coeficiente de correlação ao quadrado para o ensaio de linearidade do fármaco. O gráfico 5 demonstra o resultado.

Através da análise do gráfico 10 correspondente aos resíduos comprova-se que os pontos da curva estão dispersos entre si, e que todos os valores de resíduos estiveram dentro do intervalo de duas vezes o erro padrão, cujo valor foi, 7974. Para a avaliação da dispersão dos gráficos dos resíduos utilizou-se a definição que os resíduos devem estar distribuídos de maneira aleatória no gráfico de concentração x resíduo. Ou seja, para atender a essa definição, não deve existir uma tendência linear de aumento do resíduo em função do aumento de concentração das soluções analisadas (ERMER, MILLER, 2005).

Gráfico 9: Linearidade do padrão

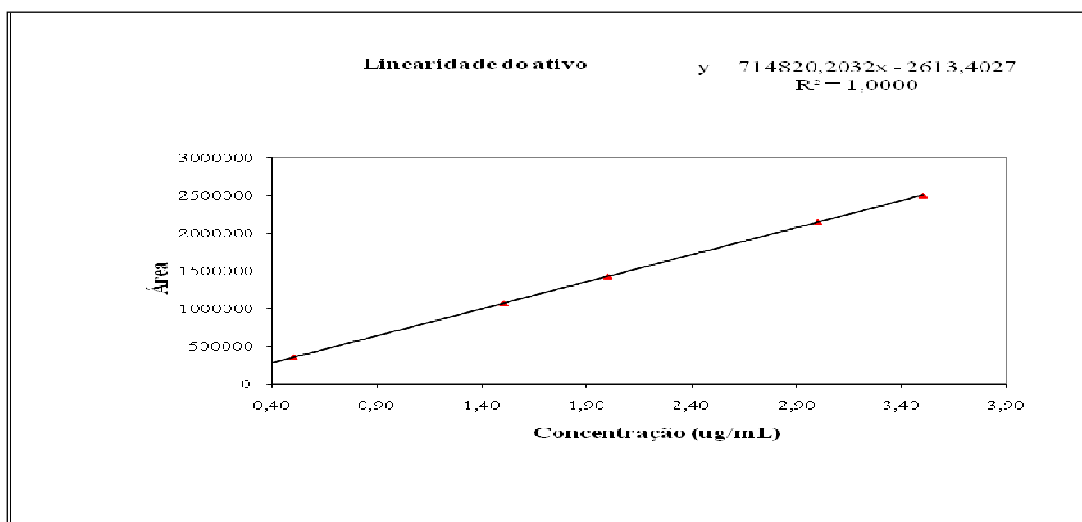
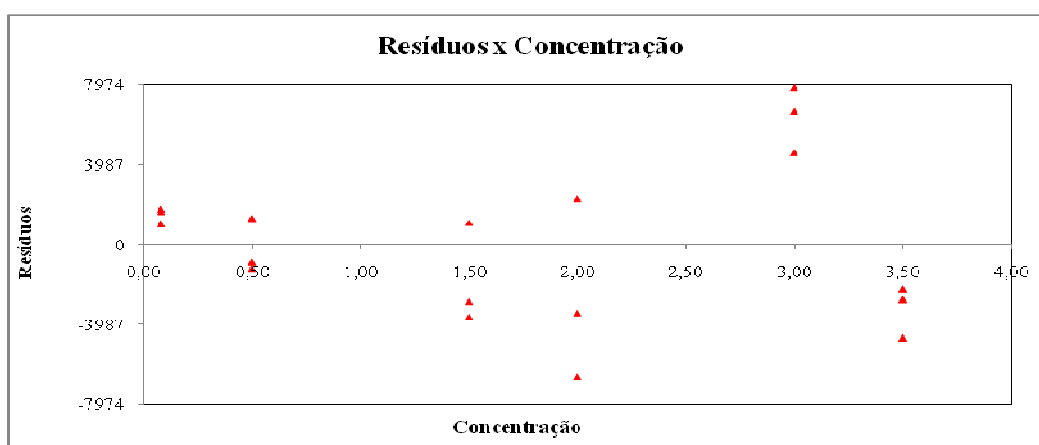


Gráfico 10: Gráfico dos resíduos



O método analítico foi considerado linear por atender ao critério de aceitação estabelecido para este teste.

4.1.3. Precisão

4.1.3.1. Precisão intracorrída

Os valores dos desvios padrões relativos encontrados para as amostras nos tempos 2^a, 12^a e 24^a hora foram 7,7, 2,7 e 3,6% respectivamente.

O quadro 10 apresenta o resultado do desvio padrão relativo encontrado no teste e o respectivo critério de aceitação preconizado pela ANVISA, onde o método é considerado preciso se o desvio padrão relativo entre as amostras, for menor que 5% (BRASIL, 2003).

Quadro 10: Critério de aceitação e resultados da precisão intracorrida da indapamida

| TESTE | CRITÉRIO | RESULTADO |
|------------------------------|---|---|
| PRECISÃO INTRACORRIDA | <p>2^ah e 12^ah: Desvio Padrão Relativo (RSD) menor que 10%.</p> <p>24^ah: Desvio Padrão Relativo (RSD) menor que 5%.</p> | <p>2^a hora = 7,7 %</p> <p>12^a hora = 2,7 %</p> <p>24^a hora = 3,6 %</p> |

Considerou-se o método preciso pois atendeu ao critério de aceitação.

A precisão intracorrida é um teste importante na validação por avaliar a concordância entre resultados obtidos em uma série de medidas por um único analista em determinado dia (ERMER, MILLER, 2005).

4.1.3.2. Precisão intercorridas

As amostras foram preparadas por dois analistas em dias diferentes.

O critério de aceitação estabelecido para este teste foi baseado no critério da RDC da ANVISA que determina que o desvio padrão relativo da medição de pelo menos 12 amostras de mesma concentração, deve ser menor que 5,0% (BRASIL, 2003).

Os valores dos coeficientes de variação encontrados para as amostras dos analistas 1 e 2 nos tempos 2^a, 12^a e 24^a hora foram 3,6; 4,3 e 4,3% respectivamente.

Baseando-se nos resultados encontrados, o método foi considerado preciso, porque atendeu ao critério de aceitação estabelecido para o tempo final de dissolução. Por definição, o teste de precisão intercorridas é importante na validação do método verifica-se a concordância de resultados do mesmo laboratório, mas, obtidos em dias diferentes com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ERMER, MILLER, 2005).

3.1.4. Exatidão

O quadro 11 apresenta os resultados de nove amostras encontrados no teste de exatidão, sendo três em cada nível, preparadas nas concentrações de 5, 100 e 120%.

Quadro 11: Resultados da exatidão da indapamida.

| Concentração (%) | Amostra | Recuperação (%) |
|-------------------------|-----------------|------------------------|
| 5 | 1 | 98 |
| | 2 | 99 |
| | 3 | 98 |
| 100 | 1 | 99 |
| | 2 | 98 |
| | 3 | 97 |
| 120 | 1 | 98 |
| | 2 | 99 |
| | 3 | 99 |
| | Média = | 99 |
| | Desvio = | 0,8 |

A ANVISA não determina qual deverá ser a faixa aceitável para o critério de aceitação, usualmente utiliza-se a faixa de recuperação de 98-102% para compostos cuja concentração nas soluções amostras são altas (BRASIL, 2003). Porém, por ser um teste de dissolução, foi necessário aumentar a faixa de recuperação pelo fato da diferença existente entre os comprimidos utilizados no ensaio analítico. Desta forma, foi estabelecida como critério de aceitação a faixa de 95-105%.

Segundo a resolução publicada pela ANVISA, o método analítico deverá ser exato se houver a proximidade de resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro e, por isso, o método foi considerado

exato pelo fato das recuperações das soluções amostras estarem dentro da faixa de 95 a 105% da concentração real das soluções (BRASIL, 2003).

4.1.5. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Este parâmetro é derivado dos estudos da linearidade, precisão e exatidão e é considerado satisfatório, se o método apresentar exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicado à amostra (placebo contaminado) contendo quantidade de indapamida dentro do intervalo 5% a 206% para linearidade e 5% a 120% para exatidão (BRASIL, 2003).

Portanto baseando-se nos testes realizados, o método analítico foi linear, preciso e exato na faixa de concentração 5% a 206% para linearidade e 5% a 120% para exatidão. A precisão foi avaliada no nível 100% da concentração teste.

4.1.6. Robustez

4.1.6.1. Estabilidade das soluções

Realizou-se o monitoramento das soluções recém-preparadas, do ativo indapamida e da amostra por um período de 48 horas. A solução padrão e a solução amostra apresentaram-se estáveis durante este período, onde a variação média do sinal foi 0,5% para a solução padrão e 1,4% para a solução amostra.

O critério de aceitação para o teste de robustez foi estabelecido a partir da estabilidade das soluções padrão e da amostra e foram consideradas estáveis até o tempo em que a variação percentual da área do pico referente a indapamida (%) no instante testado em relação à área encontrada no tempo zero para a indapamida, fosse de ± 2 %.

O teste de robustez é importante no estudo de validação porque avalia a capacidade do método a ser validado, em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ERMER, MILLER, 2005).

A estabilidade das soluções amostra e padrão é um dos critérios que deverá ser avaliado em uma metodologia analítica. Para uma análise cromatográfica, a avaliação do comportamento cromatográfico das soluções testadas, quando houver variação do fluxo, temperatura da coluna, por exemplo, poderão ser adotados para verificar a robustez do método (BRASIL, 2003).

4.1.6.2. Variação da temperatura do forno

Foi feita a comparação entre os percentuais liberados de indapamida em duas amostras, injetadas nas temperaturas do forno de 38, 40 e 42 °C. As soluções amostras foram quantificadas contra o padrão injetado nas mesmas condições.

O critério de aceitação foi estabelecido das amostras injetadas nas diversas variações de temperatura do forno onde a variação (%) entre as concentrações das amostras nas temperaturas de 38 e 42°C não deveria ser maior que 2% em relação às concentrações das amostras injetadas na temperatura de 40°C. A maior variação foi de -1,2%, conforme demonstrado no quadro 12.

Quadro 12: Resultados das amostras para a variação da temperatura.

| Condição | Amostra 1 (%) | Variação (%) | Amostra 2 (%) | Variação (%) |
|------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Normal 40°C | 85 | NA | 98 | NA |
| Temperatura 38°C | 85 | 0,0 | 97 | 1,0 |
| Temperatura 42°C | 86 | -1,2 | 97 | 1,0 |

4.1.6.3. Variação do fluxo da fase móvel

Foi feita a comparação entre os percentuais liberados de indapamida em duas amostras, injetadas nos fluxos 1,9; 2,0 e 2,1 mL/min. As soluções amostras foram quantificadas contra o padrão injetado nas mesmas condições.

Estabeleceu-se que critério de aceitação das amostras injetadas nas diversas variações de fluxo da fase móvel onde a variação (%) entre as concentrações das amostras nos fluxos 1,9 e 2,1 mL/min não deveria ser maior que 2% em relação às concentrações das amostras injetadas no fluxo 2,0mL/min. A maior variação foi de 0,0%, conforme demonstrado no quadro 13.

Quadro 13: Resultados das amostras para a variação do fluxo.

| Condição | Amostra 1 (%) | Variação (%) | Amostra 2 (%) | Variação (%) |
|-----------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Fluxo 2,0mL/min | 85 | NA | 98 | NA |
| Fluxo 1,9mL/min | 85 | 0,0 | 98 | 0,0 |
| Fluxo 2,1mL/min | 85 | 0,0 | 98 | 0,0 |

4.1.6.4. Variação da coluna cromatográfica

Considerou-se o método robusto à variação do lote de coluna cromatográfica porque atendeu o critério da precisão intercorridas, conforme demonstrado nos resultados anteriores.

Portanto, tomando como base os resultados encontrados nos testes de robustez, o método foi considerado robusto por atender aos critérios de aceitação estabelecidos para o teste.

4.2. Resultados e discussão para mesalazina

4.2.1. Seletividade / Especificidade

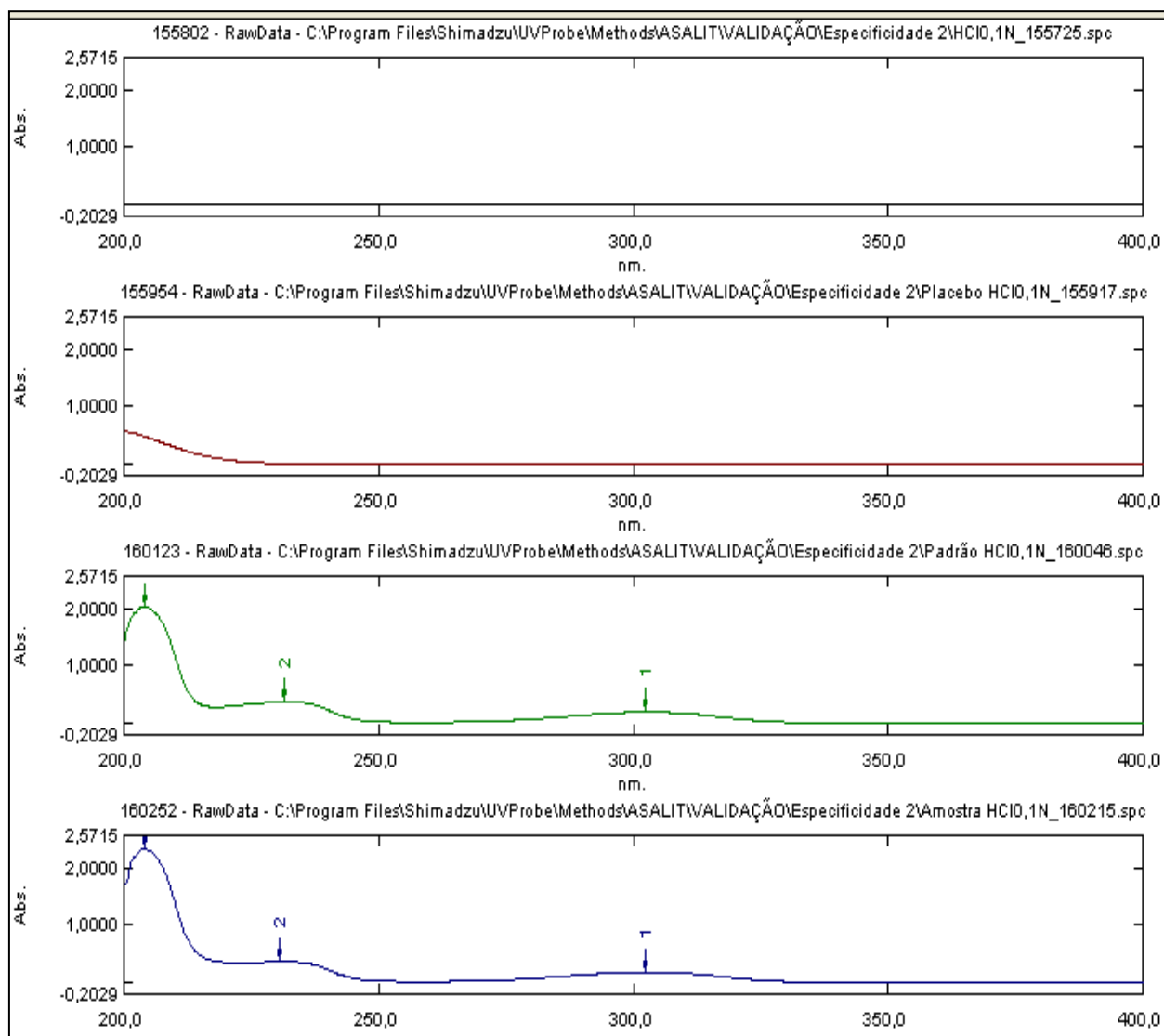
Apresenta-se no quadro 14 o resultado encontrado no teste utilizado no estudo de validação da mesalazina e seu respectivo critério de aceitação.

Quadro 14: Critério de aceitação e resultados de seletividade/ especificidade da mesalazina.

| TESTE | CRITÉRIO | RESULTADO |
|---|---|---|
| SELETIVIDADE/ ESPECIFICIDADE | - O sinal emitido pela solução do placebo for menor ou igual a 2% do sinal emitido pela solução do ativo. | Corresponde ao critério de aceitação, conforme demonstra os quadros 9 a 11 e os gráficos 11 a 13. |

- Soluções do estágio ácido HCl 0,1N.

Gráfico 11: Sobreposição dos espectros de varredura das soluções do branco (meio dissolução), placebo, ativo e amostra (de cima para baixo).

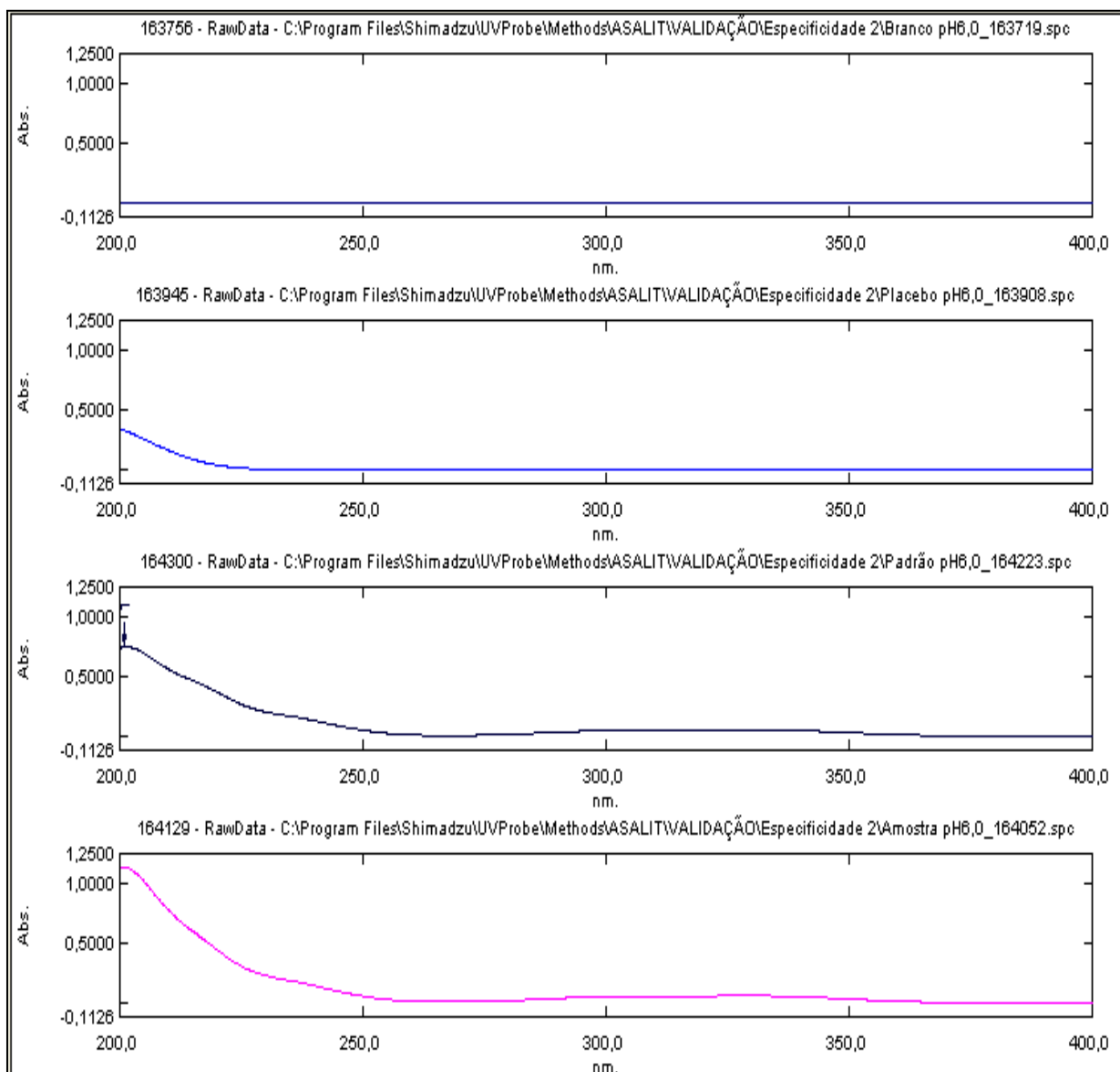


Quadro 15: Tabela com o resultado das soluções de especificidade do estágio ácido HCl 0,1N

| Solução | Absorbância |
|--------------------|-------------|
| Branco | -0,0001 |
| Placebo | 0,0007 |
| Ativo (mesalazina) | 0,1945 |
| Amostra | 0,1855 |

- Soluções do estágio Tampão 1 pH 6,0.

Gráfico 12: Sobreposição dos espectros de varredura das soluções do branco (meio de dissolução), placebo, ativo e amostra (de cima para baixo).

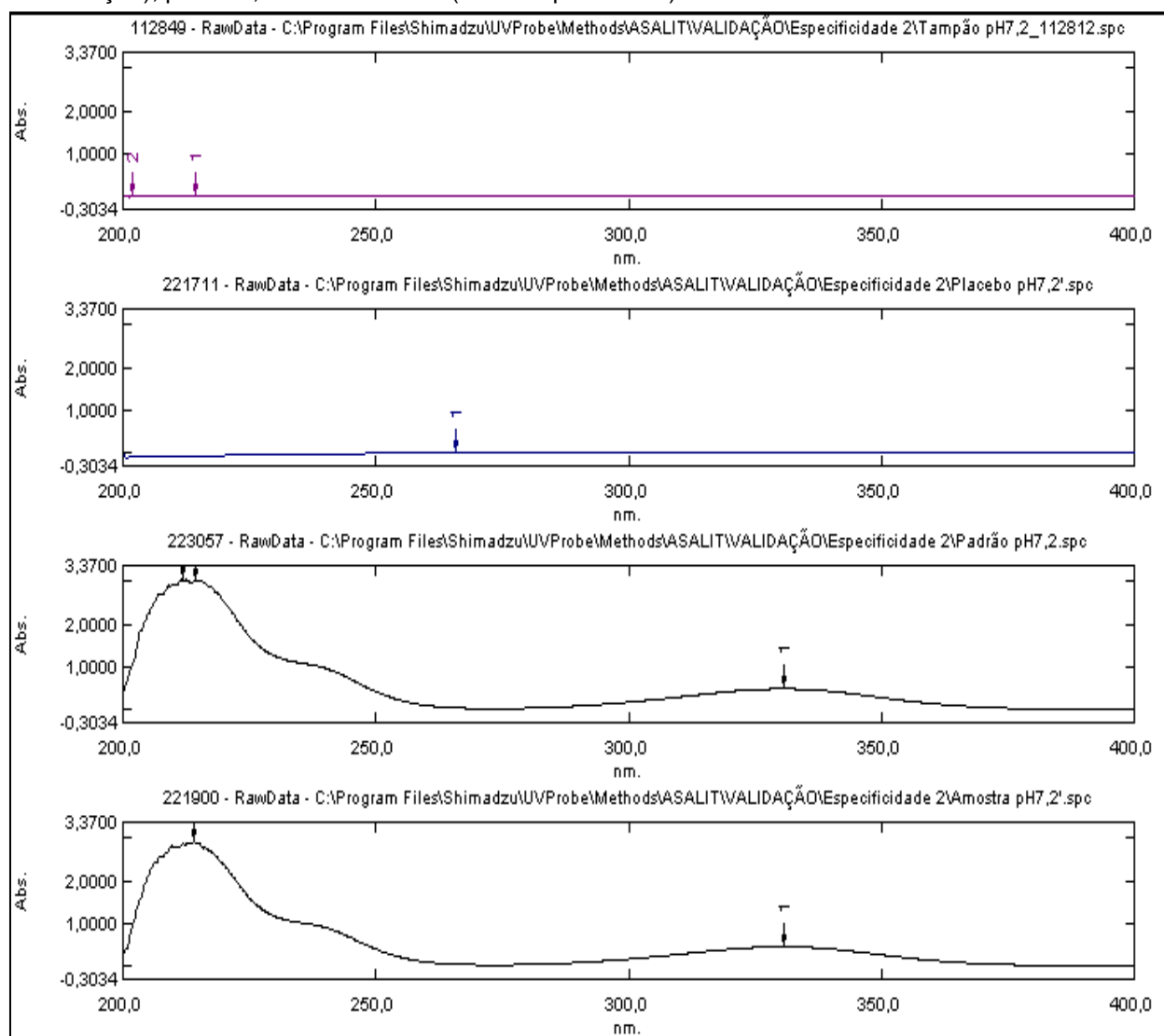


Quadro 16: Resultado das soluções de especificidade do estágio Tampão 1 pH 6,0

| Amostra | Absorbância |
|--------------------|-------------|
| Branco | -0,0007 |
| Placebo | 0,0006 |
| Ativo (mesalazina) | 0,0587 |
| Amostra | 0,0629 |

– Soluções do estágio Tampão 2 pH 7,2.

Gráfico 13: Sobreposição dos espectros de varredura das soluções do branco (meio de dissolução), placebo, ativo e amostra (de cima para baixo).



Quadro 17: Resultado das soluções de especificidade do estágio Tampão 2 pH 7,2

| Amostra | Absorbância média |
|--------------------|--------------------------|
| Branco | 0,0007 |
| Placebo | -0,0066 |
| Ativo (mesalazina) | 0,4823 |
| Amostra | 0,4537 |

A ANVISA não estabelece valor de referência para o critério de aceitação para este item (BRASIL, 2003). Sendo assim, estabeleceu-se o critério de aceitação a partir do conceito de seletividade/ especificidade de um método analítico que é caracterizado como sendo o parâmetro onde é verificado se a metodologia foi capaz de distinguir o sinal emitido pelo princípio ativo de interesse, em presença de possíveis interferentes tais como: placebo, impurezas e produtos de degradação (ERMER, MILLER, 2005). Em decorrência da técnica analítica empregada na metodologia, considerou-se como sinal emitido, o valor da absorbância.

De acordo com a análise dos gráficos considerou-se o método seletivo/ específico porque comprovou-se que não só foi possível identificar o sinal do fármaco, como também garantir que os sinais emitidos pela solução dos placebos nos estágios ácido, tampão 1 e tampão 2 foram menor ou igual a 2% do sinal emitido pela solução amostra.

4.2.2. Precisão

4.2.2.1. Precisão intracorrída

No quadro 18 apresenta-se o resultado encontrado no teste e o respectivo critério de aceitação preconizado pela ANVISA, onde o método é considerado preciso se o desvio padrão relativo entre as amostras da precisão, for menor que 5% (BRASIL, 2003). Para o parâmetro em questão avaliou-se o desvio padrão relativo do percentual dissolvido entre as amostras.

Quadro 18: Tabela contendo o critério de aceitação e resultados da precisão intracorrída da mesalazina

| TESTE | CRITÉRIO | RESULTADO |
|------------------------------|--|---|
| PRECISÃO INTRACORRIDA | O coeficiente de variação (CV %) entre as concentrações de mesalazina obtidas for menor ou igual a 5%. | Estágio ácido = 0,8 % Estágio tampão 1 = 3,4 % Estágio tampão 2 = 3,8 % |

Considerou-se o método preciso por atender ao critério de aceitação. A ANVISA determina que o método é considerado preciso se o valor do RSD entre as amostras não for maior que 5,0%. Como o teste apresentou resultado inferior a 5,0% o método foi considerado preciso.

A precisão intracorrída é um teste importante na validação por avaliar a concordância entre resultados obtidos em uma série de medidas por um único analista em determinado dia (ERMER, MILLER, 2005).

4.2.2.2. Precisão intercorridas

As amostras foram preparadas por dois analistas em dias diferentes.

O critério de aceitação estabelecido para este teste foi baseado pela ANVISA que determina que o desvio padrão relativo da medição de pelo menos 12 amostras de mesma concentração, deve ser menor que 5,0% (BRASIL, 2003).

Apresenta-se no quadro 19 o resultado encontrado no teste e o respectivo critério de aceitação preconizado pela ANVISA.

Quadro 19: Tabela contendo o critério de aceitação e resultados da precisão intercorridas da mesalazina

| TESTE | CRITÉRIO | RESULTADO |
|-------------------------------|--|---|
| PRECISÃO INTERCORRIDAS | O coeficiente de variação (CV %) entre as concentrações de mesalazina obtidas nos três estágios for menor ou igual a 5%. | Estágio ácido = 2,2 % Estágio tampão 1 = 2,9 % Estágio tampão 2 = 4,1 % |

Baseando-se nos resultados encontrados, o método foi considerado preciso, pois atendeu ao critério de aceitação estabelecido. Por definição, o teste de precisão intercorridas é importante na validação do método verifica-se a concordância de resultados do mesmo laboratório, mas, obtidos em dias diferentes com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ERMER, MILLER, 2005).

4.2.3. Exatidão

Os quadros 20, 21 e 22 apresentam os resultados encontrados no teste, onde o método será considerado exato se as recuperações de seis amostras na concentração equivalente a 1% para os estágios ácido e tampão 1 e para as nove amostras, sendo três em cada nível, preparadas nas concentrações de 20, 100 e 120% para o estágio tampão 2 estiverem entre a faixa de 95 a 105%.

Quadro 20: Tabela contendo os resultados da exatidão da mesalazina para o estágio ácido.

| Amostra | Recuperação (%) |
|-----------------|------------------------|
| 1 | 96 |
| 2 | 96 |
| 3 | 95 |
| 4 | 97 |
| 5 | 97 |
| 6 | 96 |
| Média = | 96 |
| Desvio = | 0,7 |

Quadro 21: Tabela contendo os resultados da exatidão da mesalazina para o estágio tampão 1.

| Amostra | Recuperação (%) |
|-----------------|------------------------|
| 1 | 101 |
| 2 | 103 |
| 3 | 104 |
| 4 | 95 |
| 5 | 98 |
| 6 | 99 |
| Média = | 100 |
| Desvio = | 3,4 |

Quadro 22: Tabela contendo os resultados da exatidão da mesalazina para o estágio tampão 2.

| Concentração (%) | Amostra | Recuperação (%) |
|-------------------------|-----------------|------------------------|
| 20 | 1 | 100 |
| | 2 | 104 |
| | 3 | 102 |
| 100 | 1 | 101 |
| | 2 | 102 |
| | 3 | 102 |
| 120 | 1 | 101 |
| | 2 | 103 |
| | 3 | 101 |
| | Média = | 102 |
| | Desvio = | 1,1 |

A ANVISA não determina qual deverá ser a faixa aceitável para o critério de aceitação, usualmente utiliza-se a faixa de recuperação de 98-102% para compostos cuja concentração nas soluções amostras são altas (BRASIL, 2003). Porém, por ser um teste de dissolução, foi necessário aumentar a faixa de recuperação pelo fato da diferença existente entre os comprimidos utilizados no ensaio analítico. Desta forma, foi estabelecida como critério de aceitação a faixa de 95-105%.

Segundo a resolução publicada pela ANVISA, o método analítico deverá ser exato se houver a proximidade de resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro e, por isso, o método foi considerado exato pelo fato das recuperações das soluções amostras estarem dentro da faixa de 95 a 105% da concentração real das soluções (BRASIL, 2003).

4.2.4. Robustez

4.2.4.1. Estabilidade das soluções

Realizou-se o monitoramento das soluções recém-preparadas, do ativo mesalazina e da amostra por um período de 24 horas. Considerou-se como critério de aceitação para o teste da estabilidade das soluções padrão e da amostra, que as mesmas serão estáveis até o tempo em que a variação percentual da área do pico referente a mesalazina (%) no instante testado em relação à área encontrada no tempo zero para a indapamida, fosse de $\pm 2\%$.

A solução padrão e a solução amostra apresentaram-se estáveis durante este período, onde a variação média do sinal foi $-1,1\%$ para a solução padrão e $-0,9\%$ para a solução amostra.

O teste de robustez é importante no estudo de validação porque avalia a capacidade do método a ser validado, em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ERMER, MILLER, 2005).

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- O método cromatográfico (CLAE) utilizado para a determinação do percentual dissolvido de indapamida demonstrou especificidade / seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez adequados à análise de indapamida aplicado para o produto Indapamina SR 1,5 mg comprimidos.
- O método espectrofotométrico aplicado para a determinação do percentual dissolvido de mesalazina se mostrou bastante satisfatório, uma vez que demonstrou especificidade, precisão e exatidão adequados à análise de mesalazina aplicado para o produto Mesalazina 400 mg comprimidos revestidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. Formas Farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 776 p.

Brasil, Resolução RDC nº 210, de 04 de Agosto de 2003. Dispõe sobre as Boas Práticas para fabricação de medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 04 ago. 2003.

Brasil, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 2 jun. 2003.

ICH, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **International Conference on Harmonisation**, IFPMA, Geneva, 1994.

ERMER, J.; MILLER, J. H. M. F. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. 1. ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005. 411 p.

INMETRO, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Brasil, 2003.

MESACOL®: mesalazina. Wagner Moy. Rio de Janeiro: Nycomed Pharma Ltda. 2013. Bula.

NATRILIX® SR: indapamida. Patrícia Kasesky de Avellar. Rio de Janeiro: Laboratórios Servier do Brasil Ltda. 2013. Bula.

PEZZINI, B. R., SILVA, M. A. S., FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** vol. 43, Nº4 out/ dez 2007.

UNITED States Pharmacopeia. 35 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Conventions; 2012.