

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Ana Cristina Batista da Silva Corveler

**DESENVOLVIMENTO DE NOVA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE TOPIRAMATO EM COMPRIMIDOS, UTILIZANDO A
TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM
DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA**

Rio de Janeiro

2011

Ana Cristina Batista da Silva Corveler

**DESENVOLVIMENTO DE NOVA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE TOPIRAMATO EM COMPRIMIDOS, UTILIZANDO A
TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM
DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadoras: Katia Christina Leandro
Silvana do Couto Jacob

Rio de Janeiro

2011

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Corveler, Ana Cristina Batista da Silva

Desenvolvimento de nova metodologia analítica para a determinação de topiramato em comprimidos, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica. / Ana Cristina Batista da Silva Corveler. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2011.

78 f., il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2011.

Orientadoras: Katia Christina Leandro; Silvana do Couto Jacob

1. Anticonvulsivantes. 2. Métodos Analíticos de Preparação de Amostras. 3. Cromatografia Líquida. 4. Espectrofotometria. 5. Dinitrofluorbenzeno. I. Título.

Development of a new analytical method for the determination of topiramate in tablets using high performance liquid chromatography with UV detection

Ana Cristina Batista da Silva Corveler

DESENVOLVIMENTO DE NOVA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE TOPIRAMATO EM COMPRIMIDOS, UTILIZANDO A TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Leonardo Lucchetti Caetano da Silva (Doutor)
Instituto de Tecnologia em Fármacos (Far-Manguinhos)

Gláucia Barbosa Cândido Alves Slana (Doutora)
Instituto de Tecnologia em Fármacos (Far-Manguinhos)

Rafael Dias Mesquita (Doutor)
Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Katia Christina Leandro (Doutora) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Silvana do Couto Jacob (Doutora) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida.

À minha família, pelo carinho e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido, pela compreensão.

Aos meus companheiros de trabalho, pelo suporte nos inúmeros momentos de ausência.

Às minhas orientadoras, pela excelente acolhida e pelo estímulo incessante.

Aos funcionários do Departamento de Química, da Secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca do INCQS, pela gentileza e prestatividade.

Aos docentes e coordenadores do Curso de Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária, pelos ensinamentos e dedicação.

Ao Dr. André Luiz Mazzei Albert, pelo valioso auxílio, sem o qual não teria sido possível concluir este trabalho.

Quase todos os homens morrem de seus remédios e não de suas doenças.

Molière

RESUMO

A USP 34 é o único compêndio oficial na atualidade que estabelece uma metodologia analítica para a determinação do topiramato em matérias-primas e comprimidos. No entanto, esta metodologia tem como inconveniente a utilização de um sistema cromatográfico acoplado a um detector de índice de refração, equipamento de difícil operação, baixa sensibilidade e alto custo. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica alternativa para a quantificação do topiramato em comprimidos, utilizando a técnica de cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica no UV/visível, associada à derivatização com o 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno. Os resultados sugeriram que o método é linear e seletivo.

Palavras-chave: Topiramato. Cromatografia Líquida. Detecção Espectrofotométrica. Derivatização. 1-Flúor-2,4-dinitrobenzeno.

ABSTRACT

USP 34th edition is the only current pharmacopeial compendium that includes an official monography for topiramate determination in raw materials and in tablets. However, this methodology has some disadvantages, due to the use of a chromatography system equipped with a refraction index detector, an equipment with low sensitivity and high operational costs. The aim of this work was developing an alternative analytical method for topiramate determination in tablets, using liquid chromatography with UV / vis spectrophotometric detection, with fluorodinitrobenzene derivatization. The results suggest that the method is linear and selective.

Keywords: Topiramate. Liquid chromatography. Spectrophotometric detection. Derivatization. Fluorodinitrobenzene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do topiramato	25
Figura 2 - Síntese do topiramato	26
Figura 3 - Representação do topiramato na conformação de bote torcido.....	27
Figura 4 - Composto relacionado A do topiramato	35
Figura 5 - Vias de degradação do topiramato	36
Figura 6 - Estruturas do topiramato e suas impurezas.....	37
Figura 7 - Estrutura do O-(1-metiletilideno)-frutopiranosose sulfamato.....	40
Figura 8 - Determinação gráfica do LD e do LIQ.....	51
Figura 9 - Estrutura química do FDNB (MM: 186,10)	55
Figura 10 - Reação de derivatização de amins primárias com o FDNB	56
Figura 11 - Comparação entre os cromatogramas obtidos na determinação analítica do ensaio em branco (A) e do derivado gerado a partir do TPM (B).....	57
Figura 12 - Comparação entre os cromatogramas obtidos na presença (A) e na ausência (B) de TEA	58
Figura 13 - Comparação entre os cromatogramas obtidos para o ensaio em branco (A), com o CRT (B) e com o analito de interesse (C)	59
Figura 14 - Comparação entre os cromatogramas obtidos para o ensaio em branco (A) e para os produtos da degradação do TPM por calor úmido (B)	60
Figura 15 - Espectro de massas EM/ESI do suposto sinal do derivado (modo +; Q array 5 V; e RF 150 V)	61
Figura 16 - Reação do TPM com duas moléculas de FDNB, produzindo o bis-(2,4-dinitrobenzeno)-topiramato (MM: 671,544)	61
Figura 17 - Arranjo espacial mais provável do bis-(2,4-dinitrobenzeno)-topiramato, obtido pela análise conformacional da molécula, utilizando o programa ChemOffice 4.0	62
Figura 18 - Reação do TPM com uma molécula de FDNB, produzindo o mono-(2,4-dinitrobenzeno)-topiramato (MM: 505,453)	63
Figura 19 - Cálculo dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico (Shimadzu série 10)	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação atualizada de produtos registrados no Brasil, contendo o TPM como princípio ativo	32
Quadro 2 - Ensaio físico e químico envolvidos na análise da matéria-prima TPM, segundo a USP 34	33
Quadro 3 - Ensaio físico e químico envolvidos na análise de comprimidos de TPM, segundo a USP 34.....	34
Quadro 4 - Soluções padrões (estoque) utilizadas no presente estudo	46
Quadro 5 - Condições cromatográficas para a determinação do TPM.....	63
Quadro 6 - Composição dos medicamentos utilizados no presente estudo.....	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva analítica do derivado, elaborada com sete níveis de concentração de TPM.....	68
Gráfico 2 - Cálculo do LD e LIQ, a partir da curva analítica (Statistica 6.0)	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos dados obtidos nos testes de estresse do TPM.....	38
Tabela 2 - Estudo de recuperação do TPM.....	53
Tabela 3 - Determinação analítica do TPM em comprimidos	54
Tabela 4 - Estudo da linearidade do método desenvolvido.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Fator de seletividade
a	Coeficiente angular
ACN	Acetonitrila
AMPA	Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metilsoxazol-4-propiónico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
C8	Coluna de fase reversa de sílica quimicamente ligada a grupos octilsilano
CCF	Cromatografia em camada fina
CFB	Comissão da Farmacopeia Brasileira
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CRT	Composto relacionado 1 do topiramato
CTT	Comitê Técnico Temático
d.i.	Diâmetro interno
DL ₅₀	Dose letal 50%
DOU	Diário Oficial da União
DPR	Desvio padrão relativo
EM/ ESI	Espectrometria de massas por nebulização com elétrons
EUA	Estados Unidos da América
FAR-MANGUINHOS	Instituto de Tecnologia em Fármacos
FB	Farmacopeia Brasileira
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FDNB	1-flúor-2,4-dinitrobenzeno
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz

FMOC-Cl	Cloroformato de 9-fluorenilmetila
FT-IR	Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier
GABA	Gama-aminobutirato
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (sigla em inglês)
ICH Q1B	Guia para ensaio de fotoestabilidade de novos fármacos e produtos da <i>International Conference on Harmonisation</i>
IFA	Insumo farmacêutico ativo
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
k'	Fator de capacidade
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
m	massa
[M+1] ⁺	Íon pseudomolecular
MP	Medida Provisória
MSDS	<i>Material Safety Data Sheet</i> (Ficha de Dados de Segurança de Material)
N	Número de pratos teóricos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pró-análise
pH	Potencial hidrogeniônico
MM	Massa molecular
p/p	Peso / Peso
Q array	Arranjo de quadrupolo

RE	Resolução Extraordinária
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RF	Radiofrequência
Res	Resolução
R	Coeficiente de correlação
R ²	Coeficiente de determinação
SNC	Sistema nervoso central
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
TEA	Trietilamina
TF	Fator de assimetria
TM	Tempo morto
TPM	Topiramato
TR	Tempo de retenção
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i> (Farmacopeia Norte-Americana)
UV/vis	Ultravioleta/ visível
v/v	Volume / Volume
W	Largura do pico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 A VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO BRASIL	18
1.1.1 Constituição da vigilância sanitária no Brasil: aspectos legais	18
1.1.2 A Farmacopeia Brasileira	22
1.2 TOPIRAMATO.....	25
1.2.1 Breve histórico.....	25
1.2.2 Propriedades físicas e químicas.....	27
1.2.3 Aspectos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos	28
1.2.4 Outros usos terapêuticos.....	29
1.2.5 Produtos registrados no Brasil	31
1.2.6 Monografias oficiais.....	32
1.2.7 Estabilidade.....	35
1.2.8 Métodos analíticos não normalizados	38
2 OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	44
3.1 EQUIPAMENTOS	44
3.2 REAGENTES E MATERIAIS.....	44
3.3 PADRÕES	45
3.4 PRODUTOS	45
4 METODOLOGIA	46
4.1 SOLUÇÕES PADRÕES	46
4.2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TPM POR CLAE/UV, EM FASE REVERSA, USANDO O FDNB COMO AGENTE DERIVATIZANTE	46
4.2.1 Estudo da reação de derivatização do TPM.....	46
4.2.2 Ajuste das condições cromatográficas	48
4.2.3 Cálculo dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico	49
4.2.4 Estudo da estabilidade do derivado	49
4.2.5 Identificação positiva do derivado por espectrometria de massas	49

4.3 ANÁLISE PRELIMINAR DE ALGUNS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	
INTRALABORATORIAL.....	50
4.3.1 Determinação da seletividade do método analítico	50
4.3.2 Estudo da linearidade e determinação da faixa linear de trabalho	50
4.3.4 Estimativa do limite de detecção e limite inferior de quantificação	51
4.3.5 Estudo da recuperação do analito	52
4.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA NA DETERMINAÇÃO	
ANALÍTICA DO TPM EM COMPRIMIDOS	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 ESTUDO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO TPM.....	54
5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E CÁLCULO DE	
PARÂMETROS DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	63
5.3 ANÁLISE PRELIMINAR DE ALGUNS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	
INTRALABORATORIAL.....	67
6 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 A VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO BRASIL

No Brasil, denominou-se Vigilância Sanitária a maneira de avaliar e abordar os efeitos sobre a saúde humana e ambiental, relacionados a produtos, serviços, tecnologias e intervenções de diversas naturezas no meio ambiente (DALLARI, 2008). No entanto, as ações de interesse para a saúde não são de competência exclusiva da área de vigilância sanitária, estando também vinculadas às políticas sociais e econômicas implementadas pelo governo.

As ações de vigilância sanitária têm caráter essencialmente preventivo e incluem todas as práticas médico-sanitárias, atuando sobre a promoção, proteção, recuperação e reabilitação da saúde, agindo sobre fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, o meio ambiente e o ambiente de trabalho, e com a circulação internacional de transportes, cargas e pessoas.

1.1.1 Constituição da vigilância sanitária no Brasil: aspectos legais

A Lei nº. 6360, de 23 de setembro de 1976, também conhecida como Lei de Vigilância Sanitária, surgiu em meio a denúncias sobre práticas comerciais questionáveis, adotadas pela indústria farmacêutica (COSTA; ROZENFELD, 2000). Esta lei normatiza as operações industriais a que se sujeitam os medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos e correlatos, bem como aos produtos de higiene, cosméticos, perfumes, saneantes domissanitários e produtos dietéticos. Ela aborda questões como: rotulagem, embalagem, responsabilidade técnica, requisitos para a concessão de registro, critérios para propaganda e transporte, entre outras. A Lei nº. 6360/76 estabelece também algumas práticas que configuram infrações sanitárias, sujeitas assim às penalidades previstas na legislação, e determina as competências da ação fiscalizadora, afirmando a necessidade da utilização do controle de qualidade como forma de garantir os aspectos qualitativos e quantitativos das operações de fabricação de medicamentos (BRASIL, 1976).

A Lei nº. 6437, de 20 de agosto de 1977, complementa a Lei nº 6360/76, determinando as sanções administrativas às quais estão sujeitas as infrações sanitárias definidas na primeira norma, e inclui todos os produtos, inclusive os alimentos, sob o mesmo ordenamento jurídico. Determina também a necessidade de avaliação laboratorial para a verificação da conformidade do produto com as especificações contidas no registro (análise de controle), e com as normas de qualidade mínima (análise fiscal), publicadas no Diário Oficial da União (DOU) (DA SILVA, 2000).

Até o ano de 1988, o Ministério da Saúde definia a vigilância sanitária da seguinte forma:

Vigilância sanitária é um conjunto de medidas que visam elaborar, controlar a aplicação e fiscalizar o cumprimento de normas e padrões de interesse sanitário relativo a portos, aeroportos e fronteiras, medicamentos, cosméticos, alimentos, saneantes e bens, respeitada a legislação pertinente, bem como o exercício profissional relacionado com a saúde. (COSTA; ROZENFELD, 2000, p. 15)

A Constituição Federal, elaborada em 1988, tinha como objetivo afirmar o Estado democrático de direito, resgatando o compromisso do Estado de promover o bem-estar e a justiça social. Em seu capítulo II, artigo 6º, a Carta Magna de 1988 definia a saúde como um direito social. Neste contexto, o Sistema Único de Saúde (SUS), com atividade predominantemente preventiva, foi instituído como um meio de concretizar esse direito, o que representou um grande salto qualitativo e quantitativo na concepção sanitária nacional. O artigo 200 da Constituição Federal estabeleceu as atribuições legais do SUS, entre elas o controle e a fiscalização de procedimentos, produtos e substâncias de interesse para a saúde, a execução das ações de vigilância sanitária e epidemiológica, bem como as de saúde do trabalhador, além da fiscalização e inspeção de alimentos, bebidas e água para consumo humano (DE LIMA; BAPTISTA, 2006).

Mas foi somente em 19 de setembro de 1990, com a Lei nº 8.080, também conhecida como Lei Orgânica da Saúde, que a estrutura e o funcionamento do SUS foram regulamentados. Em seu artigo 6º, parágrafo 1º, esta Lei caracteriza a vigilância sanitária como “um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio

ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”. Segundo a Lei nº 8080/90, não apenas os produtos historicamente alvos da ação da vigilância sanitária, mas quaisquer bens de consumo passaram a ser objeto de fiscalização, desde que, direta ou indiretamente, se relacionassem aos fatores condicionantes ou determinantes da saúde (BRASIL, 1990b).

Segundo Lucchese (2006), a Vigilância Sanitária caracteriza-se como um dos braços executivos que estruturam e operacionalizam o SUS na busca da concretização do direito social à saúde, em especial devido ao seu poder normativo e fiscalizador sobre os serviços prestados, produtos e insumos terapêuticos de interesse para a saúde, tendo como principal objetivo a eliminação ou minimização do risco sanitário envolvido na produção, circulação e consumo.

Outro fato que merece destaque é a evolução da legislação sanitária da época que, de estatuto criminal contra a fraude e a propaganda enganosa, passou a uma estrutura legislativa cujo principal objetivo era a prevenção de riscos à saúde dos usuários (DA SILVA, 2000).

Paralelamente, foi publicada a Lei nº. 8078/90, também conhecida como Código de Defesa do Consumidor que, reconhecendo a vulnerabilidade do consumidor dentro do mercado de consumo, busca resguardar a sua dignidade, saúde, segurança e os seus interesses econômicos, por meio da regulação das relações produção-consumo (BRASIL, 1990a).

Em sua Seção I, a Lei nº 8078/90 aborda exclusivamente aspectos relativos à proteção da saúde e segurança dos consumidores, reiterando a responsabilidade do fornecedor ou fabricante sobre potenciais riscos à saúde ou segurança, mesmo aqueles anteriormente desconhecidos, exercidos pelos produtos ou serviços colocados no mercado de consumo. Segundo essa norma, os fornecedores têm a obrigação de informar aos consumidores, ostensiva e adequadamente, acerca da potencial nocividade ou periculosidade à saúde dos produtos ou serviços por eles prestados (BRASIL, 1990a).

Somente em 26 de janeiro de 1999, foi publicada a Lei nº 9.782 – alterada pela Medida Provisória (MP) nº 2.190-34, de 23 de agosto de 2001 – que define o

Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências na sua área de atuação.

Legalmente, a ANVISA foi definida como uma autarquia vinculada ao Ministério da Saúde, que tem autonomia administrativa e financeira e confere estabilidade aos seus dirigentes. Em seu Artigo 6º, esta Lei define:

A Agência terá por finalidade institucional promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e fronteiras.(BRASIL, 1999)

Entre as principais competências da ANVISA estão: coordenar o SNVS; fomentar e realizar estudos e pesquisas na sua área de atuação; estabelecer normas que norteiem as ações de vigilância sanitária; estabelecer limites para contaminantes e resíduos tóxicos; autorizar o funcionamento de empresas de fabricação, distribuição, importação e comercialização de produtos de interesse da Saúde Pública, bem como interditá-las em caso de violação da legislação pertinente; conceder registros de produtos; coordenar as ações de vigilância sanitária realizadas por todos os laboratórios que compõem a rede oficial de laboratórios de controle de qualidade em saúde; promover a revisão e atualização periódica da farmacopeia; fiscalizar a propaganda e publicidade de produtos submetidos ao regime de vigilância sanitária; e executar atividades de vigilância epidemiológica e controle de vetores relativas a portos, aeroportos e fronteiras (BRASIL, 1999).

Nessa norma, foram definidas ainda novas atribuições da vigilância sanitária, como o monitoramento da qualidade de bens e serviços por meio de programas especiais, a implementação dos sistemas de vigilância farmacológica e toxicológica, bem como a manutenção de um sistema de informação, e o controle dos produtos fumígenos, e de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (COSTA; ROZENFELD, 2000).

As principais unidades que compõem o SNVS são: no âmbito federal, a ANVISA e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), subordinado administrativamente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e

tecnicamente à ANVISA; no âmbito estadual, os 27 órgãos de vigilância sanitária das Secretarias Estaduais de Saúde, além de um Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) em cada unidade da federação; e no âmbito municipal, os serviços de vigilância sanitária dos 5.543 municípios brasileiros (LUCCHESI, 2006).

O INCQS oferece suporte laboratorial às ações de vigilância sanitária em todo o território nacional, realizando as análises laboratoriais previstas na legislação sanitária ou por demanda de órgãos oficiais, seja em caso de denúncia ou como parte de programas especiais de monitoramento da qualidade em saúde. Assessora, também, outros laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária e, por ser uma instituição pública de referência na sua área de atuação, emite pareceres técnico-científicos sobre questões relacionadas à vigilância sanitária e participa de comissões, comitês e grupos técnicos vinculados ao setor de saúde. Consonante com a sua função estratégica dentro do SNVS, o INCQS ainda desenvolve, adapta, aprimora e/ ou implementa metodologias analíticas aplicadas à verificação da qualidade de produtos de saúde.

1.1.2 A Farmacopeia Brasileira

A Farmacopeia é o código oficial farmacêutico de um determinado país, que contém os requisitos mínimos de qualidade, compilados sob a forma de monografias, específicas para matérias-primas e produtos de interesse da saúde.

A primeira Farmacopeia Brasileira (FB) foi aprovada pelo Decreto nº 17.509, de 04 de novembro de 1926, porém somente a partir de 15 de agosto de 1929 teve o seu uso obrigatório. Ela nasceu do trabalho de Rodolpho Albino Dias da Silva, que compilou em um livro a pesquisa realizada ao longo de toda a sua vida, envolvendo drogas de origem animal e vegetal, bem como a descrição de produtos químicos e de preparações oficinais (FARMACOPEIA..., 2010).

A partir da década de quarenta, a substituição gradativa das boticas pelas farmácias, que não mais realizavam a arte da manipulação magistral, associada ao crescimento da industrialização no setor farmacêutico e o surgimento dos

medicamentos modernos, determinaram a necessidade de revisão da FB, que ganhou uma segunda edição em 1959 (FARMACOPEIA..., 2010).

A partir daí, surgiram novas edições que, como a segunda, permaneceram voltadas para os insumos e especialidades farmacêuticas, buscando padrões nacionais de qualidade dos bens de interesse da saúde. No entanto, a cada nova edição da FB, as edições anteriores não eram revogadas, o que representava um entrave para as ações reguladoras da vigilância sanitária. Esta situação só foi modificada com a publicação da quinta edição, em 2010, para a qual foi realizado o levantamento de todos os textos publicados nas edições anteriores, com a substituição de procedimentos desatualizados e a exclusão de monografias obsoletas, possibilitando assim a revogação das demais edições (FARMACOPEIA..., 2010).

A seleção dos medicamentos a serem incluídos na FB não é aleatória. Estes são escolhidos entre os medicamentos que constam da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) ou da lista elaborada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). São, também, elaboradas em caráter de prioridade, as monografias dos medicamentos incluídos em programas especiais de saúde e dos novos produtos de maior interesse terapêutico (AGUIAR, 2006).

Desde a criação da ANVISA, em 1999, a revisão permanente da FB passou a ser de responsabilidade administrativa, técnica e científica da agência, mais especificamente da Comissão da Farmacopeia Brasileira (CFB), nomeada pelo Diretor-Presidente da ANVISA, e subdividida em vários Comitês Técnicos Temáticos (CTT), cada qual composto por profissionais com experiência em uma área específica do conhecimento.

Uma nova monografia de um fármaco ou de uma especialidade farmacêutica pode ser proposta pelo CTT pertinente, por um laboratório pertencente à rede oficial de laboratórios de controle de qualidade em saúde ou por uma indústria farmacêutica. Em seguida, a nova monografia deverá ser submetida a uma série de avaliações que comprovem tratar-se de um método analítico validado. Se a monografia for julgada adequada pela CFB, ela será remetida para outros colaboradores (INCQS e demais órgãos oficiais de controle de qualidade, indústria farmacêutica e universidades credenciadas) com o objetivo de certificação, ou seja,

verificar se a metodologia funciona e fornece os mesmos resultados em diferentes laboratórios. Com base nos resultados obtidos, a monografia é reavaliada pela CFB e, sendo aprovada, é colocada em Consulta Pública para apreciação da comunidade científica e, caso não ocorram manifestações contrárias, a monografia é enviada à análise e oficialização pela ANVISA (AGUIAR, 2006).

De uma maneira geral, os códigos farmacêuticos não são estáticos. Ao contrário, as Farmacopeias estão em constante evolução, passando por sucessivas revisões e atualizações, a fim de acompanhar o conhecimento científico do risco, a introdução de novos fármacos na terapêutica, o desenvolvimento tecnológico da produção e o surgimento de métodos analíticos mais modernos, precisos e/ou eficientes.

Todos os laboratórios oficiais são obrigados a aplicar as metodologias analíticas descritas nas monografias oficiais nas análises previstas na legislação sanitária, salvo nos casos de inexistência de monografia específica. A monografia oficial é considerada como o padrão mínimo de qualidade exigido para que o produto seja aceito no mercado, assegurando a sua eficácia e segurança. Em outras palavras, a monografia oficial representa o risco aceitável, no entender do Estado, num dado momento e face ao conhecimento já acumulado, e incorpora o reconhecimento social do risco e a necessidade de controle do mesmo (DA SILVA, 2000).

Por outro lado, as empresas fabricantes não são obrigadas a utilizar os métodos analíticos oficiais durante a etapa de controle de qualidade de seus produtos. Contudo, a indústria farmacêutica deverá utilizar necessariamente metodologias analíticas validadas e observar os limites de tolerância estabelecidos nos compêndios oficiais em vigor.

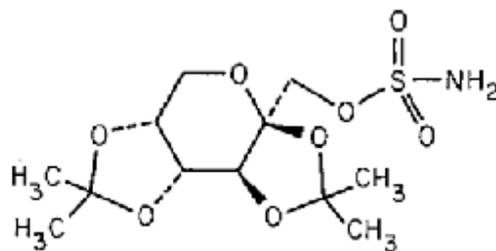
Segundo a Resolução nº 37, de 06 de julho de 2009, na ausência de monografias oficiais de matérias-primas, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais, inscritas na FB, poderão ser adotadas monografias oficiais extraídas de certos compêndios internacionais, em suas últimas edições. Entre estes, destacam-se a Farmacopeia Norte-Americana (USP), a Britânica, a Europeia e a Internacional, esta última elaborada pela OMS (BRASIL, 2009).

1.2 TOPIRAMATO

O topiramato [2,3:4,5-bis-O-(1-metiletilideno)- β -D-frutopiranosose sulfamato] (TPM) é um fármaco anticonvulsivante, usado no tratamento de convulsões epiléticas do tipo parciais (simples – com ou sem crise tônico-clônica secundariamente generalizada – ou complexas) e generalizadas (convulsões mioclônicas e tônico-clônicas), tanto em adultos como em crianças acima de dois anos (HARDMAN; LIMBIRD, 2005).

O TPM é um derivado sulfamato do monossacarídeo D-frutose (Figura 1), cujo uso é aprovado em vários países, na prevenção ou redução da frequência de ataques epiléticos (quando utilizado em monoterapia ou concomitantemente com outro fármaco) e, ainda, na profilaxia da enxaqueca (SHANK; MARYANOFF, 2008).

Figura 1 - Estrutura química do topiramato



Fonte: THE UNITED... (2011)

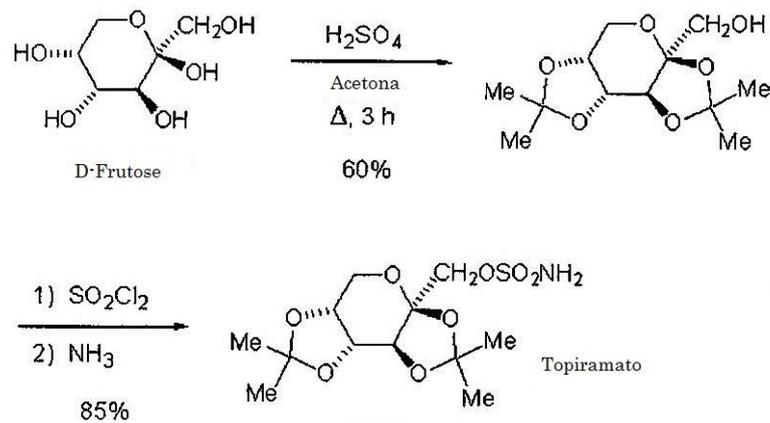
1.2.1 Breve histórico

O TPM foi descoberto casualmente em 1979 por pesquisadores da Johnson & Johnson, que buscavam análogos estruturais da frutose-1,6-difosfato capazes de inibir a frutose 1,6-bisfosfatase e, conseqüentemente, a gliconeogênese, sendo assim potenciais candidatos a agentes antidiabéticos. Posteriormente, um dos compostos intermediários foi selecionado para ensaios farmacológicos visando à verificação de uma possível atividade anticonvulsivante. Tais ensaios não somente

confirmaram esta hipótese, como também demonstraram que esta molécula apresentava alta potência, longa duração de ação e considerável efeito neuroprotetor (SHANK; MARYANOFF, 2008; MARYANOFF, 2009).

Na ocasião, o TPM foi sintetizado a partir da D-frutose, cujos grupamentos polares hidroxila foram mascarados por dois grupamentos acetonida (O-CMe₂-O) (Figura 2). Isto conferiu à subunidade monossacarídica do TPM a conformação tridimensional de bote torcido, a qual contribui para os efeitos farmacológicos observados (Figura 3). Não obstante, sabe-se que o grupamento sulfamato é essencial para a atividade anticonvulsivante (SHANK; MARYANOFF, 2008).

Figura 2 - Síntese do topiramato



Fonte: SHANK; MARYANOFF (2008)

enquanto que o grupo amida desempenha um papel importante como doador na formação de ligações dessa natureza. O referido fármaco possui o pKa de 8,7, graças à presença do grupamento sulfamato fracamente ácido. Paralelamente, possui valor de log P relativamente baixo (aproximadamente 0,5), no entanto, o TPM parece atravessar as membranas celulares prontamente (SHANK et al., 2000; MATERIAL..., 2006).

1.2.3 Aspectos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos

A epilepsia é um distúrbio multifatorial do sistema nervoso central (SNC), caracterizada por convulsões recorrentes, que normalmente resultam de uma explosão de descargas neuronais excessivas no cérebro, que perturba o comportamento preexistente. Sendo assim, é razoável que os efeitos neurológicos do TPM derivem de mecanismos de ação múltiplos, que acarretam na atenuação da excitabilidade das vias neuronais cerebrais, razão pela qual este fármaco é comumente chamado de “neuroestabilizador” (MARYANOFF, 2009).

Existem pelo menos três propriedades farmacodinâmicas bem estabelecidas do TPM, que contribuem para a sua atividade anticonvulsivante. São elas: (i) efeitos inibitórios sobre vários tipos de canais de Na^+ e Ca^{2+} ativados por voltagem; (ii) inibição dos canais iônicos ativados por glutamato, mais precisamente os subtipos ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato; e (iii) aumento da atividade do gama-aminobutirato (GABA) em alguns subtipos de receptores de GABA. Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem outros mecanismos de ação, que podem estar envolvidos com a atividade anticonvulsivante do TPM: (iv) modulação positiva de alguns tipos de canais de K^+ ativados por voltagem; (v) discreta inibição de algumas isozimas da anidrase carbônica; (vi) modulação do processo de liberação de neurotransmissores pelos neurônios pré-sinápticos; e (vii) efeitos sobre a concentração intracelular de GABA em terminais sinápticos GABA-érgicos (SHANK; MARYANOFF, 2008).

Paralelamente, as principais propriedades farmacológicas do TPM que contribuem para a sua eficácia no tratamento da enxaqueca são os seus efeitos inibitórios sobre os subtipos AMPA e cainato dos receptores para glutamato e, em

menor proporção, sobre os canais de Ca^{2+} ativados por voltagem (SHANK; MARYANOFF, 2008).

O TPM é rapidamente e completamente absorvido após administração oral, sendo que o pico de concentração plasmática é atingido aproximadamente 2 h após a ingestão de uma dose de 400 mg. As concentrações plasmáticas máximas estão entre 1,7 e 29 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e são proporcionais à dose, sendo atingidas entre 2 e 4 h (MARYANOFF, 2009).

As propriedades toxicológicas do TPM administrado por via oral são as seguintes: (i) dose letal 50% (DL_{50}) em ratos: 3745 mg.Kg^{-1} (macho) e 2436 mg.kg^{-1} (fêmea); e (ii) DL_{50} em camundongos: 2338 mg.Kg^{-1} (macho) e 2915 mg.Kg^{-1} (fêmea). Não existem evidências de carcinogenicidade e de mutagenicidade, no entanto, estudos com algumas espécies de animais demonstraram que o fármaco em questão está diretamente relacionado com o aumento da frequência de malformações fetais (MATERIAL..., 2006).

1.2.4 Outros usos terapêuticos

Estudos demonstraram que o TPM é eficaz contra ataques acinéticos e convulsões tônico-clônicas em pacientes com síndrome de Lennox-Gastaut (HARDMAN; LIMBIRD, 2005). Estudos sugerem ainda que o TPM é eficaz no tratamento em longo prazo de espasmos infantis associados à síndrome de West (GLAUSER; CLARK; McGEE, 2000). Outros pesquisadores demonstraram a eficácia deste fármaco na terapia adjuvante da epilepsia mioclônica severa na infância (NIETO-BARRERA; CANDAU; NIETO-JIMENEZ, 2000). Estudos indicaram ainda que o TPM é um fármaco eficaz e bem tolerado contra um grande espectro de epilepsias infantis resistentes a outras drogas (YEUNG et al., 2000).

Pacientes com neuralgia trigeminal essencial ou secundária, resistentes ou intolerantes a outros fármacos anticonvulsivantes, foram tratados com TPM, com resultados positivos. Os vários mecanismos de ação do TPM, que age em diferentes níveis da transmissão neural, podem explicar a sua ação antinociceptiva (SOLARO et al., 2001).

Os resultados de um ensaio clínico sugeriram que o TPM é um fármaco seguro e eficaz no tratamento do alcoolismo. A este respeito, postulou-se que o seu mecanismo de ação envolveria a inibição da liberação de dopamina no mesencéfalo, induzida pela ingestão de álcool (JOHNSON et al., 2003). O TPM também apresentou resultados positivos no tratamento de indivíduos viciados em cocaína (SOFUOGLU; KOSTEN, 2005). Os efeitos inibitórios do TPM sobre os subtipos AMPA e cainato dos receptores para glutamato e os efeitos modulatórios deste fármaco sobre os receptores GABA_A são considerados fatores relevantes na redução do vício em álcool ou drogas em geral (SHANK; MARYANOFF, 2008).

Pesquisadores investigaram a eficácia em longo prazo e a tolerabilidade do TPM no tratamento do transtorno de compulsão alimentar periódica associado à obesidade, com resultados satisfatórios (McELROY et al., 2005). Outro pesquisador investigou o uso do TPM no tratamento da bulimia nervosa severa em pacientes com transtornos de humor e/ou ansiedade, tendo obtido resultados animadores (BARBEE, 2003). A base para o decréscimo na frequência dos episódios de compulsão alimentar pode estar relacionada, pelo menos em parte, com os efeitos inibitórios sobre os receptores AMPA e cainato, pois as vias neurais glutamatérgicas são importantes na promoção da ingesta calórica. Além disso, os efeitos modulatórios complexos do TPM sobre os receptores GABA_A podem contribuir para os efeitos deste fármaco sobre o comportamento alimentar (SHANK; MARYANOFF, 2008).

Cientistas norte-americanos estudaram o uso do TPM no tratamento do tremor essencial moderado a severo, em monoterapia ou como adjuvante de um medicamento antitremor convencional, tendo obtido excelentes resultados (ONDO et al., 2006).

Por ter propriedades de estabilização do humor, o TPM foi objeto de estudo clínico para avaliar a sua eficácia e tolerabilidade na terapia adjuvante do transtorno bipolar. Os resultados sugeriram que o TPM poderia ter efeitos antimaníacos ou anticíclicos em alguns pacientes (McELROY et al., 2000). Por outro lado, um estudo mais recente (KUSHNER et al., 2006), com pacientes adultos portadores de transtorno bipolar do tipo I, em episódios agudos de mania ou mistos, não apresentou resultados animadores.

Ensaios clínicos sugeriram que o TPM pode ser eficaz no tratamento de pacientes portadores de transtorno de estresse pós-traumático e de fobia social. Além disso, resultados positivos foram observados em pacientes portadores de transtorno obsessivo-compulsivo, após terapia que incluía agentes serotoninérgicos e TPM, como fármaco adjuvante. Os efeitos inibitórios sobre os receptores AMPA e cainato na amígdala e nas estruturas límbicas relacionadas podem estar ligados à suposta eficácia do TPM sobre transtornos relacionados à ansiedade (SHANK; MARYANOFF, 2008).

Em indivíduos obesos com *diabetes mellitus* tipo 2, o TPM atenuou vários sinais característicos da doença, em parte em função do seu efeito de perda de peso. Estudos com animais forneceram forte evidência de que o TPM inibe a deposição de lipídios nos tecidos adiposos e reverte a dessensibilização à insulina no tecido adiposo, músculo esquelético e células beta pancreáticas, o que contribuiria também para o efeito antidiabético deste fármaco. Além disso, o TPM pode reverter os efeitos nocivos do ácido oleico sobre a liberação de insulina pelas células beta *in vitro* e melhora ainda a função mitocondrial nestas células (SHANK; MARYANOFF, 2008).

Os diversos estudos científicos acima relatados, que culminaram com a descoberta de novas propriedades clínicas do TPM e, conseqüentemente, incentivaram o seu uso *off label*, demonstram de forma inequívoca a potencialidade deste fármaco no campo da medicina e a sua relevância no que diz respeito a aspectos sanitários.

1.2.5 Produtos registrados no Brasil

Segundo dados da ANVISA, existem atualmente oito produtos de marca registrados, contendo o TPM como princípio ativo, além de doze medicamentos genéricos, totalizando 368 apresentações, entre ativas e inativas (CONSULTA..., 2011). Estes dados encontram-se dispostos de maneira sucinta no Quadro 1.

Quadro 1 - Relação atualizada de produtos registrados no Brasil, contendo o TPM como princípio ativo

PRODUTOS	EMPRESAS FABRICANTES	NÚMERO DE APRESENTAÇÕES
Amato	Eurofarma Laboratórios Ltda.	09
Arasid	Accord Farmacêutica Ltda.	12
Égide	Libbs Farmacêutica Ltda.	06
Sigmax	EMS Sigma Pharma Ltda.	45
Temax	Laboratório Teuto Brasileiro S/A	18
Topamax	Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.	25
Topiramato (Genérico)	Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A	21
Topiramato (Genérico)	EMS S/A	45
Topiramato (Genérico)	Laboratório Teuto Brasileiro S/A	18
Topiramato (Genérico)	Medley Indústria Farmacêutica Ltda.	09
Topiramato (Genérico)	Zydus Healthcare Brasil Ltda.	01
Topiramato (Genérico)	Biosintética Farmacêutica Ltda.	21
Topiramato (Genérico)	EMS Sigma Pharma Ltda.	36
Topiramato (Genérico)	Legrand Pharma Indústria Farmacêutica Ltda.	12
Topiramato (Genérico)	Accord Farmacêutica Ltda.	12
Topiramato (Genérico)	Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica Ltda.	12
Topiramato (Genérico)	Eurofarma Laboratórios Ltda.	09
Topiramato (Genérico)	Germed Farmacêutica Ltda.	36
Topit	Medley Indústria Farmacêutica Ltda.	09
Toptil	Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica Ltda.	12

Fonte: CONSULTA... (2011)

O TPM é comercializado sob as formas farmacêuticas de comprimidos revestidos, nas dosagens de 25, 50 e 100 mg, além de cápsulas gelatinosas duras com microgrânulos, contendo 15 ou 25 mg de princípio ativo. O medicamento referência é o Topamax[®], fabricado pela Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.

1.2.6 Monografias oficiais

A Farmacopeia Brasileira 5^a edição não contém qualquer monografia relacionada ao fármaco TPM, seja sob a forma de insumo ou de produto acabado. O mesmo ocorre com a Farmacopeia Europeia 7^a edição, a Farmacopeia Britânica 2011 e com a Farmacopeia Internacional 4^a edição. Em contrapartida, a USP 34 apresenta duas monografias específicas para o TPM, uma relativa à matéria-prima e

a outra, referente ao medicamento contendo o fármaco, sob a forma de comprimido. Os ensaios e seus respectivos limites, estabelecidos em cada uma das referidas monografias, encontram-se descritos nos Quadros 2 e 3.

Quadro 2 - Ensaios físicos e químicos envolvidos na análise da matéria-prima TPM, segundo a USP 34

ENSAIOS	ESPECIFICAÇÕES E LIMITES
Identificação	A: <i>Absorção no infravermelho <197K></i> : Passa teste. B: O tempo de retenção do maior pico no cromatograma da amostra corresponde àquele no cromatograma do padrão, obtido no doseamento.
Rotação Específica <781S>	Entre -28,6° e -35,0°, medida a 20°.
Teor de Água, <i>Método I</i> <921>	Não mais que 0,5%.
Resíduo de Ignição <281>	Não mais que 0,2%.
Metais Pesados, <i>Método II</i> <231>	Limite: 0,001%.
Compostos Relacionados por CCF (caso o N-metiltopiramato seja um potencial composto relacionado)	Nenhuma mancha é maior em tamanho e intensidade que a do padrão; não mais que 0,1% de qualquer impureza individual; e não mais que 0,5% de impurezas totais.
Compostos Relacionados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	Teste 1: Não mais que 0,3% de frutose; não mais que 0,3% de composto relacionado A de TPM; não mais que 0,1% de qualquer outra impureza individual; e não mais que 0,5% de impurezas totais. Teste 2 (caso o N-metiltopiramato seja um potencial composto relacionado): Não mais que 0,3% do composto relacionado A de TPM; não mais que 0,10% de qualquer outra impureza individual; e não mais que 0,5% de impurezas totais.
Limite de Sulfamato e Sulfato	Não mais que 0,10% de íon sulfato; e não mais que 0,10% de íon sulfamato.
Doseamento	Técnica: CLAE <621>; Fase móvel: acetonitrila: água (1:1); Concentração da solução padrão: 2,0 mg.mL ⁻¹ ; Características da fase estacionária: coluna com dimensões de 4,6 mm x 25 cm, empacotamento L ₁ e tamanho de partícula de 5 µm; Fluxo da fase móvel: 0,6 mL.min ⁻¹ ; Temperatura da coluna e do detector: 50°C; Volume de injeção: 20 µL; Detector: refratométrico; Eficiência da coluna: não menos que 1.500 pratos teóricos; Fator de cauda: não mais que 2,0; e Desvio padrão relativo: não mais que 2,0%. Não menos que 98,0% e não mais que 102,0% de TPM, calculado em base anidra.

Fonte: THE UNITED... (2011)

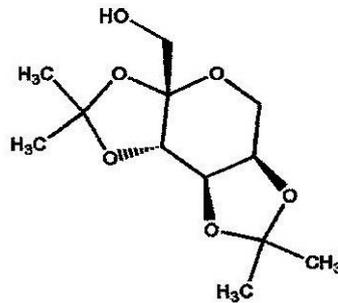
Quadro 3 - Ensaio físicos e químicos envolvidos na análise de comprimidos de TPM, segundo a USP 34

ENSAIOS	ESPECIFICAÇÕES E LIMITES
Identificação	<p>A: <i>Absorção no infravermelho <197F></i>: Passa teste (faixa de comprimento de onda: 4000 - 650 cm^{-1} e concentração da solução padrão: 20 mg.mL^{-1} em acetona).</p> <p>B: O tempo de retenção do maior pico no cromatograma da amostra corresponde àquele no cromatograma do padrão, obtido no doseamento.</p>
Doseamento	<p>Técnica: CLAE <621>; Fase móvel: metanol: solução tampão de acetato de amônio em água a 1,54 g.L^{-1} e pH= 4,0 (1:4); Concentração da solução padrão: 6,0 mg.mL^{-1}, em metanol: água (1:4); Características da fase estacionária: coluna com dimensões de 4,6 mm x 25 cm, empacotamento L_1 e tamanho de partícula de 5 μm; Fluxo da fase móvel: 1,5 mL.min^{-1}; Temperatura da coluna e do detector: 35°C; Volume de injeção: 100 μL; Detector: refratométrico; e Desvio padrão relativo: não mais que 2,0%. Não menos que 90,0% e não mais que 110,0% da quantidade rotulada de TPM.</p>
Dissolução <711>	<p>Meio: água; Volume: 900 mL Tipo de aparato: 2; Tempo: 20 min; e Método de quantificação: CLAE com detecção refratométrica. Não menos que 80% (Q) da quantidade rotulada de TPM é dissolvida.</p>
Uniformidade de Doses Unitárias <905>	Atende aos requisitos.
Impurezas Orgânicas	Não mais que 0,5% de composto relacionado A de TPM; não mais que 0,2% de produto de degradação individual não especificado; e não mais que 0,7% de impurezas totais.
Limite de Sulfamato e Sulfato	Não mais que 0,25% de íon sulfato; e não mais que 0,25% de íon sulfamato.

Fonte: THE UNITED... (2011)

Uma das impurezas orgânicas pesquisadas no TPM é o composto relacionado A, cuja denominação química é 2,3:4,5-bis-O-(1-metiletilideno)- β -D-frutopiranosose e para o qual a USP disponibiliza um padrão de referência. A sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 4.

Figura 4 - Composto relacionado A do topiramato



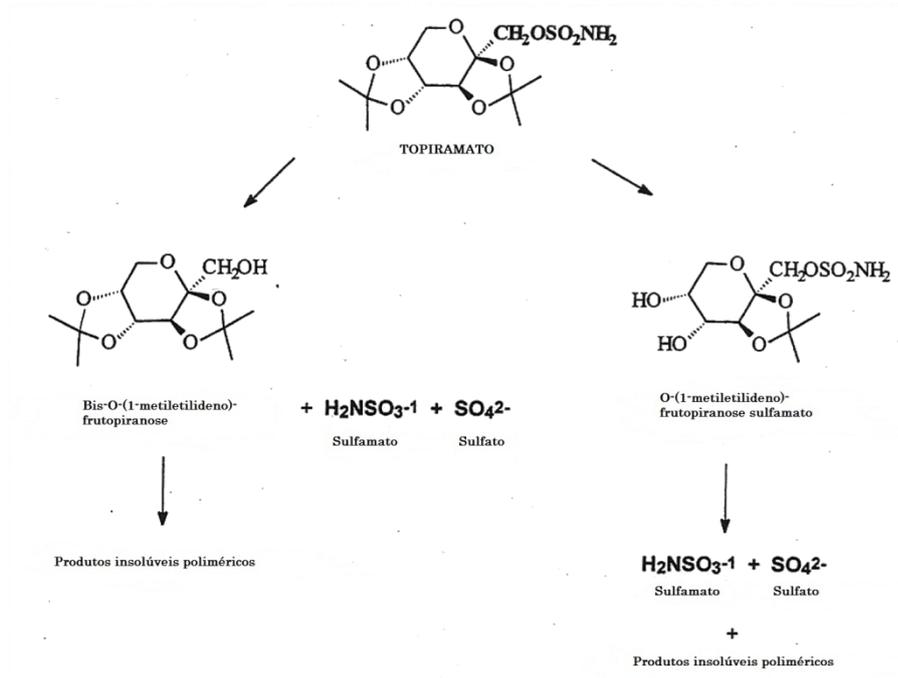
Fonte: CERTIFICADO... (2011)

A única metodologia de análise de TPM preconizada por um compêndio oficial baseia-se na técnica de CLAE associada à detecção refratométrica. O detector de índice de refração é um detector sensível à massa, cujo princípio de operação fundamenta-se na medição da diferença entre os índices de refração da amostra e da célula de referência. É um detector não específico, por isso bastante versátil. No entanto, devido às diferenças relativamente pequenas entre os índices de refração absolutos de várias substâncias comumente analisadas por CLAE, a sensibilidade deste tipo de equipamento é geralmente menor que a obtida com detectores espectrofotométricos e fluorimétricos. Além disso, a grande dependência do índice de refração em relação à temperatura torna necessário o controle rigoroso desta propriedade durante as análises, a fim de eliminar qualquer diferença de temperatura entre as duas células de fluxo. Por fim, este tipo de detector também é sensível a variações de pressão, e sua resposta é afetada por mudanças na composição da fase móvel, dificultando a realização de análises que empregam a técnica de eluição por gradiente (KRSTULOVIC; BROWN, 1982).

1.2.7 Estabilidade

No estado sólido e sob condições normais de estocagem, o TPM é muito estável, mas sofre degradação a alta temperatura e umidade (KLOCKOW-BECK et al., 1998), originando produtos de degradação orgânicos, produtos poliméricos insolúveis e os ânions inorgânicos sulfato e sulfamato, como mostra a Figura 5.

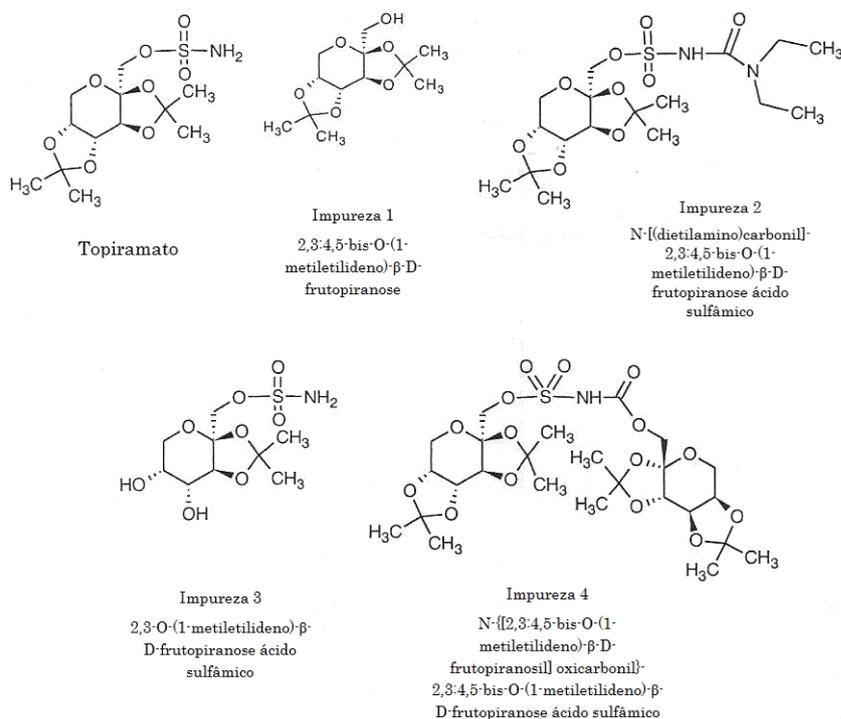
Figura 5 - Vias de degradação do topiramato



Fonte: KLOCKOW-BECK et al. (1998)

Através da realização de testes de estresse em condições extremas, Biró e colaboradores (2006) determinaram as possíveis formas de decomposição e os produtos de degradação do TPM. A Figura 6 mostra as estruturas do TPM e de suas impurezas. As impurezas 1 e 3 são muito polares, enquanto que as impurezas 2 e 4 têm um caráter menos polar. Os íons sulfamato e sulfato foram denominados impurezas 5 e 6, respectivamente.

Figura 6 - Estruturas do topiramato e suas impurezas



Fonte: BIRÓ et al. (2006)

Estes pesquisadores verificaram que a principal rota de decomposição do TPM era a hidrólise. No meio alcalino, observou-se que o principal produto de decomposição do TPM era a impureza 1, enquanto que no meio ácido ou neutro, a impureza 3 era predominante. Os mesmos produtos de degradação foram encontrados na solução de peróxido de hidrogênio, indicando que é provável que a reação de hidrólise também tenha ocorrido nesta condição. Já o TPM no estado sólido foi menos sensível ao tratamento com calor, após o qual foram detectados principalmente os íons sulfato e sulfamato. Durante o ensaio de fotoestabilidade, verificou-se somente um discreto aumento na quantidade destes dois últimos produtos de degradação. Os dados obtidos no teste de desafio indicaram que: (i) em solução, os principais produtos de degradação do TPM são as impurezas 1 e 3, enquanto que, no estado sólido, são os íons sulfato e sulfamato; e (ii) o TPM não é sensível à luz. A Tabela 1 contém os resultados do referido estudo.

Tabela 1 - Resumo dos dados obtidos nos testes de estresse do TPM

Compostos formados	Condições de tratamento						
	HCl 0,1 mol.L ⁻¹ 40°C 3h	NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ 40°C 3h	H ₂ O ₂ 3% 25°C 15h	H ₂ O 60°C 3h	Forno 80°C 70h	Forno 80°C 4 semanas	Fotoesta- bilidade (ICH Q1B)
Impureza 1		+++++					
Impureza 2	+	++		+			
Impureza 3	+++++		++++	++			
Impureza 4							
Desconhecido	+++			+	++	++	
Íons sulfamato	-	-	-	-	-	+++++	+
Íons sulfato	-	-	-	-	-	+++++	+

*Quantidade de impureza na amostra em % de TPM: +: < 0,1%; ++: 0,1-0,5%; +++: 0,5-1,0%; ++++: 1,0-5,0%; e +++++: > 5,0%

Fonte: BIRÓ et al. (2006)

Mais recentemente, pesquisadores sul-africanos (MOHAMMADI et al., 2010) também investigaram a estabilidade do TPM mediante testes de estresse, nos quais avaliaram a suscetibilidade deste fármaco, separadamente, à hidrólise em condições neutras, ácidas e alcalinas, oxidação e degradação na presença de alta temperatura e luz, empregando, para isso, amostras de insumo, comprimidos e soluções contendo o ativo. Tais estudos concluíram que este fármaco é instável sob alta temperatura, e que mais de 95% do TPM sofreu decomposição após três dias de exposição ao calor seco (90°C). Além disso, este fármaco mostrou-se mais estável em condições ácidas e neutras, sob estresse oxidativo e na presença de luz, do que em presença de pH básico.

1.2.8 Métodos analíticos não normalizados

Pesquisadores utilizaram a técnica de cromatografia de troca iônica associada à espectrometria de massas por ionização via nebulização com elétrons (EM/ESI) para identificar espécies orgânicas e inorgânicas presentes em comprimidos de TPM (XIANG; KO; GUH, 1996). Alguns analitos aniônicos, incluindo lactato, glicolato, cloreto, formato, sulfato e oxalato, foram identificados por meio da comparação entre os espectros de massas e tempos de retenção exibidos pelos componentes da amostra, e aqueles característicos dos compostos originais. Este método permitiu a

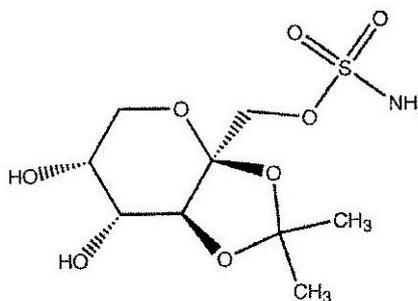
identificação das respostas cromatográficas geradas pelos excipientes contidos em amostras de formulações farmacêuticas contendo TPM.

Alguns cientistas têm se dedicado a desenvolver e validar métodos analíticos alternativos, capazes de quantificar o TPM e seus produtos de degradação, simultaneamente, para monitoramento da estabilidade de insumos e produtos acabados. Tal tarefa é especialmente desafiadora, uma vez que os compostos de interesse não possuem cromóforos ativos acima de 190 nm – inviabilizando o uso de detectores espectrofotométricos na faixa do UV/vis para a análise quantitativa direta – e em virtude da possível interferência de excipientes hidrossolúveis na análise com detecção refratométrica (STYSLO-ZALASIK; LI, 2004). Além disso, sabe-se que o TPM não pode ser quantificado diretamente por CLAE com detecção fluorimétrica (BAHRAMI; MIRZAEI; KIANI, 2004).

Estudiosos desenvolveram e validaram métodos analíticos para monitorar a degradação do TPM na matéria-prima e no produto acabado, mediante a quantificação dos íons sulfato e sulfamato presentes (KLOCKOW-BECK et al., 1998; MICHEEL; KO; GUH, 1998), já que estes são produzidos estequiometricamente durante a degradação do TPM, são estáveis e não voláteis e podem ser extraídos quantitativamente a partir da matéria-prima e do produto acabado parcialmente degradado. No método convencional, é utilizada a técnica de CLAE, na qual o sistema cromatográfico é composto por um gradiente de hidróxido de sódio como fase móvel, uma coluna de troca iônica e um ânion supressor (MICHEEL; KO; GUH, 1998). Uma proposta alternativa envolve a utilização da técnica de eletroforese capilar para a determinação dos produtos de degradação inorgânicos do TPM, tanto na matéria-prima como no produto acabado. Nela, os ânions de interesse são separados em um eletrólito contendo cromato de potássio e ácido bórico, sob a influência de um campo elétrico, e detectados, indiretamente, por UV a 272 nm. Estudos mostraram que este método é estatisticamente equivalente ao método convencional, com a vantagem de possuir uma maior faixa linear, permitindo a análise de produtos farmacêuticos contendo tanto o TPM não degradado quanto o ativo em estágio avançado de degradação, sem que haja a necessidade de etapas adicionais de diluição (KLOCKOW-BECK et al., 1998).

Posteriormente, foi proposto um método de CLAE em fase reversa, associado a um detector de nitrogênio quimioluminescente, para a análise quantitativa simultânea de TPM e de um dos seus produtos de degradação, o O-(1-metiletilideno)-frutopiranosose sulfamato (Figura 7), em estudos de estabilidade envolvendo formulações para soluções orais em fase de desenvolvimento. O método foi validado, exibindo linearidade na faixa de 32 a 4800 ng de TPM, e limite de quantificação de 0,1% p/p do produto de degradação, em relação ao ativo. Entretanto, dificuldades operacionais podem inviabilizar o uso desse tipo de detector na análise de rotina (STYSLO-ZALASIK; LI, 2004).

Figura 7 - Estrutura do O-(1-metiletilideno)-frutopiranosose sulfamato



Fonte: STYSLO-ZALASIK; LI (2004)

Biró e colaboradores (2006) desenvolveram e validaram três métodos de CLAE para a determinação de impurezas iônicas e não iônicas (subprodutos e/ou produtos de degradação) no insumo farmacêutico ativo (IFA) produzido por uma nova rota sintética: (i) um método com eluição isocrática e detecção refratométrica; (ii) um método com eluição por gradiente e detecção por arranjo de diodo; e (iii) um método por cromatografia de troca iônica e detecção refratométrica e espectrofotométrica inversa. Além disso, uma quarta metodologia foi desenvolvida e validada, empregando a técnica de EM/ESI, acoplada à cromatografia líquida, a única que se mostrou capaz de detectar todas as impurezas não iônicas do TPM em uma única análise.

Mais recentemente, cientistas desenvolveram e validaram um método indicativo de estabilidade para a determinação do TPM em matéria-prima, comprimidos e amostras coletadas durante o teste de dissolução (MOHAMMADI et

al., 2010). Para isso, utilizaram a técnica de CLAE com eluição isocrática e detecção espectrofotométrica a 264 nm. Em razão da sua baixa absorvidade no UV, o TPM foi submetido à prévia derivatização com 9-fluorenil-metil cloroformato (FMOC-Cl), composto que reage com aminas primárias e secundárias, formando produtos apolares que absorvem na região do UV. O método desenvolvido mostrou-se seletivo para a quantificação do TPM, uma vez que não sofreu interferência dos excipientes utilizados na fabricação dos comprimidos testados, constituindo uma alternativa mais simples e barata ao método analítico por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas.

A manipulação química (ou derivatização) pré-cromatográfica do TPM, utilizando um reagente adequado para a quantificação de aminas, é uma alternativa possível, capaz de aumentar a capacidade de detecção deste analito com precisão, viabilizando o uso de outros detectores, como o fluorimétrico ou o espectrofotométrico no UV/vis, no lugar do refratométrico.

O 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (FDNB) é um reagente empregado em derivatizações pré-cromatográficas, gerando derivados detectáveis no UV/vis. Ele reage com funções amino para formar aminas aromáticas substituídas. O FDNB é usado como marcador para aminoglicosídeos, tais como: neomicina, tobramicina, fortimicina A, amicacina, gentamicina e sisomicina (LINGEMAN; UNDERBERG, 1990).

Os únicos métodos oficiais atualmente aceitos no Brasil, para a quantificação do topiramato em matérias-primas e comprimidos, são oriundos da Farmacopeia Norte-Americana 34^a. edição. Ambos utilizam a técnica de cromatografia líquida, associada à detecção refratométrica. O alto custo e a dificuldade de operação de um cromatógrafo líquido equipado com detector refratométrico, em relação ao provido de detector espectrofotométrico no UV/vis, é a razão pela qual este último é muito mais comum que o primeiro, seja nos LACEN, ou mesmo nos laboratórios de controle de qualidade de empresas farmacêuticas. Sistemas cromatográficos com detecção espectrofotométrica no UV/vis têm maior sensibilidade, maior aplicabilidade e são operados mais facilmente.

Diante desse cenário, faz-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a detecção do TPM, utilizando a técnica de cromatografia

líquida com detecção no UV/vis, associada à derivatização com um reagente apropriado para a detecção de amins, a fim de que os órgãos oficiais de controle de qualidade brasileiros tenham acesso a uma metodologia analítica mais simples e compatível com os recursos materiais de suas unidades.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova metodologia analítica para a determinação de TPM em comprimidos, utilizando a técnica de CLAE com detecção espectrofotométrica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e aperfeiçoar uma técnica de derivatização pré-cromatográfica para o TPM, utilizando o composto FDNB como reagente derivatizante;
- Desenvolver e otimizar uma metodologia analítica para a quantificação do TPM, utilizando a técnica de CLAE em fase reversa e detecção espectrofotométrica na faixa do UV/vis;
- Estudar alguns parâmetros de validação intralaboratorial, relativos à metodologia analítica desenvolvida, estabelecidos pelos guias para validação de métodos analíticos da ANVISA (BRASIL, 2003) e do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2010); e
- Aplicar a metodologia desenvolvida na determinação analítica do TPM, utilizando amostras de comprimidos provenientes do mercado brasileiro.

3 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

3.1 EQUIPAMENTOS

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector espectrofotométrico na região do UV/vis, fabricante Shimadzu, série 10;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas, fabricante Shimadzu, modelo LCMS-2010;
- Aparelho de ultrassom, fabricante Branson, modelo 2510;
- Balança analítica com resolução de 0,1 mg, fabricante Mettler Toledo, modelo AG 204;
- Câmara para reação química, fabricante Shimadzu, modelo CRB-6A; e
- Sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Millipore, modelo Simplicity[®] UV.

3.2 REAGENTES E MATERIAIS

- Água deionizada, grau 1, filtrada com membrana de 0,22 µm;
- Acetonitrila (ACN), grau HPLC, fabricante Merck;
- Trietilamina (TEA) para síntese, fabricante Merck;
- 1-Flúor-2,4-dinitrobenzeno, teor ≥ 99 %, fabricante Sigma-Aldrich;
- Ácido fosfórico, grau PA, fabricante Proquímios;
- Coluna de fase reversa de sílica, com octilsilano quimicamente ligado (C8), com tamanho de partícula de 5 µm e dimensões de (250 x 4,6) mm, fabricante Ace, lote DV06-1119;
- Pipetas automáticas; e
- Vidrarias de uso comum no laboratório.

3.3 PADRÕES

- Topiramato, insumo farmacêutico ativo (IFA), fabricante Sun Pharmaceutical Industries Ltda., fornecedor EMS S/A, lote EL-02/L031/M/09002, teor 100,2%, validade agosto de 2014; e
- Composto Relacionado A do Topiramato (CRT), Padrão de Referência USP, lote F0F279, teor 100,0%, validade junho de 2013.

3.4 PRODUTOS

- Comprimidos revestidos de Topiramato 50 mg, nome comercial Topamax[®], fabricante Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda., lote ALS0700, validade novembro de 2012 (medicamento referência adquirido no comércio local); e
- Comprimidos revestidos de Topiramato 100 mg, fabricante EMS S/A, lote 315330, validade agosto de 2012 (medicamento genérico enviado ao INCQS para análise).

4 METODOLOGIA

4.1 SOLUÇÕES PADRÕES

Todas as soluções padrões utilizadas neste trabalho foram preparadas e estocadas a 4°C, ao abrigo da luz. O Quadro 4 resume as características destas soluções e a técnica de preparo de cada uma delas.

Quadro 4 - Soluções padrões (estoque) utilizadas no presente estudo

Soluções	Solvente	Concentração real	Método de homogeneização	Material constitutivo do recipiente de estocagem	Tempo máximo de estocagem nas condições descritas
Topiramato	Acetonitrila grau HPLC	$1,012 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Ultrassom por 10min	Vidro borossilicato	30 dias
Composto Relacionado 1 do Topiramato	Acetonitrila grau HPLC	$1,022 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Ultrassom por 10min	Vidro borossilicato	30 dias
1-Flúor-2,4-Dinitrobenzeno	Acetonitrila grau HPLC	$2,220 \times 10^4 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Agitação manual	Polipropileno	7 dias

Fonte: elaborado pela autora (2011)

4.2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TPM POR CLAE/UV, EM FASE REVERSA, USANDO O FDNB COMO AGENTE DERIVATIZANTE

4.2.1 Estudo da reação de derivatização do TPM

O procedimento de derivatização pré-cromatográfica do TPM foi estudado, mediante a realização de alguns experimentos, nos quais foi investigada a influência de certos parâmetros fundamentais, separadamente, sobre a velocidade e a extensão da reação do analito com o composto FDNB.

Conforme o parâmetro sob investigação, os reagentes necessários foram acrescentados a um tubo de ensaio de vidro, sempre na mesma ordem – padrão do analito (400µL) + TEA (10 µL) + solução de derivatizante (500 µL) –

homogeneizados e colocados na câmara para reação química. Paralelamente, foram realizados também ensaios em branco, utilizando apenas FDNB e TEA. O resíduo seco resultante da reação foi redissolvido em 10 mL de ACN e, então, submetido à separação por CLAE em fase reversa com detecção espectrofotométrica no UV/vis.

As variáveis estudadas, separadamente, foram as seguintes:

- *Temperatura da reação.* Foram realizados ensaios a fim de investigar a possível ocorrência de derivatização do TPM a 60°C e a 100°C, por 60 minutos. Mediante a separação por CLAE/UV em fase reversa, foram obtidos cromatogramas, que foram comparados com o do ensaio em branco, realizado em paralelo.
- *Tempo de reação.* O TPM foi submetido à reação de derivatização a 100°C, por 40 e 60 minutos, separadamente. Então, ambas as amostras foram submetidas à separação por CLAE/UV em fase reversa, e os cromatogramas gerados foram comparados com o do ensaio em branco.
- *Razão mínima entre a concentração molar do agente derivatizante e do TPM.* Em cinco tubos de ensaio, procedeu-se à reação de derivatização do TPM (400 µL) em meio básico, a 100°C, durante 60 minutos, variando apenas o volume de solução de FDNB adicionado: 100 µL (10:1); 200 µL (20:1); 300 µL (30:1); 400 µL (40:1); e 500 µL (50:1). A seguir, as cinco amostras foram submetidas à separação por CLAE/UV em fase reversa, e os cromatogramas obtidos foram comparados com o gerado pelo ensaio em branco, realizado em paralelo.
- *Influência da presença de TEA no meio reacional.* Investigou-se se a reação de derivatização ocorre mesmo na ausência de TEA. Com esse objetivo, realizou-se um experimento no qual o analito foi submetido à reação com o FDNB, a 100°C, durante 60 minutos, na presença e na ausência de TEA. Paralelamente, foi realizado um ensaio em branco. Em seguida, as três amostras foram separadas por CLAE/UV, e os cromatogramas assim obtidos foram comparados.

- *Comportamento da impureza CRT frente ao FDNB.* O propósito deste estudo foi investigar se ocorre reação entre o CRT e o FDNB ou se este reagente pode ser utilizado como marcador específico para o TPM. O procedimento adotado foi o seguinte: adicionou-se a um tubo de ensaio 200 µL de solução de CRT, 10 µL de TEA e 500 µL de FDNB e submeteu-se esse material ao procedimento de derivatização a 100°C por 60 minutos, em paralelo com um ensaio controle (contendo 200 µL de TPM e as mesmas quantidades de TEA e FDNB) e um branco (que incluía somente TEA e FDNB). A seguir, os produtos formados em cada um dos três ensaios foram separados por CLAE e detectados por espectrofotometria no UV/vis, gerando cromatogramas que foram posteriormente comparados.
- *Estudo da influência da presença de produtos de degradação do TPM sobre a reação de derivatização.* A degradação do TPM foi induzida, submetendo-se aproximadamente 10 mg do IFA a tratamento com calor úmido, a 80°C, por 3 horas. Então, o resíduo resultante foi acondicionado em dessecador durante 72 horas e, após este período, ressuspenso em 10 mL de ACN. Esta mistura foi homogeneizada em ultrassom por 10 minutos e, em seguida, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm. Utilizando uma alíquota de 1000 µL desta amostra, procedeu-se à reação com o derivatizante em meio básico, a 100°C, durante 60 minutos, realizada em paralelo com um ensaio em branco. As duas amostras foram então submetidas à separação por CLAE/UV em fase reversa, e os cromatogramas obtidos foram comparados.

A partir dos experimentos acima descritos, foi definido o procedimento de derivatização mais adequado, que foi utilizado nos estudos subsequentes.

4.2.2 Ajuste das condições cromatográficas

Posteriormente ao estudo de cinética da reação de derivatização, foram realizadas diversas análises de uma alíquota da solução padrão de TPM,

previamente derivatizada (concentração de TPM na alíquota: $40,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$), promovendo sucessivos ajustes na composição e no fluxo da fase móvel. Tais modificações tinham por objetivo garantir a simetria do sinal gerado pelo TPM e uma resolução adequada, em um tempo de análise razoável. Mediante a avaliação de vários cromatogramas preliminares, as condições cromatográficas nas quais o método analítico mostrava-se mais eficiente foram definidas e aplicadas nas demais análises.

4.2.3 Cálculo dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico

A partir de um cromatograma, obtido mediante a injeção de uma amostra contendo $40,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de TPM pré-derivatizado, foram calculados alguns parâmetros de adequação do sistema cromatográfico, segundo a USP 34. São eles:

- Número de pratos teóricos (N);
- Fator de capacidade (k');
- Fator de assimetria (TF); e
- Resolução (R_s).

4.2.4 Estudo da estabilidade do derivado

Foi realizado mediante a investigação de um possível decaimento do sinal do analito de interesse, em função do tempo. Para isso, foram realizadas dez injeções consecutivas, em um intervalo de 3 horas, do produto resultante da reação entre uma alíquota da solução padrão (contendo $40,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de TPM) e o reativo FDNB, nas condições ideais de reação preestabelecidas, mantendo constantes os parâmetros de análise.

4.2.5 Identificação positiva do derivado por espectrometria de massas

O sinal correspondente ao derivado foi coletado e a fase móvel evaporada por liofilização. A seguir, o resíduo foi redissolvido em 1 mL de ACN. A seguir, foi obtido

um espectro EM/ESI, em modo positivo e com baixa voltagem de colisão, com o objetivo de inibir as fragmentações e, assim, obter informações mais exatas a respeito do íon pseudomolecular $[M+1]^+$. A amostra foi inserida diretamente no espectrômetro de massas, sem o uso do cromatógrafo, uma vez que o sinal foi previamente isolado.

4.3 ANÁLISE PRELIMINAR DE ALGUNS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

4.3.1 Determinação da seletividade do método analítico

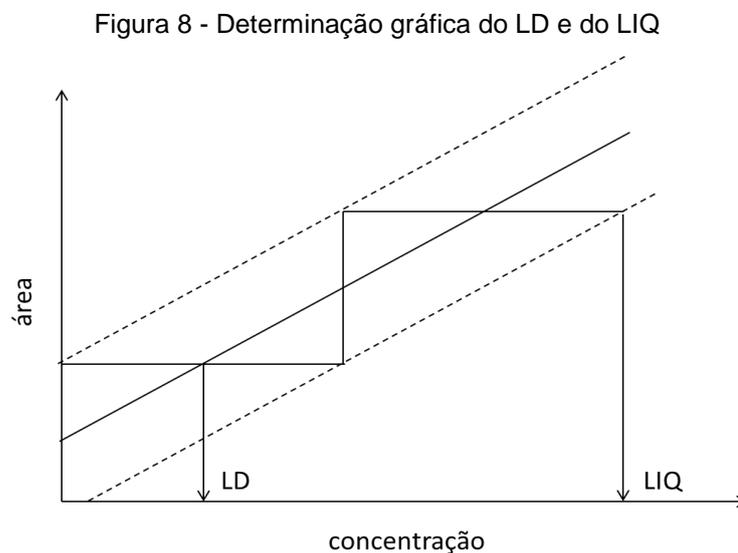
Seletividade é a capacidade que um método tem de distinguir a resposta do analito de interesse das de outros compostos, ditos interferentes (INMETRO, 2010). Esta avaliação foi realizada mediante o estudo da pureza do pico gerado pelo analito de interesse, pela técnica de CLAE/EM/ESI, conforme descrito no item 4.2.5.

4.3.2 Estudo da linearidade e determinação da faixa linear de trabalho

A linearidade consiste na capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo de concentração específico (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010). A fim de estimar a faixa de concentração do analito na qual o método apresenta resposta linear, foram retiradas alíquotas da solução padrão de TPM, contendo concentrações variáveis, que foram submetidas à reação de derivatização, nas condições pré-determinadas. Posteriormente, cada um dos nove níveis de concentração utilizados (5,06; 10,12; 20,24; 30,36; 40,48; 50,60; 60,72; 80,96; e 101,20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi injetado em triplicata no sistema de CLAE/UV e, com os resultados, foi estimada a faixa linear de trabalho e elaborado o gráfico das respostas em função da concentração do analito (curva analítica), a partir do qual foram calculados os coeficientes da reta de regressão, o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação (R^2).

4.3.4 Estimativa do limite de detecção e limite inferior de quantificação

O limite de detecção (LD) para o TPM foi determinado graficamente, a partir da curva analítica, com o auxílio do programa Statistica 6.0. O LD foi obtido traçando-se uma paralela ao eixo x, a partir da intercessão do eixo y com o limite superior do intervalo de confiança da curva. A intercessão desta paralela com a curva analítica forneceu um valor de x que corresponde ao LD. O limite inferior de quantificação (LIQ) foi estimado prolongando-se a reta horizontal que passa pelo LD até o limite inferior do intervalo de confiança. Então, a partir deste ponto, traçou-se uma reta perpendicular até a intercessão com o limite superior do intervalo da regressão e, então, uma reta paralela ao eixo x até a reta de regressão. A intercessão entre estas duas retas forneceu o valor do LIQ (AGUIAR, 2008). A Figura 8 mostra como foi realizado o cálculo do LD e do LIQ, a partir da curva analítica.



Fonte: elaborada pela autora (2011)

4.3.5 Estudo da recuperação do analito

Foi realizado por meio da análise de amostras do medicamento fortificadas com quantidades conhecidas do padrão, em diferentes concentrações (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010). Neste experimento, foi utilizado o medicamento genérico em análise no INCQS na ocasião. Primeiramente, vinte comprimidos foram pesados e, com os dados, foi calculado o peso médio (416,19 mg). Então, pesou-se o equivalente a cerca de 100 mg de TPM ($m = 416,16$ mg), transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, avolumou-se com ACN e homogeneizou-se em ultrassom por 10 minutos. Então, foram transferidas alíquotas de 1000 μL desta solução a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cinco balões volumétricos de 10 mL, que foram acrescidos de quantidades conhecidas do padrão de TPM e avolumados com ACN, conforme esquematizado na Tabela 6.

Então, alíquotas de 500 μL de cada balão volumétrico foram submetidas à reação de derivatização com o FDNB, ressuspendidas em 10 μL de ACN, filtradas e analisadas mediante a técnica de CLAE/UV. A partir dos resultados obtidos, foi calculada a recuperação, segundo a seguinte fórmula (INMETRO, 2010):

$$\text{Recuperação (\%)} = (C_1 - C_2) / C_3$$

Sendo:

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada; e

C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

O inconveniente desta técnica é que o analito adicionado não se encontra necessariamente sob a mesma forma que o presente na amostra. Quando o analito adicionado é mais facilmente detectável que o proveniente da amostra, a recuperação do analito pode ser superestimada (INMETRO, 2010).

A Tabela 2 resume os dados anteriormente citados, e inclui as concentrações de TPM em cada um dos níveis considerados neste estudo.

Tabela 2 - Estudo de recuperação do TPM

	Nível 1 (amostra não fortificada)	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5
Massa de amostra (μg)	999,9	999,9	999,9	999,9	999,9
Massa de padrão (μg)	0	506,01	1012,02	1518,03	2024,04
Concentração de TPM em cada balão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	99,99	150,59	201,19	251,79	302,39
Quantidade de TPM na alíquota (μg)	49,99	75,29	100,59	125,89	151,19
Concentração final de TPM na amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	4,99	7,53	10,06	12,59	15,12

Fonte: elaborada pela autora (2011)

4.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA NA DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DO TPM EM COMPRIMIDOS

Inicialmente, determinou-se o peso médio de cada um dos medicamentos sob análise. Então, foram pesadas, em triplicata, massas equivalentes a um peso médio de cada produto.

Em seguida, procedeu-se ao preparo das amostras do medicamento referência da seguinte forma: cada massa pesada foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, que foi avolumado com ACN e homogeneizado em ultrassom por 10 minutos. Então, retirou-se uma alíquota de 1500 μL desta amostra e diluiu-se com ACN em balão volumétrico de 5 mL. Alíquotas de 1000 μL de cada amostra foram submetidas à reação de derivatização com o FDNB, ressuspensas em 10 mL de ACN, filtradas e analisadas por CLAE/UV (amostras R₁, R₂ e R₃).

As amostras do medicamento genérico foram preparadas segundo o procedimento a seguir: cada massa pesada foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, que foi avolumado com ACN, seguido de homogeneização em ultrassom por 10 minutos. Então, tomou-se uma alíquota de 1500 μL desta amostra e diluiu-se com ACN em balão volumétrico de 5 mL. Alíquotas de 1000 μL destas amostras foram então submetidas à reação de derivatização com o FDNB, ressuspensas em 10 mL de ACN, filtradas e analisadas por CLAE/UV (amostras G_1 , G_2 e G_3).

O teor de TPM nos medicamentos em estudo foi determinado por interpolação na curva analítica elaborada no item 4.3.2, contendo sete níveis de concentração do padrão (método da padronização externa). Em paralelo a esse ensaio, três alíquotas (100, 300 e 500 μL) da solução padrão de TPM em três diferentes níveis de concentração (P_1 , P_2 e P_3 , respectivamente) foram submetidas à reação de derivatização sob as mesmas condições da amostra e, após ressuspensas em 10 mL de ACN, foram filtradas e analisadas por CLAE/UV, em triplicata, a fim de checar a adequabilidade do método.

Os dados pertinentes a este estudo estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Determinação analítica do TPM em comprimidos

	MEDICAMENTO REFERÊNCIA TOPAMAX® 50 mg	MEDICAMENTO GENÉRICO TOPIRAMATO EMS 100 mg	PADRÃO TPM
Peso médio (mg)	162,87	417,39	-
Massas pesadas (mg)	162,8 (m_{R1})	417,32 (m_{G1})	20,2 (m_P)
	162,8 (m_{R2})	417,40 (m_{G2})	
	162,9 (m_{R3})	417,33 (m_{G3})	
Concentração da amostra / padrão após derivatização ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	29,99 (R_1)	29,99 (G_1)	10,12 (P_1)
	29,99 (R_2)	30,00 (G_2)	30,36 (P_2)
	30,01 (R_3)	30,00 (G_3)	50,60 (P_3)

Fonte: elaborada pela autora (2011)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO TPM

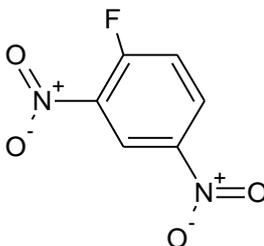
A molécula do TPM, por conter apenas grupos alquila, éter e sulfamato, é praticamente transparente na faixa de trabalho comum à espectrofotometria UV. A região de absorção máxima está localizada em torno de 195 a 205 nm, graças à existência de grupos cromóforos, contendo átomos de nitrogênio e oxigênio, que possuem dois elétrons desemparelhados.

Com isso, quaisquer metodologias baseadas em CLAE, com detecção por UV, apresentariam uma série de inconvenientes. A faixa linear de trabalho seria estreita, e os aumentos nas concentrações de TPM, a fim de compensar a baixa absorvidade molar intrínseca, poderiam causar desvios na Lei de Lambert-Beer. Além da necessidade de se trabalhar numa região de baixa seletividade, muito provavelmente isso acarretaria comprometimento dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico, com a obtenção de sinais inadequados, especialmente no que concerne à simetria e ao número de pratos teóricos.

Objetivando-se elaborar um método quantitativo coerente para o TPM, por cromatografia líquida com detecção na região do UV, foi necessário incorporar grupos cromóforos à molécula original, por meio de uma reação de derivatização.

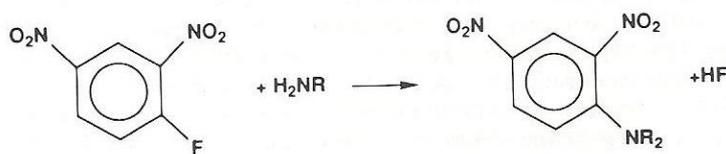
Neste estudo, optou-se pela utilização do reagente 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (Figura 9), também conhecido como reagente de Sanger, que é comumente usado para a derivatização de aminoglicosídeos e fenóis. Segundo a literatura, essa reação requer um tempo razoavelmente longo para ocorrer (30 a 60 minutos), altas temperaturas (entre 60 e 100°C) e pH alcalino. O comprimento de onda de detecção do derivado é normalmente em torno de 350 nm (LINGEMAN; UNDERBERG, 1990). A Figura 10 mostra a representação esquemática da reação do FDNB com uma amina primária.

Figura 9 - Estrutura química do FDNB (MM: 186,10)



Fonte: adaptada de LINGEMAN; UNDERBERG (1990)

Figura 10 - Reação de derivatização de aminas primárias com o FDNB



Fonte: LINGEMAN; UNDERBERG (1990)

A partir dos ensaios realizados, foram determinadas as condições em que se processa a reação de derivatização do TPM. São elas:

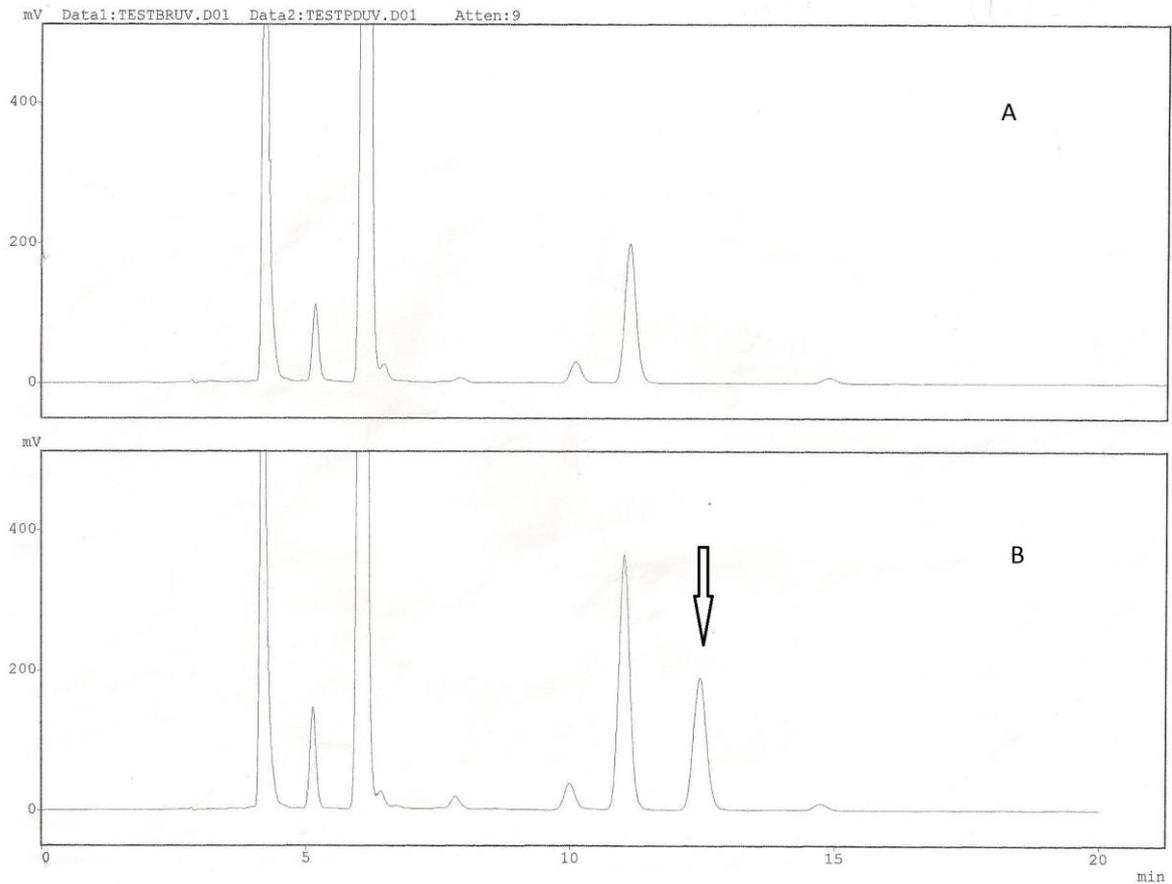
- Temperatura: 100°C;
- Tempo de reação: 60 minutos;
- A trietilamina é essencial à reação; e
- A razão mínima empregada (10 mols de FDNB para cada 1 mol de TPM) já é suficiente para que a reação de derivatização seja completa.

Os resultados obtidos estão plenamente de acordo com os dados coletados na literatura. A Figura 11 mostra os cromatogramas gerados pela determinação analítica do ensaio em branco (A), contendo apenas FDNB e TEA, e do meio reacional contendo o derivado do TPM (B), cujo sinal aparece indicado por uma seta. Já a Figura 12 apresenta uma comparação entre os cromatogramas obtidos a partir da análise do TPM submetido à reação de derivatização em presença de trietilamina (A) e na ausência desta base (B). A seta indica o sinal correspondente ao derivado. A dependência da reação em relação à presença de TEA poderia ser explicada pelo aumento da nucleofilicidade do meio proporcionado por esta base, contribuindo assim para a estabilização do estado de transição do derivado.

Os resultados demonstram que o estudo da razão entre as concentrações de FDNB e TPM ainda não foi esgotado. Como perspectiva futura, sugere-se que novos ensaios sejam realizados, no intuito de avaliar o efeito da utilização de razões derivatizante x analito ainda menores, a fim de otimizar o método, buscando a

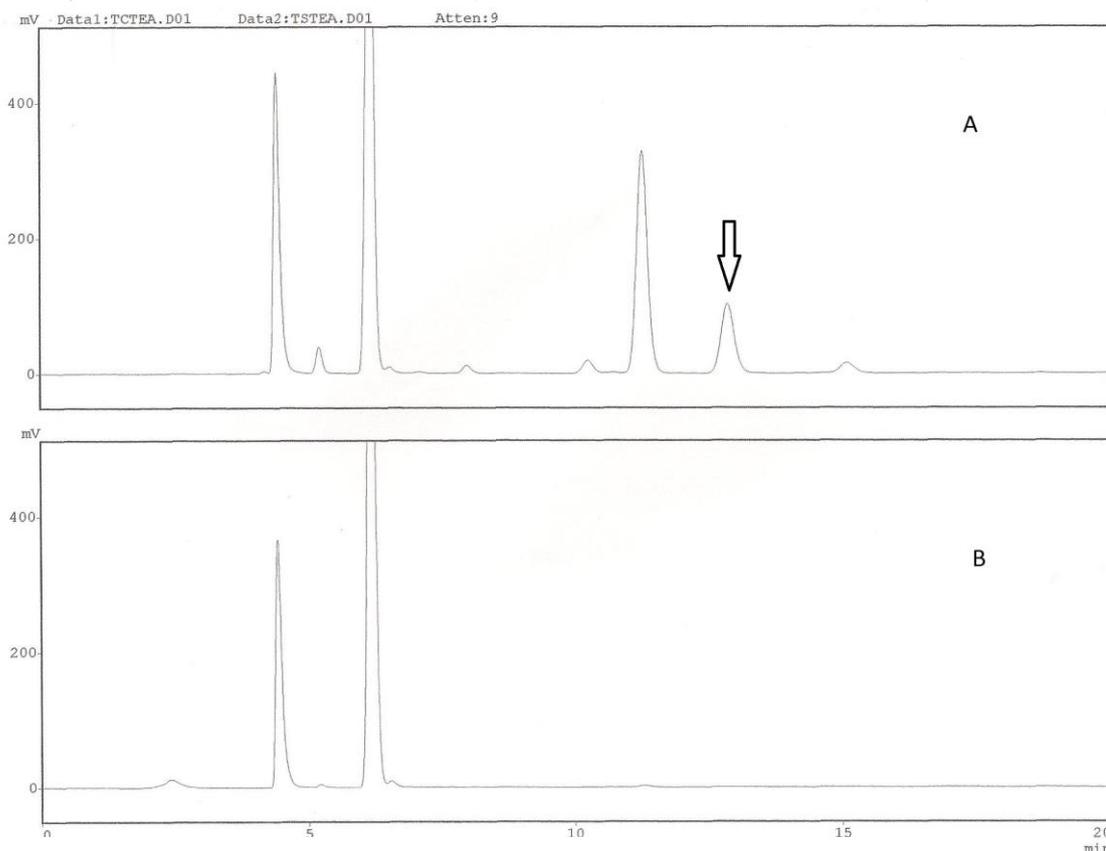
utilização de quantidades mínimas de FDNB e, conseqüentemente, menores custos analíticos.

Figura 11 - Comparação entre os cromatogramas obtidos na determinação analítica do ensaio em branco (A) e do derivado gerado a partir do TPM (B)



*Condições analíticas: coluna C8 (5 μm , 250 x 4,6 mm d.i.); fase móvel acetonitrila; fluxo 1,0 mL.min⁻¹; detecção 350 nm; e volume de injeção 15 μL .
Fonte: elaborada pela autora (2011)

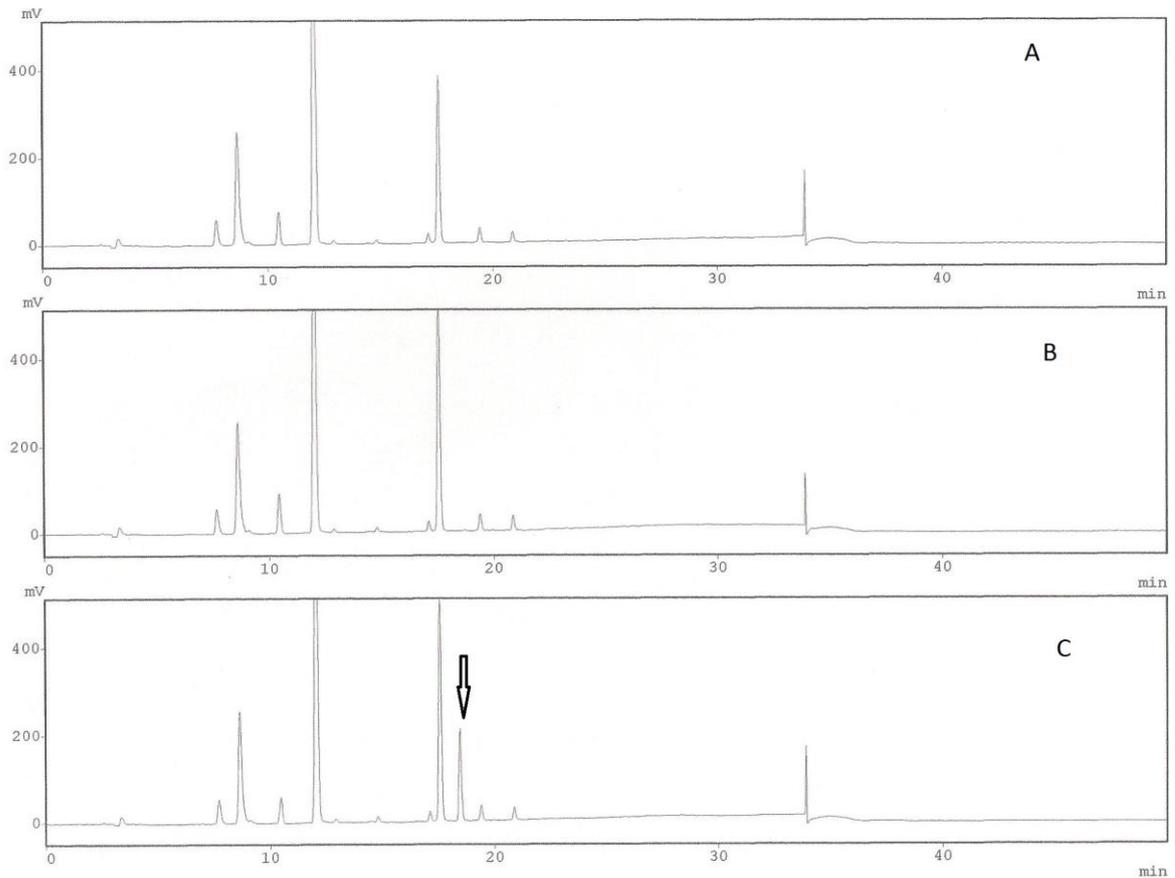
Figura 12 - Comparação entre os cromatogramas obtidos na presença (A) e na ausência (B) de TEA



*Condições analíticas: coluna C8 (5 μm , 250 x 4,6 mm d.i.); fase móvel acetonitrila; fluxo 1,0 mL.min⁻¹; detecção 350 nm; e volume de injeção 15 μL .
Fonte: elaborada pela autora (2011)

Através dos ensaios preliminares para estudo da reação de derivatização, verificou-se que o CRT não reage com o FDNB, logo não interfere na detecção do TPM. A Figura 13 demonstra tal afirmativa, mediante a comparação dos cromatogramas obtidos a partir da análise de um ensaio em branco (A), contendo apenas FDNB e TEA, da solução contendo CRT, FDNB e TEA (B) e do meio reacional que continha TPM e derivatizante em pH básico (C), onde a seta mostra o sinal produzido pelo derivado do TPM. Tal fato condiz com a estrutura química desta impureza, que pode ser visualizada na Figura 4. A ausência do grupo amino justifica a não reatividade frente ao FDNB e torna esta reação adequada à detecção específica do TPM.

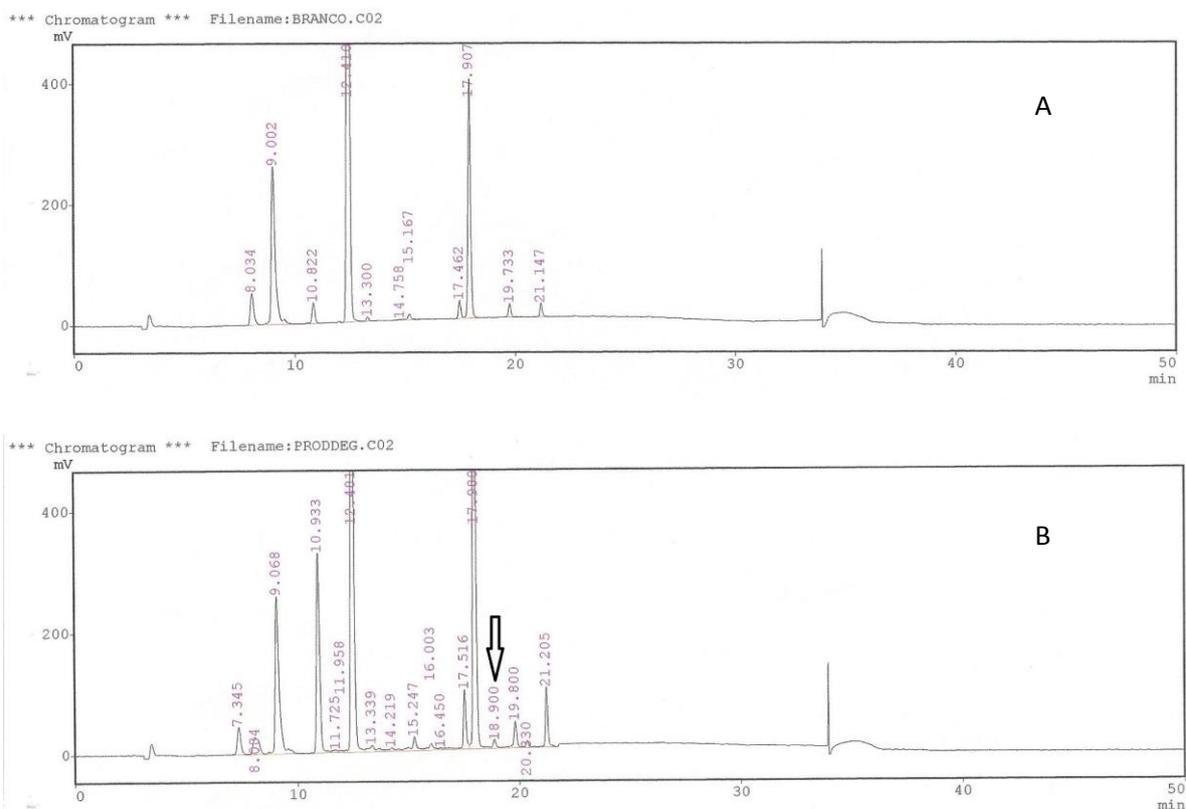
Figura 13 - Comparação entre os cromatogramas obtidos para o ensaio em branco (A), com o CRT (B) e com o analito de interesse (C)



*Condições analíticas: coluna C8 (5 μm , 250 x 4,6 mm d.i.); fase móvel gradiente de acetonitrila : ácido fosfórico 0,1% v/v em água (55:45) até acetonitrila : ácido fosfórico 0,1% v/v em água (70:30); fluxo 1,0 mL.min⁻¹; detecção 350 nm; e volume de injeção 15 μL .
Fonte: elaborada pela autora (2011)

O ensaio no qual se induziu a decomposição do TPM por calor úmido, nas condições descritas no item 4.2.1, a fim de se comparar os sinais cromatográficos gerados pela derivatização em presença de produtos de degradação deste fármaco (Figura 14 B), em relação aos do ensaio em branco (Figura 14 A), evidenciou o aparecimento de alguns sinais adicionais no cromatograma da amostra. Além disso, um sinal possivelmente devido ao derivado do TPM (tempo de retenção de 18,9 minutos, indicado pela seta) foi detectado, com resolução satisfatória, o que sugere que a presença de tais produtos de degradação não interfere na detecção do analito de interesse.

Figura 14 - Comparação entre os cromatogramas obtidos para o ensaio em branco (A) e para os produtos da degradação do TPM por calor úmido (B)



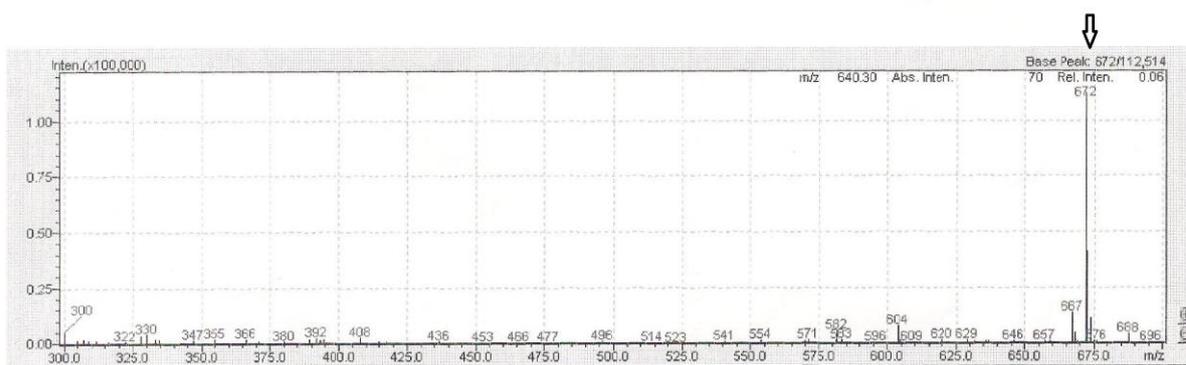
*Condições analíticas: coluna C8 (5 μ m, 250 x 4,6 mm d.i.); fase móvel gradiente de acetonitrila : ácido fosfórico 0,1% v/v em água (55:45) até acetonitrila : ácido fosfórico 0,1% v/v em água (70:30); fluxo 1,0 mL.min⁻¹; detecção 350 nm; e volume de injeção 15 μ L.
Fonte: elaborada pela autora (2011)

Através de injeções consecutivas de uma concentração conhecida de TPM, submetido à reação de derivatização pré-cromatográfica e analisado sob as mesmas condições – coluna C8 (5 μ m, 250 x 4,6 mm d.i.); fase móvel acetonitrila; fluxo 1,0 mL.min⁻¹; detecção 350 nm; volume de injeção 15 μ L; e tempo de análise 20 minutos – observou-se que os sinais não sofreram decaimento durante as dez análises efetuadas, o que sugere que o derivado produzido mantém-se estável por, pelo menos, 3 horas.

A evidência de que o sinal cromatográfico observado é de fato oriundo do derivado produzido pela reação entre o TPM e o FDNB foi obtida mediante a técnica de EM/ESI, associada à CLAE. O resultado obtido sugere que, muito provavelmente, houve a formação do bis-(2,4-dinitrobenzeno)-topiramato (Figura 15), uma vez que o íon pseudomolecular $[M+1]^+$ encontrado (indicado por uma seta) possui razão massa/carga de 672. A fim de se obter informações mais precisas sobre a estrutura

molecular do derivado, fazem-se necessárias análises adicionais a fim de avaliar o padrão de fragmentação deste composto. Além disso, a utilização de outras técnicas espectroscópicas, como o infravermelho e a ressonância magnética nuclear, pode fornecer mais evidências que corroborem a estrutura molecular do derivado proposta nesse estudo.

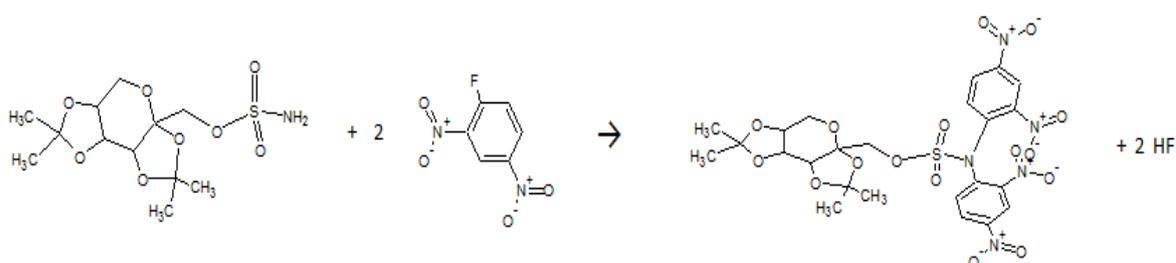
Figura 15 - Espectro de massas EM/ESI do suposto sinal do derivado (modo +; Q array 5 V; e RF 150 V)



Fonte: elaborada pela autora (2011)

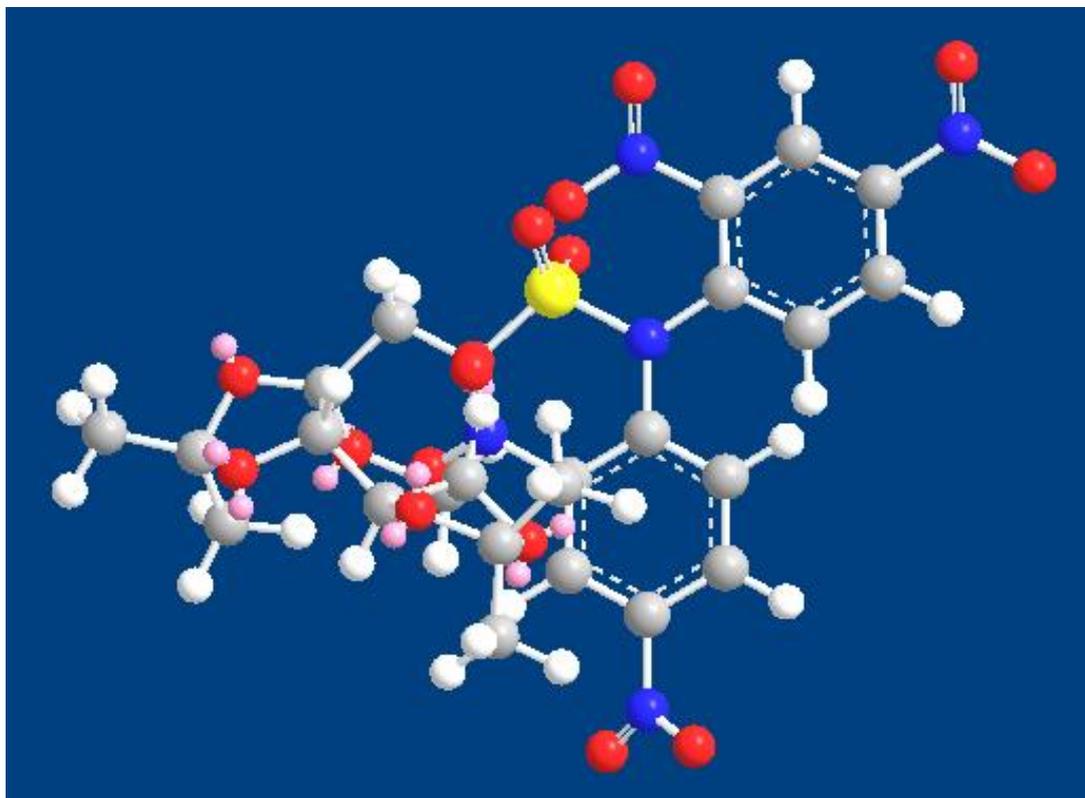
No presente trabalho, utilizou-se um excesso de derivatizante (no mínimo, 10 mols de derivatizante para cada 1 mol de TPM) e aquecimento a 100°C por 60 minutos, tendo sido obtido o bis-(2,4-dinitrobenzeno)-topiramato, através da dupla substituição aromática nucleofílica diretamente, nos grupos terminais N-amino da função sulfamato do TPM (Figura 16). A Figura 17 mostra o provável arranjo tridimensional dos átomos na molécula do bis-(2,4-dinitrobenzeno)-topiramato.

Figura 16 - Reação do TPM com duas moléculas de FDNB, produzindo o bis-(2,4-dinitrobenzeno)-topiramato (MM: 671,544)



Fonte: elaborada pela autora (2011)

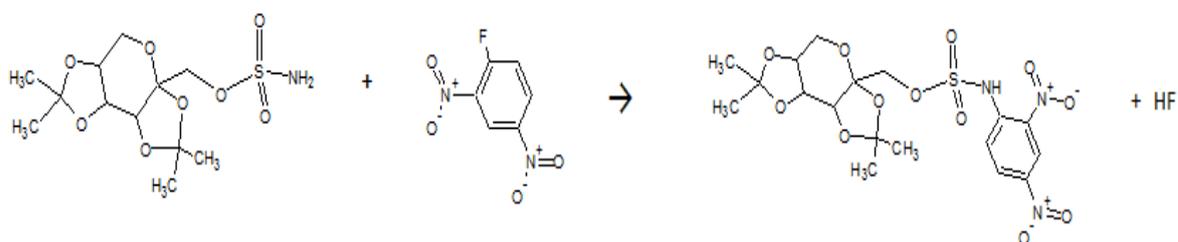
Figura 17 - Arranjo espacial mais provável do bis-(2,4-dinitrobenzeno)-topiramato, obtido pela análise conformacional da molécula, utilizando o programa ChemOffice 4.0



Fonte: elaborada pela autora (2011)

Tais resultados sugerem que, caso fosse utilizada a estequiometria 1:1, ocorreria a formação do mono-(2,4-dinitrobenzeno)-topiramato (Figura 18). Contudo, optou-se pela utilização do excesso de reagente, devido à maior proteção do grupo funcional do derivado, acarretando maior estabilização do composto por ressonância e, também, ganho de absorvidade molar, pelo aumento do número de grupos cromóforos na molécula.

Figura 18 - Reação do TPM com uma molécula de FDNB, produzindo o mono-(2,4-dinitrobenzeno) topiramato (MM: 505,453)



Fonte: elaborada pela autora (2011)

5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E CÁLCULO DE PARÂMETROS DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Paralelamente ao estudo da cinética da reação de derivatização, os parâmetros cromatográficos foram ajustados de forma a garantir uma resolução adequada à análise. Após vários ensaios, foram determinadas as condições cromatográficas mais favoráveis, que estão dispostas no Quadro a seguir.

Quadro 5 - Condições cromatográficas para a determinação do TPM

PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	CARACTERÍSTICAS
Fase estacionária	Coluna de fase reversa de sílica C8 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i.), fabricante Ace
Fase móvel	Eluição isocrática com acetonitrila
Fluxo da fase móvel	1 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	15 µL
Detector	UV / vis
Comprimento de onda	350 nm
Tempo total de análise	20 minutos

Fonte: elaborado pela autora (2011)

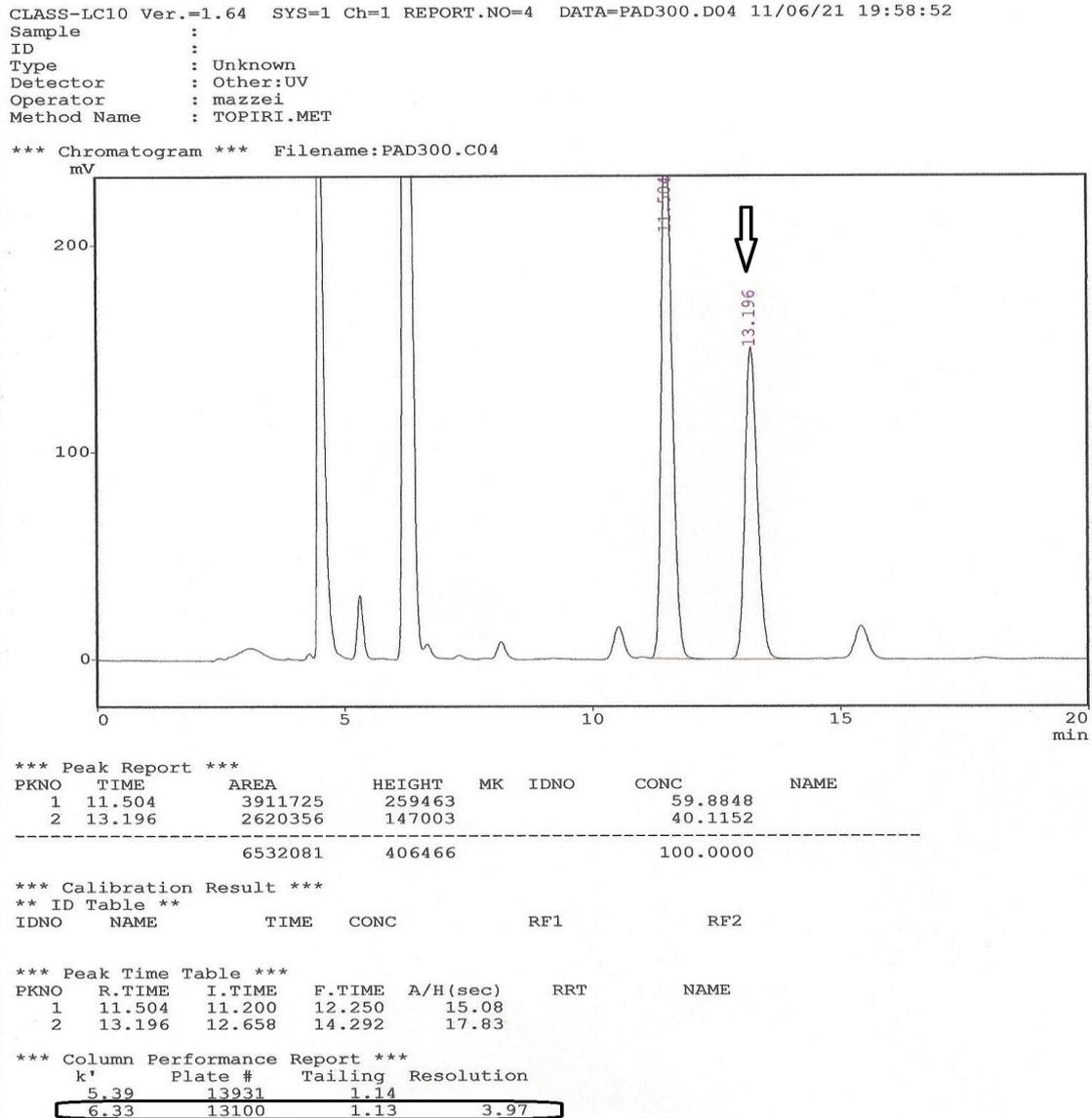
A fim de se trabalhar com moléculas polares em cromatografia de fase reversa, normalmente recomendam-se as colunas com octilsilano (C8) ou octildecilsilano (C18) quimicamente ligado. No entanto, para a separação de

moléculas polares por técnicas de fase reversa, colunas com fases ligadas de cadeia curta proporcionam picos mais simétricos, em relação às colunas contendo fases de cadeia longa (HORVÁTH, 1980). A fase estacionária utilizada foi uma coluna de sílica, com octilsilano quimicamente ligado (C8), base desativada.

Com relação à fase móvel, utilizou-se também, com bons resultados, eluição por gradiente de acetonitrila:ácido fosfórico 0,1% v/v em água (55:45) até acetonitrila:ácido fosfórico 0,1% v/v em água (70:30), no tempo de análise de 30 minutos, recurso este utilizado para diminuir o uso de solvente orgânico durante a operação do sistema. O uso do ácido fosfórico na fase móvel tinha por objetivo interagir com a extremidade N-terminal parcialmente substituída do grupo sulfamato no monoderivado, composto que se acreditava ser, a princípio, o produto da reação entre o TPM e o FDNB.

O cálculo dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico, utilizando um cromatograma obtido na análise do derivado com eluição isocrática, encontra-se demonstrado na Figura 19. A seta mostra o sinal produzido pelo derivado do TPM.

Figura 19 - Cálculo dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico (Shimadzu série 10)



Fonte: elaborada pela autora (2011)

Segundo a USP 34, os testes de adequação do sistema cromatográfico são essenciais para a verificação de que este último é adequado para a análise pretendida.

O número de pratos teóricos (N) é uma medida da eficiência da coluna e, para picos gaussianos, é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$N = 16 (TR/W)^2$$

Onde TR é o tempo de retenção da substância e W é a largura do pico na sua base. Na USP 34, a monografia para a matéria-prima TPM estabelece que a eficiência da coluna não deve ser menor que 1.500 pratos teóricos, sendo que a eficiência da coluna calculada para a separação do analito de interesse nas condições operacionais utilizadas foi de 13.100.

O fator de capacidade k' também é conhecido como fator de retenção. É definido como a razão entre a quantidade de substância na fase estacionária e aquela presente na fase móvel. A partir do cromatograma, o fator de capacidade k' pode ser calculado conforme a fórmula a seguir:

$$k' = (TR - TM) / TM$$

Onde TM é o tempo morto, ou o tempo requerido para a eluição de um composto não retido. Os valores de fator de capacidade k' são característicos de solutos individuais, e a seleção de um sistema cromatográfico capaz de retardar seletivamente os demais componentes da mistura é de suma importância. Por meio da seleção de uma combinação apropriada de fases móveis e estacionárias, os valores de k' serão diferentes para cada componente numa dada mistura (KRSTULOVIC; BROWN, 1982).

O fator de assimetria (TF) de um determinado pico de interesse é calculado da seguinte forma:

$$TF = W_{0,05} / 2f$$

Sendo $W_{0,05}$ a largura do pico a 5% da altura e f a distância entre o ponto máximo do pico e a sua linha de frente, medida a 5% da altura do pico, em relação à linha de base. Em monografia destinada à matéria-prima TPM, a USP 34 preconiza que o TF do pico do analito de interesse não deve ser superior a 2,0, sendo que, nesta análise, foi obtido o valor de TF de 1,13.

A resolução significa a separação de dois componentes de uma mistura, e é calculada por:

$$R_s = 2 (TR_2 - TR_1) / (W_1 + W_2)$$

Onde TR_2 e TR_1 são os tempos de retenção dos dois componentes, e W_2 e W_1 são as larguras correspondentes nas bases dos picos. Para valor de resolução igual a 1,5, considera-se a separação essencialmente completa, com menos de 1%

de sobreposição (KRSTULOVIC; BROWN, 1982), ou seja, o valor de resolução obtido (3,97) comprova que houve a separação completa do TPM pré-derivatizado dos demais componentes da mistura.

5.3 ANÁLISE PRELIMINAR DE ALGUNS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

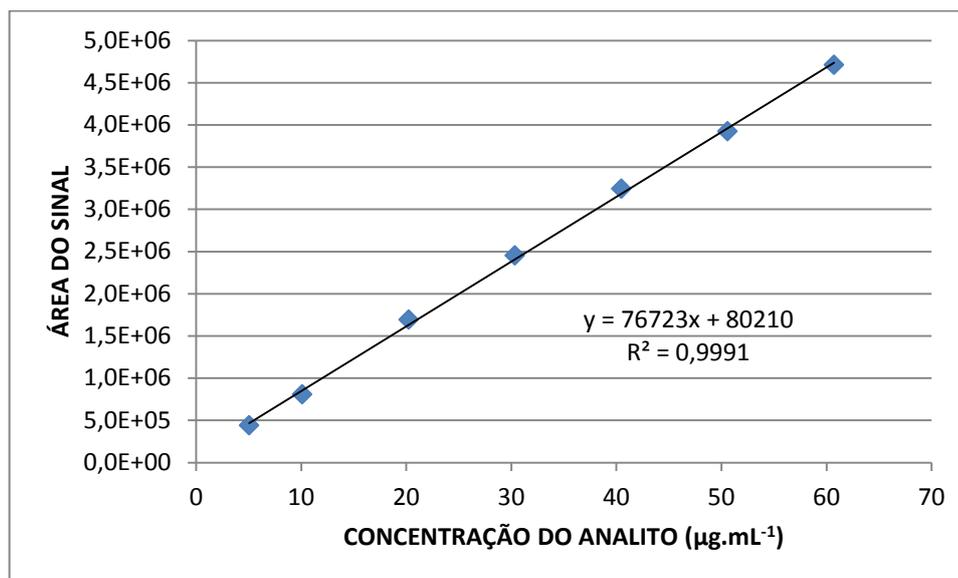
O estudo da linearidade do método demonstrou que, para os dois maiores níveis de concentração de TPM utilizados (80,96 e 101,20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ocorreu desvio da Lei de Lambert-Beer. Observou-se ainda haver uma relação linear entre a resposta do detector e a concentração do analito, que pode ser comprovada pela curva analítica do derivado (Gráfico 1), elaborada com base nos dados dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Estudo da linearidade do método desenvolvido

NÍVEL	CONCENTRAÇÃO DE TPM DERIVATIZADO ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	ÁREAS OBTIDAS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO RELATIVO (%)
1	5,0601	437965	438584	0,123564
		438814		
		438973		
2	10,1202	807194	807061	0,014320
		807004		
		806985		
3	20,2404	1681419	1688904	0,431561
		1689314		
		1695979		
4	30,3606	2473158	2450102	0,903208
		2448115		
		2429033		
5	40,4808	3260260	3240160	0,559381
		3235160		
		3225060		
6	50,6010	3919471	3921001	0,034856
		3922101		
		3921431		
7	60,7212	4706140	4709030	0,053983
		4710030		
		4710920		

Fonte: elaborada pela autora (2011)

Gráfico 1 - Curva analítica do derivado, elaborada com sete níveis de concentração de TPM



Fonte: elaborado pela autora (2011)

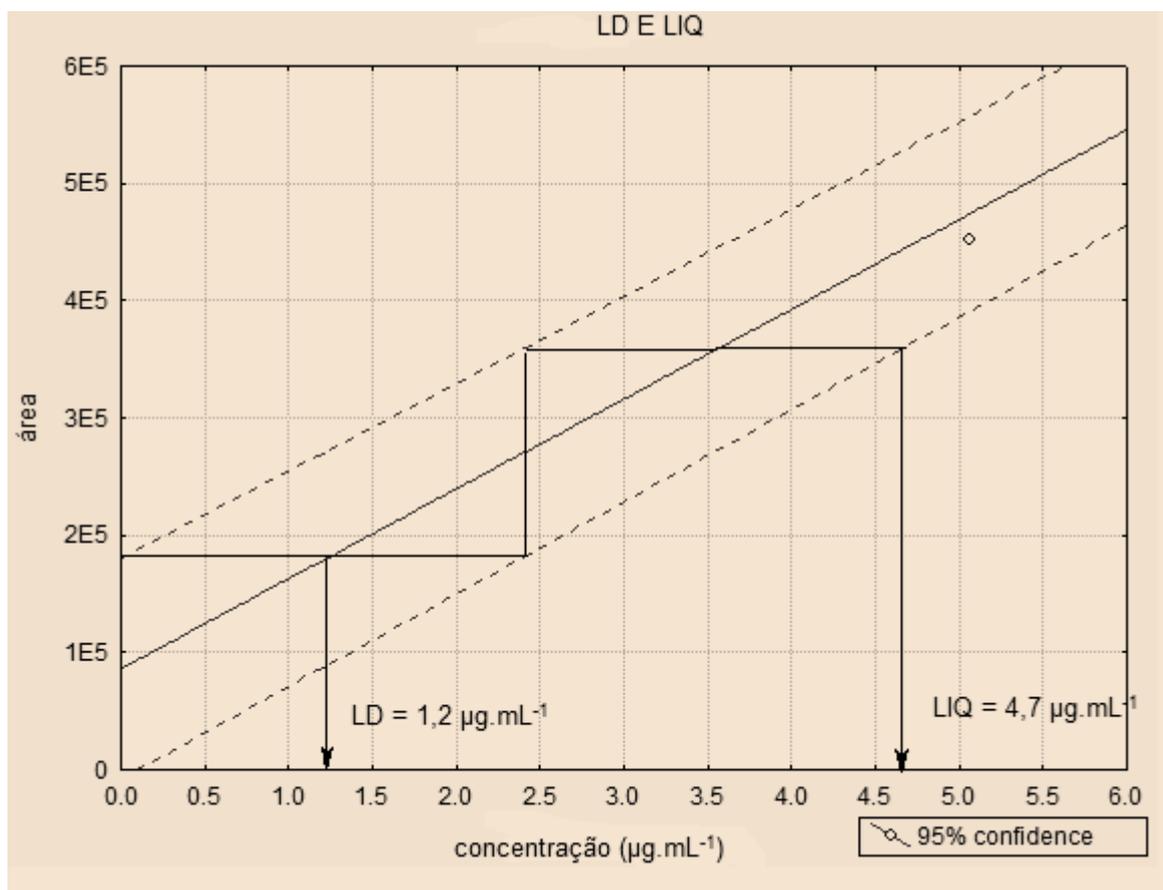
O valor do coeficiente de determinação R^2 obtido significa que 99,91% da variação da variável dependente (y ou área do sinal) pode ser explicada pela variável independente (x ou concentração do analito). O valor do coeficiente de correlação (0,9995) evidencia a existência de uma relação linear entre as variáveis em estudo, bem como uma correlação fortíssima entre elas (BRITO et al., 2003). A constatação da linearidade do método segundo o procedimento descrito no item 4.3.2 é mais um forte indício da estabilidade do derivado formado.

A inclinação da curva de calibração (coeficiente angular $a = 76723$) é um parâmetro que expressa a variação da resposta em função da concentração, ou seja, a sensibilidade (INMETRO, 2010). Dessa forma, pode-se afirmar que a metodologia desenvolvida é sensível, uma vez que uma pequena diferença na concentração do analito resulta em uma grande variação no valor do sinal analítico gerado.

A partir da curva analítica obtida, foram calculados os limites de detecção e inferior de quantificação, embora a avaliação destes parâmetros seja exigida apenas em se tratando de testes qualitativos ou ensaios limites para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010). O limite de detecção é a menor concentração de

um composto que o método analítico consegue diferenciar do ruído de fundo com confiabilidade. Já o limite inferior de quantificação corresponde à menor quantidade de um analito em uma amostra, que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. O Gráfico 2 mostra os valores de LD e LIQ obtidos, mediante o tratamento estatístico da curva analítica usando o programa Statistica 6.0.

Gráfico 2 - Cálculo do LD e LIQ, a partir da curva analítica (Statistica 6.0)



Fonte: elaborado pela autora (2011)

O estudo preliminar da recuperação do analito, antes da validação propriamente dita de um novo método analítico, é um indicativo da eficiência do procedimento de extração. Porcentagens de recuperação do analito próximas a 100% são as ideais, segundo a Resolução-RE nº 899/2003, embora sejam admitidos valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. A recuperação está relacionada com a exatidão de um método analítico, pois evidencia a quantidade de

determinado analito, recuperado na metodologia, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO et al., 2003). Os valores de recuperação do analito calculados para os diversos níveis de concentração de TPM foram os seguintes: 98,2% (nível 2), 97,4% (nível 3), 99,1% (nível 4) e 101,2% (nível 5). Para o nível 2 (concentração de TPM = 0,753%), o intervalo de recuperação aceito é de 95 a 105%, enquanto que para os níveis 3 (concentração de TPM = 1,006%), 4 (concentração de TPM = 1,259%) e 5 (concentração de TPM = 1,512%), a faixa de recuperação admitida é de 97 a 103% (BRITO et al., 2003). Dessa forma, o presente estudo sugere que a recuperação do analito a partir da metodologia analítica desenvolvida é satisfatória.

Os ensaios para determinação do teor de TPM nos dois medicamentos analisados pelo método da padronização externa tiveram os seguintes resultados: 99,4%, 97,2% e 99,1% do valor declarado (medicamento referência); e 97,0%, 96,2% e 95,8% (medicamento genérico). Ambos os produtos encontram-se dentro da faixa de teor preconizada pela USP 34 (90 a 110%), no entanto a diferença entre os resultados obtidos para cada produto pode ser decorrente da diversidade das matrizes analisadas, uma vez que cada produto possui uma composição própria (Quadro 6). Vale ressaltar que o ensaio preliminar para a determinação do percentual de recuperação do analito foi realizado somente com o medicamento referência.

Quadro 6 - Composição dos medicamentos utilizados no presente estudo

Produto	Composição
Topamax 50 mg comprimidos revestidos (referência)	Amido pré-gelatinizado, amidoglicolato de sódio, celulose microcristalina, cera de carnaúba, estearato de magnésio, lactose, hipromelose, macrogol, dióxido de titânio, óxido férrico amarelo e polissorbato 80.
Topiramato 100 mg comprimidos revestidos (genérico EMS)	Amido pré-gelatinizado, lactose monoidratada, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, óxido de ferro amarelo, dióxido de titânio, álcool polivinílico, talco, macrogol e água purificada.

Fonte: BULAS... (2011)

A metodologia desenvolvida mostrou-se promissora, como uma alternativa mais acessível aos métodos para a determinação do topiramato em matérias-primas e comprimidos preconizados pela USP 34, que utilizam a técnica de cromatografia

líquida com detecção refratométrica. No entanto, em se tratando de um método totalmente novo, é necessário assegurar que as características de desempenho do método atendem aos requisitos necessários para as operações analíticas pretendidas, garantindo a sua confiabilidade (INMETRO, 2010).

Dessa forma, a metodologia analítica desenvolvida no presente estudo deve ser validada, no intuito de confirmar que o método é adequado para a determinação do topiramato em matérias-primas e comprimidos. Esse estudo de validação deve contemplar a avaliação dos seguintes parâmetros: especificidade e seletividade; sensibilidade, linearidade e faixa de trabalho; precisão; exatidão e recuperação; e robustez (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010). Para isso, recomenda-se utilizar padrão de referência USP Topiramato, não disponível na ocasião em que foram conduzidos os estudos experimentais aqui descritos. Além disso, devem ser obedecidos os requisitos necessários para a realização de experimentos completos de validação, particularmente no que tange ao número de amostras e repetições e à análise dos dados brutos mediante tratamento estatístico apropriado.

Futuramente, o método devidamente validado poderá ser enviado para posterior apreciação pela Comissão da Farmacopéia Brasileira e certificação e, sendo aprovada a monografia, esta poderá ser remetida para apreciação e oficialização pela ANVISA.

6 CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida, visando à determinação do topiramato utilizando as técnicas de derivatização com FDNB e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica, mostrou-se uma alternativa viável ao método oficial em vigor.

Os experimentos preliminares de validação sugerem que o método apresenta sensibilidade, especificidade, linearidade e exatidão, esta última evidenciada pelo percentual de recuperação satisfatório, utilizando-se como amostra o medicamento de referência.

O presente trabalho pode ser o ponto de partida para a realização de ensaios completos de validação, a fim de demonstrar que as características de desempenho do método atendem à finalidade pretendida, ou seja, a análise quantitativa do topiramato em matérias-primas e comprimidos.

Dessa forma, os órgãos públicos de controle de qualidade brasileiros poderão ter à sua disposição uma nova metodologia analítica oficial para a determinação do topiramato em matérias-primas e comprimidos. O método proposto, além de mais simples e específico, vai ao encontro dos recursos materiais existentes nesses laboratórios.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J.L.N. **Laboratório oficial na avaliação crítica das monografias farmacopeicas**: “system suitability”, risco sanitário e desenvolvimento de novo método analítico por cromatografia a líquido do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico em comprimidos. 2006. 72 f. Monografia (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.
- AGUIAR, J.L.N. **Validação interlaboratorial de um novo método analítico por cromatografia em fase líquida do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico em comprimidos**. 90 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- BAHRAMI, G.; MIRZAEI, S.; KIANI, A. Sensitive analytical method for topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 813, n.1-2 , p. 175-180, dez. 2004.
- BARBEE, J.G. Topiramate in the treatment of severe bulimia nervosa with comorbid mood disorders: a case series. **The International Journal of Eating Disorders**, New York, v. 33, n. 4, p. 468-472, mai. 2003.
- BIRÓ, A.; PERGEL, É.; ÁRVAI, G.; ILISZ, I.; SZEPESI, G.; PÉTER, A.; LUKÁCS, F. High-performance liquid chromatographic study of topiramate and its impurities. **Chromatographia**, Berlin, v. 63, suppl. 13, p. S137-S141, jun. 2006.
- BRASIL. Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 set. 1976. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6360.htm>. Acesso em: 20 mar. 2010.
- BRASIL. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 set. 1990. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8078.htm>. Acesso em: 20 mar. 2010.
- BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8080.htm>. Acesso em: 20 mar. 2010.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9782.htm>. Acesso em: 20 mar. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 37, de 06 de julho de 2009. Trata da admissibilidade das Farmacopeias estrangeiras. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 jul. 2009. Seção 1, p. 40.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de Métodos Analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/download/3173/2546>>. Acesso em: 15 jan. 2011.

BULAS dos medicamentos Topamax 50 mg e Topiramato 100 mg genérico EMS. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp>. Acesso em: 30 set. 2011.

CERTIFICADO do Padrão de Referência USP do Composto Relacionado A do Topiramato, lote: F0F279, data de emissão: 01 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/certificates/1672210-F0F279.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

CONSULTA de medicamentos contendo o Topiramato como princípio ativo (dados atualizados após 25/3/2002). Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp>. Acesso em: 07 nov. 2011.

COSTA, E.A.; ROZENFELD, S. Constituição de Vigilância Sanitária no Brasil. In: ROZENFELD, S. (Org.) **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000. p. 15-40.

DALLARI, S.G. Vigilância Sanitária: responsabilidade pública na proteção e promoção da saúde. In: COSTA, E.A. (Org.) **Vigilância Sanitária: desvendando o enigma**. Salvador: EDUFBA, 2008. p. 45-52.

DA SILVA, A.C.P. O Laboratório Oficial na avaliação analítica. In: ROZENFELD, S. (Org.) **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000. p. 271-301.

DE LIMA, L.D.; BAPTISTA, T.W.F. Política e gestão da saúde no Brasil. In: DE SETA, M.H.; PEPE, V.L.E.; OLIVEIRA, G.O. (Org.) **Gestão e Vigilância Sanitária: modos atuais do pensar e fazer**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. p. 89-110.

FARMACOPEIA Brasileira. 5^a ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 25 jun.2011.

GLAUSER, T.A.; CLARK, P.O.; MCGEE, K. Long-term response to topiramate in patients with West syndrome. **Epilepsia**, Copenhagen, v. 41, suppl. 1, p. S91-S94, jan. 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02180.x/pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2011.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed.) **Goodman and Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. p. 391-406.

HORVÁTH. C. (Ed.) **High-Performance Liquid Chromatography: advances and perspectives**. New York: Academic Press, 1980. v. 1 e 2.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008/3^a Revisão: Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2011.

JOHNSON, B.A.; AIT-DAOUD, N.; BOWDEN, C.L.; DICLEMENTE, C.C.; ROACHE, J.D.; LAWSON, K.; JAVORS, M.A.; MA, J.Z. Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. **The Lancet**, London, v. 361, n. 9370, p. 1677-1685, mai. 2003.

KLOCKOW-BECK, A.; NICK, A.; GEISSHUESLER, S; SCHAUFELBERGER, D. Determination of the inorganic degradation products sulfate and sulfamate in the antiepileptic drug topiramate by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 720, n. 1-2, p. 141-151, dez. 1998.

KRSTULOVIC, A.M.; BROWN, P.R. **Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography: theory, practice, and biomedical applications**. New York: John Wiley & Sons, 1982. 296 p.

KUSHNER, S.F.; KHAN, A.; LANE, R.; OLSON, W.H. Topiramate monotherapy in the management of acute mania: results of four double-blind placebo-controlled trials. **Bipolar Disorders**, Copenhagen, v. 8, n. 1, p. 15-27, fev. 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-5618.2006.00276.x/epdf>>. Acesso em: 25 mar. 2011.

LINGEMAN, H.; UNDERBERG, W.J.M. (Ed.) **Detection-Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography**. New York: Marcel Dekker, 1990. 387 p.

LUCCHESI, G. A Vigilância Sanitária no Sistema Único de Saúde. In: DE SETA, M.H.; PEPE, V.L.E.; OLIVEIRA, G.O. (Org.) **Gestão e Vigilância Sanitária: modos atuais do pensar e fazer**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. p. 33-48.

MARYANOFF, B.E. Sugar sulfamates for seizure control: discovery and development of topiramate, a structurally unique antiepileptic drug. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 9, n. 11, p. 1049-1062, ago.2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/38039951_Sugar_Sulfamates_for_Seizure_Control_Discovery_and_Development_of_Topiramate_a_Structurally_Unique_Antiepileptic_Drug>. Acesso em: 25 mar. 2011.

MATERIAL Safety Data Sheet (MSDS) do Padrão de Referência USP Topiramato, data de revisão: 06 out. 2006. Disponível em: <<http://www.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/msds/1672206.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

McELROY, S.L.; SHAPIRA, N.A.; ARNOLD, L.M.; KECK, P.E.; ROSENTHAL, N.R.; WU, S.C.; CAPECE, J.A.; FAZZIO, L.; HUDSON, J.I. Topiramate in the long-term treatment of binge-eating disorder associated with obesity. **Journal of Clinical Psychiatry**, Memphis, v. 65, n. 11, p. 1463-1469, nov.2004.

MICHEEL, A.P.; KO, C.Y.; GUH, H.Y. Ion chromatography method and validation for the determination of sulfate and sulfamate ions in topiramate drug substance and finished product. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 709, n. 1, p. 166-172, mai. 1998.

MOHAMMADI, A.; REZANOUR, N.; ANSARI, M.; WALKER, R.B. Development of a stability-indicating high performance liquid chromatographic method for the analysis of topiramate and dissolution rate testing in topiramate tablets. **Asian Journal of Chemistry**, Shibabad, v. 22, n. 5, p. 3856-3866, mai. 2010. Disponível em: <http://www.asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=22_5_72>. Acesso em: 25 mar. 2011.

NIETO-BARRERA, M.; CANDAU, R.; NIETO-JIMENEZ, M.; CORREA, A.; DEL PORTAL, L.R. Topiramate in the treatment of severe myoclonic epilepsy in infancy. **Seizure: European Journal of Epilepsy**, London, v. 9, n. 8, p. 590-594, dez. 2000. Disponível em: <[http://www.seizure-journal.com/article/S1059-1311\(00\)90466-7/pdf](http://www.seizure-journal.com/article/S1059-1311(00)90466-7/pdf)>. Acesso em: 25 mar. 2011.

ONDO, W.G.; JANKOVIC, J.; CONNOR, G.S.; PAHWA, R.; ELBLE, R.; STACY, M.A.; KOLLER, W.C.; SCHWARZMAN, L.; WU, S.C.; HULIHAN, J.F. Topiramate in essential tremor: a double-blind, placebo-controlled trial. **Neurology**, Minneapolis, v. 66, n. 5, p. 672-677, mar.2006.

SHANK, R.P.; GARDOCKI, J.F.; STREETER, A.J.; MARYANOFF, B.E. An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. **Epilepsia**, Philadelphia, v. 41, suppl. 1, p. S3-S9, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02163.x/pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2011.

SHANK, R.P.; MARYANOFF, B.E. Molecular pharmacodynamics, clinical therapeutics, and pharmacokinetics of topiramate. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 120-142, fev. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1527-3458.2008.00041.x/epdf>>. Acesso em: 25 mar. 2011.

SOFUOGLU, M.; KOSTEN, T.R. Novel approaches to the treatment of cocaine addiction. **CNS Drugs**, Auckland, v. 19, n. 1, p. 13-25, 2005.

SOLARO, C.; UCELLI, M.M.; BRICHETTO, G.; GASPERINI, C.; MANCARDI, G.L. Topiramate relieves idiopathic and symptomatic trigeminal neuralgia. **Journal of Pain and Symptom Management**, New York, v. 21, n. 5, p. 367-368, mai. 2001.

STYSLO-ZALASIK, M.; LI, W. Determination of topiramate and its degradation product in liquid oral solutions by high performance liquid chromatography with a chemoluminescent nitrogen detector. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 529-534, mar. 2005.

THE UNITED States Pharmacopeia 34. National Formulary 29. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2011. v. 3. p. 4470-4474.

XIANG, X.; KO, C.Y.; GUH, H.Y. Ion-exchange chromatography / electrospray mass spectrometry for the identification of organic and inorganic species in topiramate tablets. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, n. 21, p. 3726-3731, nov. 1996.

YEUNG, S.; FERRIE, C.D.; MURDOCH-EATON, D.G.; LIVINGSTON, J.H. Topiramate for drug-resistant epilepsies. **European Journal of Paediatric Neurology**, London, v. 4, n. 1, p. 31-33, jan. 2000.