

UFSM

Dissertação de Mestrado

**CLORIDRATO DE AMIODARONA – ESTUDO
COMPARATIVO DE METODOLOGIAS DE ANÁLISE
DE MATÉRIA-PRIMA**

Ricardo Chiappa

PPGCTF

Santa Maria, RS – Brasil

2004

**CLORIDRATO DE AMIODARONA – ESTUDO
COMPARATIVO DE METODOLOGIAS DE ANÁLISE
DE MATÉRIA-PRIMA**

por

Ricardo Chiappa

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas**.

PPGCTF

Santa Maria, RS – Brasil

31 de maio de 2004

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas

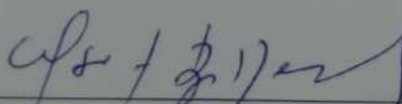
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CLORIDRATO DE AMIODARONA – ESTUDO
COMPARATIVO DE METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE
MATÉRIA-PRIMA**

Elaborada por
Ricardo Chiappa

Como requisito para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

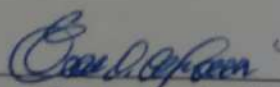
COMISSÃO EXAMINADORA:



Celso Figueiredo Bittencourt
(Presidente/Orientador)



Lenise Arneiro Teixeira



Eduardo Augusto Moreira

Santa Maria, 31 de maio de 2004.

Dedico este trabalho

À minha família, em especial aos meus pais, Wilney e Nilda, pelo apoio, confiança, sacrifício e exemplo de trabalho, humildade e honestidade;

À Débora, pelo amor, paciência e compreensão em todos os momentos de minha vida;

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”.

Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Celso Figueiredo Bittencourt**, pelo exemplo profissional, apoio, confiança, formação e pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, além da orientação e amizade;

À Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira, pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de execução deste trabalho;

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas, pelos conhecimentos adquiridos;

À amiga **Luciane Varini Laporta**, pela convivência amiga, pelo auxílio e colaboração prestada em todas as etapas deste trabalho;

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon Flores**, pela amizade, valiosas contribuições e pela disponibilidade na utilização dos laboratórios do Setor de Química Industrial e Ambiental, durante a elaboração deste trabalho;

Ao Prof. Dr. **Renato Zanella**, pela amizade e valiosas contribuições na determinação por CLAE;

Ao Prof. Dr. **Felipe Dias Lopes**, pela amizade, orientação e auxílio nas determinações estatísticas;

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos do Centro Universitário Franciscano, em especial às amigas **Ana Laura Escarrone e Jane Limberger**, pela amizade, auxílio e colaboração prestada no decorrer deste trabalho;

À amiga **Elaide Minato**, pela disposição, amizade, carinho e incentivo;

Aos amigos e colegas da Farmacopéia Brasileira, pela amizade, paciência e incentivo;

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos, **Marinês J. Souza, Rosecler Kulmann, Carmem Julião e Fernando Luiz Dias**, pela amizade, receptividade e atenção;

Ao amigo e colega **Juliano Barin**, pela amizade e auxílio na padronização deste trabalho;

À **Débora**, pelo amor, compreensão, incentivo e paciência com o mau humor decorrente deste trabalho;

Aos familiares, em especial **Wilney, Nilda, Ronaldo e Márcia**, pelo carinho e compreensão;

A todos aqueles que contribuíram, de uma maneira ou outra, para a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	<i>xii</i>
LISTA DE TABELAS	<i>xiv</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	<i>xvii</i>
RESUMO.....	<i>xix</i>
ABSTRACT.....	<i>xx</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1. Histórico	6
2.2. Eletrofisiologia do ritmo cardíaco normal	7
2.3. Mecanismo das arritmias	10
2.4. Drogas antiarrítmicas	10
2.5. Estrutura química	13
2.6. Mecanismo de ação da amiodarona	14
2.7. Atividade antiarrítmica da amiodarona	14
2.8. Características farmacocinéticas	16
2.9. Toxicidade	18
2.10. Determinação quantitativa	19

2.11. Validação de métodos quantitativos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Materiais	25
3.1.1. Substância química de referência	25
3.1.2. Matéria prima	25
3.1.3. Solventes e reagentes	25
3.1.4. Equipamentos e acessórios	26
3.2. Metodologia.....	27
3.2.1. Análises físico-químicas	27
3.2.1.1. Determinação do pH	27
3.2.1.2. Testes de caracterização da substância química de referência e matéria-prima.....	27
3.2.1.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho	27
3.2.1.2.2. Espectrofotometria na região do ultravioleta	28
3.2.1.2.3. Determinação da faixa de fusão	28
3.2.1.2.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)	28
3.2.2. Análise quantitativa	30
3.2.2.1. Espectrofotometria de absorção no ultravioleta	30
3.2.2.1.1. Construção da curva de Ringbom.....	30
3.2.2.1.2. Preparo da curva padrão	31
3.2.2.1.3. Execução do ensaio	32
3.2.2.1.4. Teste de recuperação	33
3.2.2.1.5. Precisão do método	34
3.2.2.1.6. Limite de detecção.....	34

3.2.2.1.7. Limite de quantificação	35
3.2.2.2. Titulação em meio não-aquoso	36
3.2.2.2.1. Padronização do método utilizando titulação em meio não-aquoso	36
3.2.2.2.2. Obtenção da curva de calibração	36
3.2.2.2.3. Execução do ensaio	37
3.2.2.2.4. Cálculo para a quantificação do cloridrato de amiodarona	37
3.2.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	39
3.2.2.3.1. Procedimentos preliminares	39
3.2.2.3.2. Padronização do método utilizando coluna Supelcosil C18	39
3.2.2.3.2.1. Preparo da solução padrão	40
3.2.2.3.2.2. Preparo da solução amostra	40
3.2.2.3.2.3. Obtenção da curva de calibração	41
3.2.2.3.2.4. Execução do ensaio	42
3.2.2.3.2.5. Teste de recuperação	43
3.2.2.3.2.6. Precisão do método	43
3.2.2.3.2.7. Limite de detecção	44
3.2.2.3.2.8. Limite de quantificação	44
3.2.2.3.2.9. Robustez	45
3.2.2.4. Titulação em meio aquoso	46
3.2.2.4.1. Padronização do método utilizando titulação em meio não-aquoso	46
3.2.2.4.2. Obtenção da curva de calibração	46
3.2.2.4.3. Execução do ensaio	47
3.2.2.4.4. Cálculo para a quantificação do cloridrato de amiodarona	47
3.2.3. Análise comparativa dos métodos propostos	49

4. RESULTADOS	50
4.1 Análise físico-química	50
4.1.1 Determinação do pH.....	50
4.1.2. Testes de caracterização da substância química de referência e matéria-prima.....	51
4.1.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho	51
4.1.2.2. Espectrofotometria na região do ultravioleta	53
4.1.2.3. Determinação da faixa de fusão	54
4.1.2.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)	55
4.2. Análise quantitativa	57
4.2.1. Espectrofotometria de absorção no ultravioleta	57
4.2.1.1. Construção da curva de Ringbom.....	57
4.2.1.2. Preparo da curva padrão	58
4.2.1.3. Execução do ensaio	60
4.2.1.4. Teste de recuperação	61
4.2.1.5. Precisão do método	62
4.2.1.6. Limite de detecção.....	63
4.2.1.7. Limite de quantificação	63
4.2.2 Titulação em meio não-aquoso	64
4.2.2.1. Obtenção da curva de calibração.....	64
4.2.2.2. Execução do ensaio	66
4.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	67
4.2.3.1. Obtenção da curva de calibração	67
4.2.3.2. Execução do ensaio	71

4.2.3.3. Teste de recuperação	73
4.2.3.4. Precisão do método	74
4.2.3.5. Limite de detecção	75
4.2.3.6. Limite de quantificação	75
4.2.3.7. Robustez	76
4.2.4. Titulação em meio aquoso	77
4.2.4.1. Obtenção da curva de calibração	77
4.2.4.2. Execução do ensaio	79
4.3. Análise comparativa dos métodos propostos	80
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 –	O potencial de ação cardíaco. Fases do potencial de ação (registradas numa fibra cardíaca de Purkinje): 0 = despolarização rápida; 1 = repolarização parcial; 2 = platô; 3 = repolarização; 4 = despolarização de marca-passo. O painel inferior mostra as alterações concomitantes na condutância da membrana para os íons Na ⁺ , K ⁺ e Ca ²⁺ (NOBLE, 1975 ³⁸ In RANG <i>et al</i> , 2001 ⁴⁷).....	8
FIGURA 02 –	O potencial de ação cardíaco. Condução do impulso através do coração, com o traçado ECG correspondente. Observe que o maior retardo ocorre no nódulo AV, onde o potencial de ação possui tipicamente uma forma de onda lenta (NOBLE, 1975 ³⁸ In RANG <i>et al</i> , 2001 ⁴⁷).....	9
FIGURA 03 –	Estrutura química do cloridrato de amiodarona.....	13
FIGURA 04 –	Semelhança estrutural entre as moléculas de quinidina, procainamida e lidocaína. Os antiarrítmicos amiodarona e aprindina apresentam a mesma fórmula geral da procainamida.....	14
FIGURA 05 –	Espectro na região do infravermelho do cloridrato de amiodarona substância química de referência.....	51
FIGURA 06 –	Espectro na região do infravermelho do cloridrato de amiodarona matéria-prima.....	52
FIGURA 07 –	Espectro de absorção, na região do ultravioleta, da solução de cloridrato de amiodarona padrão a 8 µg/ml em metanol.....	53
FIGURA 08 –	Espectro de absorção, na região do ultravioleta, da solução de cloridrato de amiodarona matéria-prima a 8 µg/ml em metanol.....	53
FIGURA 09 –	Espectro de absorção, na região do ultravioleta, da solução de cloridrato de amiodarona matéria-prima sobreposta à solução de cloridrato de amiodarona padrão a 8 µg/ml em metanol.....	54
FIGURA 10 –	Análise cromatográfica de cloridrato de amiodarona. Fase fixa: sílica gel GF ₂₅₄ , fase móvel: ácido fórmico, metanol e cloreto de metileno (5:10:85) (V/V).1: cloridrato de amiodarona matéria-prima 100 mg/ml; 2: cloridrato de amiodarona matéria-prima 5 mg/ml; 3: cloridrato de amiodarona padrão 5 mg/ml; 4: cloridrato de amiodarona matéria-prima 0,5 mg/ml; 5: cloridrato de amiodarona matéria-prima	

	0,25 mg/ml; 6: cloridrato de (2-cloroetil)dietilamina 0,2 mg/ml.....	56
FIGURA 11 –	Curva de Ringbom para o cloridrato de amiodarona.....	58
FIGURA 12 –	Representação gráfica da curva padrão de cloridrato de amiodarona, obtida através de espectrofotometria a 242 nm.....	59
FIGURA 13 –	Representação gráfica da curva de calibração de cloridrato de amiodarona obtida através de titulação em meio não-aquoso, e sua respectiva equação da reta.....	65
FIGURA 14 –	Representação gráfica da curva de calibração de cloridrato de amiodarona, obtida através de CLAE, e sua respectiva equação da reta.	68
FIGURA 15 –	Cromatograma obtido na curva padrão do cloridrato de amiodarona, pelo método de CLAE, na concentração de 2,5 µg/ml.....	69
FIGURA 16 –	Cromatograma obtido na curva padrão do cloridrato de amiodarona, pelo método de CLAE, na concentração de 3,75 µg/ml.....	69
FIGURA 17 –	Cromatograma obtido na curva padrão do cloridrato de amiodarona, pelo método de CLAE, na concentração de 5,0 µg/ml.....	70
FIGURA 18 –	Cromatograma obtido na curva padrão do cloridrato de amiodarona, pelo método de CLAE, na concentração de 6,25 µg/ml.....	70
FIGURA 19 –	Cromatograma obtido na curva padrão do cloridrato de amiodarona, pelo método de CLAE, na concentração de 7,5 µg/ml.....	71
FIGURA 20 –	Cromatograma obtido no doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, pelo método de CLAE, na concentração de 5,0 µg/ml....	73
FIGURA 21 –	Representação gráfica da curva de calibração de cloridrato de amiodarona obtida através de titulação em meio aquoso, e sua respectiva equação da reta.....	78
FIGURA 22 –	Representação gráfica da análise comparativa das médias e desvio padrões encontrados nos diferentes métodos. Método A: espectrofotometria de absorção no ultravioleta; Método B: titulação em meio não-aquoso; Método C: cromatografia líquida de alta eficiência; Método D: titulação em meio aquoso.....	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Classificação de Vaughan – Williams (VAUGHAN, 1970).....	11
TABELA 02 – Publicações que relatam a determinação de amiodarona em fluídos biológicos.....	20
TABELA 03 – Descrição das soluções utilizadas na CCD.....	29
TABELA 04 – Volumes e concentrações de cloridrato de amiodarona utilizados na construção da curva de Ringbom.....	31
TABELA 05 – Volumes e concentrações de cloridrato de amiodarona utilizados na construção da curva padrão.....	32
TABELA 06 – Preparo das soluções utilizadas para o teste de recuperação de cloridrato de amiodarona, matéria-prima, utilizando espectrofotometria UV.....	33
TABELA 07 – Condições utilizadas na determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por titulação em meio não-aquoso.....	36
TABELA 08 – Curva de calibração utilizada para determinação do cloridrato de amiodarona por meio de titulação em meio não-aquoso.....	37
TABELA 09 – Sistemas avaliados para a quantificação do cloridrato de amiodarona e suas impurezas.....	39
TABELA 10 – Condições cromatográficas utilizadas na determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por CLAE utilizando coluna Supelcosil C18.....	40
TABELA 11 – Concentrações finais da solução padrão para obtenção da curva de calibração utilizada para determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima.....	41
TABELA 12 – Preparo das soluções utilizadas para o teste de recuperação do cloridrato de amiodarona, matéria-prima, utilizando CLAE.....	43
TABELA 13 – Condições utilizadas na determinação de cloridrato de amiodarona	

	matéria-prima, por titulação em meio aquoso.....	46
TABELA 14 –	Curva de calibração utilizada para determinação do cloridrato de amiodarona através de titulação em meio aquoso.....	47
TABELA 15 –	Métodos analíticos empregados na quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima.....	49
TABELA 16 –	Valores de Rf e Rx obtidos para cloridrato de amiodarona padrão e matéria-prima.....	55
TABELA 17 –	Valores médios obtidos, expressos em absorbâncias, para construção da curva de Ringbom na determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, através do método espectrofotométrico no comprimento de onda de 242 nm.....	57
TABELA 18 –	Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão de cloridrato de amiodarona, através do método espectrofotométrico a 242 nm.....	58
TABELA 19 –	Análise estatística (ANOVA) das absorbâncias obtidas na determinação da curva padrão do cloridrato de amiodarona.....	60
TABELA 20 –	Valores experimentais obtidos para o doseamento de cloridrato de amiodarona matéria-prima, através de espectrofotometria no UV.....	61
TABELA 21 –	Valores experimentais obtidos no teste de recuperação, realizado em amostras de cloridrato de amiodarona, através do método espectrofotométrico a 242 nm.....	61
TABELA 22 –	Valores experimentais obtidos no teste de precisão do método por espectrofotometria no UV, para o doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por diferentes analistas.....	62
TABELA 23 –	Valores experimentais obtidos no teste de precisão do método por espectrofotometria no UV, para o doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, em diferentes dias.....	63
TABELA 24 –	Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão de cloridrato de amiodarona, através do método volumétrico em meio não-aquoso.....	64
TABELA 25 –	Análise estatística (ANOVA) das diferenças de volume obtidas na determinação da curva padrão do cloridrato de amiodarona.....	65
TABELA 26 –	Valores experimentais obtidos para o doseamento de cloridrato de amiodarona matéria-prima, por meio de titulação em meio não-aquoso..	66

TABELA 27 –	Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão de cloridrato de amiodarona, através da CLAE.....	67
TABELA 28 –	Análise estatística (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva de calibração de cloridrato de amiodarona através de CLAE.....	68
TABELA 29 –	Valores experimentais obtidos para o doseamento de cloridrato de amiodarona matéria-prima, através de CLAE.....	72
TABELA 30 –	Valores experimentais obtidos no teste de recuperação, realizado em amostras de cloridrato de amiodarona, através da CLAE.....	73
TABELA 31 –	Valores experimentais obtidos no teste de precisão do método por CLAE, para o doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por diferentes analistas.....	74
TABELA 32 –	Valores experimentais obtidos no teste de precisão do método por CLAE, para o doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, em diferentes dias.....	75
TABELA 33 –	Valores experimentais obtidos e alterações sofridas durante a quantificação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, na avaliação da robustez do método.....	76
TABELA 34 –	Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão de cloridrato de amiodarona, através do método volumétrico em meio aquoso.....	77
TABELA 35 –	Análise estatística (ANOVA) das diferenças de volume obtidas na determinação da curva padrão do cloridrato de amiodarona.....	78
TABELA 36 –	Valores experimentais obtidos para o doseamento de cloridrato de amiodarona matéria-prima, através de titulação em meio aquoso.....	79
TABELA 37 –	Métodos analíticos analisados comparativamente para a quantificação de cloridrato de amiodarona matéria-prima.....	80
TABELA 38 –	Análise estatística (ANOVA) entre os métodos estudados para a quantificação do cloridrato de amiodarona.....	80
TABELA 39 –	Análise comparativa das médias e desvio padrões encontrados nos diferentes métodos.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
AV	Átrio-ventricular
°C	Graus centígrados
C ₁₈	Octadecilsilano
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPRFB	Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira
CV %	Coefficiente de variação percentual
DPA	Duração do potencial de ação
D.p.	Desvio padrão
ECG	Eletrocardiograma
EDQM	European Directorate for Quality of Medicines
f.e.m.	Força eletromotriz
gl	Graus de liberdade
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mg	Miligrama
mg/dia	Miligrama / dia
mg/kg	Miligrama / kilograma
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mg/minuto	Miligrama / minuto
nm	Nanômetros
PWG	Pharmacopeial Working Group
SA	Sino-atrial

TDM	Taxa máxima de despolarização
PRE	Período refratário efetivo
T ₃	Tri-iodotironina
T ₄	Tiroxina
UV	Ultravioleta
USP 27	The United States Pharmacopeia 27
r	Coefficiente de correlação de Pearson
Rf	Fator de retenção
OMS	Organização Mundial da Saúde
p/V	Peso / volume
µg/ml	Micrograma / mililitro
µM	Micromêtros

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CLORIDRATO DE AMIODARONA – ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE MATÉRIA-PRIMA

Autor: Ricardo Chiappa
Orientador: Prof. Dr. Celso Figueiredo Bittencourt
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de maio de 2004

Tendo em vista a descrição em códigos oficiais, unicamente, da titulação volumétrica em meio aquoso para a determinação do cloridrato de amiodarona, o propósito do autor do presente trabalho foi estudar as diferentes metodologias encontradas na literatura com a finalidade de determinar essa substância em outros tipos de amostras e desenvolvê-las de maneira a permitir seu emprego na identificação e determinação quantitativa da substância em estudo, bem como, fornecer subsídios em forma de métodos de análise para serem incorporados à Farmacopéia Brasileira.

Em consonância com o propósito todas metodologias foram estudadas, modificadas e validadas em conformidade com as normas internacionais. Os métodos desenvolvidos apresentaram linearidade, precisão e exatidão, bem como, mostraram-se equivalentes quando submetidos a estudos estatísticos por meio de análise de variância, pelo que são propostos para serem oficializados pela Farmacopéia Brasileira.

ABSTRACT

AMIODARONE CHLORIDRATE: A COMPARATIVE STUDY OF THE METHODOLOGIES OF RAW MATERIAL ANALYSIS

Author: Ricardo Chiappa

Advisor: Ph.D. Celso Figueiredo Bittencourt

Local and Date: Santa Maria, 31 May, 2004

The purpose of the author of the present work was to study the differences among the methodologies found in the literature taking into account only the description in the official codes of the volumetric titulation in acquous means to the determination of amiodarone chloridrate. The objective was to determine this substance in other types of samples and develop them in order to allow their employment in the identification and quantitative determination of the substance in study, as well as to provide subsidies in the form of methods of analysis to be incorporated in the Brazilian Pharmacopoeia.

All the methodologies were studied, modified and validated according to the international norms. The methods developed presented linearity, precision and accuracy. They also showed equivalence when submitted to statistics studies, by means of variance analysis, according to the proposed to be officialized by the Brazilian Pharmacopoeia.

1. INTRODUÇÃO

Relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 1997 revelam que as doenças cardiovasculares foram responsáveis por cerca de 30 % de todas as mortes que ocorreram no mundo, o que corresponde a quase 15 milhões de óbitos por ano, sendo que a maioria (9 milhões) é proveniente dos países em desenvolvimento ⁷.

O desenvolvimento de fármacos, capazes de reverterem esta estatística, compõe-se, atualmente, em um esforço concentrado da indústria farmacêutica mundial.

Dentre as doenças cardiovasculares, a arritmia é uma das anomalias mais freqüentes do funcionamento cardíaco, decorrente da geração ou condução de impulsos elétricos irregulares ou defeituosos.

Os primeiros estudos da amiodarona exploravam seu efeito antianginoso, porém, foi logo evidenciada sua potente ação antiarrítmica, que a faz ocupar posição de destaque na terapia destas etiologias.

A amiodarona é um derivado benzofurânico de estrutura química semelhante a tiroxina, possuindo dois átomos de iodo em sua molécula, apresentando na forma de cloridrato peso molecular de 681,8 g.

A amiodarona foi sintetizada, em 1963, por Tondeur & Binon, sendo detentores da patente de número 1,339,389 ⁵⁵.

⁷ BRANDÃO, A. P. *Revista Brasileira de Cardiologia*, v. 2, n. 5, (2000) p. 181-183.

⁵⁵ THE MERCK INDEX, Merck, Rahway, 1997.

O principal metabólito da amiodarona é a desetilamiodarona, que possui efeitos terapêuticos similares aos da droga principal, sua concentração pode se aproximar a do fármaco, durante terapias longas complementando as atividades terapêuticas²⁴.

A grande vantagem da amiodarona sobre outros antiarrítmicos é que este fármaco possui ação terapêutica longa, em razão de sua meia-vida variar de 30 a 120 dias, o que permite uma única dose diária¹⁹. De acordo com SINGH *et al*, em 1989⁵², a substância atinge concentrações plasmáticas da ordem de 0.5 a 2.5 mg/l, existindo relação linear entre as doses orais de amiodarona e as concentrações do fármaco no plasma e no tecido cardíaco. Essas concentrações, ainda que proporcionais em indivíduos, variam significativamente quando as mesmas doses são administradas em diferentes pacientes.

Os agentes antiarrítmicos são fármacos empregados no tratamento de distúrbios no ritmo e velocidade dos batimentos cardíacos. Entende-se por arritmia uma anormalidade na iniciação ou propagação dos estímulos cardíacos³⁰.

Em 1970 foi proposta classificação das drogas antiarrítmicas por seus efeitos eletrofisiológicos (classificação de Vaughan-Willians). A saber: **Classe I**: drogas que bloqueiam os canais de sódio sensíveis à voltagem. São subdivididas em: Ia, Ib e Ic. **Classe II**: antagonistas dos receptores β -adrenérgicos. **Classe III**: drogas que prolongam o potencial da ação cardíaca, aumentando assim o período refratário e suprimindo a atividade de reentrada. **Classe IV**: antagonistas do cálcio⁴⁷.

A amiodarona é classificada como antiarrítmico de classe III.

É recomendada sua utilização no tratamento de arritmias ventriculares, taquicardia paroxística supraventricular, fibrilação e “flutter” atrial. A amiodarona relaxa a musculatura lisa e diminui a resistência coronária e vascular periférica. Além disso, provoca bradicardia

²⁴ KANNAN, R., NADEMANEE, K., HENDRICKSON, J. A. *et al. Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 31 (1982) p. 438-452.

¹⁹ HOLT, D. W., TUCKER, G. T., JACKSON, P. R. *et al. American Heart Journal*, 106 (1983) p. 840.

⁵² SINGH, B., VENKATESH, N., NADEMANEE, K. *et al. Progress in Cardiovascular Diseases*, (1989) p. 249-280.

³⁰ KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J. H. Química Farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1988).

⁴⁷ RANG, H.P., DALE, M. M., RITTER, J. M. Farmacologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2001).

sinusal e exerce ações antiadrenérgicas não-competitivas que, provavelmente, não são mediadas pela inibição direta dos receptores adrenérgicos ³⁴.

A amiodarona possui ações antiadrenérgicas, antiarrítmicas e antianginosas. Deprime as funções sinusais, atriais e do nódulo AV porque prolonga o tempo de condução e o tempo de recuperação do nó sinusal, aumentando o período refratário dos átrios, do nódulo AV e do sistema específico de condução. Seus efeitos hemodinâmicos incluem bradicardia, redução da resistência vascular coronariana e periférica, além do débito cardíaco ³⁷.

A amiodarona é um fármaco único pelo fato de somar sua ação sobre o potencial de ação da fibra cardíaca à indução do relaxamento da musculatura lisa arterial e à ação frenadora sobre os alfa e beta-receptores. É capaz, portanto, de suprimir arritmias, aumentar o fluxo sanguíneo coronariano e reduzir o consumo miocárdico de oxigênio. Nas doses recomendadas, não altera a contratilidade do miocárdio e não exerce ação hipotensora ³⁵.

Os efeitos adversos conhecidos da amiodarona incluem hipertireoidismo e hipotireoidismo ⁵¹, fibrose pulmonar ⁴⁵, bem como toxicidade cutânea, neurológica e gastrointestinal. ^{18, 41} Alguns destes efeitos colaterais são dose-dependentes, o que enfatiza a necessidade de aplicação de dose efetiva menor e de monitoramento do tratamento.

Para a análise da amiodarona, encontram-se descritas na literatura diversas metodologias, sendo que a maior parte delas tem como objetivo a determinação da substância em estudo em fluidos biológicos. Na literatura consultada, encontramos publicações determinando o cloridrato de amiodarona, com o uso de HPLC, em plasma e soro ¹⁴, somente em plasma ^{12, 33, 17}, em plasma e urina ⁴³ e em soro ^{3, 67}. Utilizando a cromatografia em

³⁴ MASON, J. W. *New England Journal of Medicine*, (1993) p. 329-452.

³⁷ MOSTOW, N. D., VROBEL, T. R., NOON, D. *et al. Circulation*, 73 (1986).

³⁵ MASON, J.W. *New England Journal of Medicine*, (1987) p. 316-455.

⁵¹ SINGH, B. N., NADEMANEE, K. *American Heart Journal*, (1983) p. 857-868.

⁴⁵ RAKITA, L., MOSTOW, N. D., NOON, D. L. *et al. Journal of Chromatography*, 277 (1983) p. 229-237.

¹⁸ HEGER, J. J., PRYSTOWSKY, E. N., ZIPES, D. P. *American Heart Journal*, 106 (1983) p. 931.

⁴¹ PETER, T., HAMER, A., MANDEL, W. J. *et al. American Heart Journal* 106 (1983) p. 943.

¹⁴ FLANAGAN, R. J., STOREY, G. C. A., HOLT, D. W. *Journal of Chromatography*, 187 (1980) p. 391-398.

¹² FAILLER, J. M., FARINOTTI, R., DAUPHIN, A. *Journal de Pharmacie Clinique*, 4 (1985) p. 415-421.

camada delgada encontramos a publicação de XIA *et al.*, em 1986⁶⁴, que determinou o cloridrato de amiodarona presente no soro.

Foi encontrado número menor de publicações descrevendo métodos para a determinação quantitativa da amiodarona, quer como matéria-prima, ou em forma de especialidades farmacêuticas. A espectrofotometria de absorção no ultravioleta foi empregada por PIETRA *et al.*, em 1988⁴², a determinação potenciométrica foi utilizada por RALUCA *et al.*, 1996⁴⁶ e por KRAMER *et al.*, em 1998³¹, HPLC foi utilizado para determinar o fármaco por VIO & MANOLO, em 1988⁵⁹ e por GUMIENICZEK *et al.*, em 1994¹⁶.

Embora comercializado em muitos países, desde a década de 70, não existe consenso na metodologia proposta por empresas e órgãos oficiais de controle de qualidade em relação aos métodos utilizados na análise quantitativa do cloridrato de amiodarona, como matéria-prima ou produto acabado.

Em nosso meio, indústria farmacêutica de relevância internacional recomenda a espectrofotometria no ultravioleta e a volumetria em meio não-aquoso para a determinação quantitativa da matéria-prima cloridrato de amiodarona. O Brasil, até o momento, não possui metodologia oficial para a quantificação dessa substância medicamentosa. A Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira (CPRFB), 4ª edição, submeteu, recentemente, à Consulta Pública as mesmas metodologias. A Farmacopéia Européia, em sua 4ª edição¹¹ preconiza a volumetria em meio aquoso para a determinação do fármaco. A Farmacopéia Americana, em estudos colaborativos para comporem a futura Farmacopéia da

³³ MAMOLO, M. G., VIO, L., FURLAN, G. *Farmaco*, 47 (1992) p. 1067-1080.

¹⁷ HA, H. R., KOZLIK, P., STIEGER, B. *et al. Journal of Chromatography B*, 15 (2001) p. 309-324.

⁴³ PLOMP, T. A., ENGELS, M., DE MEDINA, E. O. R. *et al. Journal of Chromatography*, 273 (1983) p. 379-392

³ ARRANZ, M. I., MORO, C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7 (1989) p. 1909-1914.

⁶⁷ ZAPATA, V., VALENCIA, M., BIDER, A. *et al. Acta Científica Venezolana*, 51 (2000) p. 53-60.

⁶⁴ XIA, S. H., YUAN, Y. S., LI, L. *et al. Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 6 (1986) p. 433-436.

⁴² PIETRA, A. M., CAVRINI, V., GATTI, R. *et al. Pharmaceutical Research*, 5 (1988).

⁴⁶ RALUCA, I. S., HASSAN, Y. A., BAIULESCU, G. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 37 (1996) p. 141-144.

³¹ KRAMER, S. D., GAUTIER, J. C., SAUDEMONT, P. *Pharmaceutical Research*, 15 (1998) p. 1310-1313.

⁵⁹ VIO, L., MAMOLO, M. G. *Il Farmaco*, 43 (1988) p. 365-372.

¹⁶ GUMIENICZEK, A., MISZTAL, G., PRZYBOROWSKI, L. *Acta Polonica Pharmaceutica*, 51 (1994).

¹¹ EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4. ed. Council of Europe, Strasbourg, 2004.

Américas, através do programa Pharmacopeial Working Group (PWG), sob os auspícios da Organização Pan-americana da Saúde, propôs em 2003 a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência para a mesma determinação.

Conforme SWARTZ & KRULL, 1998 ⁵⁴, um processo de validação bem definido e documentado oferece às autoridades em vigilância sanitária, evidências de que uma metodologia é adequada ao uso analítico.

O presente trabalho tem por objetivo o estudo comparativo entre as principais metodologias descritas na literatura para a determinação qualitativa e quantitativa do cloridrato de amiodarona - matéria-prima -, verificar suas validações e apresentar sugestão de nova metodologia para a Farmacopéia Brasileira.

⁵⁴ SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. *Pharmaceutical Technology*, v. 2, n. 3 (1998) p. 12–20.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

As doenças cardiovasculares são a principal *causa mortis* nos países desenvolvidos. Este grupo de moléstias compreende as doenças coronárias e as doenças dos vasos sanguíneos e linfáticos.

O emprego dos extratos de plantas contendo glicosídeos cardíacos já estava descrito no Papiro de Ebers, há 2000 anos a.C. A *Scilla marítima* (cila) era empregada pelos romanos como tônico cardíaco e diurético. Em 1785, o botânico William Withering publicou um tratado onde preconizava o uso da *digitalis* no tratamento de determinadas formas de hidropisia. Em 1799, John Ferriar atribuiu ação cardíaca à plantas contendo substâncias digitálicas. Em 1835, Homolle preparou extrato purificado de folhas de *Digitalis purpurea*. Em 1872, Fraser atribuiu natureza glicosídica aos princípios ativos dos extratos digitálicos. Em 1875, Schiedeberg isolou a digitoxina a partir da *Digitalis purpúrea*³⁰.

Em 1853, Pasteur extraiu a quinidina da casca da quina (*Cinchona* sp), a qual foi considerada útil no tratamento de arritmias cardíacas por Frey, no ano de 1918³⁰.

Em 1936, Mautz relatou que o cloridrato de procaína aplicado, topicamente, elevava o limiar da resposta do músculo ventricular ao estímulo elétrico. Em 1951, a substituição da função éster da procaína por função amídica resultou na procainamida, que possui ação prolongada por ser resistente às estearases¹⁰.

³⁰ KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J. H. Química Farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1988).

¹⁰ DONOSO, E. Drugs in Cardiology, 2 parts, Thieme, Stuttgart (1975).

Em 1963, Stock e Dale observaram que agentes bloqueadores beta-adrenérgicos possuíam atividade antiarrítmica. Essa descoberta levou à procura de fármacos em diferentes classes químicas e gerou a síntese de diversos agentes antiarrítmicos ¹⁰.

Assim, o uso da amiodarona na terapêutica foi iniciado na Europa, em 1967, quando era explorado seu efeito antianginoso. Porém, em seguida foi evidenciada sua ação antiarrítmica e o fármaco passou, rapidamente, a ser usado para essa finalidade ⁵.

2.2 Eletrofisiologia do ritmo cardíaco normal

O coração é um órgão composto de fibras musculares dotadas de contratilidade e que possui, também, um sistema de células e fibras especializadas em gerar e conduzir impulso elétrico, de modo rítmico, que deflagra a função mecânica da bomba cardíaca ⁵⁰.

A função marca-passo permite ao coração a auto-excitação e ritmicidade que lhe são peculiares. As fibras de resposta lenta, do nó sinoatrial, lideram esse mecanismo; as de resposta rápida o executam, mas em nível bem inferior. O registro dessa função é visível na fase 4, na forma de uma ascensão gradual da curva designada como despolarização diastólica inferior. Esta despolarização se deve, aparentemente, a entrada gradual de Na^+ , no contexto da desativação da saída do K^+ , tendo como condições subjacentes e contínuas uma outra corrente de saída do K^+ e outras de entrada de Na^+ e Ca^{2+} . No ponto em que esta ativação gradual alcança o limiar de excitabilidade da fibra, imediatamente, sobrevém a despolarização total e a propagação deste impulso para diante ⁵⁰.

Os miócitos cardíacos devem sua excitabilidade elétrica a um aumento transitório na permeabilidade da membrana ao Na^+ e/ou Ca^{2+} em resposta a uma despolarização da membrana, resultando em correntes que se dirigem para dentro das células. Ocorre repolarização em consequência de um aumento tardio na permeabilidade ao K^+ , resultando numa corrente para fora de K^+ , possivelmente favorecida pelo movimento do Cl^- para o

⁵ AVERY, G. S. Cardiovascular Drugs, 2 vols., University Park Press, Baltimore (1978).

⁵⁰ SILVA, P. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2002).

interior das células. Os canais de Na^+ e Ca^{2+} são proteínas heteromultiméricas, nas quais as subunidades α e α_1 (grandes proteínas tetraméricas) formam os canais seletivos de íons Na^+ e Ca^{2+} , respectivamente voltagem-dependente. Os aspectos eletrofisiológicos do músculo cardíaco que o distinguem de outros tecidos excitáveis incluem: o ritmo intrínseco espontâneo gerado por células especializadas dos nódulos sinoatrial (SA) e atrioventricular (AV), isto é, atividade marca-passo; a inexistência da corrente rápida de Na^+ nos nódulos SA e AV; a corrente lenta de Ca^{2+} para o interior da célula que é responsável pelo desencadeamento e pela propagação do potencial de ação nessas regiões; a longa duração do potencial de ação e o período refratário prolongado e, também, o grande influxo de Ca^{2+} durante o platô do potencial de ação^{25, 47}. Conforme Figuras 01 e 02.

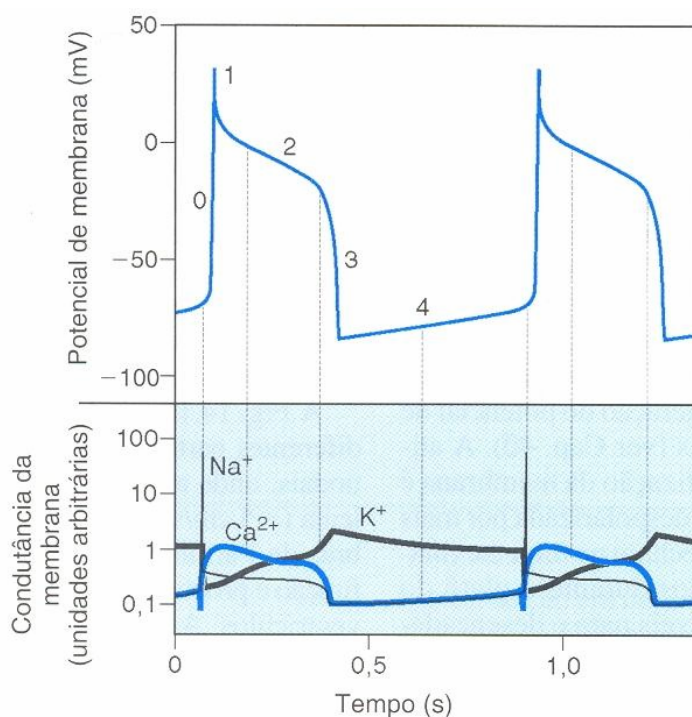


FIGURA 01 - O potencial de ação cardíaco. Fases do potencial de ação (registradas numa fibra cardíaca de Purkinje): 0 = despolarização rápida; 1 = repolarização parcial; 2 = platô; 3 = repolarização; 4 = despolarização de marca-passo. O painel inferior mostra as alterações concomitantes na condutância da membrana para os íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (NOBLE, 1975³⁸ In RANG *et al*, 2001⁴⁷).

²⁵ KATZ, A. M. *New England Journal of Medicine*, 328 (1993) p. 1244-1251.

⁴⁷ RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. *Farmacologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2001).

³⁸ NOBLE, J. P., LAMBERT, D., JUSTRABO, E. *et al. Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie*, 102 (1975) p. 277-286.

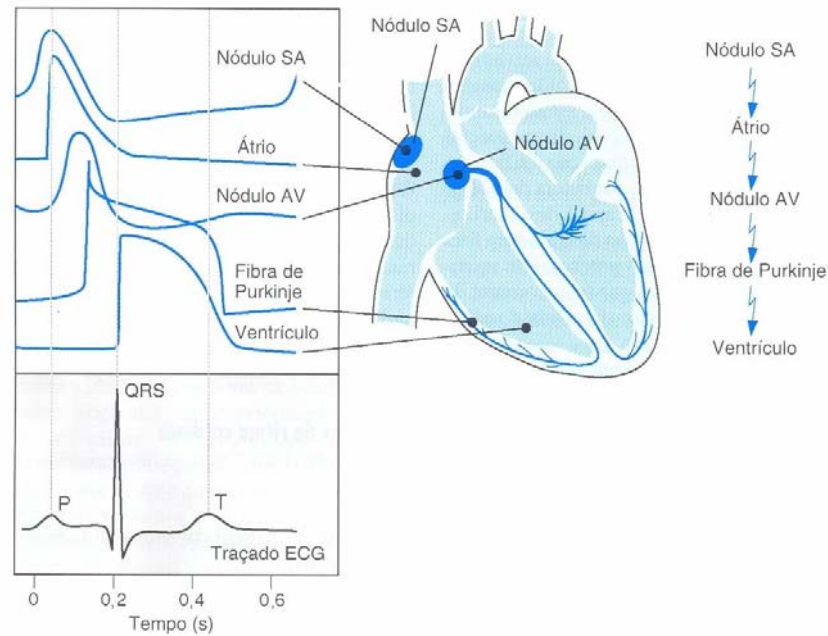


FIGURA 02 - O potencial de ação cardíaco. Condução do impulso através do coração, com o traçado ECG correspondente. Observe que o maior retardo ocorre no nódulo AV, onde o potencial de ação possui tipicamente uma forma de onda lenta (NOBLE, 1975³⁸ In RANG *et al*, 2001⁴⁷).

O impulso elétrico que desencadeia uma contração cardíaca normal origina-se a intervalos regulares no nodo sinoatrial, habitualmente numa frequência de 60 – 100 batimentos por minuto. Esse impulso dissemina-se rapidamente pelos átrios e penetra no nodo atrioventricular, que normalmente constitui a única via de condução entre os átrios e os ventrículos. A condução através do nodo atrioventricular é lenta, levando cerca de 0,15 segundos (essa demora dá tempo suficiente para que a contração atrial bombeie sangue para os ventrículos). A seguir, o impulso propaga-se pelo sistema de His-Purkinje e invade todas as partes dos ventrículos. A ativação ventricular torna-se completa em menos de 0,1 segundos, por conseguinte, a contração de todo o músculo ventricular é sincrônica e hemodinamicamente eficaz. O potencial transmembrana das células cardíacas é determinado

³⁸ NOBLE, J. P., LAMBERT, D., JUSTRABO, E. *et al*. *Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie*, 102 (1975) p. 277-286.

⁴⁷ RANG, H.P., DALE, M. M., RITTER, J. M. *Farmacologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2001).

pelas concentrações dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} em ambos os lados da membrana, bem como pela permeabilidade da membrana a cada íon. Esses íons hidrossolúveis são incapazes de sofrer difusão livre através da membrana celular lipídica em resposta a gradientes elétricos e de concentração; para que ocorra difusão, eles necessitam de canais aquosos (proteínas específicas formadoras de poros). Portanto, os íons atravessam as membranas celulares em resposta a seus gradientes, apenas em momentos específicos do ciclo cardíaco, quando esses canais iônicos estão abertos. Os movimentos desses íons produzem correntes que formam a base do potencial de ação cardíaca²⁰.

2.3 Mecanismo das arritmias

Muitos fatores podem desencadear ou aumentar as arritmias cardíacas: isquemia, hipóxia, acidose ou alcalose, anormalidades eletrolíticas, exposição excessiva a catecolaminas, influências autônomas, toxicidade farmacológica, estiramento excessivo das fibras cardíacas e presença de tecido cicatricial ou mórbido. Entretanto, todas as arritmias decorrem de distúrbios na formação e na condução dos impulsos, ou em ambos²⁶.

Do ponto de vista clínico, os distúrbios do ritmo cardíaco são classificados de acordo com o local de origem da anormalidade (atrial, juncional ou ventricular) ou pelo aumento ou redução da frequência (taquicardia e bradicardia, respectivamente). Quatro mecanismos fisiológicos básicos estão na origem dos distúrbios do ritmo cardíaco: pós-despolarização tardia – devido a uma corrente orientada para o interior da célula, associada a uma elevação anormal de Ca^{2+} ; reentrada – quando partes do miocárdio estão despolarizadas e a condução depende da “resposta lenta” mediada pelo Ca^+ ; atividade de marca-passo normal – estimulada pela atividade simpática e bloqueio cardíaco – quando há lesão no nódulo AV ou do sistema de condução ventricular^{49, 47}.

²⁰ HONDEGHEM, L. M., KATZUNG, B. G. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, (1984) p. 24-387.

²⁶ KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2003).

⁴⁹ RUSKIN, J. N. *New England Journal of Medicine*, 321 (1989) p. 386-388.

⁴⁷ RANG, H.P., DALE, M. M., RITTER, J. M. *Farmacologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2001).

2.4 Drogas antiarrítmicas

Os agentes antiarrítmicos são fármacos empregados no tratamento de distúrbios no ritmo e velocidade dos batimentos cardíacos. Entende-se por arritmia uma anormalidade na iniciação ou propagação dos estímulos cardíacos ³⁰.

Os antiarrítmicos são classificados de acordo com seus efeitos específicos na condutância iônica conforme propôs Vaughan-Williams em 1970 ⁵⁸, o que pode ser visualizado na Tabela 01.

TABELA 01 - Classificação de Vaughan – Williams ⁵⁸.

Classe	Exemplos	Mecanismo	Efeitos cardíacos*				
			TMD	DPA	PRE	Condução AV	Contratilidade
Ia	Quinidina	Bloqueio dos canais de Na	↓↓	↑	↑	↓↓	↓
	Procainamida		↓↓	↑	↑	↓↓	↓
	Disopiramida		↓↓	↑	↑	↓↓	↓↓
Ib	Lidocaína	Bloqueio dos canais de Na (dissociação rápida)	↓	↓	↑↑	-	-
Ic	Flecainida	Bloqueio dos canais de Na (dissociação lenta)	↓↓↓	-	-	↓↓	↓↓
II	Propranolol	Antagonismo dos receptores β-adrenérgicos	-	-	-	↓	↓↓
III	Amiodarona	Aumento da duração do PA	-	↑↑↑	↑↑↑	↓	-
	Sotalol		-	↑↑↑	↑↑↑	↓	↓↓
IV	Verapamil	Bloqueio do canal de Ca	-	↓↓	-	↓↓	↓↓↓

*TMD: taxa máxima de despolarização; DPA: duração do potencial de ação; PRE: período refratário efetivo

Classes de antiarrítmicos, conforme Vaughan-Williams ^{57, 61, 47}.

Classe I: fármacos que bloqueiam os canais de sódio sensíveis à voltagem. Sua ação inibe a propagação do potencial de ação em muitas células excitáveis reduzindo assim

³⁰ KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J. H. Química farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1988).

⁵⁸ VAUGHAN WILLIAMS, E. M. Classification of antiarrhythmic drugs. In Symposium on cardiac arrhythmias. Astra, Elsinore, Denmark, (1970) p. 449-472.

⁵⁷ VAUGHAN WILLIAMS, E. M. Antiarrhythmic drugs: Handbook of experimental pharmacology. Springer-Verlag, Berlin, vol. 89 (1989).

⁶¹ WALDO, A. L., WIT, A. L. *Lancet*, 341 (1993) p. 1189-1193.

⁴⁷ RANG, H.P., DALE, M. M., RITTER, J. M. Farmacologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2001).

a taxa máxima de despolarização durante a fase 0. São subdivididas em Ia, Ib e Ic devido a diferenças funcionais, embora compartilhem o mesmo mecanismo básico de ação.

Classe II: compreendem os antagonistas dos receptores β -adrenérgicos. A condução AV depende fundamentalmente da atividade simpática, e o período refratário do nódulo AV é aumentado por drogas bloqueadoras dos receptores β -adrenérgicos.

Classe III: é baseada no comportamento incomum de alguns fármacos, como a amiodarona. Os componentes dessa classe apresentam atividade antiarrítmica característica de outras classes, o que os incluem na categoria que tem como ação o prolongamento significativo do potencial de ação cardíaca. O mecanismo desse efeito ainda não foi totalmente esclarecido, mas envolve o bloqueio de alguns dos canais de potássio que atuam na repolarização cardíaca.

Classe IV: atuam ao bloquear os canais de cálcio sensíveis à voltagem. As drogas da classe IV diminuem a velocidade de condução nos nódulos SA e AV, onde a propagação do potencial de ação depende da corrente de Ca^{2+} orientada para o interior da célula, lentificando o músculo cardíaco e interrompendo as taquicardias supraventriculares ao produzir bloqueio AV parcial. Reduzem a fase de platô do potencial de ação, bem como a força de contração. A redução da entrada de cálcio diminui a corrente transitória para o interior da célula e, portanto, reduz a pós-despolarização, com conseqüente supressão dos batimentos ectópicos prematuros.

2.5 Estrutura química

Quimicamente, a amiodarona corresponde ao cloridrato de (2-Butil-3-benzofuranil)(4 – (2-(dietilamino)etoxi)3,5-diiodofenil)(metanona), conforme Figura 03.

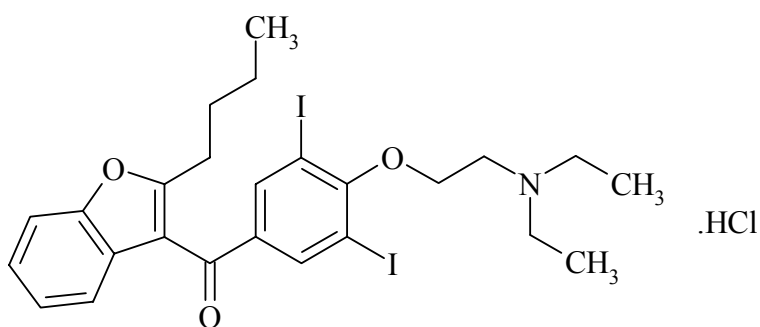


FIGURA 03 – Estrutura química do cloridrato de amiodarona

O cloridrato de amiodarona encontra-se descrito no Merck Index, 1997⁵⁵, com as seguintes especificações:

Nomes genéricos: Cloridrato de amiodarona

Nomes comerciais: Amiodar®, Ancoron®, Angiodarona®, Atlansil®, Cordarex®, Cordarone X®, Miocard®, Miodaron®, Ortacrone®, Ritmocardyl®, Rythmarone® e Trangorex®.

Sigla: L-3428

Fórmula: C₂₅H₂₉I₂NO₃

Peso molecular: 645,32

Composição elementar: C 46,53 %, H 4,53 %, I 39,33 %, N 2,17%, O 7,44%

Categoria: Antiarrítmico

⁵⁵ THE MERCK INDEX, Merck, Rahway, 1997.

2.6 Mecanismo de ação da amiodarona

A amiodarona apresenta estrutura química análoga à quinidina, o que explica os efeitos cardíacos similares. Seu mecanismo de ação resulta de sua ligação à membrana celular miocárdica e, também, a lipídios e lipoproteínas, por meio de seu átomo de nitrogênio protonizado, o que causa um ou mais dos seguintes efeitos: repulsão de cátions, incluindo sódio; espessamento da membrana por hidratação e quelação de íons cálcio. Estas interações corrigem o movimento patológico de íons no miocárdio (reduzindo a entrada de sódio e a saída de potássio através da membrana celular) produzindo efeitos antiarrítmicos que estão correlacionados com o efeito anestésico local ^{10,30}.

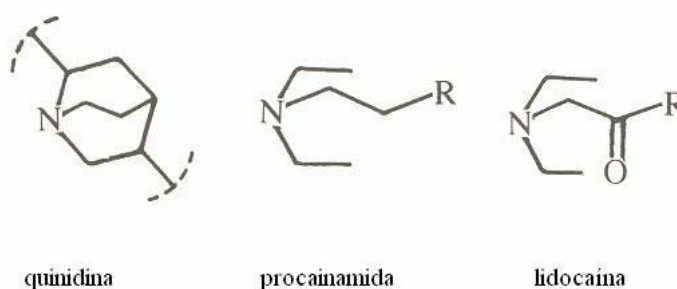


FIGURA 04 - Semelhança estrutural entre as moléculas de quinidina, procainamida e lidocaína. Os antiarrítmicos amiodarona e aprindina apresentam a mesma fórmula geral da procainamida.

2.7 Atividade Antiarrítmica da Amiodarona

A amiodarona possui amplo espectro de ações sobre o coração. Trata-se de um bloqueador muito eficaz dos canais de sódio, entretanto, diferentemente da quinidina, possui baixa afinidade pelos canais ativados, combinando-se quase exclusivamente com canais no estado inativado. Por conseguinte, a ação bloqueadora do sódio da amiodarona é mais pronunciada nos tecidos que apresentam potenciais de ação longos, de ação freqüentes ou

¹⁰ DONOSO, E. *Drugs in Cardiology*, 2 parts, Thieme, Stuttgart (1975).

³⁰ KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J. H. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1988).

potenciais diastólicos menos negativos. Em concentrações terapêuticas, a amiodarona, também, aumenta acentuadamente a duração do potencial de ação da fibra cardíaca. A amiodarona mantém o aumento da duração do potencial de ação em frequências cardíacas rápidas, isto é, carece dos efeitos indesejáveis de outras drogas que prolongam o potencial de ação. Essa é provavelmente uma razão importante para a sua eficácia nas taquicardias. A amiodarona é um agente bloqueador fraco dos canais de cálcio, bem como um inibidor não-competitivo dos receptores beta-adrenérgicos. Foi também constatado que o fármaco atua como potente inibidor da automaticidade anormal. A indução de novas arritmias ventriculares ou o agravamento de arritmias preexistentes, raramente ocorrem durante a terapia com amiodarona. A amiodarona também exerce efeitos antianginosos. Isso pode decorrer de suas propriedades bloqueadoras não competitivas dos receptores alfa e beta-adrenérgicos, bem como de sua capacidade aparente de bloquear o influxo de cálcio no músculo liso vascular ⁶¹,
26.

A amiodarona possui ações antiadrenérgicas, antiarrítmicas e antianginosas. Caracteriza-se por prolongar a duração do potencial de ação, com pouco efeito sobre a fase 0, atuando no miocárdio atrial e ventricular, também retardando o tempo de recuperação do nó sinusal e deprimindo a condução no nó AV. Todo o sistema de condução se torna mais refratário, inclusive as vias acessórias. Seus efeitos hemodinâmicos incluem bradicardia e redução da resistência vascular coronariana e periférica, além de aumento do débito cardíaco. O início da ação da amiodarona ocorre, em geral, após o quinto dia do uso diário de dose de 400 a 600 miligramas via oral. Sendo a administração suspensa, sua eliminação é lenta e aleatória, sendo influenciada pela dose e pelo tempo de uso, podendo essa ação persistir até 30 dias ou mais. Durante sua metabolização, o fármaco elimina iodo, o qual é rapidamente excretado. A parte restante da molécula é metabolizada, principalmente, no fígado, gerando a desetilamiodarona, que é dotada de efeitos similares. O uso endovenoso da amiodarona permite um início mais rápido de sua atividade. Sendo administrada em período de 5 minutos, sua ação pode ocorrer em até 15 minutos, com o desaparecimento rápido da sintomatologia ¹,
50.

⁶¹ WALDO, A. L., WIT, A. L. *Lancet*, 341 (1993) p. 1189-1193

²⁶ KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2003).

¹ ALMEIDA, E. C., GUIMARÃES, A. C., MAGUIRE, J. H. *Tropical Cardiology*, 9 (1983) p. 65-71.

⁵⁰ SILVA, P. *Farmacologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2002).

A amiodarona é um fármaco único pelo fato de somar sua atividade sobre o potencial de ação da fibra cardíaca, à indução do relaxamento da musculatura lisa arterial e à ação frenadora sobre os alfa e beta-receptores. É capaz de suprimir arritmias, aumentar o fluxo sanguíneo coronariano e reduzir o consumo miocárdico de oxigênio. Nas doses recomendadas não altera a contratilidade miocárdica e não é hipotensora ³⁵.

A amiodarona é, predominantemente, um antiarrítmico de Classe III, mas possui efeitos das classes I, II e IV. Em 1977 foi descrita como agente antiarrítmico ideal. Porém, havia um menosprezo clínico em relação à sua absorção variável, a resposta inicial à dosagem de ataque e à sua longa meia-vida. Assim, o emprego do fármaco começou, gradualmente, a perder importância frente à sua toxicidade. Em 1990, com mudanças no esquema terapêutico e maior controle nas doses de manutenção, os efeitos adversos diminuíram e a amiodarona ressurgiu como uma das poucas substâncias medicamentosas efetivas na prevenção e supressão de arritmias ⁴⁴.

A amiodarona é o principal fármaco antiarrítmico. As ações eletrofisiológicas da amiodarona são complexas e não completamente compreendidas. Geralmente é classificada como um agente da Classe III, segundo Vaughan-Williams, ela prolonga a repolarização por inibição de canais externos de potássio. Comparada com muitas outras drogas antiarrítmicas, amiodarona causa poucos efeitos cardiovasculares adversos, porém, sua tolerância global está limitada através de sua considerável toxicidade não-cardíaca ⁴.

2.8 Características farmacocinéticas

É disponível, na forma de cloridrato, para uso oral e parenteral. Sua concentração terapêutica situa-se entre 1 a 2,5 µg/ml, sua taxa de absorção gastrointestinal oscila em 50 % e seu pico plasmático ocorre 3 a 7 horas após a administração de dose oral única ³⁵.

³⁵ MASON, J.W., *New England Journal of Medicine*, (1987) p. 316-455.

⁴⁴ POLLAK, P. T. *Pharmacotherapy*, 18 (1998) p. 121-126.

⁴ AUER, J., BERENT, R., EBER, B. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 3 (2002) p. 1037-1044.

³⁵ MASON, J.W. *New England Journal of Medicine*, (1987) p. 316-455.

A amiodarona sofre um processo cumulativo gradual nos tecidos, especialmente no adiposo e no miocárdio, de onde só se libera lentamente. Isto tem dificultado a abordagem de parâmetros farmacocinéticos. A supressão da arritmia fica evidente após o quinto dia de uso oral, diário de 400 a 600 mg⁵⁰.

A administração da amiodarona é realizada por meio das vias endovenosa e oral.

- Quando a via endovenosa é empregada, são preconizados dois métodos:
 - a) método direto, com administração da dose de 5 mg/kg de peso, que ocasionará ação terapêutica em até 15 minutos, com duração de ação por tempo limitado.
 - b) método prolongado, quando se deseja que a manutenção dos efeitos seja prolongada por tempo maior, pode-se empregar a amiodarona diluída em sangue ou solução fisiológica na concentração de 5 %, com aplicação na razão de 0,5 a 1 mg/minuto. Os dois métodos podem ser associados, sendo indicados para a obtenção de efeitos rápidos e duradouros.

Entre os efeitos colaterais relatados a principal reação secundária descrita é a presença de ondas de calor. O paciente deve ser observado, principalmente, em relação a ocorrência de bradicardia e hipotensão arterial⁴⁴.

- Quando a via oral é empregada:

As doses iniciais devem variar de 600 a 1.000 mg/dia, durante aproximadamente 10 dias e após a dose deve ser reduzida para que se mantenha a eficácia obtida, em geral, a dose de manutenção é de 200 a 400 mg/dia. Recomenda-se descanso de dois dias na semana ou uma semana por mês, a fim de se evitar o excesso de impregnação. Em condições críticas administra-se dose de ataque de 2 g, com redução diária gradativa para a dose de manutenção durante a primeira semana. Este tratamento preconiza a supressão de episódios de taquicardia ventricular grave já no segundo dia de tratamento^{1, 21, 50}.

⁵⁰ SILVA, P. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2002).

⁴⁴ POLLAK, P. T. *Pharmacotherapy*, 18 (1998) p. 121-126.

¹ ALMEIDA, E. C., GUIMARÃES, A. C., MAGUIRE, J. H. *Tropical Cardiology*, 9 (1983) p. 65-71.

²¹ HONDEGHEM, L. M., MASON, J. W. In KATZUNG, B. G. *Basic and Clinical Pharmacology*. 5 edition. Appleton and Lange, Connecticut, (1992) p. 190-210.

⁵⁰ SILVA, P. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2002).

A amiodarona possui uma meia-vida extremamente longa (13-103 dias), com concentração plasmática efetiva de 1-2 µg/ml, enquanto a concentração no tecido cardíaco é quase 30 vezes maior. Mesmo com o uso de grandes doses de ataque, são necessários 15 – 30 dias para suprir as reservas corporais com o fármaco em concentração suficiente para estimar sua eficácia. Devido a sua longa meia-vida, é aconselhável a administração de uma única dose diária. Ocorrendo toxicidade, ela pode persistir por muito tempo após a interrupção do fármaco ²².

2.9 Toxicidade

A dose letal média da amiodarona, por via endovenosa, é 10 vezes superior à dose terapêutica, e praticamente inexistente quando por via oral, o que a torna um fármaco bastante seguro. A amiodarona concentra-se nos tecidos e pode ser encontrada em praticamente todos os órgãos. Sua deposição é mais facilmente encontrada na córnea, onde aparecem como micro-cristais castanhos amarelados dentro de poucas semanas após o início da terapia. Esses depósitos na córnea podem causar halos ocasionais nos campos visuais periféricos, mais proeminentes à noite ⁴⁴.

Os depósitos cutâneos resultam em fotodermatite em aproximadamente 25 % dos pacientes, devendo os mesmos evitar exposição ao sol. Em menos de 5 % dos casos verifica-se o desenvolvimento de pigmentação cutânea azul-acinzentada ^{22, 38}.

²² HONDEGHEN, L. M. *Cardiovascular Research*, 45 (2000) p. 57-60.

⁴⁴ POLLAK, P. T. *Pharmacotherapy*, 18 (1998) p. 121-126.

²² HONDEGHEN, L. M. *Cardiovascular Research*, 45 (2000) p. 57-60.

³⁸ NOBLE, J. P., LAMBERT, D., JUSTRABO, E. *et al. Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie*, 102 (1975) p. 277-286.

Há o desenvolvimento de hipotireoidismo em menos de 5 % dos pacientes devido a um bloqueio na conversão periférica de T₄ em T₃, ou hipertireoidismo, de acordo com a sensibilidade ao iodo extra^{21, 62}.

As interações farmacológicas são muito comuns. A amiodarona reduz a depuração da varfarina, da teofilina, da quinidina, da procainamida, da flecainida, entre outras²⁶. A amiodarona com frequência pode induzir anormalidades da função sinusal e bloqueios AV de graus acentuados em pacientes já com predisposição, de modo a requerer atenção especial e eventualmente ser necessário o emprego de marca-passo artificial para a continuidade do tratamento³⁵.

A molécula de amiodarona contém 2 átomos de iodo, o que compreende 37 % de seu peso molecular e possui estrutura química análoga ao hormônio tireoidiano^{51, 27}. Os efeitos cardíacos da amiodarona são similares, em muitos aspectos, aos sintomas causados pelo hipotireoidismo⁵². Isto ocorre em decorrência da inibição causada pela amiodarona e por seu metabólito – desetilamiodarona -, na conversão do T₄ em T₃^{51, 65}.

2.10 Determinação quantitativa

A literatura científica relata um número maior de publicações em referência à quantificação do cloridrato de amiodarona em fluídos orgânicos, do que em formas farmacêuticas.

²¹ HONDEGHEN, L. M., MASON, J. W. In KATZUNG, B. G. Basic and Clinical Pharmacology. 5 edition. Appleton and Lange, Connecticut, (1992) p. 190-210.

⁶² WEIR, S. J., UEDA, C. T. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246 (1998) p. 1026-1032.

²⁶ KATZUNG, B. G. Farmacologia Básica e Clínica. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2003).

³⁵ MASON, J.W. *New England Journal of Medicine*, (1987) p. 316-455.

⁵¹ SINGH, B. N., NADEMANEE, K. *American Heart Journal*, (1983) p. 857-868.

²⁷ KENNEDY, R. L., GRIFFITHS, H., GRAY, T. A. *Clinical Chemistry*, (1989) p. 1882-1887.

⁵² SINGH, B., VENKATESH, N., NADEMANEE, K. *et al. Progress in Cardiovascular Diseases*, (1989) p. 249-280.

⁵¹ SINGH, B. N., NADEMANEE, K. *American Heart Journal*, (1983) p. 857-868.

⁶⁵ YIN, Y., VASSY, R., NICOLAS, P. *et al. European Journal of Pharmacology*, (1994) p. 97-104.

A Tabela 02 relata as publicações em que se determinou a amiodarona em fluidos biológicos:

TABELA 02 – Publicações que relatam a determinação de amiodarona em fluidos biológicos.

Autor e Ano de Publicação	Método	Material Biológico
FLANAGAN <i>et al.</i> , 1980 ¹⁴	HPLC	Plasma e soro
PLOMP <i>et al.</i> , 1983 ⁴³	HPLC	Plasma e urina
FAILLER <i>et al.</i> , 1985 ¹²	HPLC	Plasma
XIA <i>et al.</i> , 1986 ⁶⁴	CCD	Soro
ARRANZ & MORO, 1989 ³	HPLC	Soro
MAMOLO <i>et al.</i> , 1992 ³³	HPLC	Plasma
ZAPATA <i>et al.</i> , 2000 ⁶⁷	HPLC	Soro
HA <i>et al.</i> , 2001 ¹⁷	HPLC	Plasma
KOLLROSER & SCHOBER, 2001 ²⁹	HPLC	Plasma

Foram encontradas as seguintes publicações relatando a determinação quantitativa da amiodarona em especialidades farmacêuticas.

1 - Em 1988, PIETRA *et al.*⁴² determinaram, quantitativamente, o cloridrato de amiodarona em formulações farmacêuticas empregando espectrofotometria no UV e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV.

2 - Em 1994, GUMIENICZEK *et al.*¹⁶ determinaram amostras de comprimidos de cloridrato de amiodarona e a presença desta substância no plasma, por meio de cromatografia líquida de

¹⁴ FLANAGAN, R. J., STOREY, G. C. A., HOLT, D. W. *Journal of Chromatography*, 187 (1980) p. 391-398.

⁴³ PLOMP, T. A., ENGELS, M., DE MEDINA, E. O. R. *et al. Journal of Chromatography*, 273 (1983) p. 379-392.

¹² FAILLER, J. M., FARINOTTI, R., DAUPHIN, A. *Journal de Pharmacie Clinique*, 4 (1985) p. 415-421.

⁶⁴ XIA, S. H., YUAN, Y. S., LI, L. *et al. Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 6 (1986) p. 433-436.

³ ARRANZ, M. I., MORO, C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7 (1989) p. 1909-1914.

³³ MAMOLO, M. G., VIO, L., FURLAN, G. *Il Farmaco*, 47 (1992) p. 1067-1080.

⁶⁷ ZAPATA, V., VALENCIA, M., BIDER, A. *et al. Acta Científica Venezolana*, 51 (2000) p. 53-60.

¹⁷ HA, H. R., KOZLIK, P., STIEGER, B. *et al. Journal of Chromatography B*, 15 (2001) p. 309-324.

²⁹ KOLLROSER, M., SCHOBER, C. *Journal of Chromatography B*, 766 (2002) p. 219-226.

⁴² PIETRA, A. M., CAVRINI, V., GATTI, R. *et al. Pharmaceutical Research*, 5 (1988).

¹⁶ GUMIENICZEK, A., MISZTAL, G., PRZYBOROWSKI, L. *Acta Polonica Pharmaceutica*, 51 (1994).

alta eficiência acoplada a um detector UV, com o emprego de coluna C₁₈ e detecção no comprimento de onda de 254 nm.

3 – VIO & MAMOLO, em 1988 ⁵⁹, determinaram, quantitativamente, o cloridrato de amiodarona em comprimidos e cápsulas utilizando CLAE, com emprego de coluna C₁₈ e detecção no comprimento de onda de 240 nm.

4 – A utilização do método potenciométrico para a determinação quantitativa da amiodarona nas formas de comprimidos e injetáveis foi proposto por RALUCA *et al*, em 1996 ⁴⁶ e KRAMER *et al*, em 1998 ³¹.

5 – A FARMACOPÉIA EUROPÉIA, em sua 4^a Edição ¹¹, preconiza a volumetria potenciométrica em meio aquoso para a determinação da amiodarona sob a forma de matéria-prima.

6 – A FARMACOPÉIA BRITÂNICA, em sua 5^a Edição ⁸, recomenda a volumetria potenciométrica em meio aquoso para a determinação da amiodarona sob a forma de matéria-prima.

⁵⁹ VIO, L., MAMOLO, M. G. II *Farmaco*, 43 (1988) p. 365-372.

⁴⁶ RALUCA, I. S., HASSAN, Y. A., BAIULESCU, G. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 37 (1996) p. 141-144.

³¹ KRAMER, S. D., GAUTIER, J. C., SAUDEMONT, P. *Pharmaceutical Research*, 15 (1998) p. 1310-1313.

¹¹ EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4. ed. Council of Europe, Strasbourg, 2004.

⁸ BRITISH PHARMACOPOEIA 2001 CD-ROM, Version 5.0, may 2001, Data © Crow Copyright 2001, Index + © System Simulation Ltd, The Stationery Office Ltd.

2.11 Validação de métodos quantitativos

Os métodos analíticos utilizados nas determinações qualitativas e quantitativas, desde a matéria-prima até as especialidades farmacêuticas, incluindo todas as fases do desenvolvimento do fármaco, desde a pesquisa até o controle de qualidade, devem ser devidamente validados ⁵³.

A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, conforme a USP 27 (2004) ⁵⁶.

A validação de métodos representa apenas uma parte do processo total que abrange, também, outros aspectos diferentes, sendo cada um deles crítico para o resultado adequado da análise: validação de software, validação e qualificação de hardware (instrumentação) e adequação do sistema à validação do método ⁵³.

Diversas diretrizes de orientação sobre validação de procedimentos analíticos encontram-se, atualmente, disponíveis ^{23, 56} e contêm os principais parâmetros da performance analítica a serem avaliados no estudo de um método, principalmente:

1- Exatidão: representa a concordância entre os valores obtidos e o valor verdadeiro ou mais provável para uma análise, utilizando-se um método específico. A exatidão é expressa, geralmente, em termos de percentagem de recuperação, realizada pela adição de quantidades conhecidas do material referencial na amostra analisada. Para o ensaio de fármacos, a medida da exatidão é obtida pela comparação dos resultados obtidos com a análise de uma substância padrão de referência ou através da comparação com um segundo método. Para a quantificação de impurezas, a exatidão é determinada através da análise de amostras (fármacos ou produtos)

⁵³ SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. *Analytical Letters*, 32, 6 (1999) p. 1067-1080.

⁵⁶ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 27nd Revision 2004, The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD.

⁵³ SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. *Analytical Letters*, 32, 6 (1999) p. 1067-1080.

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24-26.

⁵⁶ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 27nd Revision 2004, The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD.

contendo quantidades conhecidas de impurezas.

2- Precisão: representa a concordância entre os resultados dos testes individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de uma mesma amostra homogênea. Normalmente é expressa pelo desvio padrão relativo e/ou coeficiente de variação percentual (CV %). A precisão pode ser avaliada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade expressa a precisão através de várias reproduções de um método, nas mesmas condições operacionais, em curto intervalo de tempo. Também pode ser denominada precisão intra-ensaio. A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do laboratório em diferentes dias, com diferentes analistas e em diferentes equipamentos. A reprodutibilidade expressa os efeitos das variações entre laboratórios em diferentes dias, com diferentes analistas e em diferentes equipamentos.

3- Linearidade: corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância ativa na amostra, dentro de determinada variação. A linearidade está normalmente relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão. A partir da curva de calibração obtida, determina-se a equação de regressão linear, o coeficiente de correlação e o coeficiente de variação percentual (CV %).

4- Especificidade: é a capacidade de um método analítico em atribuir valor quantitativo inequívoco à substância a ser analisada, na presença de componentes de uma formulação, que poderiam interferir com a sua determinação numa mistura complexa. Esses interferentes são representados por impurezas, excipientes ou produtos de degradação. As amostras utilizadas no desenvolvimento e validação do método são obtidas através de condições de estresse do fármaco, empregando-se hidrólise ácida ou básica, temperatura, fotólise e oxidação.

5- Robustez: corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros, tais como composição orgânica da fase móvel, pH, força iônica ou temperatura.

6- Limite de quantificação: representa a mais baixa concentração da substância analisada em uma amostra que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade, sob as condições

experimentais estabelecidas, ou seja, precisamente e exatamente determinadas.

7- Limite de detecção: é a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada pelo método analítico, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas.

Tanto a USP 27 (2004)⁵⁶, como o ICH (1996)²³, admitem que não existe necessidade de avaliar todos os parâmetros de performance analítica. O método escolhido e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser investigados⁵⁴.

⁵⁶ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 27nd Revision 2004, The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD.

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24-26.

⁵⁴ SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. *Pharmaceutical Technology*, v. 2, n. 3 (1998) p. 12-20.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Substância Química de Referência

Utilizou-se como substância química de referência para identificação o cloridrato de amiodarona produzido pela Farmacopéia Européia, divisão da European Directorate for Quality of Medicines (EDQM), tendo por código A0575000, lote 2.

3.1.2 Matéria-prima

Cloridrato de amiodarona, produzido pela indústria Libbs Farmacêutica, identificado pelo lote de número 3.260.3/0, com data de fabricação de 06/2003, com prazo de validade de 5 anos a partir da data de fabricação.

3.1.3 Solventes e reagentes

- Ácido acético glacial (Merck)
- Acetato mercúrico (Merck)
- Ácido perclórico (Merck)
- Metanol (J.T.Baker)
- Ácido fórmico (Merck)
- Cloreto de metileno (Vetec)
- Peróxido de hidrogênio (Merck)

-
- Ácido tartárico (Merck)
 - Subnitrato de bismuto (Synth)
 - Iodeto de potássio (Merck)
 - Hidróxido de amônio (Synth – ACS)
 - Solução tampão biftalato de potássio 0,05 M-pH 4,0 (Merck)
 - Solução tampão fosfato de sódio e potássio-pH 7,0 (Merck)
 - Ácido clorídrico (Merck)
 - Hidróxido de sódio (Merck)
 - Etanol (Merck)

3.1.4 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica SARTORIUS precisão 0,0001g
- Espectrofotômetro IV Shimadzu DR 8001FTIR 8101
- Cromatoplaça AL sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck)
- Cuba cromatográfica
- Espectrofotômetro UV-Vis SPECTRONIC GENESYS 2
- Membrana filtrante 0,45 µM (Millipore)
- Membrana de acetato de celulose
- Medidor digital de ponto de fusão POLAX/WRS-1
- Papel filtro quantitativo 80 g/m² SARTORIUS
- Potenciômetro digital METTLER – modelo Delta 340
- Software Microcal Origin 5.0. 1997
- Software estatístico SAS
- Integrador Shimadzu C-R6A
- Detector Shimadzu SPD-10^a
- Bomba Merck Hitachi L-6200^a
- Coluna Supelcosil C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)
- Pré-coluna Supelcoguard LC-18 (20 x 2 mm, 5 µm)

3.2 Metodologia

3.2.1 Análises físico-químicas

3.2.1.1 Determinação do pH

Para a determinação do pH, dissolveu-se 1,25 g da amostra de cloridrato de amiodarona em água destilada isenta de dióxido de carbono, aquecida a 80 °C. Resfriou-se a 25 °C e completou-se o volume para 25 ml com o mesmo diluente.

Determinou-se o pH com auxílio de potenciômetro previamente aferido, com soluções tampões de padronização, dotadas de pH 4,0 e 7,0, respectivamente: biftalato de potássio 0,05 M em água e fosfato equimolar 0,05 M (3,53 g de fosfato ácido de sódio e 3,39 g de fosfato ácido de potássio em 1000 ml de água).

3.2.1.2 Testes de caracterização da substância química de referência e matéria-prima

Com o objetivo de caracterizar a substância utilizada como amostra realizaram-se análises espectroscópicas na região do infravermelho e ultravioleta e a determinação da faixa de fusão.

3.2.1.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho de cloridrato de amiodarona foi obtido em espectrofotômetro IV Shimadzu DR 8001FTIR 8101, com pastilha contendo 1,5 mg da amostra, em 150 mg de brometo de potássio. Os espectros foram observados na faixa de 4600 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

3.2.1.2.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta

Com a finalidade de identificar, caracterizar e determinar o comprimento de onda de absorção máxima da substância foram obtidos espectros de absorção na região de 200 – 400 nm, utilizando metanol como solvente. Empregaram-se soluções na concentração de 0,0002%.

3.2.1.2.3 Determinação da faixa de fusão

Para determinação da faixa de fusão utilizou-se a quantidade de 10 mg do cloridrato de amiodarona matéria-prima. Efetuaram-se três determinações da amostra, sendo a faixa de fusão determinada em (°C).

3.2.1.2.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a identificação e determinação qualitativa das impurezas presentes na matéria-prima foi empregado o método de cromatografia em camada delgada e foram utilizadas substâncias químicas de referência.

Para a identificação de cloridrato de amiodarona em CCD, utilizaram-se placas de sílica gel GF₂₅₄, com espessura de 0,25 mm e como fase móvel, ácido fórmico, metanol e cloreto de metileno (5:10:85) (V/V). Aplicaram-se 5 µl de cada uma das soluções amostra de cloridrato de amiodarona matéria-prima, 5 µl da solução de cloridrato de amiodarona padrão e 5 µl da solução padrão de Cloridrato de (2-cloroetil)dietilamina. Todas as soluções foram diluídas com cloreto de metileno. O esquema de aplicação encontra-se descrito na Tabela 03.

TABELA 03 – Descrição das soluções utilizadas na CCD.

Soluções	Substâncias	Concentrações
1	Cloridrato de amiodarona matéria-prima	100,0 mg/ml
2	Cloridrato de amiodarona matéria-prima	5,0 mg/ml
3	Cloridrato de amiodarona padrão	5,0 mg/ml
4	Cloridrato de amiodarona matéria-prima	0,5 mg/ml
5	Cloridrato de amiodarona matéria-prima	0,25 mg/ml
6	Cloridrato de (2-cloroetil)dietilamina	0,2 mg/ml

Transferiu-se a placa para cuba cromatográfica e permitiu-se o desenvolvimento do cromatograma até atingir 15 cm acima do ponto de aplicação. Após a retirada da placa e subsequente exposição ao ar para secagem, as manchas foram visualizadas com auxílio de luz ultravioleta a 254 nm. Determinaram-se os valores do fator de retenção (Rf) para as soluções de número 1 a 5.

A placa foi nebulizada com solução de iodobismutato de potássio e, em seguida, com solução de peróxido de hidrogênio 3 % (p/V), examinando-se imediatamente. Determinou-se a presença de mancha correspondente ao cloridrato de (2-cloroetil)dietilamina.

A solução de iodobismutato de potássio foi obtida pela dissolução de 16,6 g de ácido tartárico e 1,41 g de subnitrato de bismuto em 67 ml de água destilada, completando-se o volume para 100 ml com solução de iodeto de potássio 40 % (p/V).

3.2.2 Análise quantitativa

Para a análise quantitativa do cloridrato de amiodarona foram comparados os métodos de espectrofotometria de absorção no ultravioleta, titulação em meio não aquoso, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e titulação em meio aquoso.

3.2.2.1 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Para a determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima empregando-se método espectrofotométrico, utilizou-se metanol como solvente e detecção no comprimento de onda de 242 nm.

3.2.2.1.1 Construção da curva de Ringbom

Para a análise de cloridrato de amiodarona matéria-prima, empregando-se espectrofotometria no ultravioleta, determinou-se a faixa ideal de concentração, através da construção da curva de Ringbom^{6,9}, para a qual foram utilizadas diferentes concentrações do padrão de cloridrato de amiodarona.

Preparou-se a solução padrão, conforme procedimento descrito a seguir:

Pesaram-se, exatamente, cerca de 50 mg de cloridrato de amiodarona, transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com metanol. Procederam-se diluições sucessivas, utilizando o mesmo solvente, até a concentração final de 50 µg/ml.

Transferiram-se, através de bureta calibrada, os volumes necessários para balões volumétricos, de modo a obter concentrações que variam de 1,0 µg/ml a 20,0 µg/ml de cloridrato de amiodarona.

⁶ BITTENCOURT, C. F. Cloridrato de DL-homocisteína-tiolactona análises eletroforética e espectrofotométrica. Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria: UFSM, 1967. Tese (Doutorado).

⁹ CARDOSO, S. G. Contribuição ao controle de qualidade de comprimidos de cloridrato de buspirona. Curso de Pós-graduação em Farmácia, Porto Alegre: UFRGS 1995. Dissertação (Mestrado).

TABELA 04 - Volumes e concentrações de cloridrato de amiodarona utilizados na construção da curva de Ringbom.

Balões X ml	Solução de cloridrato de amiodarona 50 µg/ml (ml)	Metanol (ml)	Concentração expressa µg/ml
01	0,5	24,5	1,0
02	1,0	24,0	2,0
03	1,5	23,5	3,0
04	2,0	23,0	4,0
05	2,5	22,5	5,0
06	3,0	22,0	6,0
07	3,5	21,5	7,0
08	4,0	21,0	8,0
09	4,5	20,5	9,0
10	5,0	20,0	10,0
11	5,5	19,5	11,0
12	6,0	19,0	12,0
13	6,5	18,5	13,0
14	7,0	18,0	14,0
15	7,5	17,5	15,0
16	8,0	17,0	16,0
17	8,5	16,5	17,0
18	9,0	16,0	18,0
19	9,5	15,5	19,0
20	10,0	15,0	20,0

Completo-se o volume com metanol e procedeu-se à leitura das absorbâncias em cubetas de quartzo de 1 cm, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 242 nm.

3.2.2.1.2 Preparo da curva padrão

Pesou-se, analiticamente, 25 mg de cloridrato de amiodarona e transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml. Completo-se o volume com metanol de modo a obter concentração de 1 mg/ml de cloridrato de amiodarona. A partir dessa solução, retirou-se uma alíquota de 4 ml e transferiu-se para balão de 200 ml. Completo-se o volume com o mesmo solvente de modo a obter uma concentração de 0,02 mg/ml.

A partir desta solução, preparou-se a curva padrão de acordo com a Tabela 05.

TABELA 05 - Volumes e concentrações de cloridrato de amiodarona utilizados na construção da curva padrão.

Balão (ml)	Cloridrato de amiodarona (ml)	Metanol (ml)	Concentração expressa ($\mu\text{g/ml}$)
1	10	40	4,0
2	15	35	6,0
3	20	30	8,0
4	25	25	10,0
5	30	20	12,0
Branco	-	50	

A equação da reta, para a representação gráfica da curva padrão, foi avaliada através de estudo de regressão linear. Determinou-se a validade através da análise de variância.

3.2.2.1.3 Execução do ensaio

Para a determinação quantitativa do fármaco em estudo, empregando a espectrofotometria de absorção no ultravioleta, dissolveram-se 50 mg do cloridrato de amiodarona matéria-prima em metanol, completando-se o volume de 100 ml com o mesmo solvente. Retirou-se, desta solução, alíquota de 0,4 ml e transferiu-se para balão de 25 ml e completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução na concentração de 0,008 mg/ml.

A solução do cloridrato de amiodarona padrão foi preparada na mesma concentração utilizando o mesmo solvente. As absorbâncias das soluções resultantes foram medidas no comprimento de onda de 242 nm usando metanol para o ajuste do zero.

Cálculo para a quantificação

$$A_a = C_p (A_a/A_p)$$

Onde:

A_a = absorvância do cloridrato de amiodarona matéria-prima

A_p = absorvância do cloridrato de amiodarona padrão

C_p = concentração do cloridrato de amiodarona padrão

3.2.2.1.4 Teste de recuperação

Este procedimento tem por finalidade determinar a exatidão do método por meio da adição de quantidades conhecidas do padrão à amostra ^{23, 2, 56}.

TABELA 06 - Preparo das soluções utilizadas para o teste de recuperação do cloridrato de amiodarona, matéria-prima, utilizando espectrofotometria no UV.

	Volume sol. amostra 0,04 mg/ml (ml)	Volume sol. padrão do cloridrato de amiodarona 0,02 mg/ml (ml)	Concentração final (µg/ml)*
A	5,0	-	4,0
R ₁	5,0	5	6,0
R ₂	5,0	10	8,0
R ₃	5,0	15	10,0
P	-	20	12,0

* Cada concentração foi preparada em triplicata.

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24 – 26.

² AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15. ed. Arlington, v. 1, (1990) p. xvii.

⁵⁶ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 27nd Revision 2004, The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD.

3.2.2.1.5 Precisão do método

Avaliou-se a precisão do método através do coeficiente de variação porcentual obtido, na determinação da matéria-prima cloridrato de amiodarona, nos ensaios de repetibilidade (n = 15) e precisão intermediária em diferentes dias (n = 2) e diferentes analistas (n = 2).

Para a determinação da precisão do método, empregando a espectrofotometria de absorção no ultravioleta, dissolveu-se 50 mg cloridrato de amiodarona matéria-prima em metanol, completando-se o volume de 100 ml com o mesmo solvente. Retirou-se, desta solução, alíquota de 0,4 ml e transferiu-se para balão de 25 ml, completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução à 0,008 mg/ml.

A solução de cloridrato de amiodarona padrão foi preparada na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. As absorbâncias das soluções resultantes foram medidas no comprimento de onda de 242 nm, usando metanol para o ajuste do zero.

3.2.2.1.6 Limite de detecção

Calculou-se o limite de detecção (LD) a partir da fórmula preconizada pelo ICH (1996)²³, empregando-se os valores do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração do padrão de referência.

O cálculo para encontrar-se o LD foi realizado segundo a equação:

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC}$$

Onde,

σ = desvio padrão do intercepto da curva de calibração

IC = inclinação da curva de calibração

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24 – 26.

3.2.2.1.7 Limite de quantificação

Calculou-se o limite de quantificação (LQ) a partir da fórmula preconizada pelo ICH (1996)²³, empregando-se os valores do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração do padrão de referência.

O cálculo para encontrar-se o LQ foi realizado segundo a equação:

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$$

Onde,

σ = desvio padrão do intercepto da curva de calibração

IC = inclinação da curva de calibração

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24 – 26.

3.2.2.2 Titulação em meio não-aquoso

A titulação potenciométrica em meio não-aquoso é um método rápido e exato na quantificação de bases ou ácidas demasiadamente fracas ¹³.

3.2.2.2.1 Padronização do método utilizando titulação em meio não-aquoso

Para a determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, com o emprego de titulação em meio não-aquoso, utilizaram-se os parâmetros descritos na Tabela 07.

TABELA 07 – Condições utilizadas na determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por titulação em meio não-aquoso.

Solvente	Mistura de 40 ml de ácido acético glacial e 10 ml de acetato mercúrico a 5% (p/V)
Titulante	Ácido perclórico 0,1 M em ácido acético glacial
Eletrodo	Vidro-calomelano

3.2.2.2.2 Obtenção da curva de calibração

Para a construção da curva de calibração empregando a titulação em meio não-aquoso optou-se por pesagem direta do cloridrato de amiodarona substância química de referência para cada ponto da curva. Na Tabela 08, encontram-se as pesagens e as concentrações finais do cloridrato de amiodarona empregadas na curva de calibração.

¹³ FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo, Atheneu, Parte I, 1988.

TABELA 08 – Curva de calibração utilizada para determinação do cloridrato de amiodarona por meio de titulação em meio não-aquoso.

	Cloridrato de amiodarona (mg)	Solvente (40 ml de ácido acético glacial e 10 ml de acetato mercúrico a 5% (p/V) em ácido acético glacial) (ml)	Concentração (mg/ml)
1	125,0	50	2,50
2	187,5	50	3,75
3	250,0	50	5,00
4	312,5	50	6,25
5	375,0	50	7,50

3.2.2.2.3 Execução do ensaio

Para a determinação quantitativa por titulação em meio não-aquoso, dissolveu-se 0,5 gramas de cloridrato de amiodarona matéria-prima em mistura de 40 ml de ácido acético glacial e 10 ml de solução de acetato mercúrico a 5% (p/V) em ácido acético glacial. Como titulante foi utilizado ácido perclórico 0,1 M, preparado e padronizado conforme Farmacopéia Brasileira 4ª Edição ¹³. Paralelamente, procedeu-se à titulação em branco. O ponto final da titulação foi determinado através de exame da curva de titulação.

3.2.2.2.4 Cálculo para a quantificação do cloridrato de amiodarona

Para a quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por titulação em meio não-aquoso, deve-se avaliar a curva de titulação em relação à abrupta modificação do potencial no gráfico das leituras da força eletromotriz (f.e.m.) contra o volume da solução titulante, que corresponde ao ponto de equivalência ⁶⁰. O ponto final da titulação foi determinado através da primeira derivada, através do máximo verificado no ponto de inflexão da curva de titulação, ou pela segunda derivada, quando o coeficiente angular da curva for um máximo.

¹³ FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo, Atheneu, Parte I, 1988.

⁶⁰ VOGEL, A. I. Análise química quantitativa. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1992).

Para o cálculo quantitativo da substância utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{mg de cloridrato de amiodarona} = \frac{(n - n') \text{ mEq}}{p}$$

Onde:

p = amostra de cloridrato de amiodarona em mg

n = ácido perclórico gasto com cloridrato de amiodarona em ml

n' = ácido perclórico gasto com o branco em ml

mEq = miliequivalente de cloridrato de amiodarona

3.2.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.2.2.3.1 Procedimentos preliminares

Foram encontradas na literatura poucas publicações utilizando CLAE para a quantificação do cloridrato de amiodarona em plasma e em formas farmacêuticas, bem como para a determinação de impurezas. As fases móveis mais utilizadas nesses trabalhos foram avaliadas para estabelecer a fase móvel mais adequada a metodologia proposta na presente pesquisa.

TABELA 09 – Sistemas avaliados para a quantificação do cloridrato de amiodarona e suas impurezas.

Coluna	Detector UV (nm)	Fase móvel	Referência
Symmetry C ₁₈ (150 x 3,0 mm)	254 nm	Acetonitrila: 0,1% ácido fórmico (46:54, V/V)	Kollroser & Schober, 2002 ²⁹
MicroBondapak CN RP (3,9 x 150 mm)	242 nm	Tampão fosfato de potássio 10 mM: metanol: acetonitrila (40:37:23, V/V) pH 3,5.	Zapata et al., 2000 ⁶⁷

3.2.2.3.2 Padronização do método utilizando coluna Supelcosil C18

Para a determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência, utilizou-se os parâmetros descritos na Tabela 10.

²⁹ KOLLROSER, M., SCHOBER, C. *Journal of Chromatography B*, 766 (2002) p. 219-226.

⁶⁷ ZAPATA, V., VALENCIA, M., BIDER, A. *et al. Acta Científica Venezolana*, 51 (2000) p. 53-60.

TABELA 10 – Condições cromatográficas utilizadas na determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por CLAE utilizando coluna Supelcosil C18.

Fase móvel	metanol : hidróxido de amônio 25% (98 : 2)
Coluna	Supelcosil C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)
Comprimento de onda	242 nm
Vazão	0.8 ml/min
Temperatura	Ambiente
Volume de injeção	20 µl

A fase móvel foi filtrada através de membrana com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, sob vácuo, e degaseificada com gás hélio, durante 15 min. Estabilizou-se o sistema, através da passagem da fase móvel, por 30 min, com vazão de 0,8 ml/min. Após estabilização do sistema, foram injetados 20 µl das soluções padrão de referência e amostras previamente filtradas em membranas com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. As soluções foram preparadas e injetadas em triplicatas.

3.2.2.3.2.1 Preparo da solução padrão

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 10 mg de cloridrato de amiodarona padrão, transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com metanol, de modo a obter solução padrão contendo 1 mg/ml. A partir desta solução, transferiu-se 1,0 ml para balão volumétrico de 10 ml obtendo-se concentração final de 0,1 mg/ml, utilizando metanol como diluente. A partir da solução com 0,1 mg/ml, uma alíquota de 250 µl foi transferida para balão volumétrico de 5,0 ml, completando-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução com concentração de 5,0 µg/ml.

3.2.2.3.2.2 Preparo da solução amostra

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 10 mg do cloridrato de amiodarona matéria-prima, transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com metanol, de modo a obter solução contendo 1mg/ml. A partir desta solução, transferiu-se 1,0 ml para balão volumétrico de 10 ml obtendo-se concentração final de 0,1 mg/ml, utilizando metanol como diluente. A partir da solução com 0,1 mg/ml, uma alíquota de 250 µl foi transferida para

balão volumétrico de 5,0 ml, completando-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução com concentração teórica de 5,0 µg/ml.

3.2.2.3.2.3 Obtenção da curva de calibração

A partir da solução padrão do cloridrato de amiodarona com concentração de 0,1 mg/ml, preparou-se as diluições nas concentrações de 2,5; 3,75; 5,0; 6,25 e 7,5 µg/ml, utilizando metanol como diluente. Cada solução foi preparada em triplicata. Na Tabela 11, encontram-se as diluições e as concentrações finais do cloridrato de amiodarona empregadas na curva de calibração.

TABELA 11 – Concentrações finais da solução padrão para obtenção da curva de calibração utilizada para determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima.

	Volume da solução padrão do cloridrato de amiodarona 0,1 mg/ml (µl)	Volume do balão volumétrico (ml)	Concentração final (µg/ml)
1	125	5	2,50
2	375	10	3,75
3	250	5	5,00
4	625	10	6,25
5	375	5	7,50

As médias das áreas absolutas, correspondentes a cada diluição do padrão, foram plotadas em gráfico de área absoluta versus concentração (µg/ml).

A representação gráfica da equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear, através do método dos mínimos quadrados. As áreas absolutas utilizadas na determinação da curva de calibração foram estatisticamente avaliadas pela análise de variância (ANOVA).

3.2.2.3.2.4 Execução do ensaio

Para a execução dos ensaios, determinação quantitativa e curva de calibração, as soluções da amostra e do padrão foram previamente submetidas à filtração em membrana com porosidade 0,25 μM . Posteriormente, injetou-se, em triplicata, o volume de 20 μl de cada solução.

A concentração do cloridrato de amiodarona foi obtida através da seguinte equação:

$$C_A = A_A \cdot C_P / A_P$$

Onde:

C_A = concentração do cloridrato de amiodarona (mg/l)

C_P = concentração do padrão (mg/l)

A_A = área absoluta da amostra

A_P = área absoluta do padrão

O valor percentual de cloridrato de amiodarona foi calculado pela equação:

$$C_A\% = C_A \cdot 100 / C_T$$

Onde:

$C_A\%$ = concentração da amostra em porcentagem

C_A = concentração do cloridrato de amiodarona na amostra (mg)

C_T = concentração teórica do cloridrato de amiodarona na amostra (mg)

3.2.2.3.2.5 Teste de recuperação

Este procedimento tem por finalidade determinar a exatidão do método por meio da adição de quantidades conhecidas do padrão a amostra^{23, 2, 56}.

Para o teste de recuperação, transferiram-se alíquotas de 1,25 ml da solução amostra contendo 10 µg/ml do cloridrato de amiodarona, para balões volumétricos de 10 ml, denominados A, R₁, R₂, R₃. Acrescentaram-se as quantidades de 1,25; 3,75; 6,25 e 1,25 ml de solução padrão contendo 10 µg/ml do cloridrato de amiodarona aos balões R₁, R₂, R₃ e P, respectivamente. Completou-se o volume com a fase móvel, obtendo-se concentrações de 2,5; 5,0 e 7,5 µg/ml para os balões R, e 1,25 µg/ml para os balões P e A, conforme Tabela 12.

TABELA 12 - Preparo das soluções utilizadas para o teste de recuperação do cloridrato de amiodarona, matéria-prima, utilizando CLAE.

	Volume solução amostra 10 µg/ml (ml)	Volume solução padrão do cloridrato de amiodarona 10 µg/ml (ml)	Concentração final (µg/ml)*
A	1,25	-	1,25
R ₁	1,25	1,25	2,50
R ₂	1,25	3,75	5,00
R ₃	1,25	6,25	7,50
P	-	1,25	1,25

* Cada concentração foi preparada em triplicata.

3.2.2.3.2.6 Precisão do método

Avaliou-se a precisão do método através do coeficiente de variação percentual obtido, na determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária em diferentes dias (n = 2) e diferentes analistas (n = 2).

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24 – 26.

² AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15. ed. Arlington, v. 1, (1990) p. xvii.

⁵⁶ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 27nd Revision 2004, The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD.

3.2.2.3.2.7 Limite de detecção

Calculou-se o limite de detecção (LD) a partir da fórmula preconizada pelo ICH (1996)²³, empregando-se os valores do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração do padrão de referência.

O cálculo para encontrar-se o LD foi realizado segundo a equação:

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC}$$

Onde,

σ = desvio padrão do intercepto da curva de calibração

IC = inclinação da curva de calibração

3.2.2.3.2.8 Limite de quantificação

Calculou-se o limite de quantificação (LQ) a partir da fórmula preconizada pelo ICH (1996)²³, empregando-se os valores do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração do padrão de referência.

O cálculo para encontrar-se o LQ foi realizado segundo a equação:

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$$

Onde,

σ = desvio padrão do intercepto da curva de calibração

IC = inclinação da curva de calibração

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24 – 26.

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24 – 26.

3.2.2.3.2.9 Robustez

Avaliou-se a robustez do método analítico através de pequenas modificações nas condições cromatográficas estabelecidas para determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por CLAE.

Alteraram-se os seguintes parâmetros da metodologia analítica: composição da fase móvel para metanol: hidróxido de amônio 25 % (98,5 : 1,5), comprimento de onda para 240 nm e vazão da fase móvel para 0,7 ml/min.

Prepararam-se as amostras conforme item 3.2.2.3.2.2 até atingirem a concentração final de 5,0 µg/ml.

3.2.2.4 Titulação em meio aquoso

A quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, através de titulação em meio aquoso, é o método oficial descrito pela Farmacopéia Européia ¹¹ e Farmacopéia Britânica ⁸. Neste estudo, serão utilizados os mesmos parâmetros usadas nas monografias indicadas para ser estabelecida comparação com os métodos propostos.

3.2.2.4.1 Padronização do método utilizando titulação em meio aquoso

Para a determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, empregando a titulação em meio aquoso, utilizou-se os parâmetros descritos na Tabela 13.

TABELA 13 – Condições utilizadas na determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, por titulação em meio aquoso.

Solvente	Mistura de 5 ml de ácido clorídrico 0,01 M e 75 ml de etanol 96 %
Titulante	Hidróxido de sódio 0,1 M
Eletrodo	Vidro-calomelano

3.2.2.4.2 Obtenção da curva de calibração

Para a construção da curva de calibração utilizando a titulação em meio aquoso optou-se por pesagem direta do cloridrato de amiodarona padrão para cada ponto da curva. Na Tabela 14, encontram-se as pesagens e as concentrações finais do cloridrato de amiodarona empregadas na curva de calibração.

¹¹ EUROPEAN PHARMACOPEIA, 4. ed. Council of Europe, Strasbourg, 2004.

⁸ BRITISH PHARMACOPEIA 2001 CD-ROM, Version 5.0, may 2001, Data © Crow Copyright 2001, Index + © System Simulation Ltd, The Stationery Office Ltd.

TABELA 14 – Curva de calibração utilizada para determinação do cloridrato de amiodarona através de titulação em meio aquoso.

	Cloridrato de amiodarona (mg)	Mistura de 5 ml de ácido clorídrico 0,01 M e 75 ml de etanol 96 % (ml)	Concentração (mg/ml)
1	320,0	80	4,0
2	400,0	80	5,0
3	480,0	80	6,0
4	560,0	80	7,0
5	640,0	80	8,0

3.2.2.4.3 Execução do ensaio

Para a determinação quantitativa por titulação em meio aquoso, 0,6 gramas de cloridrato de amiodarona matéria-prima foram dissolvidas em mistura de 5 ml de ácido clorídrico 0,01 M e 75 ml de etanol 96 %. Como titulante foi utilizado hidróxido de sódio 0,1 M. Paralelamente deve-se proceder à titulação em branco. O ponto final da titulação foi determinado através de exame da curva de titulação fornecida por potenciômetro de vidro-calomelano.

3.2.2.4.4 Cálculo para a quantificação do cloridrato de amiodarona

Para a quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por titulação em meio aquoso, deve-se avaliar a curva de titulação em relação à abrupta modificação do potencial no gráfico das leituras da força eletromotriz (f.e.m.) contra o volume da solução titulante, que corresponde ao ponto de equivalência ⁶⁰. O ponto final da titulação foi determinado através da primeira derivada, através do máximo verificado no ponto de inflexão da curva de titulação, ou pela segunda derivada, quando o coeficiente angular da curva for um máximo.

⁶⁰ VOGEL, A. I. Análise química quantitativa. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1992).

Para o cálculo quantitativo da substância utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{mg de cloridrato de amiodarona} = \frac{(n - n') \text{ mEq}}{p}$$

Onde:

p = amostra de cloridrato de amiodarona em mg

n = hidróxido de sódio gasto com cloridrato de amiodarona em ml

n' = hidróxido de sódio gasto com o branco em ml

mEq = miliequivalente de cloridrato de amiodarona

3.2.3 Análise comparativa dos métodos propostos

Para a análise comparativa entre os métodos propostos efetuou-se estudo dos resultados obtidos na execução dos ensaios quantitativos para a determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima obtidos com a aplicação dos diferentes metodologias. Conforme indicado na Tabela 15.

TABELA 15 – Métodos analíticos empregados na quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima

	Método
A	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta
B	Titulação em meio não-aquoso
C	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
D	Titulação em meio aquoso

Na aplicação da análise de variância (ANOVA-DUNCAN), os resultados encontrados indicarão se existem diferenças significativas entre as médias obtidas na quantificação da substância objeto do presente estudo, quando analisados comparativamente os quatro métodos propostos. Esta análise indicará, também, se as metodologias A, B, C ou D são equivalentes e se qualquer uma delas pode ser empregada em determinações quantitativas rotineiras, em função dos recursos disponíveis em diferentes laboratórios de diferentes regiões.

4. RESULTADOS

4.1 Análise físico-química

4.1.1 Determinação do pH

O valor determinado para o pH da amostra de cloridrato de amiodarona matéria-prima foi de $3,692 \pm 0,005$. O valor obtido para o pH representa a média de cinco determinações. Este valor está dentro dos limites de 3,2 a 3,8, permitidos pela Farmacopéia Européia 4^a, Edição. O coeficiente de variação percentual foi 0,82 %.

4.1.2 Testes de caracterização da substância química de referência e da amostra

4.1.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro de absorção da substância química de referência cloridrato de amiodarona, na região do infravermelho, encontra-se exposto na Figura 05.

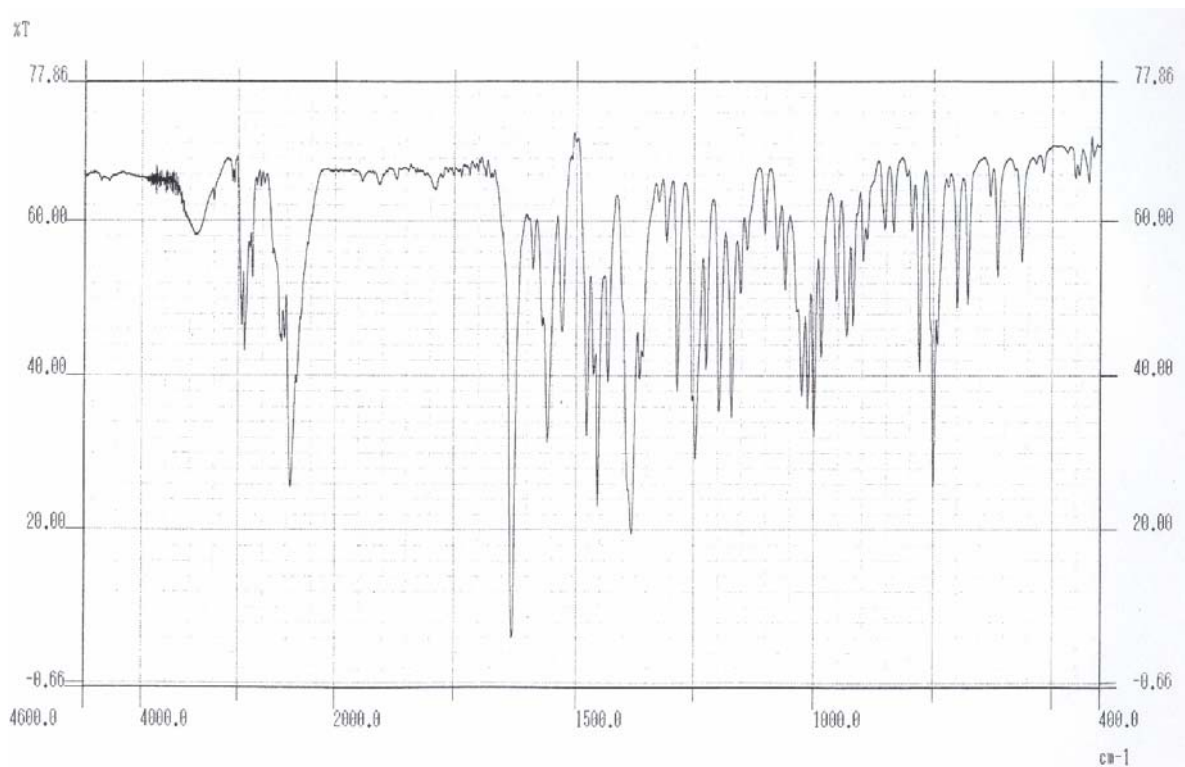


FIGURA 05 – Espectro na região do infravermelho do cloridrato de amiodarona substância química de referência.

O espectro de absorção do cloridrato de amiodarona matéria-prima, na região do infravermelho, encontra-se exposto na Figura 06.

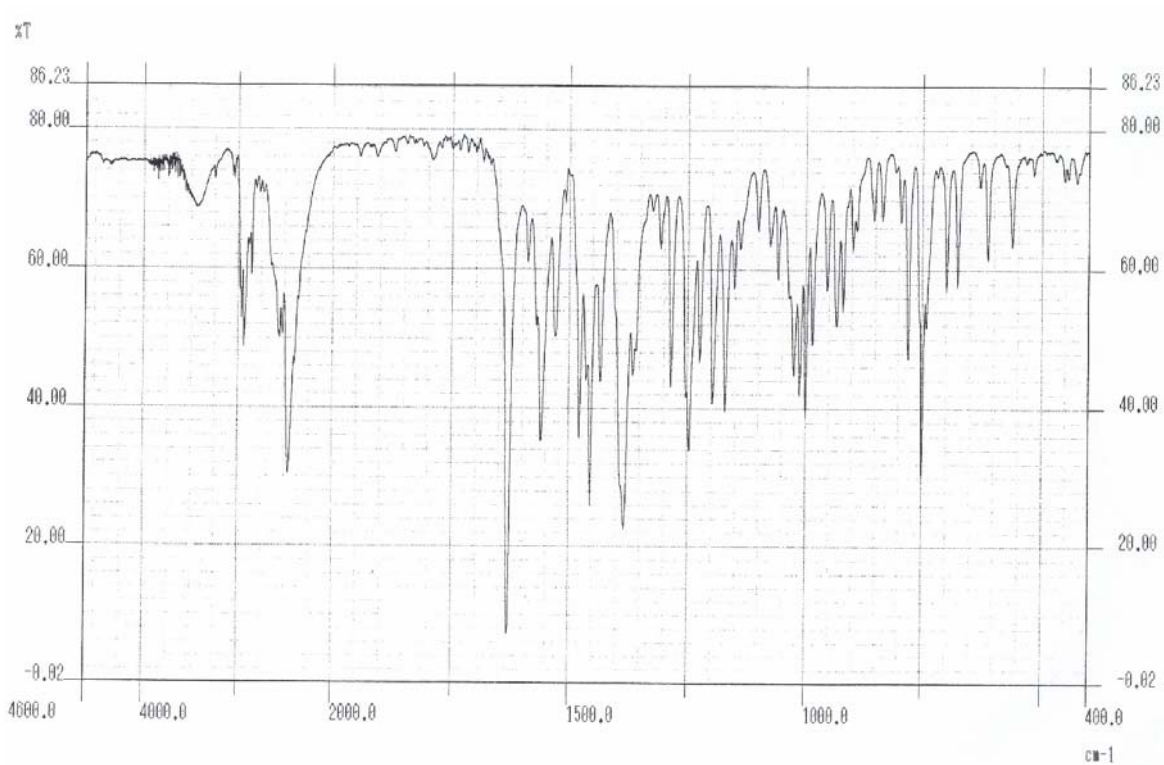


FIGURA 06 – Espectro na região do infravermelho do cloridrato de amiodarona matéria-prima.

O espectro de absorção no infravermelho do cloridrato de amiodarona matéria-prima dispersa em brometo de potássio, apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas dos observados no espectro de cloridrato de amiodarona padrão, preparado de maneira idêntica, na faixa de 4600 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

4.1.2.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta

Os espectros de absorção de cloridrato de amiodarona substância química de referência e matéria-prima, na região do ultravioleta, na concentração de 8 µg/ml em metanol, estão representados nas Figuras 07 a 09.

A sobreposição dos espectros de absorção na região do ultravioleta de cloridrato de amiodarona padrão e matéria-prima encontra-se representada na Figura 07.

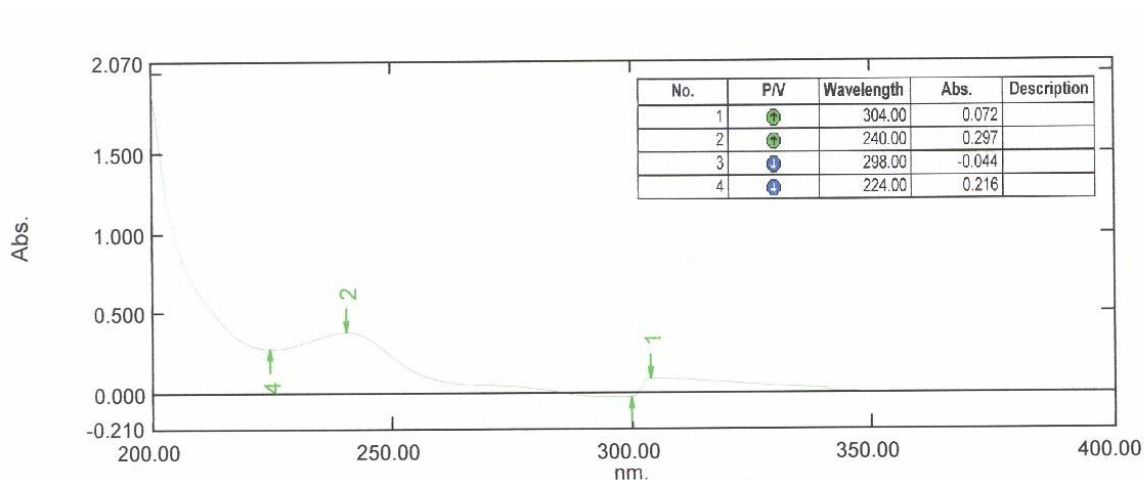


FIGURA 07 – Espectro de absorção, na região do ultravioleta, da solução de cloridrato de amiodarona padrão a 8 µg/ml em metanol.

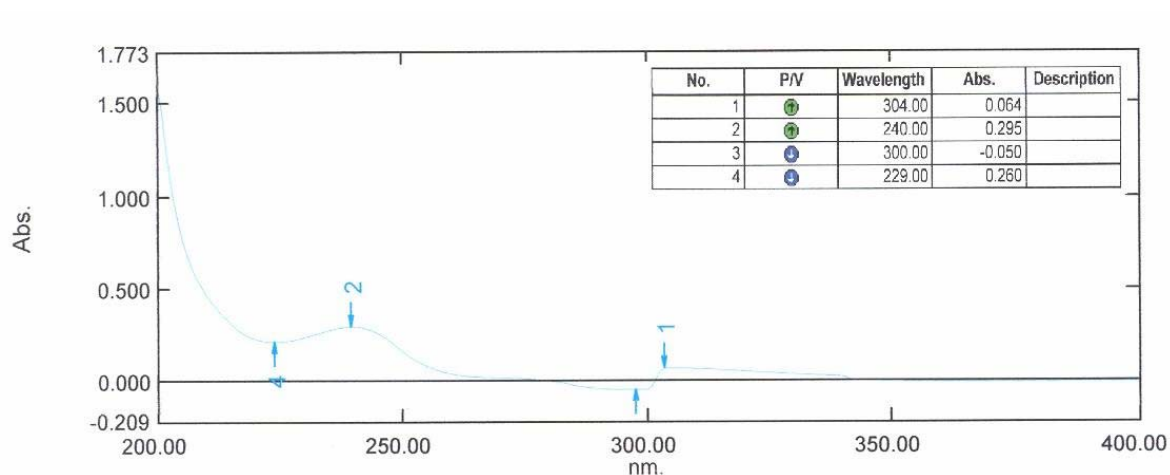


FIGURA 08 – Espectro de absorção, na região do ultravioleta, da solução de cloridrato de amiodarona matéria-prima a 8 µg/ml em metanol.

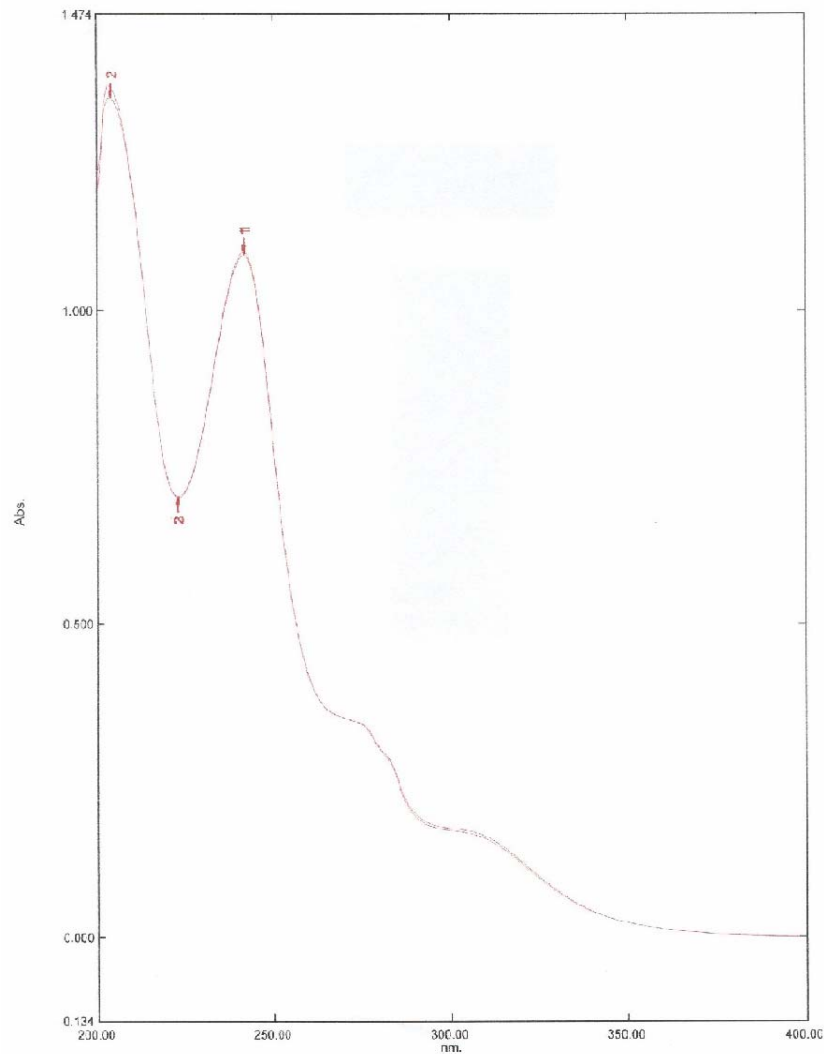


FIGURA 09 - Espectro de absorção, na região do ultravioleta, da solução de cloridrato de amiodarona matéria-prima sobreposta à solução de cloridrato de amiodarona padrão a 8 µg/ml em metanol.

4.1.2.3 Determinação da faixa de fusão

A faixa de fusão encontrada para o padrão do cloridrato de amiodarona foi 161,0 a 162,0 °C e para a amostra foi de 160,6 a 160,8 °C. Esses valores representam a média de três determinações.

4.1.2.4 Cromatografia em camada delgada

O sistema eluente utilizado possibilitou a migração da solução do padrão do cloridrato de amiodarona, da amostra de matéria-prima e da solução de cloridrato de (2-cloroetil)dietilamina, principal resíduo de síntese, que através da fase estacionária foram visualizadas com auxílio de luz ultravioleta (254 nm). Foram obtidas manchas de cor marrom, semelhantes, para as soluções padrão e amostra e mancha cinza para a solução do resíduo de síntese, o que permitiu inferir que a solução da matéria-prima possui concentração do interferente em quantidade inferior a 0,2 %.

Os valores de Rf e Rx, das soluções de cloridrato de amiodarona padrão e matéria-prima, obtidos em camada delgada encontram-se expostos na Tabela 16.

TABELA 16 – Valores de Rf e Rx obtidos para cloridrato de amiodarona padrão e matéria-prima.

Amostras	Rf x 100	Rx x 100
Padrão (solução 3)	75	-
Matéria-prima (solução 2)	75	100

$$Rx = Rf \text{ amostra} / Rf \text{ padrão}$$

O cromatograma obtido, em camada delgada, para as soluções amostra e padrão de cloridrato de amiodarona e a solução de cloridrato de (2-cloroetil)dietilamina está representado na Figura 10.



FIGURA 10 – Análise cromatográfica de cloridrato de amiodarona. Fase fixa: sílica gel GF₂₅₄, fase móvel: ácido fórmico, metanol e cloreto de metileno (5:10:85) (V/V). 1: Cloridrato de amiodarona matéria-prima 100 mg/ml; 2: Cloridrato de amiodarona matéria-prima 5 mg/ml; 3: Cloridrato de amiodarona padrão 5 mg/ml; 4: Cloridrato de amiodarona matéria-prima 0,5 mg/ml; 5: Cloridrato de amiodarona matéria-prima 0,25 mg/ml; 6: Cloridrato de (2-cloroetil)dietilamina 0,2 mg/ml.

4.2 Análise Quantitativa

4.2.1 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta

4.2.1.1 Curva de Ringbom

A Tabela 17 apresenta os valores médios das absorbâncias, obtidos na determinação da curva de Ringbom, para concentrações de 1,0 a 20,0 µg/ml.

A representação gráfica da curva (Figura 11) foi obtida através da plotagem dos valores das absorbâncias obtidas, no eixo das ordenadas, expressos em (100 – T %), contra o logaritmo da concentração, no eixo das abscissas.

TABELA 17 – Valores médios obtidos, expressos em absorbâncias, para construção da curva de Ringbom na determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, através do método espectrofotométrico no comprimento de onda de 242 nm.

Pontos da curva	Concentração µg/ml	Absorbância*	T %	100 – T %
01	1,0	0,07947	83,28	16,72
02	2,0	0,11047	77,54	22,46
03	3,0	0,17456	66,90	33,10
04	4,0	0,22217	59,95	40,05
05	5,0	0,28125	52,33	47,67
06	6,0	0,34961	44,71	55,29
07	7,0	0,39063	40,68	59,32
08	8,0	0,44421	35,96	64,04
09	9,0	0,50562	31,22	68,78
10	10,0	0,54883	28,26	71,74
11	11,0	0,61633	24,19	75,81
12	12,0	0,68750	20,53	79,47
13	13,0	0,71594	19,23	80,77
14	14,0	0,74438	18,01	81,99
15	15,0	0,79956	15,86	84,14
16	16,0	0,87366	13,38	86,62
17	17,0	0,96545	10,83	89,17
18	18,0	0,99402	10,14	89,86
19	19,0	1,07666	8,38	91,62
20	20,0	1,13660	7,30	92,70

* Cada valor corresponde à média de três determinações

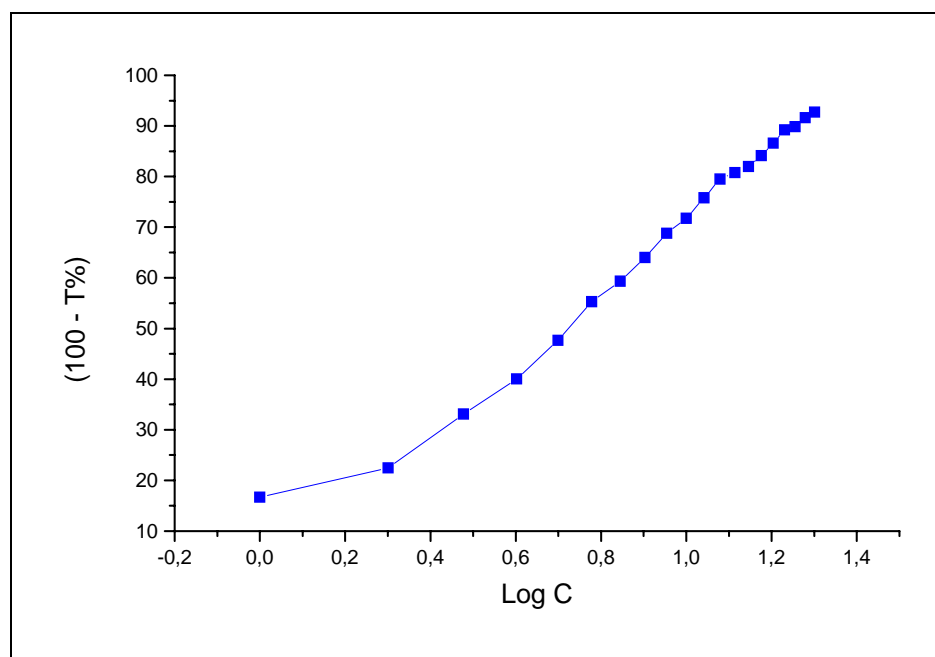


FIGURA 11 – Curva de Ringbom para o cloridrato de amiodarona.

4.2.1.2 Curva padrão

A Tabela 18 apresenta as absorvâncias médias correspondentes à curva padrão de cloridrato de amiodarona, relativas a cada uma das diluições do padrão.

TABELA 18 – Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão de cloridrato de amiodarona, através do método espectrofotométrico a 242 nm.

Concentração µg/ml	Absorbância*			Média ± D.p.	CV %	
4,0	0,22876	0,22412	0,21997	0,22428	0,00359	1,600815
6,0	0,33826	0,33447	0,33118	0,33464	0,00289	0,86446
8,0	0,44910	0,44739	0,44385	0,44678	0,00219	0,48934
10,0	0,55872	0,55908	0,55273	0,55684	0,00291	0,52300
12,0	0,67773	0,66992	0,66089	0,66951	0,00688	1,027748

* Cada valor corresponde à média de três determinações

D.p. = desvio padrão

CV % = coeficiente de variação porcentual

A representação gráfica da curva padrão e a equação da reta, determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, estão apresentadas na Figura 12.

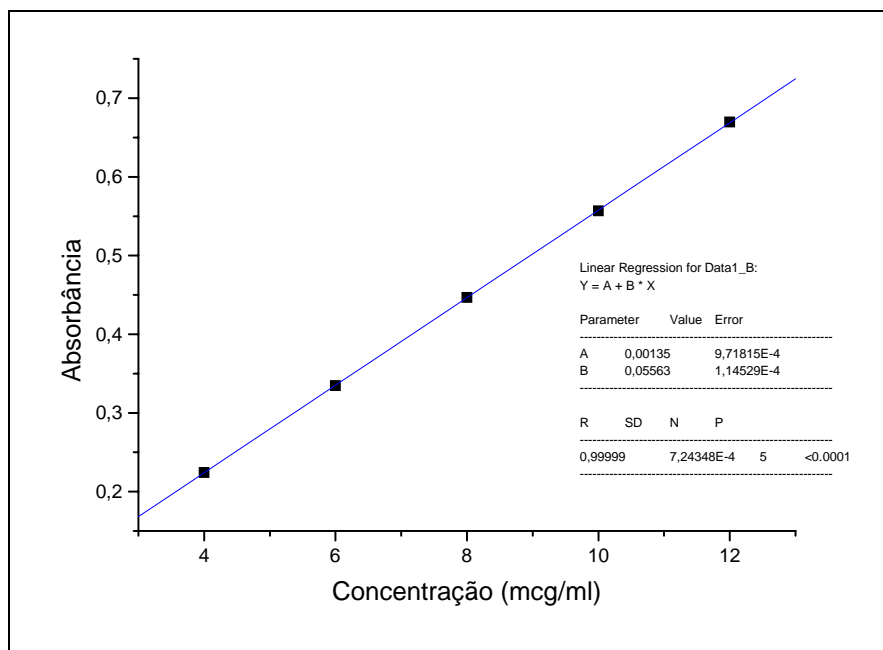


FIGURA 12 – Representação gráfica da curva padrão de cloridrato de amiodarona, obtida através de espectrofotometria a 242 nm.

Os resultados do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão, através da análise de variância, encontram-se na Tabela 19.

TABELA 19 – Análise estatística (ANOVA) das absorvâncias obtidas na determinação da curva padrão do cloridrato de amiodarona.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F.C	F
Entre amostras	4	0,37141286	0,09285321	2268,38937*	4,53
Regressão linear	1	0,37140813	0,37140813	9073,4418*	5,99
Desvio de linearidade	3	0,4735 . 10 ⁵	0,15783 . 10 ⁻⁵	0,038558**	4,76
Resíduo	6	0,2456 . 10 ³	4,09335. 10 ⁻⁵		
Total	14	0,37165847			

* Significativo ($p < 0,05$)

** Não significativo ($p > 0,05$)

4.2.1.3 Execução do ensaio

Os valores experimentais obtidos para a determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, através de espectrofotometria de absorção no ultravioleta, encontram-se na Tabela 20.

TABELA 20 – Valores experimentais obtidos para o doseamento de cloridrato de amiodarona matéria-prima, através de espectrofotometria no UV.

Amostra	Valor encontrado ($\mu\text{g/ml}$)*	Teor (%)	Média \pm D.p.	CV %
01	7,98	99,76		
02	7,92	99,07		
03	8,04	100,47		
04	7,97	99,64		
05	7,80	97,53		
06	8,05	100,61		
07	7,99	99,96	99,53 \pm 0,984	0,989
08	8,02	100,29		
09	7,97	99,61		
10	8,02	100,29		
11	8,00	100,02		
12	7,94	99,31		
13	7,96	99,47		
14	7,99	99,96		
15	7,76	97,00		

* Cada valor corresponde à média de três determinações

A repetibilidade do método proposto foi determinado através do coeficiente de variação percentual obtido na Tabela 20 e seu valor foi 0,989 %.

4.2.1.4 Teste de recuperação

Os resultados obtidos no teste de recuperação do cloridrato de amiodarona, com emprego do método espectrofotométrico no ultravioleta podem ser observados na Tabela 21.

TABELA 21 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação, realizado em amostras de cloridrato de amiodarona, através do método espectrofotométrico a 242 nm.

Amostra	Quantidade de padrão adicionado (mg/ml)	Quantidade de padrão recuperado* (mg/ml)	(%)
R ₁	0,1	0,1009	100,91
R ₂	0,2	0,1982	99,13
R ₃	0,3	0,2983	99,45

* Cada valor corresponde à média de três determinações.

4.2.1.5 Precisão do método

A precisão intermediária foi avaliada por meio do doseamento de cloridrato de amiodarona matéria-prima, conforme o item 4.2.2.1.3, em diferentes dias ($n = 2$) e por diferentes analistas ($n = 2$).

Os valores experimentais obtidos para a determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, no teste de precisão do método, por diferentes analistas, por meio da espectrofotometria de absorção no ultravioleta, encontram-se na Tabela 22.

TABELA 22 – Valores experimentais obtidos no teste de precisão do método por espectrofotometria no UV, para o doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por diferentes analistas.

Amostra	Teor %		Média ± D.p.		CV %
	Analista 1	Analista 2			
01	100,29	99,13			
02	97,00	99,15			
03	98,67	97,84			
04	100,42	96,17			
05	99,84	96,15			
06	100,47	101,23			
07	96,17	100,11	98,54	1,72	1,75
08	98,73	97,46			
09	102,30	96,79			
10	99,15	95,15			
11	97,53	98,52			
12	99,07	99,46			
13	99,78	96,57			
14	101,52	96,32			
15	98,85	97,31			

Na precisão intermediária, avaliada entre analistas, obteve-se um coeficiente de variação percentual de 1,75 % ($n = 2$).

Os valores experimentais obtidos para a determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, no teste de precisão do método, em diferentes dias, por meio da espectrofotometria de absorção no ultravioleta, encontram-se na Tabela 23.

TABELA 23 – Valores experimentais obtidos no teste de precisão do método por espectrofotometria no UV, para o doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, em diferentes dias.

Amostra	Teor %		Média ± D.p.		CV %
	Dia 1	Dia 2			
01	99,87	98,37			
02	100,47	96,43			
03	97,53	100,05			
04	97,00	97,32			
05	96,17	97,42			
06	99,07	97,88			
07	98,67	98,64	98,72	1,64	1,66
08	98,73	96,29			
09	99,78	96,13			
10	100,41	101,25			
11	101,30	101,34			
12	101,52	96,15			
13	99,84	98,19			
14	99,15	98,15			
15	98,85	99,64			

Na precisão intermediária, avaliada entre dias, obteve-se um coeficiente de variação percentual de 1,66 % (n = 2).

4.2.1.6 Limite de detecção

A concentração encontrada para o limite de detecção de cloridrato de amiodarona no método por espectrofotometria no ultravioleta foi de 0,379 µg/ml, empregando-se os valores do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração do padrão de referência para a determinação.

4.2.1.7 Limite de quantificação

A concentração encontrada para o limite de quantificação de cloridrato de amiodarona no método por espectrofotometria no ultravioleta foi de 1,150 µg/ml, empregando-se os valores do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração do padrão de referência para a determinação.

4.2.2 Titulação em meio não-aquoso

4.2.2.1 Obtenção da curva de calibração

A linearidade do método foi determinada pela construção da curva de calibração do padrão de referência no intervalo de concentração de 2,5 a 7,5 mg/ml. Na Tabela 24, estão representados os volumes gastos de solução titulante, suas médias, desvios padrões e coeficientes de variação encontrados para sua obtenção. O volume de solução titulante é obtido pela diferença entre os volumes gastos na determinação de cada concentração e na determinação do branco.

TABELA 24 – Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão de cloridrato de amiodarona, através do método volumétrico em meio não-aquoso.

Concentração mg/ml	Volume*			Média ± D.p.		CV %
2,50	3,71	3,81	3,71	3,74	0,047	1,2604
3,75	5,41	5,51	5,51	5,48	0,047	0,8602
5,00	7,21	7,21	7,31	7,24	0,047	0,6511
6,25	9,12	9,12	9,02	9,09	0,047	0,5186
7,50	10,92	10,92	11,42	11,09	0,236	2,1254

* Cada valor corresponde à média de três determinações

D.p. = desvio padrão

CV % = coeficiente de variação porcentual

A representação gráfica da curva de calibração e a equação da reta, obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na Figura 13.

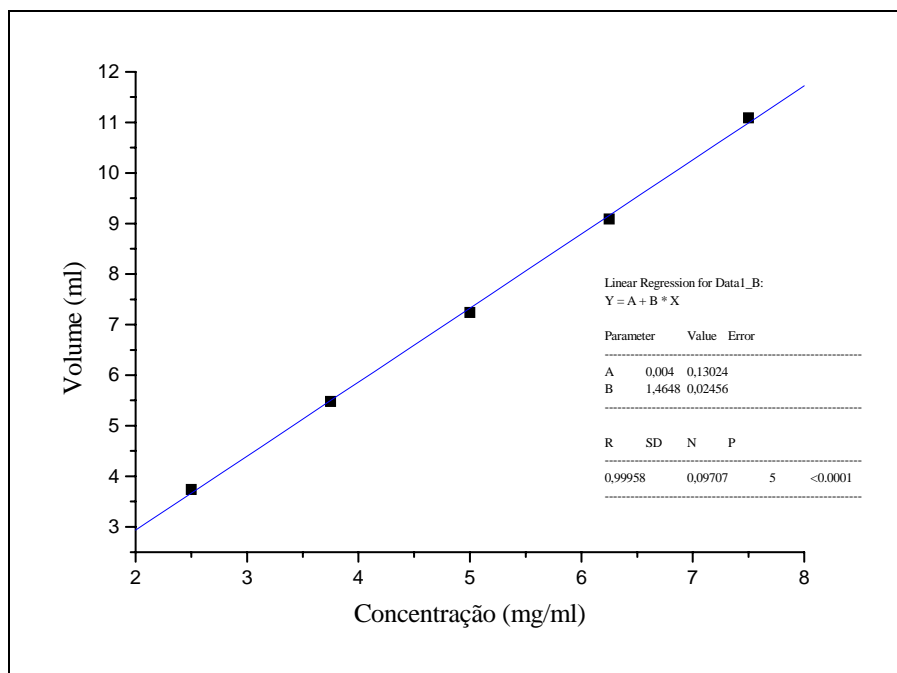


FIGURA 13 – Representação gráfica da curva de calibração de cloridrato de amiodarona obtida através de titulação em meio não-aquoso, e sua respectiva equação da reta.

Os volumes de titulantes gastos, encontrados na elaboração da curva de calibração para a titulação em meio não-aquoso, foram estatisticamente avaliados por análise de variância (ANOVA), a qual encontra-se representada na Tabela 25.

TABELA 25 – Análise estatística (ANOVA) das diferenças de volume obtidas na determinação da curva padrão do cloridrato de amiodarona.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F.C	F
Entre amostras	4	100,51476	25,12869	779,85589*	4,53
Regressão linear	1	100,43040	100,43040	3116,80562*	5,99
Desvio de linearidade	3	0,08436	0,02811	0,87265**	4,76
Resíduo	6	0,19333	0,03222		
Total	14	100,70809			

* Significativo ($p < 0,05$)

** Não significativo ($p > 0,05$)

4.2.2.2 Execução do ensaio

Os valores experimentais obtidos para a determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima com o emprego de titulação em meio não-aquoso, encontram-se na Tabela 26.

TABELA 26 – Valores experimentais obtidos para o doseamento de cloridrato de amiodarona matéria-prima, por meio de titulação em meio não-aquoso.

Amostra	Valor encontrado (mg/ml)*	Teor (%)	Média ± D.p.	CV %
01	9,93	99,32		
02	9,92	99,18		
03	9,93	99,32		
04	9,93	99,31		
05	9,88	98,77		
06	10,22	102,17		
07	10,23	102,31	99,91 ± 1,709	1,710
08	9,92	99,18		
09	9,92	99,18		
10	10,22	102,17		
11	9,54	95,36		
12	10,13	101,25		
13	10,10	101,03		
14	10,03	100,25		
15	9,98	99,78		

* Cada valor corresponde à média de três determinações

O coeficiente de variação percentual de 1,71 % determina a repetibilidade do método proposto.

4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.3.1 Obtenção da curva de calibração

A linearidade do método foi determinada pela construção da curva de calibração do padrão de referência no intervalo de concentração 2,5 a 7,5 µg/ml.

Na Tabela 27, estão representados os valores experimentais médios das áreas absolutas obtidas para a curva de calibração.

TABELA 27 – Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão de cloridrato de amiodarona, através da CLAE.

Concentração µg/ml	Áreas absolutas*			Média ± D.p.	CV %
2,50	658951	664641	642404	655332,0 ± 9431,99	1,439
3,75	953880	934296	927851	938675,6 ± 11068,37	1,179
5,00	1273526	1267933	1288814	1276757,6 ± 8825,59	0,691
6,25	1592447	1563942	1555984	1570791,0 ± 15653,94	0,996
7,50	1924546	1921884	1915804	1920744,6 ± 3658,70	0,190

* Cada valor corresponde à média de três determinações

D.p. = desvio padrão

CV % = coeficiente de variação porcentual

A representação gráfica da curva padrão e a equação da reta, determinadas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, estão representadas na Figura 14.

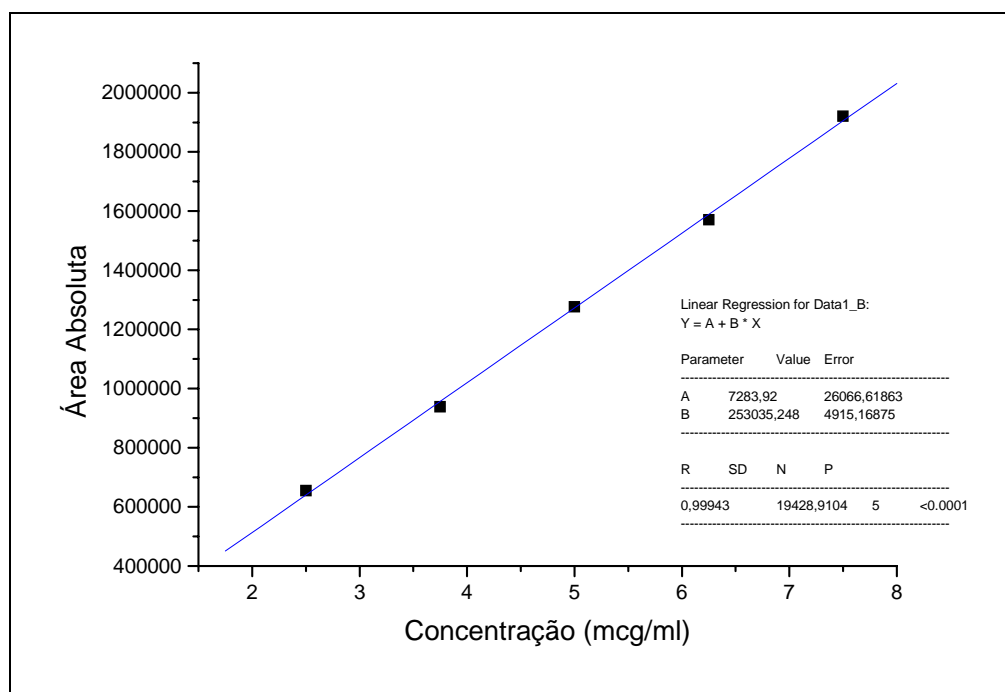


FIGURA 14 – Representação gráfica da curva de calibração de cloridrato de amiodarona, obtida através de CLAE, e sua respectiva equação da reta.

Os resultados do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão, através da análise de variância, encontram-se na Tabela 28.

TABELA 28 – Análise estatística (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva de calibração de cloridrato de amiodarona através de CLAE.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F.C	F
Entre	4	$3,00466 \cdot 10^{12}$	$7,51164 \cdot 10^{11}$	2742,50015*	4,53
Regressão linear	1	$3,00126 \cdot 10^{12}$	$3,00126 \cdot 10^{12}$	10957,5969*	5,99
Desvio de linearidade	3	$3,397 \cdot 10^9$	1132448012	4,13456**	4,76
Resíduo	6	1643384840	273897473,3		
Total	14	$3,0063 \cdot 10^{12}$			

* Significativo ($p < 0,05$)

** Não significativo ($p > 0,05$)

Os cromatogramas obtidos na análise da curva de calibração, no método por CLAE, estão representados nas Figuras de 15 a 19. Cada ponto da curva de calibração foi analisado em triplicata.

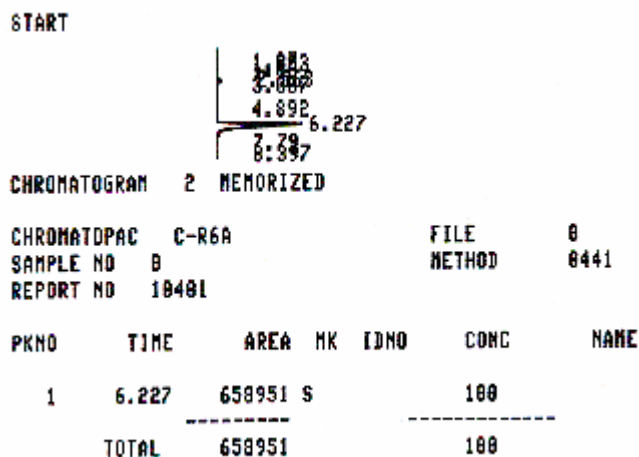


FIGURA 15 – Cromatograma obtido na curva padrão do cloridrato de amiodarona, pelo método de CLAE, na concentração de 2,5 µg/ml.

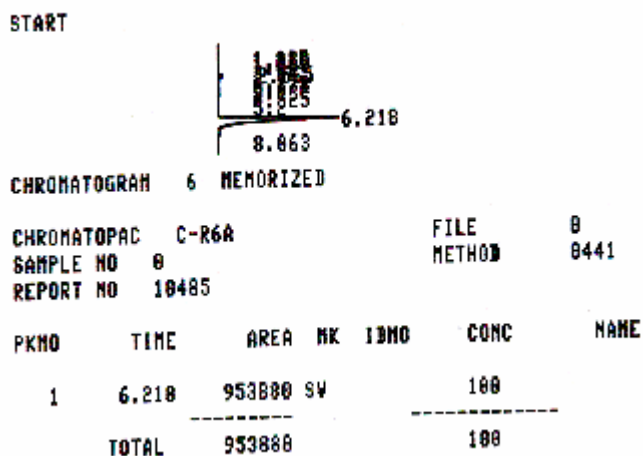


FIGURA 16 – Cromatograma obtido na curva padrão do cloridrato de amiodarona, pelo método de CLAE, na concentração de 3,75 µg/ml.

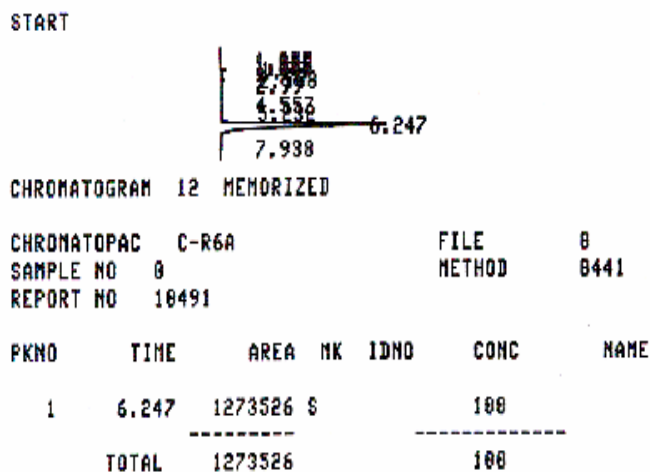


FIGURA 17 – Cromatograma obtido na curva padrão do cloridrato de amiodarona, pelo método de CLAE, na concentração de 5,0 µg/ml.

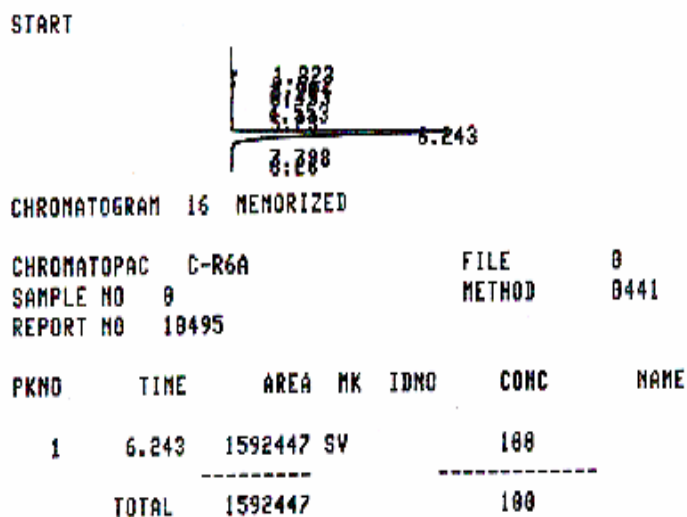


FIGURA 18 – Cromatograma obtido na curva padrão do cloridrato de amiodarona, pelo método de CLAE, na concentração de 6,25 µg/ml.

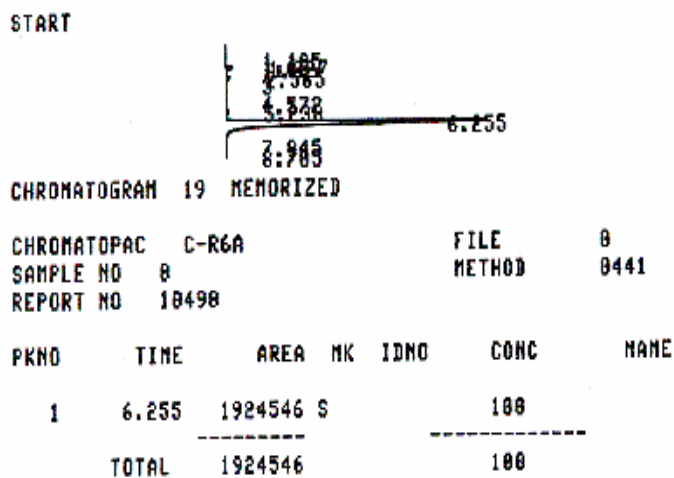


FIGURA 19 – Cromatograma obtido na curva padrão do cloridrato de amiodarona, pelo método de CLAE, na concentração de 7,5 µg/ml.

4.2.3.2 Execução do ensaio

Os valores experimentais obtidos para a determinação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), encontram-se na Tabela 29.

TABELA 29 – Valores experimentais obtidos para o doseamento de cloridrato de amiodarona matéria-prima, através de CLAE.

Amostra	Valor encontrado ($\mu\text{g/ml}$)*	Teor (%)	Média \pm D.p.	CV %
01	5,01	100,2		
02	5,07	101,5		
03	5,00	100,1		
04	5,01	100,2		
05	5,00	100,0		
06	5,01	100,2		
07	5,08	101,6	100,08 \pm 0,899	0,898
08	4,97	99,5		
09	4,98	99,7		
10	4,93	98,7		
11	4,92	98,5		
12	4,96	99,2		
13	5,07	101,4		
14	4,99	99,8		
15	5,03	100,6		

* Cada valor corresponde à média de três determinações

O coeficiente de variação percentual de 0,898 % determina a repetibilidade do método proposto.

Exemplo dos cromatogramas obtidos no doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, no método por CLAE, está representado na Figura 20.

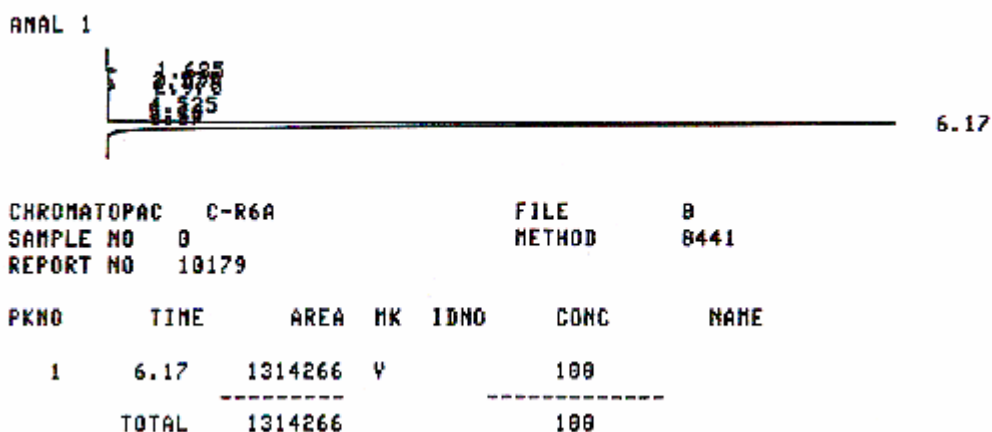


FIGURA 20 – Cromatograma obtido no doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, pelo método de CLAE, na concentração de 5,0 µg/ml.

4.2.3.3 Teste de recuperação

Os resultados obtidos no teste de recuperação do cloridrato de amiodarona, aplicando-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) estão demonstrados na Tabela 30.

TABELA 30 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação, realizado em amostras de cloridrato de amiodarona, através da CLAE.

Amostra	Quantidade de padrão adicionado (µg/ml)	Quantidade de padrão recuperado*	
		(µg/ml)	(%)
R ₁	1,25	1,255	100,4
R ₂	3,75	3,73	99,6
R ₃	6,25	6,27	100,3

* Cada valor corresponde à média de três determinações.

4.2.3.4 Precisão do método

A precisão intermediária, para o método da CLAE, foi avaliada através do doseamento de cloridrato de amiodarona matéria-prima, conforme o item 4.2.2.3.2, em diferentes dias ($n = 2$) e por diferentes analistas ($n = 2$).

Os valores experimentais obtidos para a determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, no teste de precisão do método, por diferentes analistas, por CLAE, encontram-se na Tabela 31.

TABELA 31 – Valores experimentais obtidos no teste de precisão do método por CLAE, para o doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por diferentes analistas.

Amostra	Teor %		Média \pm D.p.		CV %
	Analista 1	Analista 2			
01	98,78	102,45			
02	98,52	102,50			
03	100,60	102,00			
04	99,33	103,00			
05	99,79	100,88			
06	98,47	100,97			
07	101,53	99,41	100,20	1,3097	1,31
08	100,96	99,35			
09	101,92	99,71			
10	99,99	100,21			
11	99,84	99,72			
12	98,37	99,22			
13	100,94	99,55			
14	100,65	98,73			
15	100,32	97,94			

Na precisão intermediária, avaliada entre analistas, obteve-se um coeficiente de variação percentual de 1,31 % ($n = 2$).

Os valores experimentais obtidos para a determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, no teste de precisão do método, em diferentes dias, por CLAE, encontram-se na Tabela 32.

TABELA 32 – Valores experimentais obtidos no teste de precisão do método por CLAE, para o doseamento do cloridrato de amiodarona matéria-prima, em diferentes dias.

Amostra	Teor %		Média ± D.p.		CV %
	Dia 1	Dia 2			
01	98,89	98,17			
02	100,86	101,96			
03	100,15	101,45			
04	97,37	101,35			
05	96,51	103,00			
06	95,89	103,87			
07	98,91	102,51	100,23	1,9178	1,91
08	98,99	99,15			
09	99,05	101,91			
10	100,23	100,38			
11	101,20	100,34			
12	98,30	100,42			
13	98,29	99,89			
14	101,43	102,79			
15	101,29	102,42			

Na precisão intermediária, avaliada entre dias, obteve-se um coeficiente de variação percentual de 1,91 % (n = 2).

4.2.3.5 Limite de detecção

A concentração encontrada para o limite de detecção de cloridrato de amiodarona no método por CLAE foi 0,216 µg/ml, empregando-se os valores do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração do padrão de referência para a determinação.

4.2.3.6 Limite de quantificação

A concentração encontrada para o limite de quantificação de cloridrato de amiodarona no método por CLAE foi 0,654 µg/ml, empregando-se os valores do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração do padrão de referência para a determinação.

4.2.3.7 Robustez

Os valores experimentais obtidos na determinação de cloridrato de amiodarona através do método proposto por CLAE, com modificações em seus parâmetros analíticos, estão representados na Tabela 33.

TABELA 33 – Valores experimentais obtidos e alterações sofridas durante a quantificação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, na avaliação da robustez do método.

Parâmetro analítico	Amostra	Valor encontrado (µg/ml)*	Teor (%)	Média ± D.p.	CV %
Fase móvel: metanol:hidróxido de amônio 25 % (98,5:1,5)	1	5,095	101,91	100,15 ± 1,373	1,371
	2	4,998	99,97		
	3	4,928	98,56		
Comprimento de onda: 240 nm	1	4,889	97,79	97,35 ± 0,422	0,434
	2	4,874	97,48		
	3	4,839	96,78		
Vazão: 0,7 ml/min	1	4,866	97,33	98,21 ± 0,823	0,838
	2	4,965	99,31		
	3	4,899	97,99		

* Cada valor corresponde à média de três determinações

4.2.4 Titulação em meio aquoso

4.2.4.1 Obtenção da curva de calibração

A linearidade do método foi determinada pela construção da curva de calibração do padrão de referência no intervalo de concentração de 4,0 a 8,0 mg/ml. Na Tabela 34, estão representados os valores experimentais médios obtidos do volume de solução titulante para a realização da curva de calibração. O volume de solução titulante é obtido pela diferença entre os volumes gastos na determinação do branco.

TABELA 34 – Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão de cloridrato de amiodarona, através do método volumétrico em meio aquoso.

Concentração mg/ml	Volume*			Média ± D.p.	CV %	
4,0	6,5	6,5	6,5	6,50	0,000	0,000
5,0	7,9	7,9	7,3	7,70	0,283	3,673
6,0	9,6	9,6	9,5	9,57	0,047	0,493
7,0	11,0	11,0	10,8	10,93	0,094	0,862
8,0	12,4	12,4	12,4	12,40	0,000	0,000

* Cada valor corresponde à média de três determinações

D.p. = desvio padrão

CV % = coeficiente de variação porcentual

A representação gráfica da curva de calibração e a equação da reta, obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na Figura 21.

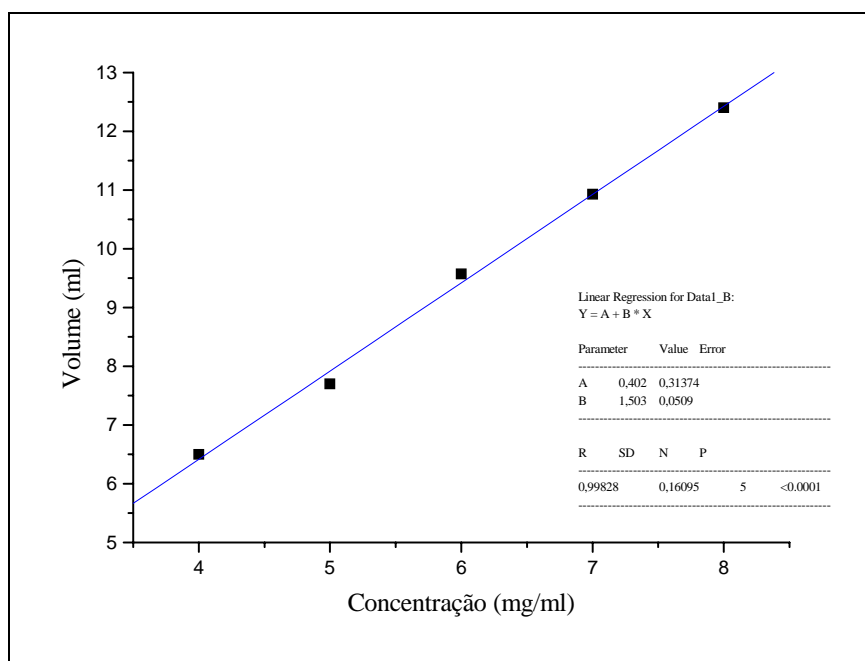


FIGURA 21 – Representação gráfica da curva de calibração de cloridrato de amiodarona obtida através de titulação em meio aquoso, e sua respectiva equação da reta.

Os volumes de titulantes gastos na elaboração da curva de calibração foram estatisticamente avaliados pela análise de variância (ANOVA), a qual é representada na Tabela 35.

TABELA 35 – Análise estatística (ANOVA) das diferenças de volume obtidas na determinação da curva padrão do cloridrato de amiodarona.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F.C	F
Entre	4	68,03066	17,00766	373,33902*	4,53
Regressão linear	1	67,80033	67,80033	1488,3*	5,99
Desvio de linearidade	3	0,2303	0,07677	1,68536**	4,76
Resíduo	6	0,27333	0,04555		
Total	14	68,304			

* Significativo ($p < 0,05$)

** Não significativo ($p > 0,05$)

4.2.4.2 Execução do ensaio

Os valores experimentais obtidos para a determinação de cloridrato de amiodarona matéria-prima através titulação em meio aquoso, encontram-se na Tabela 36.

TABELA 36 – Valores experimentais obtidos para o doseamento de cloridrato de amiodarona matéria-prima, através de titulação em meio aquoso.

Amostra	Valor encontrado (mg/ml)*	Teor (%)	Média ± D.p.	CV %
01	7,53	100,45		
02	7,55	100,67		
03	7,55	100,61		
04	7,54	100,57		
05	7,40	98,71		
06	7,44	99,20		
07	7,39	98,53	99,81 ± 0,928	0,930
08	7,48	99,75		
09	7,59	101,17		
10	7,60	101,35		
11	7,42	98,87		
12	7,44	99,15		
13	7,50	100,06		
14	7,39	98,54		
15	7,46	99,46		

* Cada valor corresponde à média de três determinações

O coeficiente de variação percentual de 0,93 % determina a repetibilidade do método proposto.

4.3 Análise comparativa dos métodos propostos

A representação dos métodos analíticos utilizados encontra-se descrita na Tabela 37.

TABELA 37 – Métodos analíticos analisados comparativamente para a quantificação de cloridrato de amiodarona matéria-prima

	Método
UV	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta
MNA	Titulação em meio não-aquoso
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
MA	Titulação em meio aquoso

Os resultados obtidos na quantificação do cloridrato de amiodarona através dos diferentes métodos foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), e estão expostos na Tabela 38.

TABELA 38 – Análise estatística (ANOVA) entre os métodos estudados para a quantificação do cloridrato de amiodarona.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F.C	F
Entre	3	2,35731	0,78577	0,53*	2,76
Resíduo	56	83,41822	1,48961		
Total	59	85,77554			

*Não significativo ($p > 0,05$)

A análise comparativa das médias e desvios padrões encontrados na determinação quantitativa do cloridrato de amiodarona matéria-prima nos diferentes métodos, encontram-se na Tabela 39.

TABELA 39 – Análise comparativa das médias e desvio padrões encontrados nos diferentes métodos.

Métodos	N	Média %	DP	Mínimo	Máximo	T. Duncan*
UV	15	99,532	1,01948	97,00	100,61	A
MNA	15	99,905	1,76907	95,36	102,31	A
CLAE	15	100,080	0,93059	98,50	101,60	A
MA	15	99,806	0,96099	98,53	101,35	A

* letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$)

A representação gráfica das médias, dos desvios padrões e dos limites de confiança encontrados para os diferentes métodos utilizados na avaliação do cloridrato de amiodarona encontra-se exposta na Figura 22.

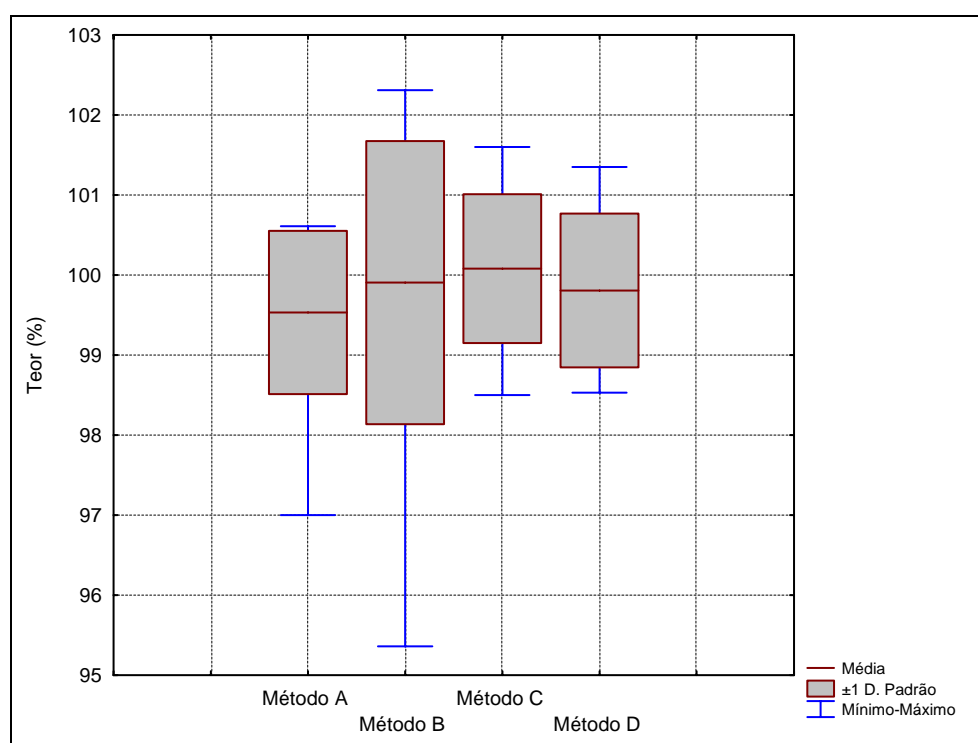


FIGURA 22 - Representação gráfica da análise comparativa das médias e desvio padrões encontrados nos diferentes métodos. Método A: espectrofotometria de absorção no ultravioleta; Método B: titulação em meio não-aquoso; Método C: cromatografia líquida de alta eficiência; Método D: titulação em meio aquoso.

5. DISCUSSÃO

A procura constante de novos fármacos pela indústria farmacêutica e a necessidade de atender a demanda mundial de medicamentos tem determinado o crescimento constante da indústria farmacêutica.

Por outro lado, as exigências internacionais de harmonização e validação de metodologias a serem empregadas nas análises têm contribuído de maneira significativa para o aprimoramento da qualidade dos medicamentos.

Foi em consonância com essas normas que o autor estudou a validação dos métodos internacionalmente preconizados para o doseamento do fármaco objeto da presente pesquisa.

Observa-se que muitas substâncias terapêuticas, amplamente usadas na clínica médica, embora tenham aprovação dos órgãos competentes, não possuem metodologias adequadas às condições reais observadas nos diferentes países onde são utilizadas.

O desenvolvimento de diferentes metodologias analíticas para a quantificação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, com a avaliação comparativa entre elas, foi objeto de estudo neste trabalho devido a ausência de monografia farmacopéica para o controle deste princípio ativo em nosso compêndio oficial.

Buscou-se o desenvolvimento dos métodos analíticos propostos, observando-se os parâmetros de validação sugeridos por órgãos internacionais ^{23,56}.

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24 – 26.

⁵⁶ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 27nd Revision 2004, The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD.

Os resultados obtidos para a determinação do pH ficaram dentro dos limites explicitado pela literatura oficial ^{11,8}, conforme especificado no item 4.1.1.

A caracterização do cloridrato de amiodarona matéria-prima foi determinada por espectrofotometria na região do infravermelho, ultravioleta e determinação da faixa de fusão. Todos os métodos utilizados mostraram-se adequados e confiáveis para a finalidade proposta, além de serem empregados pelos mais recentes códigos oficiais de uso internacional.

A espectroscopia de absorção no infravermelho é largamente utilizada para caracterização e identificação de fármacos, pois seus espectros sofrem pouca influência de impurezas, quando estas se encontram em baixas concentrações, e seus espectros são característicos para cada substância.

Os espectros de espectrofotometria no infravermelho, obtidos com a substância de referência e a matéria-prima, podem ser conferidos nas Figuras 05 e 06, respectivamente, e comprovam a autenticidade da amostra do cloridrato de amiodarona.

A caracterização do cloridrato de amiodarona matéria-prima, por espectrofotometria no ultravioleta, foi determinada comparativamente por meio da análise do espectro obtido com a substância de referência, conforme demonstrado nas Figuras 07, 08 e 09. Observou-se espectros idênticos para a substância de referência e a matéria-prima de cloridrato de amiodarona.

A determinação da faixa de fusão, mesmo simples, rápida e de baixo custo, é de grande importância como indicação do grau de pureza e identidade quando comparada com valores encontrados com substâncias químicas de referência, ou mesmo com dados da literatura.

¹¹ EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4. ed. Council of Europe, Strasbourg, 2004.

⁸ BRITISH PHARMACOPOEIA 2001 CD-ROM, Version 5.0, may 2001, Data © Crow Copyright 2001, Index + © System Simulation Ltd, The Stationery Office Ltd.

Os valores obtidos para a faixa de fusão foram comparados com os valores fornecidos na literatura oficial ^{8,11}, conforme descrito no item 4.1.2.3 e mostraram inteira concordância.

O resultado da análise qualitativa por cromatografia em camada delgada, indica que o cloridrato de amiodarona matéria-prima, em diferentes concentrações, reagiu de maneira idêntica à substância química de referência, ensejando, também, verificar que o principal interferente do fármaco encontra-se na matéria-prima em concentração inferior a 0,2 %, conforme Figura 10.

A escolha de método adequado para a realização de uma análise quantitativa depende de inúmeros fatores, tais como a quantidade de amostra disponível, a faixa da quantidade relativa em que, presumivelmente, está situado o componente a determinar, a exatidão requerida, a composição química da amostra, o número de amostras a analisar e os recursos disponíveis ^{39,40}.

Na quantificação do cloridrato de amiodarona, por meio de espectrofotometria na região do ultravioleta, verificou-se a linearidade com o auxílio da curva de Ringbom. Observou-se que a concentração, utilizada nas análises, encontra-se dentro da faixa linear determinada pela curva.

A curva de calibração obtida por esta metodologia apresentou regressão linear significativa para $p < 0,05$ e não foi observado desvio significativo de linearidade, para $p > 0,05$. O coeficiente de correlação obtido para a reta de calibração foi de 0,99999. Esses dados demonstram que a curva pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa do cloridrato de amiodarona, conforme pode ser observado na Figura 12.

⁸ BRITISH PHARMACOPOEIA 2001 CD-ROM, Version 5.0, may 2001, Data © Crow Copyright 2001, Index + © System Simulation Ltd, The Stationery Office Ltd.

¹¹ EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4. ed. Council of Europe, Strasbourg, 2004.

³⁹ OHLWEILER, O. A. Química Analítica Quantitativa. 3. ed. Rio de Janeiro: LTC. V.1. (1984).

⁴⁰ OPPE, T. P. Estudo da Estabilidade da Ampicilina na Forma Farmacêutica Pó para Suspensão Oral. Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Porto Alegre: UFRGS 1995. Dissertação (Mestrado).

O coeficiente de variação percentual médio, que representa a repetibilidade do método, foi 0,989 %, calculado a partir das absorvâncias determinadas para a execução do ensaio de quantificação, conforme Tabela 20.

A porcentagem de recuperação média obtida para esse método foi 99,83 %, demonstrando ótima sensibilidade do mesmo, conforme Tabela 21.

Na avaliação da precisão intermediária do método, com diferentes analistas e em diferentes dias, obteve-se um coeficiente de variação percentual de 1,75 % e 1,66 %, respectivamente, o que demonstrou a precisão do método, conforme descrito nas Tabelas 22 e 23.

Os limites de concentração para detecção e quantificação do cloridrato de amiodarona, para o método de espectrofotometria na região do ultravioleta, foram 0,379 µg/ml e 1,150 µg/ml, respectivamente.

Estes valores foram calculados conforme recomendação internacional ²³, utilizando-se o desvio padrão da resposta e a inclinação da curva de calibração da substância química de referência.

Os parâmetros analíticos escolhidos para a validação do método por espectrofotometria na região do ultravioleta demonstraram que a metodologia pode ser aplicada na quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima.

Os métodos quantitativos por volumetria apresentam grande seletividade, fácil execução e baixo custo operacional ⁴⁰.

A curva de calibração, determinada para o método de titulação em meio não-aquoso, representada na Figura 13, apresentou regressão linear significativa para $p < 0,05$ e não foi

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24 – 26.

⁴⁰ OPPE, T. P. Estudo da Estabilidade da Ampicilina na Forma Farmacêutica Pó para Suspensão Oral. Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Porto Alegre: UFRGS 1995. Dissertação (Mestrado).

observado desvio significativo de linearidade, para $p > 0,05$. O coeficiente de correlação obtido para a reta de calibração foi 0,99958. Esses dados demonstram que a curva pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa do cloridrato de amiodarona.

O coeficiente de variação percentual, determinado na quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, foi de 1,71 %, conforme Tabela 26, o que representa boa reprodutibilidade do método quantitativo por volumetria em meio não-aquoso.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica moderna que, apesar de ser vantajosa por sua alta seletividade, reprodutividade e rapidez, requer o manuseio de aparelhos dispendiosos, limitando sua aplicação a laboratórios que possuam este equipamento. Além disso, é necessário que o operador tenha grande experiência com o mesmo para a obtenção de aproveitamento máximo do sistema ¹⁵.

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia líquida ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas. É um método físico-químico que consiste na separação dos componentes de uma mistura através da distribuição seletiva destes componentes entre duas fases que estão em contato íntimo ⁴⁸.

Esta metodologia permite sua utilização nas mais diversas áreas de desenvolvimento e controle de produtos químico-farmacêuticos, em virtude de sua versatilidade. Isto pode ser observado pelo seu emprego na maioria das monografias farmacopéicas como método de escolha para a quantificação de fármacos ³⁶.

¹⁵ GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, R.S. Introdução a Métodos Cromatográficos. 4. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. Cap. 9 p. 183-238.

⁴⁸ RENGER, B. System performance and variability of chromatographic techniques used in pharmaceutical quality control. *Journal of Chromatography B.*, 745 (2000) p. 167-176.

³⁶ MORSCH, L. M. Cloridrato de cefetamete pivoxila: validação de metodologia de análise e estudo da estabilidade. Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas, Santa Maria: UFSM 2002. Dissertação (Mestrado).

Os parâmetros analíticos escolhidos para a quantificação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, por CLAE, satisfizeram os objetivos: pequeno tempo de retenção do analito, rápida preparação da amostra, fase móvel de simples composição, fácil preparo e baixo custo, favorecendo o aumento de vida útil da coluna cromatográfica. Conforme descrito na Tabela 10.

Na determinação quantitativa do cloridrato de amiodarona, através da CLAE, verificou-se que a curva de calibração, representada na Figura 14, apresentou regressão linear significativa para $p < 0,05$ e não foi observado desvio significativo de linearidade, para $p > 0,05$. O coeficiente de correlação obtido para a reta de calibração foi 0,99943. Esses dados demonstram que a curva pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa do cloridrato de amiodarona.

O coeficiente de variação percentual médio, que representa a repetibilidade do método, foi 0,898 %, sendo calculado a partir das áreas absolutas determinadas nos cromatogramas para a execução do ensaio de quantificação, conforme Tabela 29.

A porcentagem de recuperação média obtida para esse método foi 100,1 %, demonstrando ótima sensibilidade do mesmo, conforme Tabela 30.

Na avaliação da precisão intermediária do método, com diferentes analistas e em diferentes dias, obteve-se um coeficiente de variação percentual de 1,31 % e 1,91 %, conforme descrito nas Tabelas 31 e 32, respectivamente, demonstrando a precisão do método.

Os limites de concentração para detecção e quantificação do cloridrato de amiodarona, para o método de CLAE, foram 0,215 µg/ml e 0,654 µg/ml, respectivamente.

Estes valores foram calculados conforme recomendação internacional²³, utilizando-se o desvio padrão da resposta e a inclinação da curva de calibração da substância química de referência.

²³ ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on Validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24 – 26.

As modificações efetuadas nos parâmetros analíticos, na determinação quantitativa por CLAE do cloridrato de amiodarona matéria-prima, demonstraram que o método é robusto frente a pequenas alterações nas condições cromatográficas, conforme Tabela 33.

Os parâmetros analíticos escolhidos para a validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência, demonstraram que a metodologia pode ser aplicada na quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima.

A volumetria em meio aquoso é empregada para a quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima pela Farmacopéia Européia ¹¹ e Farmacopéia Britânica ⁸, constituindo-se no único método presente em compêndios oficiais. A obtenção de valores de validação para esse método serviu para comparação com valores obtidos nos diferentes métodos presentes nesse trabalho.

A curva de calibração, determinada para o método de titulação em meio aquoso, representada na Figura 21, apresentou regressão linear significativa para $p < 0,05$ e não foi observado desvio significativo de linearidade, para $p > 0,05$. O coeficiente de correlação obtido para a reta de calibração foi 0,99828. Esses dados demonstram que a curva pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa do cloridrato de amiodarona.

O coeficiente de variação percentual, determinado na quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, foi 0,930 %, conforme Tabela 36, o que representa boa repetibilidade do método quantitativo por volumetria em meio aquoso.

A análise comparativa entre os métodos apresentados para a quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, avaliando-se os parâmetros propostos em suas

¹¹ EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4. ed. Council of Europe, Strasbourg, 2004.

⁸ BRITISH PHARMACOPOEIA 2001 CD-ROM, Version 5.0, may 2001, Data © Crow Copyright 2001, Index + © System Simulation Ltd, The Stationery Office Ltd.

validações, demonstrou que as metodologias estudadas não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), conforme demonstrado na Tabela 39.

Os estudos realizados nos permitiram verificar que os métodos de determinação quantitativa empregados: espectrofotometria de absorção no ultravioleta, titulação em meio não-aquoso, cromatografia líquida de alta eficiência e titulação em meio aquoso são estatisticamente equivalentes e podem ser utilizados na quantificação de matéria-prima do cloridrato de amiodarona, conforme já exposto na Figura 22.

6. CONCLUSÕES

- O cloridrato de amiodarona pode ser caracterizado através dos métodos espectroscópicos de infravermelho e ultravioleta e pela determinação da faixa de fusão.
- A cromatografia em camada delgada, empregando placas de sílica gel GF₂₅₄, como suporte, e a mistura de ácido fórmico, metanol e cloreto de metileno (5:10:85) (V/V), como eluente, mostrou-se adequada para identificação de cloridrato de amiodarona matéria-prima, além de conseguir identificar a presença de Cloridrato de (2-cloroetil)dietilamina como contaminante da matéria-prima.
- O método analítico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, para quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, empregando metanol como solvente no comprimento de onda de 242 nm, demonstrou boa linearidade, precisão e exatidão.
- A espectrofotometria no UV, no comprimento de onda de 242 nm, demonstrou ser exata, precisa e reprodutível, podendo ser utilizada para a quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima.
- A determinação quantitativa do cloridrato de amiodarona por titulação potenciométrica em meio não-aquoso, utilizando mistura de ácido acético glacial e acetato mercúrico, como solvente, ácido perclórico, como solução titulante, empregando eletrodo de vidro-calomelano para detecção, demonstrou boa linearidade, precisão e exatidão.

-
- A titulação potenciométrica em meio não-aquoso demonstrou ser precisa, exata e reprodutível na quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima.
 - A cromatografia líquida de alta eficiência, utilizada para quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, com o emprego das seguintes condições cromatográficas: coluna Supelcosil C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel metanol:hidróxido de amônio 25% (98 : 2); detecção UV a 242 nm; vazão 0.8 ml/min; volume de injeção 20 µl, demonstrou atender aos requisitos de validação: linearidade, precisão, exatidão e robustez
 - A metodologia por CLAE, empregada para a quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima, demonstrou ser precisa, exata e robusta, podendo ser utilizada para esta determinação.
 - A titulação potenciométrica em meio aquoso, utilizando mistura de ácido clorídrico e etanol como solvente, hidróxido de sódio como titulante e eletrodo de vidro-calomelano para detecção, apresentou, como parâmetros de validação analítica, boa linearidade, precisão e exatidão.
 - A metodologia empregando titulação potenciométrica em meio aquoso, demonstrou se exata e precisa na quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima.
 - Os métodos propostos para a quantificação do cloridrato de amiodarona matéria-prima (espectrofotometria de absorção no ultravioleta, titulação potenciométrica em meio não-aquoso, cromatografia líquida de alta eficiência e titulação potenciométrica em meio aquoso) atenderam aos requisitos de validação analítica propostos, não apresentando, entre eles, diferenças estatisticamente significativas, demonstrando que qualquer dos métodos apresentados pode ser utilizado para a determinação quantitativa do cloridrato de amiodarona matéria-prima.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, E. C., GUIMARÃES, A. C., MAGUIRE, J. H. Efficacy of amiodarone for the treatment of ventricular extrasystoles in chronic Chagas myocarditis. *Tropical Cardiology*, 9 (1983) p. 65-71.
2. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15. ed. Arlington, v. 1, (1990) p. xvii.
3. ARRANZ, M. I., MORO, C. Amiodarone determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7 (1989) p. 1909-1914.
4. AUER, J., BERENT, R., EBER, B. Amiodarone in the prevention and treatment of arrhythmia. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 3 (2002) p. 1037-1044.
5. AVERY, G. S. Cardiovascular Drugs, 2 vols., University Park Press, Baltimore (1978).
6. BITTENCOURT, C. F. Cloridrato de DL-homocisteína-tiolactona análises eletroforética e espectrofotométrica. Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria: UFSM, 1967. Tese (Doutorado).
7. BRANDÃO, A. P. Tratando a hipertensão arterial, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares – Adalat Insight Study. *Revista Brasileira de Cardiologia*, v. 2, n. 5, (2000) p. 181-183.
8. BRITISH PHARMACOPOEIA 2001 CD-ROM, Version 5.0, may 2001, Data © Crow Copyright 2001, Index + © System Simulation Ltd, The Stationery Office Ltd.
9. CARDOSO, S. G. Contribuição ao controle de qualidade de comprimidos de cloridrato de buspirona. Curso de Pós-graduação em Farmácia, Porto Alegre: UFRGS 1995. Dissertação (Mestrado).
10. DONOSO, E. Drugs in Cardiology, 2 parts, Thieme, Stuttgart (1975).
11. EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4. ed. Council of Europe, Strasbourg, 2004.

12. FAILLER, J. M., FARINOTTI, R., DAUPHIN, A. High performance liquid chromatographic assay of amiodarone and N-desethylamiodarone in plasma. *Journal de Pharmacie Clinique*, 4 (1985) p. 415-421.
13. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo, Atheneu, Parte I, 1988.
14. FLANAGAN, R. J., STOREY, G. C. A., HOLT, D. W. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the measurement of amiodarone in blood plasma or serum at the concentrations attained during therapy. *Journal of Chromatography*, 187 (1980) p. 391-398.
15. GUIMARÃES, L. F. L., COLLINS, C. H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In COLLINS, C. H., BRAGA, G. L.; BONATO, R.S. Introdução a Métodos Cromatográficos. 4. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. Cap. 9 p. 183-238.
16. GUMIENICZEK, A., MISZTAL, G., PRZYBOROWSKI, L. Determination of amiodarone in tablets and plasma by high-performance liquid chromatography. *Acta Polonica Pharmaceutica*, 51 (1994).
17. HA, H. R., KOZLIK, P., STIEGER, B. *et al.* Metabolism of amiodarone – High-performance liquid chromatographic assay for mono-N-desethylamiodarone hydroxylation in liver microsomes. *Journal of Chromatography B*, 15 (2001) p. 309-324.
18. HEGER, J. J., PRYSTOWSKY, E. N., ZIPES, D. P. Relationship between amiodarone dosage, drug concentrations and adverse side effects. *American Heart Journal*, 106 (1983) p. 931.
19. HOLT, D. W., TUCKER, G. T., JACKSON, P. R. *et al.* Amiodarone pharmacokinetics. *American Heart Journal*, 106 (1983) p. 840.
20. HONDEGHEM, L. M., KATZUNG, B. G. Antiarrhythmic agents: Modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, (1984) p. 24-387.
21. HONDEGHEN, L. M., MASON, J. W. Agents used in cardiac arrhythmias. In KATZUNG, B. G. Basic and clinical pharmacology. 5 edition. Appleton and Lange, Connecticut, (1992) p. 190-210.
22. HONDEGHEN, L. M. Classification of antiarrhythmic agents and the two laws of pharmacology. *Cardiovascular Research*, 45 (2000) p. 57-60.
23. ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guidelines on validation of Analytical Procedure Federal Register, v. 60, n. 40 (1996) p. 24 – 26.

-
24. KANNAN, R., NADEMANEE, K., HENDRICKSON, J. A. *et al.* Amiodarone kinetics after oral doses. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 31 (1982) p. 438 – 452.
 25. KATZ, A. M. Cardiac ion channels. *New England Journal of Medicine*, 328 (1993) p. 1244-1251.
 26. KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2003).
 27. KENNEDY, R. L., GRIFFITHS, H., GRAY, T. A. Amiodarone and the thyroid. *Clinical Chemistry*, (1989) p. 1882-1887.
 28. KODAMA, I., KAMIYA, K., TOYAMA, J. Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovascular Research*, (1997) p. 13-29.
 29. KOLLROSER, M., SCHOBER, C. Determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with an ion trap detector. *Journal of Chromatography B*, 766 (2002) p. 219-226.
 30. KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J. H. *Química farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1988).
 31. KRAMER, S. D., GAUTIER, J. C., SAUDEMONT, P. Considerations on the potentiometric log P determination. *Pharmaceutical Research*, 15 (1998) p. 1310-1313.
 32. LAPORTA, L. V. Estabilidade da associação de benzilpenicilinas e estreptomicina em produtos veterinários na forma de pó para suspensão injetável. Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas, Santa Maria: UFSM 1999. Dissertação (Mestrado).
 33. MAMOLO, M. G., VIO, L., FURLAN, G. Simultaneous determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma by high performance liquid chromatography. *Farmaco*, 47 (1992) p. 1067-1080.
 34. MASON, J. W. A comparison of seven antiarrhythmic drugs in patients with ventricular tachyarrhythmias: Electrophysiologic study versus electrocardiographic monitoring investigators. *New England Journal of Medicine*, (1993) p. 329-452.
 35. MASON, J.W. Amiodarone. *New England Journal of Medicine*, (1987) p. 316-455.
 36. MORSCH, L. M. Cloridrato de cefetamete pivoxila: validação de metodologia de análise e estudo da estabilidade. Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas, Santa Maria: UFSM 2002. Dissertação (Mestrado).

-
37. MOSTOW, N. D., VROBEL, T. R., NOON, D. *et al.* Rapid suppression of complex ventricular arrhythmias with high-dose oral amiodarone. *Circulation*, 73 (1986).
 38. NOBLE, J. P., LAMBERT, D., JUSTRABO, E. *et al.* Skin pigmentation after amiodarone administration – Histogenetic problems. *Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie*, 102 (1975) p. 277-286.
 39. OHLWEILER, O. A. Química Analítica Quantitativa. 3. ed. Rio de Janeiro: LTC. V.1. (1984).
 40. OPPE, T. P. Estudo da Estabilidade da Ampicilina na Forma Farmacêutica Pó para Suspensão Oral. Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Porto Alegre: UFRGS 1995. Dissertação (Mestrado).
 41. PETER, T., HAMER, A., MANDEL, W. J. *et al.* Evaluation of amiodarone therapy in the treatment of drug-resistant cardiac arrhythmias: long-term follow-up. *American Heart Journal* 106 (1983) p. 943.
 42. PIETRA, A. M., CAVRINI, V., GATTI, R. *et al.* Determination of amiodarone hydrochloride in pharmaceutical formulations by derivative UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC). *Pharmaceutical Research*, 5 (1988).
 43. PLOMP, T. A., ENGELS, M, DE MEDINA, E. O. R. *et al.* Simultaneous determination of amiodarone and its major metabolite desethylamiodarone in plasma, urine and tissues by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 273 (1983) p. 379-392.
 44. POLLAK, P. T. Oral amiodarone: historical overview and development. *Pharmacotherapy*, 18 (1998) p. 121-126.
 45. RAKITA, L., MOSTOW, N. D., NOON, D. L. *et al.* Determination of amiodarone and its n-deethylated metabolite in serum by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 277 (1983) p. 229-237.
 46. RALUCA, I. S., HASSAN, Y. A., BAIULESCU, G. Amiodarone-selective membrane electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 37 (1996) p. 141-144.
 47. RANG, H.P., DALE, M. M., RITTER, J. M. Farmacologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2001).
 48. RENGER, B. System performance and variability of chromatographic techniques used in pharmaceutical quality control. *Journal of Chromatography B.*, 745 (2000) p. 167-176.
 49. RUSKIN, J. N., The cardiac arrhythmia suppression trial. *New England Journal of Medicine*, 321 (1989) p. 386-388.

-
50. SILVA, P. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., (2002).
 51. SINGH, B. N., NADEMANEE, K. Amiodarone and thyroid function: clinical implications during antiarrhythmic therapy. *American Heart Journal*, (1983) p. 857-868.
 52. SINGH, B., VENKATESH, N., NADEMANEE, K. *et al.* The historical development, cellular electrophysiology and pharmacology of amiodarone. *Progress in Cardiovascular Diseases*, (1989) p. 249-280.
 53. SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. Analytical method development and validation for the academic researcher. *Analytical Letters*, 32, 6 (1999) p. 1067–1080.
 54. SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, v. 2, n. 3 (1998) p. 12–20.
 55. THE MERCK INDEX, Merck, Rahway, 1997.
 56. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 27nd Revision 2004, The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD.
 57. VAUGHAN WILLIAMS, E. M. Antiarrhythmic drugs: Handbook of experimental pharmacology. Springer-Verlag, Berlin, vol. 89 (1989).
 58. VAUGHAN WILLIAMS, E. M. Classification of antiarrhythmic drugs. In Symposium on cardiac arrhythmias. Astra, Elsinore, Denmark, (1970) p. 449-472.
 59. VIO, L., MAMOLO, M. G. Quantitative high pressure liquid chromatographic determination of amiodarone in pharmaceutical formulations. *Il Farmaco*, 43 (1988) p. 365-372.
 60. VOGEL, A. I. Análise química quantitativa. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1992).
 61. WALDO, A. L., WIT, A. L. Mechanisms of cardiac arrhythmias. *Lancet*, 341 (1993) p. 1189-1193
 62. WEIR, S. J., UEDA, C. T. Amiodarone pharmacokinetics III: Influence of thyroid dysfunction on amiodarone absorption and disposition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246 (1998) p. 1026-1032.
 63. WHO – World Health Organization. Quality Assurance of Pharmaceuticals. A compendium of guidelines and related materials, v. 1, Geneva (1997).
 64. XIA, S. H., YUAN, Y. S., LI, L. *et al.* Determination of anti-arrhythmic drugs in serum by thin layer scanning. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 6 (1986) p. 433-436.

-
65. YIN, Y., VASSY, R., NICOLAS, P. *et al.* Antagonism between T₃ and amiodarone on the contractility and density of β -adrenoreceptors of chicken cardiac myocytes. *European Journal of Pharmacology*, (1994) p. 97-104.
 66. YU, Y. W. Pharmacokinetic analysis of amiodarone. *Zhonghua Ya Xueza Zhi*, 66 (1986) p. 141.
 67. ZAPATA, V., VALENCIA, M., BIDER, A. *et al.* Measurement of serum amiodarone by protein precipitation followed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Acta Científica Venezolana*, 51 (2000) p. 53-60.