

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BEZAFIBRATO: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E
APLICAÇÃO EM ESTUDO FARMACOCINÉTICO
DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Janine de Melo

Santa Maria, RS, Brasil

2007

BEZAFIBRATO: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E APLICAÇÃO EM ESTUDO FARMACOCINÉTICO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

por

Janine de Melo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

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

**BEZAFIBRATO: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E
APLICAÇÃO EM ESTUDO FARMACOCINÉTICO
DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

elaborada por
Janine de Melo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Clarice Madalena Bueno Rolim, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Ana Maria Bergold, Dr^a. (UFRGS)

Ruy Carlos Ruver Beck, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 11 de outubro de 2007.

Dedico este trabalho

A Deus, pela vida, saúde, força e vitórias conquistadas;

Aos meus pais, pelo apoio, dedicação, esforço e investimento;

Ao meu noivo, Felipe, pelo incentivo, amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram e participaram para que este trabalho cumprisse seus objetivos. Por isso, gostaria de agradecer:

À minha orientadora, Prof^ª. Clarice Bueno Rolim, que apesar de tantas outras atividades, aceitou a tarefa de coordenar este trabalho, demonstrando sempre apoio, incentivo, compreensão e dedicação.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), em especial, Prof^ª. Simone Gonçalves Cardoso e Prof. Sérgio Dalmora, que cederam seus conhecimentos, laboratórios, equipamentos, reagentes e, de diversas maneiras, cooperaram para realização deste trabalho.

Aos funcionários e estagiários do Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaio Farmacêuticos (CTEFAR), principalmente do laboratório Microbiológico, que estiveram auxiliando na execução da parte prática desta dissertação. Entre estes, destaco a participação das funcionárias Marinês, Rosecler, Carmem e Micheli, bem como dos alunos de graduação Felipe, Fábria, Fernanda e Estevan.

Aos mestrandos e estagiários dos laboratórios Físico-Químico e Biológico que estiveram prestando assistência nas dúvidas, técnicas e ensaios (Marcela, Thiago, Paulo, Maximiliano, Daniele, Lucélia, Lutiane e Marcelo).

À secretária do PPGCF, Letícia, pela execução de todos os procedimentos formais e burocráticos para realização da defesa desta dissertação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), pelo apoio financeiro através das bolsas de Mestrado e Iniciação Científica concedidas.

A todos aqueles que, embora não citados, tiveram alguma participação para concretização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

BEZAFIBRATO: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E APLICAÇÃO EM ESTUDO FARMACOCINÉTICO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

AUTORA: JANINE DE MELO

ORIENTADORA: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 11 de outubro de 2007.

Os fibratos constituem uma importante classe de medicamentos utilizada no tratamento da dislipidemia, que é o principal fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e incidência de doenças cardiovasculares. A presente dissertação aborda o desenvolvimento e a validação de procedimentos para análise de bezafibrato (BEZ) em produtos farmacêuticos e matrizes biológicas. Os métodos propostos incluem cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa com detecção ultravioleta (UV) e espectrofotometria com detecção UV. Para a determinação cromatográfica de bezafibrato em comprimidos, cápsulas e plasma humano foi empregada uma coluna C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i, 5 μ m), fase móvel composta por tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 M, pH 3,5: acetonitrila: metanol (50: 40: 10, V/V/V) com fluxo 1 mL/min e detecção em 230 nm. A extração do fármaco a partir do plasma foi realizada por extração líquido-líquido utilizando terc-butil metil éter acidificado. Na avaliação espectrofotométrica de bezafibrato em comprimidos e cápsulas foram utilizados como solventes metanol e hidróxido de sódio 0,1 N, com detecção em 230 nm. A metodologia desenvolvida para avaliação de bezafibrato foi validada observando-se os parâmetros especificidade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, robustez, estabilidade e foi considerada apropriada para análise do fármaco em formulações e fluidos biológicos. A comparação de resultados revelou que não há diferença significativa entre os métodos analíticos validados ($p < 0,05$). O método bioanalítico desenvolvido foi aplicado com sucesso para determinação plasmática de bezafibrato em seis voluntários sadios, permitindo análise de parâmetros como concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$), extensão da absorção (AUC), constante de eliminação (k_{el}) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

Palavras-chaves: bezafibrato; formulação; plasma; validação; biodisponibilidade.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Pharmaceutical Science Post-Graduate Program
Universidade Federal de Santa Maria

BEZAFIBRATE: VALIDATION OF METHODOLOGY AND APPLICATION IN PHARMACOKINETIC STUDY OF PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

AUTHOR: JANINE DE MELO

ADVISER: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Date and Local of the Examination: Santa Maria, October 11th, 2007.

Fibrates constitute an important class of drugs used in the treatment of the dyslipidemia, which is the main risk factor for the atherosclerosis development and incidence of cardiovascular diseases. The present dissertation reports the development and the validation of procedures for the bezafibrate (BEZ) analysis in pharmaceutical products and biological matrixes. The proposed methods include high performance liquid chromatography (HPLC) in reverse phase with ultraviolet detection (UV) and spectrophotometry with UV detection. For the chromatographic determination of bezafibrate in tablets, capsules and human plasma, were used a C-18 column (150 mm x 4.6 mm d.i, 5 μ m), mobile phase composed by potassium phosphate buffer 0.01 M, pH 3.5: acetonitrile: methanol (50: 40: 10, v/v/v) with flow rate of 1 mL/min and detection at 230 nm. The extraction of the drug from the plasma was performed by liquid-liquid extraction using acidified tert-butyl methyl ether. For the spectrophotometric bezafibrate evaluation in tablets and capsules were used methanol and sodium hydroxide 0.1 N as solvents, with detection at 230 nm. The methodology developed for bezafibrate evaluation was validated observing the parameters specificity, linearity, precision, accuracy, recovery, robustness, stability and it was considered suitable for the analysis of the drug in formulations and biological fluids. The comparison of results demonstrated that there is not significant difference between the validated analytical methods ($p < 0.05$). The bioanalytical developed method was applied with success for the determination of bezafibrate plasma in six healthy volunteers, allowing analysis of parameters as plasma maximum concentration (C_{max}), extension of the absorption (AUC), constant of elimination (k_{el}) and half-life time ($t_{1/2}$).

Key-words: bezafibrate; formulation; plasma; validation; bioavailability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Estrutura química do bezafibrato	26
FIGURA 2 – Cromatograma obtido a partir de solução de SQR na concentração de 250 µg/mL e espectro de absorção característico do BEZ obtido por DAD.	65
FIGURA 3 – Cromatograma obtido a partir da mistura de excipientes (placebo).....	65
FIGURA 4 – (A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de BEZ após 8 horas de hidrólise ácida com ácido clorídrico 0,1 N. (B) Espectro de absorção da SQR e dos produtos de degradação I e II.	66
FIGURA 5 – (A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de BEZ após 8 horas de hidrólise alcalina com hidróxido de sódio 1 N. (B) Espectro de absorção da SQR e do produto de degradação I.....	67
FIGURA 6 – (A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de BEZ após 22 horas de exposição à luz ultravioleta. (B) Espectro de absorção da SQR e dos produtos de degradação I, II e III.....	68
FIGURA 7 – Representação gráfica da curva de calibração de bezafibrato obtida pelo método cromatográfico validado para quantificação de comprimidos e cápsulas.	69
FIGURA 8 – Espectro de absorção característico da SQR de bezafibrato.	74
FIGURA 9 – Espectro de absorção referente à amostra simulada de excipientes dos comprimidos.....	74
FIGURA 10 – Espectro de absorção referente à amostra simulada de excipientes das cápsulas manipuladas	75

FIGURA 11 – Representação gráfica da curva de calibração de bezafibrato obtida por espectrofotometria utilizando metanol como solvente.....	77
FIGURA 12 – Representação gráfica da curva de calibração de bezafibrato obtida por espectrofotometria utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente.....	77
FIGURA 13 – Cromatograma obtido a partir da extração líquido-líquido de plasma humano contendo 20 µg/mL de bezafibrato e 10 µg/mL de ezetimibe adicionado como padrão interno..	89
FIGURA 14 – Cromatograma obtido a partir da extração líquido-líquido de plasma humano branco.	90
FIGURA 15 – Representação gráfica da curva de calibração obtida pelo método cromatográfico validado para avaliação de bezafibrato em fluidos biológicos.	91
FIGURA 16 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 1 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg..	97
FIGURA 17 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 2 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg..	98
FIGURA 18 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 3 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg..	98
FIGURA 19 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 4 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg..	99
FIGURA 20 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 5 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg..	99
FIGURA 21 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 6 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg.	100
FIGURA 22 – Representação gráfica da curva da concentração média plasmática de bezafibrato obtida a partir de seis voluntários após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg.....	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Condições para análise de bezafibrato em formulações farmacêuticas por cromatografia líquida.....	42
TABELA 2 – Condições para análise de bezafibrato em formulações farmacêuticas por espectrofotometria no UV.....	48
TABELA 3 – Condições para análise de bezafibrato em matrizes biológicas por cromatografia líquida.....	55
TABELA 4 – Parâmetros obtidos a partir do <i>System Suitability Test</i> para o método cromatográfico desenvolvido para análise de bezafibrato em formulações.....	64
TABELA 5 – Áreas absolutas obtidas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método cromatográfico desenvolvido para avaliação de produtos farmacêuticos.....	68
TABELA 6 – Resultados da curva de calibração de bezafibrato para o ensaio por HPLC para formulações, obtidos através do método dos mínimos quadrados.....	69
TABELA 7 – ANOVA das áreas absolutas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método cromatográfico desenvolvido para análise de produtos farmacêuticos.....	69
TABELA 8 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em comprimidos de bezafibrato pelo método cromatográfico.....	70
TABELA 9 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em cápsulas de bezafibrato pelo método cromatográfico.....	71
TABELA 10 – Valores experimentais referentes à exatidão de comprimidos de bezafibrato pelo método cromatográfico.....	72

TABELA 11 – Valores experimentais referentes à exatidão de cápsulas de bezafibrato pelo método cromatográfico	72
TABELA 12 – Resultados experimentais obtidos a partir de alterações nas condições cromatográficas do método.....	73
TABELA 13 – Valores de absorvâncias obtidas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando metanol como solvente.	76
TABELA 14 – Valores de absorvâncias obtidas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente.....	76
TABELA 15 – Resultados da curva de calibração de bezafibrato para o ensaio por espectrofotometria, obtidos através do método dos mínimos quadrados.	78
TABELA 16 – ANOVA das absorvâncias absolutas obtidas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método espectrofotométrico empregando metanol como solvente.	78
TABELA 17 – ANOVA das absorvâncias absolutas obtidas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método espectrofotométrico empregando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente.....	78
TABELA 18 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em comprimidos de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando metanol como solvente..	79
TABELA 19 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em cápsulas de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando metanol como solvente.....	79
TABELA 20 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em comprimidos de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente.....	80
TABELA 21 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em cápsulas de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente.....	80

TABELA 22 – Valores experimentais referentes à exatidão de comprimidos de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando metanol como solvente.....	81
TABELA 23 – Valores experimentais referentes à exatidão de cápsulas de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando metanol como solvente.....	81
TABELA 24 – Valores experimentais referentes à exatidão de comprimidos de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente.....	82
TABELA 25 – Valores experimentais referentes à exatidão de cápsulas de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente.....	82
TABELA 26 – Resultados obtidos a partir de alterações nas condições experimentais do método espectrofotométrico.....	83
TABELA 27 – ANOVA de comparação dos resultados obtidos na determinação da precisão do método espectrofotométrico empregando metanol e hidróxido de sódio 0,1 N como solventes.....	83
TABELA 28 – ANOVA de comparação dos resultados obtidos na determinação da precisão dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico utilizando metanol e hidróxido de sódio 0,1 N como solventes.....	84
TABELA 29 – Valores individuais (mg) obtidos na determinação do peso médio (PM) de comprimidos e cápsulas contendo bezafibrato.....	86
TABELA 30 – Valores médios obtidos na determinação da dureza e friabilidade de comprimidos de bezafibrato.....	87
TABELA 31 – Tempo de desintegração de comprimidos e cápsulas contendo 200 mg de bezafibrato.....	87
TABELA 32 – Determinação do teor de bezafibrato em comprimidos e cápsulas pelo método cromatográfico em fase reversa com detecção UV.....	87
TABELA 33 – Teor de bezafibrato em comprimidos e cápsulas obtido na determinação da uniformidade de conteúdo pelo método de variação de peso.....	88
TABELA 34 – Parâmetros obtidos a partir do <i>System Suitability Test</i> para o método cromatográfico desenvolvido para análise de bezafibrato em fuidos.....	89

TABELA 35 – Razão das áreas de bezafibrato e ezetimibe obtidas na determinação da linearidade pelo método cromatográfico.	91
TABELA 36 – Resultados da curva de calibração de bezafibrato para o ensaio por HPLC para plasma humano, obtidos através do método dos mínimos quadrados. .	92
TABELA 37 – ANOVA da razão das áreas de bezafibrato e ezetimibe referente à determinação da linearidade no método cromatográfico desenvolvido para análise de bezafibrato em plasma humano.	92
TABELA 38 – Valores experimentais obtidos na determinação da precisão e exatidão da amostra de controle de qualidade de concentração baixa (CQB) pelo método cromatográfico para avaliação de bezafibrato em matrizes biológicas.....	93
TABELA 39 – Valores experimentais obtidos na determinação da precisão e exatidão da amostra de controle de qualidade de concentração média (CQM) pelo método cromatográfico para avaliação de bezafibrato em matrizes biológicas.	93
TABELA 40 – Valores experimentais obtidos na determinação da precisão e exatidão da amostra de controle de qualidade de concentração alta (CQA) pelo método cromatográfico para avaliação de bezafibrato em matrizes biológicas.	94
TABELA 41 – Resultados obtidos na análise da recuperação do método por HPLC proposto para a determinação de bezafibrato em plasma humano.....	95
TABELA 42 – Resumo da estabilidade de bezafibrato em plasma humano.	95
TABELA 43 – Dados farmacocinéticos obtidos a partir de seis voluntários depois da administração de dose oral de comprimido de bezafibrato contendo 200 mg.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

∞	Infinito
ANOVA	Análise da variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASE	Amostra simulada de excipiente
AUC	Área sob a curva de concentração plasmática <i>versus</i> tempo
AUC _{0-∞}	Área sob a curva do tempo zero horas extrapolada ao tempo infinito
AUC _{0-t}	Área sob a curva do tempo zero horas ao tempo da última coleta
BEZ	Bezafibrato
C-18	Octadecilsilano
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
C _{máx}	Concentração plasmática máxima
CMD	Concentração média determinada
CQA	Concentração de qualidade alta
CQB	Concentração de qualidade baixa
CQM	Concentração de qualidade média
CV%	Coefficiente de variação percentual
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCB	Denominação comum brasileira
DCI	Denominação comum internacional
DCV	Doenças cardiovasculares
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
F	Distribuição F de Snedecor
FDA	Food and Drug Administration
GL	Graus de liberdade

HDL	Lipoproteína de densidade alta
HMG-CoA	3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC	Inclinação da curva de calibração
ICH	International Conference on Harmonisation
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
k_{el}	Constante de eliminação
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LLE	Extração líquido-líquido
LQ	Limite de quantificação
M	Molaridade
N	Normalidade
p	Probabilidade
PA	Para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso médio
r	Coefficiente de correlação de Pearson
r^2	Coefficiente de determinação
rpm	Rotação por minuto
SQ	Soma dos quadrados
SQR	Substância química de referência
SV	Solução volumétrica
t	Tempo
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
TLC	Cromatografia em camada delgada
$t_{máx}$	Tempo em que a concentração plasmática máxima é atingida
UI	Unidades internacionais
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
V	Volume
VIS	Visível
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Justificativas	21
1.2 Objetivos	22
1.2.1 Gerais.....	22
1.2.2 Específicos	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Considerações Gerais	24
2.2 Estrutura química	25
2.3 Atividade farmacológica e indicações	26
2.4 Farmacocinética	26
2.5 Reações adversas e efeitos colaterais	28
2.6 Contra-indicações e interações medicamentosas	28
2.8 Métodos de determinação e estudos de estabilidade	29
2.8.1 Formas farmacêuticas	30
2.8.2 Matrizes biológicas.....	31
2.8.3 Dissolução.....	32
2.8.4 Produtos de degradação e impurezas.....	32
2.9 Validação de métodos analíticos e bioanalíticos	32
2.9.1 Especificidade	33
2.9.2 Linearidade.....	34
2.9.3 Precisão	35
2.9.4 Exatidão	35
2.9.5 Recuperação	36

2.9.6 Limite de detecção e quantificação	36
2.9.7 Robustez	37
2.9.8 Estabilidade	38
3 MATERIAIS.....	39
3.1 Substância química de referência (SQR)	39
3.2 Produtos farmacêuticos	39
3.3 Solventes e reagentes.....	39
3.4 Equipamentos e acessórios	40
3.5 Produtos médico-hospitalares	41
4 MÉTODOS	42
4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção UV para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos.....	42
4.1.1 Especificidade	43
4.1.2 Linearidade.....	45
4.1.3 Precisão	45
4.1.4 Exatidão	46
4.1.5 Limite de detecção	47
4.1.6 Limite de quantificação.....	47
4.1.7 Robustez	48
4.2 Espectrofotometria com detecção UV para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos	48
4.2.1 Especificidade	49
4.2.2 Linearidade.....	49
4.2.3 Precisão	50
4.2.4 Exatidão	51
4.2.5 Limite de detecção	52
4.2.6 Limite de quantificação.....	52
4.2.7 Robustez	52
4.3 Comparação de métodos validados por cromatografia e espectrofotometria para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos.....	53
4.4 Controle de qualidade de produtos farmacêuticos contendo bezafibrato e aplicação do método para quantificação de formulações por cromatografia em fase reversa com detecção UV.....	53

4.4.1	Determinação do peso médio de comprimidos e cápsulas	53
4.4.2	Determinação do tempo de desintegração de comprimidos e cápsulas	53
4.4.3	Determinação da resistência mecânica de comprimidos.....	54
4.4.4	Doseamento de bezafibrato em comprimidos e cápsulas	54
4.4.5	Uniformidade de conteúdo de comprimidos e cápsulas	55
4.5	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção UV para avaliação de bezafibrato em matrizes biológicas	55
4.5.1	Especificidade	56
4.5.2	Linearidade.....	57
4.5.3	Precisão	57
4.5.4	Exatidão	58
4.5.5	Recuperação	58
4.5.6	Limites de detecção e quantificação	58
4.5.7	Estabilidade.....	59
4.6	Estudo da biodisponibilidade de comprimidos contendo bezafibrato e aplicação do método para análise de matrizes biológicas por cromatografia em fase reversa com detecção UV.....	60
4.6.1	Seleção dos voluntários	61
4.6.2	Administração de bezafibrato	61
4.6.3	Obtenção das amostras sanguíneas.....	61
4.6.4	Tratamento das amostras sanguíneas	62
4.6.5	Aplicação do método bioanalítico e seqüência de análise das amostras.....	62
4.6.6	Determinação de parâmetros farmacocinéticos dos voluntários	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção UV para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos.....	64
5.2	Espectrofotometria com detecção UV para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos	73
5.3	Comparação de métodos validados por cromatografia e espectrofotometria para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos.....	84
5.4	Controle de qualidade de produtos farmacêuticos contendo bezafibrato e aplicação do método para quantificação de formulações por cromatografia em fase reversa com detecção UV.....	84

5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção UV para avaliação de bezafibrato em matrizes biológicas	88
5.6 Estudo da biodisponibilidade de comprimidos contendo bezafibrato e aplicação do método para análise de matrizes biológicas por cromatografia em fase reversa com detecção UV.....	96
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
7 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
ANEXOS	112

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem um importante problema de saúde pública global tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (PATER, 2001). A aterosclerose está intimamente relacionada à incidência de DCV e pode ser caracterizada como uma doença inflamatória crônica na qual ocorre a progressiva obstrução vascular pela deposição de um material espesso no endotélio dos vasos sanguíneos (GLASS & WITZTUM, 2001). A placa de ateroma formada é resultado da infiltração de macrófagos na íntima dos vasos, proliferação de células da musculatura lisa e acúmulo de colesterol ou lipoproteínas oxidadas nas paredes das artérias (ROSS, 1999). A conseqüente redução do calibre dos vasos pode provocar efeitos desastrosos, como acidentes cardiovasculares devido à ruptura da placa de gordura e trombose (BERLINER et al., 1995).

Os principais fatores de risco para ocorrência de aterosclerose envolvem tanto fatores predisponentes (histórico familiar, sexo, idade, raça) quanto adquiridos (hiperlipidemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade, sedentarismo, tabagismo, estresse), sendo que os adquiridos permitem ser controlados (WILSON et al., 1998; ASSMANN et al., 1999). Embora estes fatores genéticos e ambientais estejam completamente identificados por estudos epidemiológicos, algumas pesquisas indicam que os níveis elevados de lipídios sanguíneos (hiperlipidemia) são suficientes para proporcionar o desenvolvimento de aterosclerose, inclusive na ausência dos outros fatores (GLASS & WITZTUM, 2001).

As lipoproteínas são as moléculas responsáveis pelo transporte dos lipídios através da corrente sanguínea e estão classificadas em: lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), baixa (LDL), intermediária (IDL), alta (HDL) e quilomicrons (VOSPER et al., 2002). Níveis sanguíneos inadequados de colesterol, triglicerídios ou lipoproteínas são denominados dislipidemias. Altos níveis de LDL aliados a baixos níveis de HDL estão associados ao desenvolvimento de aterosclerose (PAPADAKIS et al., 1999; CHOY, SIOW & MYMIN, 2004). Elevados níveis de triglicerídios também estão relacionados à incidência de DCV, embora existam algumas discordâncias entre os diferentes autores (RUOTOLO et al., 1998; OHMICHII et al., 2001).

O bezafibrato (BEZ) é um fármaco antilipêmico que pertence à classe dos fibratos ou derivados do ácido fíbrico. É responsável pela redução dos níveis de triglicerídios pelo aumento da atividade da lipoproteína lipase, uma enzima que promove o catabolismo da VLDL (VOSPER et al., 2002). O bezafibrato é opção de tratamento no caso de dislipidemias uma vez que reduz os níveis de LDL e eleva os níveis de HDL sangüíneos (HIRANO, KAZUMI & YOSHINO, 2000).

Comercialmente, o bezafibrato está disponível nas seguintes apresentações: comprimidos de liberação imediata contendo 200 mg, comprimidos de liberação prolongada contendo 400 mg e cápsulas magistrais.

1.1 Justificativas

Devido ao crescente destaque, importância clínica e econômica que medicamentos hipocolesterolinêmicos vêm conquistando, o desenvolvimento de métodos que possam aprimorar o controle de qualidade é fundamental para garantir sua segurança e eficácia terapêutica. Neste âmbito, estão incluídos procedimentos que permitem avaliar a dissolução e absorção destes medicamentos, uma vez que estes processos constituem-se etapas indispensáveis à distribuição dos fármacos até os locais onde exercerão suas respectivas ações farmacológicas (CORTI et al., 2006).

Considerando que existem algumas dificuldades nos métodos descritos pela literatura para o controle de qualidade de bezafibrato, como equipamentos e reagentes de alto custo, técnicas complexas e procedimentos demorados, torna-se muito interessante o desenvolvimento de métodos alternativos com diferentes equipamentos e reagentes, sendo elaborada a relação custo-benefício para cada procedimento. Na ausência de monografia oficial para análise de especialidades farmacêuticas de bezafibrato, a contribuição decorrente do desenvolvimento e validação de métodos para avaliação deste fármaco em produtos farmacêuticos e matrizes biológicas torna-se significativa, visto que resulta em importantes avanços tecnológicos na avaliação biofarmacêutica de insumos e medicamentos.

Dentre os antilipêmicos, os medicamentos pertencentes à classe dos fibratos constituem importante alternativa de tratamento no combate ao excesso de colesterol e triglicerídios sangüíneos. Por esta razão, o bezafibrato, fabricado pelo

laboratório Roche sob nome comercial Cedur[®], foi selecionado para possibilitar a obtenção de novos dados científicos relacionados à análise qualitativa e quantitativa de medicamentos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Gerais

Desenvolver e validar metodologia físico-química para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos e matrizes biológicas, estabelecendo procedimentos e especificações para o controle de qualidade, contribuindo para a segurança e eficácia terapêutica deste medicamento.

1.2.2 Específicos

- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa com detecção ultravioleta (UV) para determinação quantitativa de bezafibrato em comprimidos e cápsulas.
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria com detecção UV para determinação quantitativa de bezafibrato em comprimidos e cápsulas.
- Comparar estatisticamente os métodos validados para quantificação de bezafibrato em formas farmacêuticas por cromatografia líquida e espectrofotometria.
- Desenvolver e validar método por HPLC em fase reversa com detecção UV utilizando extração líquido-líquido (LLE) para quantificação de bezafibrato em matriz biológica (plasma).
- Aplicar o método validado e proposto por HPLC para determinação do teor e uniformidade de conteúdo das formas farmacêuticas contendo bezafibrato, bem como os ensaios físico-químicos descritos na Farmacopéia Brasileira 4^a

edição (1988) para determinação do peso médio, dureza, friabilidade e desintegração, realizando o controle de qualidade de comprimidos e cápsulas.

- Aplicar o procedimento desenvolvido por HPLC para avaliação plasmática de bezafibrato em seis voluntários sadios após administração oral de uma única dose de comprimidos de bezafibrato e analisar a biodisponibilidade e parâmetros farmacocinéticos como concentração plasmática máxima ($C_{máx}$), tempo para que esta concentração seja alcançada na circulação ($t_{máx}$), extensão da absorção (AUC), constante de eliminação (k_{el}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do fármaco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações Gerais

Diversos estudos epidemiológicos confirmaram que as dislipidemias são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e acidentes cardiovasculares (RADER, HOEG & BREWER, 1994; BERLINER et al., 1995; WILSON et al., 1998; STAMLER et al., 2000).

Associada à prática regular de exercícios físicos e hábitos saudáveis de vida, a dieta constitui a base da terapêutica em pacientes portadores de dislipidemias. Entretanto, em alguns casos, torna-se necessário o tratamento com medicamentos para normalização dos níveis sanguíneos de colesterol, triglicerídios e lipoproteínas (ASSMANN et al., 1999). Assim, dependendo da situação clínica do indivíduo, podem ser utilizados fármacos antilipêmicos de diferentes classes: inibidores da síntese do colesterol (estatinas), derivados do ácido fibríco (fibratos), resinas ou sequestrantes dos ácidos biliares, inibidores da absorção do colesterol e niacina ou ácido nicotínico (SCHMITZ & LANGMANN, 2006).

Os inibidores da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima responsável pela síntese do colesterol, constituem a classe das estatinas e apresentam capacidade de reduzir significativamente a incidência de DCV pela redução dos níveis de LDL sanguíneos (ASSMANN et al., 1999). Os principais componentes do grupo são: sinvastatina, pravastatina, fluvastatina, lovastatina, atorvastatina e rosuvastatina.

Os fibratos são compostos derivados do ácido fibríco que tiveram origem a partir do clofibrato, descoberto em 1962 (DIAMENT, FORTI & GIANNINI, 1999). Este fármaco, protótipo da classe, revelou ser efetivo na redução de lipídios sanguíneos, apresentando também algum grau de proteção nos eventos cardiovasculares. No entanto, estudos demonstraram que os benefícios decorrentes do tratamento com clofibrato, quando comparados com os riscos de câncer e o aumento da mortalidade induzidos pelo fármaco, não eram suficientes para permitir a comercialização do medicamento (VOSPER et al., 2002).

Novos medicamentos do grupo dos fibratos, como genfibrozila, bezafibrato,

fenofibrato e ciprofibrato, foram desenvolvidos com o objetivo de garantir a segurança e a eficácia no tratamento das dislipidemias caracterizadas por altos níveis de triglicerídios e baixos níveis de HDL sangüíneos. Assim, os representantes da segunda geração de fibratos apresentam boa tolerabilidade e ação no combate à hipertrigliceridemia comprovada por diversos estudos (FRICK et al., 1987; CHAPMAN & BRUCKERT, 1996; ERICSON et al., 1996).

As resinas ou seqüestrantes dos ácidos biliares constituem a primeira classe de antilipêmicos desenvolvida para redução dos níveis de colesterol. A colestiramina e o colestipol são os principais representantes deste grupo de fármacos e reduzem efetivamente os níveis de LDL. Todavia, estas resinas proporcionam um aumento nos níveis de triglicerídios, interferem na absorção de vitaminas lipossolúveis, causam constipação em 30% dos pacientes e inativam certos fármacos polares (SCHMITZ & LANGMANN, 2006).

O ezetimibe é um fármaco que inibe seletivamente a absorção do colesterol, impedindo a absorção tanto do colesterol biliar quanto do proveniente da dieta, sem afetar, contudo, a absorção de triglicerídios, vitaminas lipossolúveis e carotenóides (DAVIDSON & TOTH, 2004).

A niacina ou ácido nicotínico é uma vitamina do grupo B que aumenta os níveis de HDL e reduz os níveis de LDL e triglicerídios. Entretanto, o tratamento utilizando este fármaco freqüentemente causa reações adversas, como rubor cutâneo, miopatia e hiperglicemia (RADER, 2003; CHAPMAN et al., 2004).

2.2 Estrutura química

A classe dos fibratos apresenta estrutura química derivada do ácido 2-fenóxi-2-metilpropanóico. O bezafibrato é um constituinte do grupo e está representado na Figura 1. Possui fórmula molecular $C_{19}H_{20}ClNO_4$ e nome químico ácido 2-[4-[2-[(4-clorobenzoil)amino]etil]fenóxi]-2-metilpropanóico (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2002).

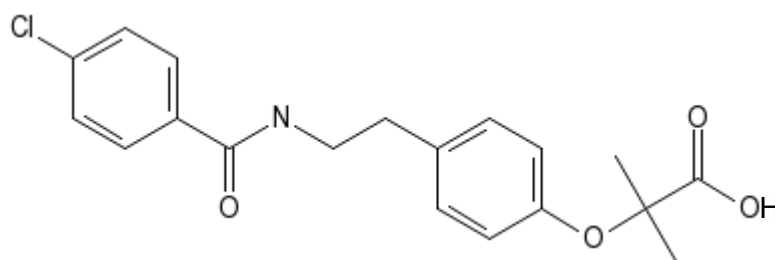


Figura 1 – Estrutura química do bezafibrato.

2.3 Atividade farmacológica e indicações

Os fibratos são considerados fármacos de escolha para o tratamento de hipertrigliceridemias (MAN et al., 2000; GAVISH et al., 2000). O efeito hipolipidêmico é resultado de diversas ações metabólicas realizadas pelos fármacos do grupo. Os fibratos aumentam a captura e estimulam a β -oxidação de ácidos graxos no fígado, reduzindo a quantidade de ácido graxo disponível para síntese de triglicerídios (SCHOONJANS et al., 1995). Além disso, aceleram o catabolismo da VLDL (lipoproteína rica em triglicerídio), visto que se ligam ao receptor peroxissomo proliferador-ativado (PPAR) e induzem a enzima lipoproteína lipase (LPL) (VOSPER et al., 2002).

Enquanto que os níveis de VLDL e LDL são reduzidos pelos fibratos, o HDL colesterol é aumentado (DAVIGNON, 1994; HIRANO, KAZUMI & YOSHINO, 2000). O bezafibrato apresenta ainda uma capacidade significativa de diminuir a atividade das plaquetas e agregação, efeitos importantes em situações de distúrbios cardiovasculares associados à aterosclerose (MCCARTY, 2001). Em pacientes diabéticos, relatou-se redução da concentração de glicose sangüínea por melhoria da tolerância à glicose. Nestes pacientes, a concentração de ácidos graxos livres, em jejum e pós-prandial, foi também reduzida pelo bezafibrato (GAVISH et al., 2000).

2.4 Farmacocinética

A farmacocinética compreende o estudo do movimento de um determinado fármaco no organismo e inclui os processos de absorção, distribuição e eliminação (biotransformação e excreção). A absorção consiste na passagem do fármaco até a

circulação, enquanto que a distribuição ocorre com a chegada do fármaco no local de ação conduzido pela corrente sanguínea. Quando o fluxo acontece para fora do organismo, o processo é conhecido como eliminação (SILVA et al., 2002).

Alguns parâmetros geralmente são avaliados em estudos de farmacocinética e biodisponibilidade, como a extensão da absorção (AUC), concentração máxima alcançada ($C_{m\acute{a}x}$), tempo máximo para que esta concentração seja atingida ($t_{m\acute{a}x}$), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e constante de eliminação (k_{el}).

A extensão da absorção é inferida através do cálculo da área sob a curva (AUC) do gráfico que corresponde à concentração plasmática do fármaco *versus* tempo. A construção deste gráfico permite a determinação da AUC_{0-t} e da $AUC_{0-\infty}$, sendo a $AUC_{0-\infty}$ uma projeção efetuada considerando a eliminação total do fármaco no tempo infinito, caso permaneçam pequenas concentrações do fármaco na última coleta.

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) refere-se ao tempo no qual a concentração de um fármaco é reduzida pela metade. Este parâmetro está intimamente relacionado com a constante de eliminação (k_{el}), sendo determinado através da equação 1.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{el}} \quad (1)$$

Todos os fibratos são rapidamente absorvidos (>90%) quando administrados com uma refeição, porém menos eficientemente quando administrados com estômago vazio. A ligação éster é rapidamente hidrolisada, e concentrações plasmáticas máximas são atingidas em duas a quatro horas. Mais de 95% destes agentes estão ligados a proteínas, quase que exclusivamente à albumina. A meia-vida difere significativamente dentro deste grupo, mas o bezafibrato possui uma meia-vida de aproximadamente duas horas. Todos os fibratos são amplamente distribuídos, e as concentrações no fígado, nos rins e nos intestinos excedem o nível plasmático. São excretados predominantemente como conjugados de glicuronídeo, sendo que 60 a 90% de uma dose oral são excretados na urina, aparecendo menores quantidades nas fezes (MILLER & SPENCE, 1998; KOROLKOVAS, 2004).

2.5 Reações adversas e efeitos colaterais

Na literatura, relataram-se alguns sintomas gastrintestinais como perda de apetite, plenitude gástrica e náuseas após a administração de bezafibrato. Estes sintomas geralmente foram transitórios e não exigiram a suspensão do tratamento. Em alguns casos, foi descrito um aumento das transaminases e colestase, sendo relatada a ocorrência de cálculo biliar durante a utilização do medicamento. Além disso, verificaram-se reações alérgicas como prurido ou urticária e, raramente, fotossensibilidade e reações de hipersensibilidade. Durante o tratamento, elevação da creatinina sérica pode ocorrer, assim como fraqueza muscular, mialgia e câibras. No entanto, apenas casos isolados de grave comprometimento muscular (rabdomiólise) foram observados. Raramente, também foram verificados efeitos como cefaléia, tontura, alopecia e distúrbios da potência (ALSHEIKH-ALI, KUVIN & KARAS, 2004).

2.6 Contra-indicações e interações medicamentosas

O bezafibrato é contra-indicado para portadores de doenças hepáticas, com exceção de infiltração gordurosa no fígado, um distúrbio comum em pacientes com hipertrigliceridemias. O fármaco também não deve ser utilizado por indivíduos com afecção da vesicular biliar, com ou sem colestase, nem por paciente com disfunção renal grave (níveis séricos de creatinina maiores que 6 mg/100 mL ou *clearance* de creatinina menor que 15 mL/min). Além disso, não é aconselhado o tratamento de pessoas com hipersensibilidade conhecida ao fármaco, a qualquer componente do produto ou a outros fibratos, bem com histórico de reação fotoalérgica ou fototóxica. O bezafibrato, como a grande maioria dos medicamentos, é contra-indicado durante a gravidez e lactação (ALSHEIKH-ALI, KUVIN & KARAS, 2004).

A combinação da terapia medicamentosa utilizando fibratos e estatinas, embora pareça interessante do ponto de vista clínico, é desaconselhada uma vez que os fármacos interagem e vários casos de reações de miopatia e rabdomiólise foram descritos. Além disso, o bezafibrato é responsável pela potencialização da ação de anticoagulantes cumarínicos, sulfoniluréias e insulina. Quando houver administração concomitante com seqüestrantes de ácidos biliares (por exemplo,

colestiramina), deve-se observar um intervalo mínimo de duas horas entre a utilização dos fármacos, pois a absorção do bezafibrato será prejudicada. Por fim, inibidores da enzima monoamino-oxidase que apresentam potencial hepatotóxico não devem ser utilizados concomitantemente com o fármaco (CORSINI, BELLOSTA & DAVIDSON, 2005).

2.8 Métodos de determinação e estudos de estabilidade

Os procedimentos de análise atualmente mais empregados na quantificação de fármacos incluem a volumetria, espectrofotometria, cromatografia, eletroforese e suas variações. Devido à facilidade, rapidez e custo relativamente baixo, a espectrofotometria com detecção UV tem sido amplamente utilizada na avaliação de fármacos (PEREIRA et al., 2005). Além disso, os procedimentos cromatográficos são vastamente utilizados na determinação qualitativa e quantitativa de fármacos em matérias-primas, produtos acabados e amostras biológicas em função da versatilidade alcançada com diferentes colunas, fases móveis e sistemas de detecção (CAUSON, 1997; SWARTZ & KRULL, 1998).

A seleção de um determinado método depende das características físico-químicas do fármaco, como propriedades ácidas ou alcalinas, presença de ligações duplas conjugadas, polaridade e coeficiente de partição do analito. A disponibilidade de equipamentos, solventes e a questão financeira são muito importantes durante a escolha do método mais apropriado.

A análise da matéria-prima de bezafibrato está descrita na Farmacopéia Européia (2002). Na monografia, são apresentados parâmetros para identificação (através do ponto de fusão, espectrofotometria no infravermelho e cromatografia em camada delgada), determinação da pureza (utilizando HPLC com detecção em 228 nm) e doseamento (por titulação volumétrica utilizando fenolftaleína como indicador).

A literatura apresenta alguns procedimentos validados para determinação de bezafibrato tanto em produtos farmacêuticos quanto em matrizes biológicas que são descritos na seqüência. Além disso, alguns métodos para avaliação da dissolução e estabilidade deste fármaco também estão disponíveis.

2.8.1 Formas farmacêuticas

Um procedimento utilizando espectrofotometria derivada foi descrito para quantificação de bezafibrato, fenofibrato, ciprofibrato e genfibrozila em produtos farmacêuticos (KOMSTA & MISZTAL, 2004). A curva de calibração demonstrou linearidade em concentrações de 2 a 20 µg/mL e a precisão do método variou de 0,78 a 1,57%, não havendo interferência dos excipientes das formulações.

Um método por HPLC foi desenvolvido para quantificação de quatro fibratos em formulações farmacêuticas (MISZTAL & KOMSTA, 2005). Os fármacos bezafibrato, fenofibrato, ciprofibrato e genfibrozila foram determinados utilizando uma coluna C-18, com uma fase móvel incomum composta por isopropanol: tampão fosfato 0,09 M, pH 2,15 (45: 55, V/V), fluxo de 1 mL/min e detecção em 227 nm. A curva de calibração foi construída no intervalo de 200 até 800 µg/mL para todos os fibratos e foram obtidos valores para o coeficiente de determinação (R^2) entre 0,9991 e 0,9999. A exatidão do método foi considerada adequada e a precisão foi aceitável com valores de CV% entre 0,63 e 1,84%.

Além disso, foi desenvolvido um método por eletroforese capilar (CE) para quantificação de três fibratos em formulações farmacêuticas (KOMSTA et al., 2006). Os fármacos bezafibrato, ciprofibrato e genfibrozila foram determinados em um capilar de sílica fundida com dimensões de 75 µm (d.i.) e 87 cm de comprimento (detector em 65 cm, 227 nm), utilizando tampão fosfato 1/15 M, pH 10, 240 V/cm a 25°C. A linearidade encontrada para o método foi de 0,9899 a 0,9913 no intervalo de 200 até 800 µg/mL. A exatidão apresentou recuperação de 92,68 até 109,62% e a precisão revelou uma variação entre 4,01 e 6,44%.

Um método colorimétrico foi validado para quantificação de bezafibrato em formulações (KREBS, STARCZEWSKA & LESZCZYNSKA, 2006). A técnica foi desenvolvida baseada na formação de um complexo ternário composto por bezafibrato: íon paládio (II): eosina (1: 1: 1). A curva de calibração foi linear no intervalo de 0,06 a 0,3 µg/mL, a variação encontrada foi de 0,3% e a recuperação de bezafibrato permaneceu em 99,74%.

2.8.2 Matrizes biológicas

Os níveis de bezafibrato presentes no plasma e urina foram quantificados por HPLC, através de extração do plasma com éter dietílico acidificado e por diluição direta da urina com fase móvel (CASTOLDI, MONZANI & TOFANETTI, 1985).

Um procedimento utilizando HPLC foi desenvolvido para quantificar níveis plasmáticos de bezafibrato, ciprofibrato e ácido fenofibrato simultaneamente (MASNATTA et al., 1996). O ensaio foi realizado com uma coluna C-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m) e fase móvel composta por ácido fosfórico 0,02 M: acetonitrila (45: 55, V/V), com fluxo variável e corrida analítica totalizando 20 minutos. Para extração do fármaco, uma alíquota de 1 mL de plasma foi acidificada com 1 mL de HCl 1 N. A amostra foi agitada em vórtex e submetida a duas extrações consecutivas com 5 mL de éter dietílico com duração de 20 minutos cada extração. Após centrifugação durante 15 minutos, as fases orgânicas foram combinadas e evaporadas sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de fase móvel, agitado em vórtex e filtrado para injeção. Foram injetados 10 μ L na coluna, sendo os fármacos detectados a 230 nm. A linearidade foi adequada para o intervalo de 0,25 a 50 μ g/mL, a recuperação foi de 75,32 a 101,92% e os limites de detecção e quantificação foram de 0,08 e 0,14 μ g/mL, respectivamente.

O bezafibrato também foi quantificado em soro de ratos tratados com nitrato de chumbo (ANCHISI et al., 1998). Com exceção da fase móvel, tampão fosfato 0,01 M, pH 3,5: metanol (35: 65, V/V) e fluxo 1 mL/min, as condições cromatográficas e o processo de extração do fármaco foram desenvolvidos de maneira idêntica ao método anteriormente citado (MASNATTA et al., 1996).

Alguns ensaios para avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência foram realizados para o bezafibrato (LEDERMANN & KAUFMAN, 1981; GANDINI et al., 1987; VENS-CAPPELL et al., 1993; ALI et al., 2002). Os ensaios para a análise da biodisponibilidade do fármaco são fontes de difícil acesso, com exceção do estudo mais recentemente realizado (ALI, et al., 2002). Neste ensaio, amostras de sangue de 14 voluntários foram coletadas nos tempos 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 3,5; 5,5 e 9,0 horas. Os parâmetros médios encontrados experimentalmente foram 1,73 μ g/mL ($C_{m\acute{a}x}$); 1,42 h ($t_{m\acute{a}x}$); 5,2 μ g.h/mL (AUC); 0,0062 h⁻¹(k_{el}) e 1,86 h ($t_{1/2}$).

2.8.3 Dissolução

Um método foi desenvolvido para avaliação da dissolução de formulações de bezafibrato com liberação convencional e liberação prolongada (CADORNIGA et al., 1991). O teste de dissolução foi realizado utilizando o aparato I (cesta) com agitação de 100 rpm. O meio empregado na análise foi composto por fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico, pH 6 e temperatura de 37°C. As alíquotas de amostra foram retiradas da cuba (900 mL), filtradas em tempos pré-determinados e quantificadas através de espectrofotômetro (240 nm).

2.8.4 Produtos de degradação e impurezas

O bezafibrato foi degradado pela luz UV em condições aeróbicas, produzindo dois compostos que foram isolados por cromatografia em camada delgada (TLC), identificados através de espectrometria e avaliados quanto à toxicidade *in vitro* através da hemólise de eritrócitos humanos (CANUDAS, VARGAS & MIRANDA, 1996). Ao contrário dos produtos de degradação isolados, o composto demonstrou toxicidade *in vitro* uma vez que ocasionou danos às membranas das células de eritrócitos. Além do estudo citado, nenhum outro procedimento foi considerado adequado para separação de bezafibrato e produtos de degradação.

2.9 Validação de métodos analíticos e bioanalíticos

A validação de um método analítico é o processo que estabelece, através de estudos laboratoriais, que este procedimento é adequado para a aplicação pretendida. O processo de validação está relacionado à finalidade do ensaio: testes de identificação, métodos quantitativos para determinação de impurezas, testes limites para controle de impurezas ou métodos quantitativos para determinação de fármacos em matérias-primas e produtos acabados. Alguns parâmetros como especificidade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e estabilidade devem ser avaliados na validação, dependendo do objetivo do ensaio.

O processo de validação de métodos analíticos e bioanalíticos é realizado com base em diretrizes nacionais e internacionais descritas em guias e compêndios (FDA, 2001; ANVISA, 2003; ICH, 2005; USP, 2006). Os órgãos que instituem e regulamentam os Guias para Validação de Métodos de Análise compreendem a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) e Food and Drug Administration (FDA). Além disso, a Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeia – USP), o compêndio oficial norte-americano, também apresenta várias orientações para a técnica de validação fundamentando-se nas diretrizes formuladas pelo ICH (ICH, 2005).

2.9.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade que o método apresenta de analisar exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Em métodos analíticos, este parâmetro é determinado pela adição de níveis apropriados de excipientes e impurezas na amostra. Se as impurezas ou produtos de degradação não estiverem disponíveis, a especificidade pode ser demonstrada pela comparação de amostras submetidas a condições de estresse (luz, calor, umidade, oxidação, hidrólise ácida e básica) com análises realizadas por um segundo procedimento bem caracterizado (método farmacopéico ou ainda outro procedimento validado).

Nas técnicas bioanalíticas, a especificidade é avaliada através de amostras de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Em cromatografia, as amostras não devem apresentar picos interferentes no tempo de retenção do fármaco ou do padrão interno com área superior a 20% da resposta do limite inferior de quantificação.

Em procedimentos cromatográficos, testes de pureza dos picos, através de detector de arranjo de diodos (DAD) ou espectrometria de massas, devem ser empregados para comprovar que o pico cromatográfico não é atribuído a mais de um componente. A resolução entre os picos do analito, da impureza e/ou do produto de degradação deve indicar a apropriada separação dos componentes.

2.9.2 Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método produzir resultados proporcionais à concentração do analito de interesse, dentro de um intervalo pré-estabelecido.

Para métodos analíticos, este parâmetro pode ser determinado pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes da substância, através da construção de um gráfico da resposta absoluta *versus* concentração. Em alguns casos, para que seja obtida uma relação linear entre a resposta e a concentração do analito, as repostas devem ser transformadas matematicamente. Os resultados do ensaio de linearidade são submetidos a um tratamento estatístico pelo estudo da regressão linear através do método dos mínimos quadrados, bem como análise da variância (ANOVA), fornecendo a equação da reta que representa a curva de calibração da substância de interesse.

A adição de uma substância química como padrão interno é necessária na validação de métodos bioanalíticos utilizando cromatografia. Na maioria das vezes, emprega-se como padrão interno um fármaco que apresente características estruturais semelhantes ao composto em análise. Uma concentração conhecida e constante de padrão interno é adicionada em todas as amostras, exceto na amostra branco da curva de calibração, com a finalidade de monitorar a qualidade do processo de extração a partir da matriz biológica. Assim, os resultados da validação utilizam a relação entre as repostas do analito e do padrão interno, considerando que um problema na extração reduziria proporcionalmente as repostas tanto do analito quanto do padrão interno.

Além disso, a curva de calibração de procedimentos bioanalíticos utilizando HPLC deve incluir uma amostra branco (isenta do fármaco e do padrão interno), uma amostra zero (com adição de padrão interno) e, no mínimo, seis concentrações diferentes do fármaco, contendo igual concentração de padrão interno em todas as amostras. Semelhante aos métodos analíticos, as relações entre as áreas do analito e padrão interno obtidas para cada concentração devem ser submetidas a tratamento estatístico e ANOVA.

2.9.3 Precisão

A precisão é a avaliação da concordância entre uma série de medidas, resultante da aplicação do método a amostras homogêneas. Normalmente, é expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) entre as medidas realizadas, calculado a partir de fórmula matemática, na qual DP equivale ao desvio padrão entre os resultados e CMD corresponde à concentração média determinada:

$$\text{DPR (CV\%)} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (2)$$

A precisão do método pode ser determinada através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade.

A repetibilidade corresponde à concordância entre os resultados obtidos nas mesmas condições durante um curto intervalo de tempo. Em procedimentos analíticos, é verificada pela análise de, no mínimo, nove determinações, isto é, três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada, ou a partir de um mínimo de seis determinações a 100% da concentração teste. No caso de métodos bioanalíticos, a repetibilidade é avaliada pela análise de três concentrações (baixa, média e alta) com cinco réplicas cada.

A precisão intermediária avalia os resultados provenientes de análises realizadas em dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. A reprodutibilidade representa a concordância entre os resultados obtidos entre laboratórios diferentes, como parte de um estudo colaborativo.

2.9.4 Exatidão

A exatidão do método representa a proximidade entre os resultados encontrados e um valor verdadeiro, aceito como referência.

Em análises de fármacos em produtos farmacêuticos, este parâmetro pode ser determinado pela adição de quantidades conhecidas do analito a uma mistura sintética de componentes da formulação (placebo). Se os componentes não estiverem disponíveis, a exatidão pode ser definida pela adição de quantidades

conhecidas do analito ao produto farmacêutico, sendo calculada a porcentagem de recuperação do fármaco adicionado ao produto.

Para métodos analíticos, a exatidão é verificada pela análise de, no mínimo, nove determinações, isto é, três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada e pode ser expressa pela relação entre a concentração média determinada no método e a concentração teórica correspondente. Nas técnicas bioanalíticas, é necessária a análise de três concentrações (baixa, média e alta) com cinco réplicas cada.

2.9.5 Recuperação

A recuperação representa a eficiência do procedimento de extração de um método dentro de limites permitidos de variação.

Para análise da recuperação, realiza-se a comparação dos resultados obtidos a partir de amostras de três concentrações diferentes (baixa, média e alta) extraídas pelo procedimento e resultados provenientes de soluções padrão não extraídas preparadas com concentrações que representem 100% de recuperação. O cálculo da porcentagem recuperada é realizado em função da razão entre a resposta do padrão extraído e não extraído.

Embora desejada, a recuperação de um método não precisa ser 100%, mas porcentagens inferiores são aceitas desde que apresentem precisão e exatidão adequadas.

2.9.6 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas.

Este parâmetro pode ser verificado por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até que seja estabelecido o menor nível detectado. Em procedimentos instrumentais, a estimativa do limite de detecção pode ser realizada com base no nível sinal-ruído ou pela análise do desvio padrão do intercepto (σ) e na inclinação da curva de calibração (IC). Considerando o

nível sinal-ruído, o parâmetro é calculado pela relação de três vezes o ruído da linha de base. Através do desvio padrão, o limite de detecção é estimado após a construção de três curvas de calibração, através da seguinte equação:

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC} \quad (3)$$

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

Este parâmetro pode ser verificado por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até que seja estabelecida a menor concentração quantificada com precisão e exatidão apropriadas. Nos procedimentos instrumentais, a estimativa do parâmetro pode ser calculada pela análise do sinal do ruído ou do desvio padrão do intercepto (σ) e na inclinação da curva de calibração (IC). Através o sinal do ruído, o parâmetro é calculado pela relação de dez vezes o ruído da linha de base. Considerando o desvio padrão, o limite de quantificação é estimado após a construção de três curvas de calibração, através da seguinte equação:

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC} \quad (4)$$

2.9.7 Robustez

A robustez corresponde a capacidade do método permanecer inalterado frente a pequenas, mas deliberadas variações nas diversas condições analíticas, estabelecendo uma indicação da confiabilidade do método quando empregado na rotina.

Em procedimentos cromatográficos, a robustez pode ser avaliada pela alteração de alguns parâmetros, como pH, composição e fluxo da fase móvel, modificação da temperatura de análise, variação do comprimento de onda e também pela utilização de colunas de diferentes fabricantes ou lotes. Em métodos espectrofotométricos, a modificação do comprimento de onda utilizado e a alteração

do fabricante, lote e concentração do solvente costumam ser realizadas para análise da robustez.

2.9.8 Estabilidade

A estabilidade do analito em um fluido biológico depende das propriedades do fármaco, do tipo de matriz biológica, das condições de armazenamento e do material de acondicionamento utilizado. Em procedimentos bioanalíticos, a estabilidade é avaliada reproduzindo as condições de manuseio e análise das amostras. Assim, a amostra não pode sofrer alteração durante o período de congelamento, quando submetida a ciclos de congelamento e descongelamento, no momento que antecede a preparação do conjunto de amostras e após o processamento enquanto aguarda a análise. O fármaco também deve se manter estável em solução e os resultados provenientes das amostras testadas precisam ser comparados com amostras frescas, preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise.

3 MATERIAIS

3.1 Substância química de referência (SQR)

Bezafibrato com teor de 99,4%, gentilmente fornecido pelo laboratório Roche, lote MH03102088 e validade 04/11/2008.

3.2 Produtos farmacêuticos

Comprimidos contendo 200 mg de bezafibrato, com o nome comercial de Cedur[®], fabricados pela indústria Roche, lote RJ0353, fabricação 10/2005 e validade 10/2008. Excipientes: amido de milho, amido pré-gelatinizado, amido glicolato de sódio, celulose microcristalina, sílica coloidal anidra, estearato de magnésio, copolímero de ácido metacrílico, lactose, polietilenoglicol, caulim, talco, dióxido de titânio, citrato de sódio, polissorbato 80.

Cápsulas contendo 200 mg de bezafibrato, manipuladas pela farmácia Dermatologe, lote 044, fabricação 03/05/2006 e validade 03/09/2006. Excipientes: aerosil, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, lactose e lauril sulfato de sódio.

3.3 Solventes e reagentes

- Acetonitrila grau HPLC, Tedia[®]
- Metanol grau HPLC, Tedia[®]
- Metanol grau HPLC, J.T.Baker[®]
- Água destilada
- Água purificada
- Fosfato de potássio monobásico, Merck[®]
- Ácido clorídrico 1 N SV, Merck[®]
- Hidróxido de sódio 1 N SV, Merck[®]
- Ácido fosfórico PA, Quimex[®]

- Peróxido de hidrogênio 30 V, Synth[®]
- Terc-butil metil éter PA, Vetec[®]

3.4 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético com aquecimento, Marconi[®]
- Balança analítica, Sartorius[®]
- Banho de ultra-som, Thornton[®]
- Banho termostaticado, Tecnal[®]
- Bomba a vácuo, J/B Industries[®]
- Centrífuga refrigerada, Jouan[®]
- Coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano (C-18) Rexchrom[®] (150 mm x 4,6 mm d.i.) 5 µm, Regis[®]
- Coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano (C-18) Supelcosil[®] (150 mm x 4,6 mm d.i.) 5 µm, Supelco[®]
- Cromatógrafo líquido Shimadzu[®] equipado com controlador SCL-10Avp, com bomba modelo LC-10ADvp, detector UV/VIS modelo SPD-10Avp, injetor automático com volume variável SIL-10AF e integrador automático computadorizado através do software CLASS-VP 6.14[®]
- Cromatógrafo líquido Shimadzu[®] equipado com controlador SCL-10Avp, com bomba modelo LC-10ADvp, degaseificador DGU-14A, forno para coluna CTO-10Avp, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-M10Avp, injetor automático com volume variável SIL-10ADvp e integrador automático computadorizado através do software CLASS-VP 6.14[®]
- Destilador, Fabbe[®]
- Desintegrador, Nova Ética[®]
- Durômetro, Pharma Test[®]
- Espectrofotômetro UV-VIS, Genesys 2 Spectronic[®]
- Friabilômetro, Pharma Test[®]
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm, Sartorius[®]
- Membrana filtrante de celulose regenerada, porosidade 0,45 µm, 13 mm, Phenomenex[®]
- Micropipeta 20-200 µL, Brand[®]

- Micropipeta 200-1000 μ L, Gilson[®]
- Micropipeta 1-5 mL, Gilson[®]
- Lâmpada ultravioleta TUV 30W/G30 T8, 254 nm, Philips[®]
- Potenciômetro, Mettler[®]
- Purificador de água, Millipore[®]
- Termômetro de imersão, Incoterm[®]
- Vórtex, Phoenix[®]

3.5 Produtos médico-hospitalares

- Álcool 70%
- Algodão
- Descarpack
- Dispositivo intravenoso Saf-T Intima 22G, BD[®]
- Heparina 5000 UI/mL, Eurofarma[®]
- Luvas descartáveis
- Micropore
- Seringa de 10 mL com agulha 25 x 7 mm, Medgoldman[®]
- Seringa de 5 mL com agulha 25 x 7 mm, Medgoldman[®]
- Soro fisiológico 125 mL, Texon[®]
- Tubos vacutainer de 10 mL com heparina, BD[®]

4 MÉTODOS

4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção UV para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos

As condições experimentais estabelecidas para análise de bezafibrato em formulações farmacêuticos através de cromatografia líquida estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições para análise de bezafibrato em formulações farmacêuticas por cromatografia líquida

Característica	Descrição
Coluna	Rexchrom [®] C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5µm), Regis [®]
Temperatura	Ambiente Tampão: acetonitrila: metanol (50: 40: 10, V/V/V)
Fase móvel	Tampão: Fosfato de potássio monobásico 0,01 M, pH 3,5 (ajustado com ácido fosfórico)
Vazão	1,0 mL/min
Comprimento de onda	230 nm
Volume de injeção	20 µL

Para preparação do tampão, 0,6804 g de fosfato de potássio monobásico foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 500 mL, completando-se o volume do balão com água ultra-pura. Ajustou-se o pH do tampão para 3,5 com ácido fosfórico PA. Preparou-se a fase móvel pela mistura de 500 mL de tampão, 400 mL de acetonitrila e 100 mL de metanol. A mistura foi filtrada sob vácuo em membrana com porosidade de 0,45 µm e diâmetro de 47 mm e degaseificada com gás hélio durante 10 minutos.

Para realização das análises, a coluna cromatográfica foi estabilizada pela passagem de fase móvel durante 30 minutos com vazão de 1 mL/min. Para injeção no equipamento, as amostras foram filtradas em membrana de nylon com porosidade de 0,45 µm.

A validação do método foi conduzida de acordo com o ICH (2005) e USP 29 (2006). Os parâmetros avaliados durante a validação foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

4.1.1 Especificidade

A especificidade do método analítico foi determinada considerando a quantificação do fármaco como objetivo do procedimento. As impurezas relacionadas ao bezafibrato não estavam disponíveis e, por isso, o fármaco foi submetido a condições de estresse (hidrólise ácida e básica, fotólise, oxidação química e calor úmido) para obtenção de produtos de degradação. Amostras simuladas de excipientes (ASE) ou placebo foram também avaliadas com a finalidade de verificar uma possível interferência destes componentes. A análise de pureza dos picos cromatográficos foi realizada através do DAD e do programa CLASS VP 6.14. Os espectros de absorção do bezafibrato, excipientes e produtos de degradação foram determinados e comparados na faixa de 190 a 370 nm.

- Preparação do bezafibrato em condições normais

Analicamente, 10 mg da SQR foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. Transferiu-se alíquota de 2,5 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução com concentração de 250 µg/mL.

- Hidrólise ácida

Analicamente, 10 mg da SQR foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume do balão com ácido clorídrico 0,1 N, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. Deixou-se a solução em refluxo à temperatura de 80°C por 8 horas.

Transferiu-se alíquota de 2,5 mL para balão volumétrico de 10 mL, neutralizou-se com 2,5 mL de hidróxido de sódio 0,1 N e completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se solução com concentração teórica de 250 µg/mL.

- Hidrólise alcalina

Analiticamente, 10 mg da SQR foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume do balão com hidróxido de sódio 1 N, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. Deixou-se a solução em refluxo à temperatura de 80°C por 8 horas. Transferiu-se alíquota de 2,5 mL para balão volumétrico de 10 mL, neutralizou-se com 2,5 mL de ácido clorídrico 1 N e completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se solução com concentração teórica de 250 µg/mL.

- Fotólise

Analiticamente, 10 mg da SQR foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume do balão com água ultra-pura, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. Transferiu-se a solução para cubetas de quartzo e irradiou-se com luz UV a 254 nm, à distância de 15 cm por 22 horas. Transferiu-se alíquota de 2,5 mL das cubetas de quartzo para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se solução com concentração de 250 µg/mL.

- Oxidação química

Analiticamente, 10 mg da SQR foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume do balão com peróxido de hidrogênio 30 V, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. O balão foi envolto em papel alumínio e mantido à temperatura ambiente por 24 horas. Transferiu-se alíquota de 2,5 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se solução com concentração de 250 µg/mL.

- Calor úmido

Analiticamente, 10 mg da SQR foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume do balão com água ultra-pura, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. A solução foi submetida ao calor úmido em autoclave à temperatura de 121°C durante 15 minutos. Transferiu-se alíquota de 2,5 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se solução com concentração de 250 µg/mL. A temperatura e o tempo empregados na preparação da amostra foram selecionados uma vez que caracterizam condições apropriadas para esterilizar e degradar diversos tipos de microrganismos.

4.1.2 Linearidade

Para preparar a curva de calibração, 20 mg da SQR foram analiticamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 20 mL. Completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL (solução inicial). Alíquotas de 20 µL, 200 µL e 1 mL da solução inicial foram transferidas para balão volumétrico de 20 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável. Completou-se o volume dos balões com metanol, obtendo-se soluções com concentrações de 1, 10 e 50 µg/mL. Alíquotas de 1 mL, 2,5 mL e 5 mL da solução inicial foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável. Completou-se o volume dos balões com metanol, obtendo-se soluções com concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL. As curvas de calibração foram preparadas em três dias diferentes para efetuar o tratamento estatístico (método dos mínimos quadrados) e análise de variância.

4.1.3 Precisão

- Precisão dos comprimidos

Determinou-se o peso médio de 20 unidades de comprimido, conforme a Farmacopéia Brasileira (1988). Os comprimidos foram triturados em gral de

porcelana com auxílio de pistilo até a formação de um pó homogêneo. Pesou-se, analiticamente, quantidade equivalente a 50 mg de bezafibrato e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de 10 mL de metanol. Para solubilizar o bezafibrato, a solução foi submetida a banho de ultra-som durante 10 minutos. Completou-se o volume do balão com metanol, homogeneizou-se e filtrou-se a solução através de filtro de papel. Foram transferidos 2,5 mL da solução filtrada para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se solução com concentração de 250 µg/mL. Foram realizadas seis determinações em condições idênticas (mesmo dia), três determinações em dias diferentes e três determinações com analistas diferentes.

- Precisão das cápsulas

Determinou-se o peso médio de 20 unidades de cápsula, conforme a Farmacopéia Brasileira (1988). O conteúdo das cápsulas foi misturado em gral de porcelana com auxílio de pistilo. Pesou-se, analiticamente, quantidade equivalente a 50 mg de bezafibrato e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de 10 mL de metanol. Para solubilizar o bezafibrato, a solução foi submetida a banho de ultra-som durante 10 minutos. Completou-se o volume do balão com metanol, homogeneizou-se e centrifugou-se a solução à rotação de 3000 rpm por 10 minutos. Foram transferidos 2,5 mL da solução centrifugada para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se solução com concentração de 250 µg/mL. Foram realizadas seis determinações em condições idênticas (mesmo dia), três determinações em dias diferentes e três determinações com analistas diferentes.

4.1.4 Exatidão

- Exatidão dos comprimidos

Pesou-se, analiticamente, uma quantidade equivalente a 50 mg de bezafibrato do pó dos comprimidos preparados em 4.1.3 e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de 20 mL de metanol. Para solubilizar o

bezafibrato, a solução foi submetida a banho de ultra-som durante 10 minutos. Completou-se o volume do balão com metanol, homogeneizou-se e filtrou-se a solução através de papel filtro. Alíquotas de 2 mL, 2,5 mL e 3 mL da solução filtrada foram transferidas para balões volumétricos de 10mL e completou-se o volume dos balões com metanol, obtendo-se soluções com concentração de 200, 250 e 300 µg/mL, respectivamente. A exatidão do procedimento foi determinada em três dias diferentes.

- Exatidão das cápsulas

Pesou-se, analiticamente, uma quantidade equivalente a 50 mg de bezafibrato do pó das cápsulas preparadas em 4.1.3 e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de 20 mL de metanol. Para solubilizar o bezafibrato, a solução foi submetida a banho de ultra-som durante 10 minutos. Completou-se o volume com metanol, homogeneizou-se e centrifugou-se a solução à rotação de 3000 rpm por 10 minutos. Alíquotas de 2 mL, 2,5 mL e 3 mL da solução centrifugada foram transferidas para balões volumétricos de 10mL e completou-se o volume dos balões com metanol, obtendo-se soluções com concentração de 200, 250 e 300 µg/mL, respectivamente. A exatidão do procedimento foi determinada em três dias diferentes.

4.1.5 Limite de detecção

O limite de detecção foi estabelecido após a construção de três curvas de calibração com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação média das curvas. O limite teórico obtido a partir da equação 3 (página 37) foi preparado e analisado utilizando o método analítico.

4.1.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi estabelecido após a construção de três curvas de calibração com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação média das curvas. A concentração teórica calculada através da equação 4 (página 37) foi

preparada experimentalmente e avaliada pelo procedimento para análise da precisão e exatidão.

4.1.7 Robustez

A robustez do método proposto foi avaliada por pequenas variações nas condições cromatográficas, como:

- Coluna cromatográfica: de diferente fabricante (Supelco[®]), mas com idênticas dimensões
- Comprimento de onda: 228 nm e 232 nm
- pH do tampão: 3,3 e 3,7
- Fluxo da fase móvel: 0,9 mL/min e 1,1 mL/min
- Composição da fase móvel: tampão e acetonitrila tiveram proporções alteradas. A fase móvel para o teste da robustez consistiu em tampão: acetonitrila: metanol nas proporções de 48: 42: 10 e 52: 38: 10.

Para verificar a influência destas modificações, as amostras foram analisadas conforme o procedimento para avaliação da precisão, descrito em 4.1.3.

4.2 Espectrofotometria com detecção UV para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos

As condições experimentais estabelecidas para análise de bezafibrato em produtos farmacêuticos através de espectrofotometria no UV estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições para análise de bezafibrato em formulações farmacêuticas por espectrofotometria no UV

Característica	Descrição
Diluentes	Metanol e Hidróxido de sódio 0,1 N
Cubeta	Quartzo (1 cm de percurso ótico)
Comprimento de onda	230 nm

As análises espectrofotométricas foram realizadas utilizando tanto solvente orgânico (metanol) quanto diluente aquoso (hidróxido de sódio 0,1 N). É importante destacar que o método validado com solvente aquoso foi desenvolvido devido à necessidade de reduzir a geração de resíduo e os gastos para execução da técnica.

A validação do método foi conduzida de acordo com o ICH (2005) e USP 29 (2006). Os parâmetros avaliados durante a validação foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

4.2.1 Especificidade

A especificidade do método analítico foi determinada considerando a quantificação do fármaco como objetivo do procedimento. Amostras simuladas de excipientes (ASE) foram avaliadas para verificação de uma possível interferência destes componentes no método espectrofotométrico. Os espectros de absorção do bezafibrato e da ASE foram determinados e comparados na faixa de 200 a 400 nm.

4.2.2 Linearidade

Para preparar a curva de calibração, 10 mg da SQR foram analiticamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume do balão com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL (solução inicial). Uma alíquota de 2 mL da solução inicial foi transferida com auxílio de micropipeta de volume variável para balão volumétrico de 20 mL. Completou-se o volume do balão com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N, obtendo-se solução com concentração de 100 µg/mL (solução estoque). Alíquotas de 500 µL, 1 mL e 1,5 mL da solução estoque foram transferidas para balão volumétrico de 20 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável. Completou-se o volume dos balões com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N, obtendo-se soluções com concentrações de 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 7,5 µg/mL. Alíquotas de 1 mL, 1,25 mL e 1,5 mL da solução estoque foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável.

Completou-se o volume dos balões com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N, obtendo-se soluções com concentrações de 10 µg/mL, 12,5 µg/mL e 15 µg/mL. As curvas de calibração foram preparadas em três dias diferentes para efetuar o tratamento estatístico (método dos mínimos quadrados) e análise de variância.

4.2.3 Precisão

- Precisão dos comprimidos

Determinou-se o peso médio de 20 unidades de comprimido, conforme a Farmacopéia Brasileira (1988). Os comprimidos foram triturados em gral de porcelana com auxílio de pistilo até a formação de um pó homogêneo. Pesou-se, analiticamente, quantidade equivalente a 50 mg de bezafibrato e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de 10 mL de metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N. Para solubilizar o bezafibrato, a solução foi submetida a banho de ultra-som durante 10 minutos. Completou-se o volume do balão com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N, homogeneizou-se e filtrou-se a solução através de filtro de papel (solução inicial). Transferiu-se alíquota de 2,0 mL da solução inicial para balão de 20 mL e completou-se o volume do balão com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N (solução estoque). Transferiu-se 1,0 mL da solução estoque para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume do balão com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N, obtendo-se solução com concentração de 10 µg/mL. Foram efetuadas seis determinações em condições idênticas (repetibilidade), três determinações em dias diferentes e três determinações com analistas diferentes (precisão intermediária).

- Precisão das cápsulas

Determinou-se o peso médio de 20 unidades de cápsula, conforme a Farmacopéia Brasileira (1988). O conteúdo das cápsulas foi misturado em gral de porcelana com auxílio de pistilo. Pesou-se, analiticamente, quantidade equivalente a 50 mg de bezafibrato e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de 10 mL de metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N. Para solubilizar o bezafibrato, a solução foi submetida a banho de ultra-som durante 10 minutos. Completou-se o

volume do balão com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N e homogeneizou-se. A solução diluída com metanol foi centrifugada à rotação de 3000 rpm por 10 minutos enquanto que a solução diluída com hidróxido de sódio 0,1N foi filtrada através de filtro de papel (solução inicial). Transferiu-se alíquota de 2,0 mL da solução inicial para balão de 20 mL e completou-se o volume do balão com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N (solução estoque). Transferiu-se 1,0 mL da solução estoque para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume do balão com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N, obtendo-se solução com concentração de 10 µg/mL. Foram efetuadas seis determinações em condições idênticas (repetibilidade), três determinações em dias diferentes e três determinações com analistas diferentes (precisão intermediária).

4.2.4 Exatidão

- Exatidão dos comprimidos

Pesou-se, analiticamente, quantidade equivalente a 50 mg de bezafibrato do pó dos comprimidos preparado em 4.2.3 e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de 10 mL de metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N. Para solubilizar o bezafibrato, a solução foi submetida a banho de ultra-som durante 10 minutos. Completou-se o volume com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N, homogeneizou-se e filtrou-se a solução através de papel filtro (solução inicial). Transferiu-se 1,0 mL da solução inicial para balão de 20 mL e completou-se o volume do balão com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N (solução estoque). Alíquotas de 800 µL, 1,0 mL e 1,2 mL da solução estoque foram transferidas para balões volumétricos de 10mL e completou-se o volume dos balões com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N, obtendo-se soluções com concentração de 8, 10 e 12 µg/mL, respectivamente. A exatidão do método foi determinada em três dias diferentes.

- Exatidão das cápsulas

Pesou-se, analiticamente, quantidade equivalente a 50 mg de bezafibrato do

pó das cápsulas preparado em 4.2.3 e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de 10 mL de metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N. Para solubilizar o bezafibrato, a solução foi submetida a banho de ultra-som durante 10 minutos. Completou-se o volume do balão com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N e homogeneizou-se. A solução diluída com metanol foi centrifugada à rotação de 3000 rpm por 10 minutos enquanto que a solução diluída com hidróxido de sódio 0,1N foi filtrada através de filtro de papel. Transferiu-se 1,0 mL das soluções centrifugada e filtrada para balão de 20 mL e completou-se o volume dos balões com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N (soluções estoque). Alíquotas de 800 µL, 1,0 mL e 1,2 mL das soluções estoque foram transferidas para balões volumétricos de 10mL e completou-se o volume dos balões com metanol ou hidróxido de sódio 0,1 N, obtendo-se soluções com concentração de 8, 10 e 12 µg/mL, respectivamente. A exatidão do método foi determinada em três dias diferentes.

4.2.5 Limite de detecção

O limite de detecção foi estabelecido após a construção de três curvas de calibração com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação média das curvas. O limite teórico obtido a partir da equação 3 (página 37) foi preparado e analisado utilizando o método analítico.

4.2.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi estabelecido após a construção de três curvas de calibração com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação média das curvas. A concentração teórica calculada através da equação 4 (página 37) foi preparada experimentalmente e avaliada pelo procedimento para análise da precisão e exatidão.

4.2.7 Robustez

A robustez do método proposto foi avaliada por pequenas variações nas condições experimentais, como:

- Solvente: diferentes fabricantes de metanol (J.T.Baker®) e diferentes concentrações de hidróxido de sódio (0,01 N)
- Comprimento de onda: 228 nm e 232 nm

Para verificar a influência destas modificações, as amostras foram analisadas conforme o procedimento para avaliação da precisão, descrito em 4.2.3.

4.3 Comparação de métodos validados por cromatografia e espectrofotometria para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos

Os resultados obtidos durante a determinação da precisão dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA). Os valores tabelados foram analisados empregando um nível de significância de até 5% ($p < 0,05$).

4.4 Controle de qualidade de produtos farmacêuticos contendo bezafibrato e aplicação do método para quantificação de formulações por cromatografia em fase reversa com detecção UV

4.4.1 Determinação do peso médio de comprimidos e cápsulas

Para determinação do peso médio foram pesados individualmente vinte comprimidos e também vinte cápsulas. Para avaliação das cápsulas, foi determinado o peso das cápsulas cheias e, após a remoção do conteúdo, foi analisado o peso dos invólucros destas cápsulas. Assim, pode-se analisar o peso médio do conteúdo das cápsulas. Os limites preconizados pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988) foram calculados considerando o peso médio das formulações, sendo permitidas variações máximas de $\pm 5\%$ e $\pm 7,5\%$ em relação ao peso médio experimental de comprimidos e cápsulas, respectivamente.

4.4.2 Determinação do tempo de desintegração de comprimidos e cápsulas

A desintegração dos comprimidos e cápsulas foi determinada em água à

temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ de acordo com o procedimento da Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988). Um aparelho de desintegração foi utilizado e seis unidades de cada produto foram testadas. O tempo de desintegração foi considerado como o tempo em minutos e segundos necessário para a desintegração de todas as seis unidades testadas, permanecendo apenas visíveis seus resíduos de revestimento.

4.4.3 Determinação da resistência mecânica de comprimidos

- Friabilidade

A friabilidade dos comprimidos de bezafibrato foi determinada pesando-se vinte comprimidos conforme o procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988). As unidades foram introduzidas em um aparelho e foram submetidas a cem rotações durante um período de cinco minutos (isto é, 20 rpm). Após este procedimento, os resíduos de poeira e pequenos fragmentos quebrados foram removidos e os vinte comprimidos retirados do equipamento foram novamente pesados para análise da porcentagem perdida durante a movimentação das unidades no friabilômetro.

- Dureza

Para a avaliação da dureza dos comprimidos procedeu-se conforme a Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988) e foram utilizados dez comprimidos para a análise. As unidades foram submetidas individualmente à ação do durômetro, sendo medida a força necessária para a deformação e quebra dos comprimidos.

4.4.4 Doseamento de bezafibrato em comprimidos e cápsulas

O doseamento dos comprimidos e cápsulas foi realizado empregando o método validado por HPLC em fase reversa com detecção UV para avaliação de bezafibrato em formulações farmacêuticas. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 1 e o procedimento de preparação das amostras foi realizado de maneira idêntica ao método descrito no item 4.1.3.

4.4.5 Uniformidade de conteúdo de comprimidos e cápsulas

A uniformidade de conteúdo dos comprimidos e cápsulas foi avaliada utilizando-se os resultados obtidos na determinação do peso médio (4.4.1) e os valores obtidos no doseamento das formulações (4.4.4). Os pesos individualmente registrados foram multiplicados pelo resultado do doseamento e teor de cada uma das unidades foi analisado. O método da variação de peso descrito pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988) foi empregado para determinação da uniformidade de conteúdo.

4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção UV para avaliação de bezafibrato em matrizes biológicas

As condições cromatográficas do método para determinação de bezafibrato em plasma humano são idênticas às padronizadas no procedimento validado para avaliação do fármaco em formulações farmacêuticas exceto pelo volume de injeção. A Tabela 3 relewa os parâmetros utilizados no método bionalítico.

Tabela 3 – Condições para análise de bezafibrato em matrizes biológicas por cromatografia líquida

Características	Descrição
Coluna	Rexchrom [®] C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5µm), Regis [®]
Temperatura	Ambiente Tampão: acetonitrila: metanol (50: 40: 10, V/V/V)
Fase móvel	Tampão: Fosfato de potássio monobásico 0,01 M, pH 3,5 (ajustado com ácido fosfórico)
Vazão	1,0 mL/min
Comprimento de onda	230 nm
Volume de injeção	50 µL

Para preparação do tampão e fase móvel, utilizou-se a técnica descrita nos parágrafos de introdução do item 4.1. As análises foram executadas com coluna cromatográfica previamente estabilizada à vazão de 1 mL/min. As amostras foram adequadamente filtradas em membrana de nylon com porosidade de 0,45 µm antes da injeção no equipamento.

O procedimento de extração do bezafibrato a partir do plasma humano foi realizado utilizando extração líquido-líquido e o padrão interno empregado nas análises foi o ezetimibe, um medicamento também utilizado para o tratamento das dislipidemias.

Para a extração, alíquotas de 20 µL de ezetimibe (com concentração inicial de 250 µg/mL) e 200 µL de ácido clorídrico 0,1 N foram adicionadas dentro de tubos eppendorf contendo 200 µL plasma contaminado com bezafibrato. As amostras foram agitadas durante 1 minuto e um volume de 1,5 mL de terc-butil metil éter foi adicionado aos tubos. Os tubos foram novamente agitados por 1 minuto e foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 1,2 mL de solvente orgânico foi separada, evaporada até a secura e reconstituída com 300 µL de uma mistura composta por acetonitrila: água (50: 50, V/V).

A validação do método foi conduzida de acordo com as recomendações de órgãos regulatórios nacionais, como Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (ANVISA, 2003), e internacionais, como Food and Drug Administration – FDA (FDA, 2001). Assim, os parâmetros avaliados durante a validação foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade.

4.5.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada pelo processamento de seis amostras de plasma branco provenientes de diferentes voluntários, sendo uma amostra lipêmica, uma amostra hemolisada e quatro amostras normais. A ausência de picos interferentes nos tempos de retenção do fármaco e padrão interno indica que o procedimento é específico.

4.5.2 Linearidade

Para a preparação da curva de calibração, 100 mg da SQR foram analiticamente pesados e transferidos para um balão volumétrico de 20 mL. Completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se uma solução de concentração 5 mg/mL (solução inicial). Alíquotas de 40 μ L, 100 μ L e 200 μ L da solução inicial foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável. Completou-se o volume dos balões com metanol, obtendo-se soluções com concentração de 20, 50 e 100 μ g/mL (soluções estoque). Alíquotas de 1,0 mL e 2,5 mL da solução inicial foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável. Completou-se o volume dos balões com metanol, obtendo-se soluções com concentração de 1,0 e 2,5 mg/mL (soluções estoque).

As soluções estoque e a solução inicial foram utilizadas na preparação das diferentes concentrações da curva de calibração com matriz biológica. Alíquotas de 200 μ L das soluções de concentração 20 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 1,0 mg/mL, 2,5 mg/mL (soluções estoque) e 5,0 mg/mL (solução inicial) foram transferidas para balões volumétricos de 20 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável. Completou-se o volume dos balões com plasma branco proveniente de voluntários, obtendo-se a curva de calibração com as concentrações de 0,2; 0,5; 1; 10; 25 e 50 μ g/mL, respectivamente. Além das seis diferentes concentrações de bezafibrato, foram preparadas amostras de plasma branco (isenta do fármaco e padrão interno) e zero (somente com adição de padrão interno) para a curva. As curvas de calibração foram preparadas em triplicata para efetuar o tratamento estatístico (método dos mínimos quadrados) e análise de variância.

4.5.3 Precisão

Analiticamente, 100 mg da SQR foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 20 mL. Completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se uma solução de concentração 5 mg/mL. Uma alíquota de 50 μ L desta solução foi transferida para balão de 10 mL, enquanto que alíquotas de 2,0 e 4,0 mL foram transferidas para balões de 5 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável.

Completou-se o volume dos balões volumétricos com metanol, obtendo-se soluções estoque com concentração de 25 µg/mL, 2,0 mg/mL e 4,0 mg/mL.

As soluções estoque foram utilizadas na preparação das amostras de controle de qualidade com concentração baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA). Alíquotas de 500 µL das soluções de concentração 25 µg/mL, 2,0 mg/mL e 4,0 mg/mL foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável. Completou-se o volume dos balões com plasma branco proveniente de voluntários, obtendo-se as amostras de controle de qualidade com concentrações de 0,25 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL, respectivamente. Foram realizadas cinco determinações de cada concentração em condições idênticas (mesmo dia), cinco determinações em dias diferentes e cinco determinações com analistas diferentes para determinação da repetibilidade e precisão intermediária.

4.5.4 Exatidão

O procedimento de preparação das soluções estoque e das amostras de controle de qualidade (0,25 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL) utilizadas na determinação da exatidão foi idêntico ao descrito no item 4.5.3. A exatidão do método foi determinada em três dias diferentes.

4.5.5 Recuperação

A recuperação do método foi avaliada através da preparação de solução de bezafibrato (analito) e ezetimibe (padrão interno) de concentração correspondente à extração teórica total (100%) a partir das amostras biológicas. A análise da recuperação foi realizada utilizando três determinações de cada concentração do fármaco (0,25 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL), sendo que o parâmetro foi avaliado em três dias diferentes.

4.5.6 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção do método foi calculado pela relação de três vezes o sinal-ruído da linha de base.

Para a avaliação do limite de quantificação, 100 mg da SQR foram analiticamente pesados e transferidos para um balão volumétrico de 20 mL. Completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se uma solução de concentração 5 mg/mL. Uma alíquota de 40 μ L desta solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável. Completou-se o volume do balão com metanol, obtendo-se solução com concentração de 20 μ g/mL. Alíquotas de 25, 50 e 100 μ L da solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, com auxílio de micropipeta de volume variável. Completou-se o volume dos balões com plasma branco proveniente de voluntários, obtendo-se soluções com concentração de 0,05 μ g/mL, 0,1 μ g/mL e 0,2 μ g/mL. Foram realizadas cinco determinações de cada concentração para a análise da precisão e exatidão experimentais.

4.5.7 Estabilidade

O procedimento de preparação das soluções estoque e das amostras de controle de qualidade (0,25 μ g/mL, 20 μ g/mL e 40 μ g/mL) utilizadas na determinação da exatidão foi idêntico ao descrito no item 4.5.3. A avaliação da estabilidade foi realizada sempre pela comparação dos resultados obtidos provenientes de amostras preparadas recentemente e de amostras teste. Foram realizadas três determinações de cada concentração para a análise estabilidade.

- Estabilidade da solução padrão de bezafibrato

As soluções de concentração baixa, média e alta do fármaco em metanol foram mantidas em repouso à temperatura ambiente durante um período de 6 horas, sendo então analisadas para a avaliação da estabilidade.

- Estabilidade de congelamento e descongelamento

As amostras contaminadas de plasma (CQB, CQM e CQA) foram congeladas e armazenadas à temperatura de -20°C durante 24 horas. Após este período, as amostras foram descongeladas totalmente à temperatura ambiente, processadas,

analisadas e novamente congeladas. Repetiu-se o procedimento de congelamento e descongelamento das amostras por mais duas vezes, sendo verificado o teor de bezafibrato em cada um dos ciclos para análise da estabilidade.

- Estabilidade de curta duração

Para a avaliação da estabilidade de curta duração, as amostras de concentração baixa, média e alta de plasma contaminado permaneceram à temperatura ambiente durante um período de 4 horas antes do processamento e análise quantitativa.

- Estabilidade pós-processamento

Na verificação de estabilidade pós-processamento, as amostras de plasma processadas foram mantidas à temperatura ambiente na estante do cromatógrafo líquido durante 6 horas aguardando pela análise de teor.

- Estabilidade de longa duração

As amostras de plasma contaminadas de concentração baixa, média e alta foram mantidas congeladas a -20°C durante um período de 3 meses para avaliação da estabilidade de longa duração.

4.6 Estudo da biodisponibilidade de comprimidos contendo bezafibrato e aplicação do método para análise de matrizes biológicas por cromatografia em fase reversa com detecção UV

Antes da execução, o protocolo do estudo foi submetido à apreciação e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.6.1 Seleção dos voluntários

Para a viabilização do estudo, seis voluntários de ambos os sexos foram selecionados de acordo com critérios pré-estabelecidos de inclusão e exclusão.

- Critérios de inclusão:
 - bom estado de saúde;
 - índice de massa corporal entre 19 e 27;
 - faixa etária de 21 a 45 anos;
 - isentos de terapia medicamentosa;
 - indivíduos com interesse em participação.

- Critérios de exclusão:
 - sensibilidade ao fármaco em estudo;
 - sensibilidade aos componentes da formulação.

Os indivíduos selecionados tinham liberdade para desistir de fazer parte do trabalho a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento, restrições ou conseqüências. Os participantes receberam garantia de não identificação, do caráter confidencial dos resultados e garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca de procedimentos, riscos, benefícios, entre outras dúvidas.

4.6.2 Administração de bezafibrato

Os voluntários foram mantidos em jejum de 8 horas até a administração do comprimido contendo 200mg de bezafibrato (Cedur[®]) juntamente com 200 mL de água.

4.6.3 Obtenção das amostras sanguíneas

Os voluntários tiveram amostras de sangue coletadas por punção venosa, após esclarecimentos e consentimento formal assinado. Um cateter intravenoso foi introduzido no paciente para evitar a realização de várias punções nas primeiras

horas do estudo e reduzir o desconforto ocasionado pela coleta. Foram coletadas amostras de 8mL de sangue em tubo a vácuo heparinizado antes da dose do medicamento e após 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 4 e 8 horas em relação à administração do medicamento.

As coletas de sangue foram realizadas em local apropriado por pessoal qualificado e treinado, utilizando material descartável. A identificação das amostras foi efetuada através de códigos para preservação da identidade e privacidade do indivíduo participante, conforme previsto na Resolução nº 196/1996 (CNS, 1996). O material biológico proveniente dos voluntários foi utilizado única e exclusivamente para alcançar os objetivos da pesquisa, sendo que a quantidade residual de amostra não empregada nos ensaios foi adequadamente descartada.

4.6.4 Tratamento das amostras sangüíneas

As amostras foram centrifugadas 6000 rpm por 10 minutos à temperatura de -4°C para obtenção do plasma, utilizado para a análise quantitativa de bezafibrato. As amostras de plasma foram submetidas a congelamento à temperatura de -20°C por período inferior a 3 meses, garantida a estabilidade do fármaco a ser quantificado.

4.6.5 Aplicação do método bioanalítico e seqüência de análise das amostras

O procedimento de desenvolvimento e validação do método cromatográfico empregado no estudo da biodisponibilidade de bezafibrato encontra-se descrito no item 4.5. As amostras analisadas em cada corrida analítica incluíram, além das amostras de plasma de três voluntários, amostras de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) e a curva de calibração. A seqüência de análise iniciou com a curva de calibração, amostras do voluntário 1 ou 4, análise da qualidade (uma determinação de cada concentração), amostras do voluntário 2 ou 5, avaliação da qualidade (uma determinação de CQB, CQM e CQA), amostras do voluntário 3 ou 6 e análise da qualidade (uma determinação de cada concentração). O coeficiente de determinação, bem como a precisão e exatidão do ensaio foram calculados com o objetivo de garantir o desempenho satisfatório do método e validade do ensaio.

4.6.6 Determinação de parâmetros farmacocinéticos dos voluntários

A área sob a curva (AUC) foi calculada pela regra dos trapezóides utilizando a curva de concentração plasmática de bezafibrato *versus* tempo. A concentração máxima plasmática ($C_{máx}$) e o tempo para alcançar esta concentração ($t_{máx}$) foram obtidos diretamente do gráfico com auxílio do programa Excel[®] (Microsoft[®]). A constante de eliminação (k_{el}) foi determinada pela regressão linear da transformação logarítmica utilizando os 3 últimos pontos da curva. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculado através da equação 1 (página 27).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção UV para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos

A Figura 2 apresenta o cromatograma típico referente à análise de bezafibrato em formulações farmacêuticas através do método proposto por HPLC. O tempo de retenção do fármaco foi aproximadamente 5,2 minutos e a simetria do pico cromatográfico revelou-se apropriada para a quantificação do bezafibrato. Os parâmetros cromatográficos avaliados através do teste de adequabilidade do sistema (*System Suitability Test*) permaneceram dentro dos limites aceitáveis e podem ser visualizados na Tabela 4.

A técnica desenvolvida e validada revelou vantagens em relação ao método cromatográfico descrito na literatura (MISZTAL & KOMSTA, 2005). Considerando que os procedimentos validados são aplicados na rotina, a composição da fase móvel é muito importante no desenvolvimento de um método. A técnica proposta empregou fase móvel economicamente mais viável (tampão fosfato 0,01 M, pH 3,5: acetonitrila: metanol, 50: 40: 10, V/V/V) e reduziu tanto a concentração quanto a porcentagem do tampão, aumentando a vida útil da coluna utilizada. A fase móvel do procedimento descrito na literatura (tampão fosfato 0,09 M, pH 2,145: isopropanol, 55: 45) ainda emprega em grande proporção isopropanol, um solvente incomum na separação não-quiral.

Tabela 4 – Parâmetros obtidos a partir do *System Suitability Test* para o método cromatográfico desenvolvido para análise de bezafibrato em produtos farmacêuticos

Substância	Parâmetro	Média*	Permitido**	CV%
	Simetria	1,35	<2,0	0,234
	Pratos teóricos	5017,02	>2000	0,568
Bezafibrato	Área absoluta	15256336	---	1,117
	Tempo de retenção	5,32	---	0,287
	Fator de capacidade	2,55	---	0,399

* Valor correspondente a seis determinações de cada concentração

** De acordo com a Farmacopéia Americana (USP, 2006)

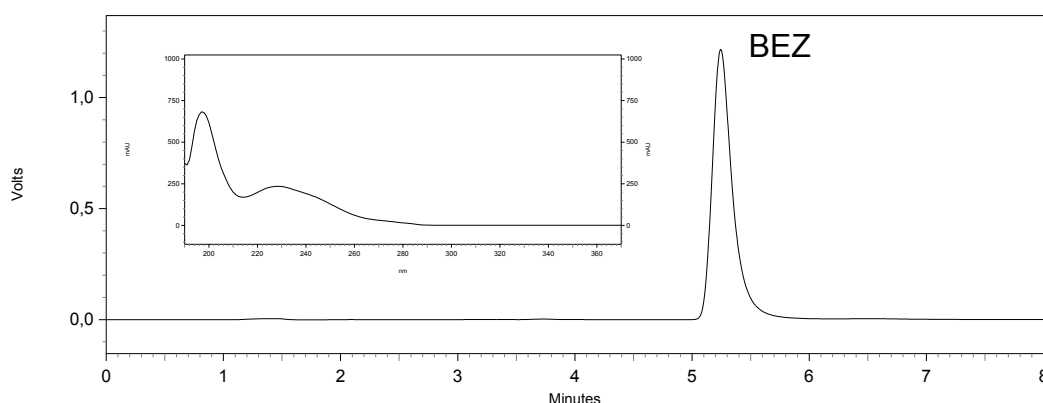


Figura 2 – Cromatograma obtido a partir de solução de SQR na concentração de 250 µg/mL e espectro de absorção característico do BEZ obtido por DAD. Condições cromatográficas: Coluna Rexchrom® Regis® C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm); Fase móvel: tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 M, pH 3,5; acetonitrila: metanol (50: 40: 10, V/V/V); Fluxo: 1 mL/min; Detecção: 230 nm.

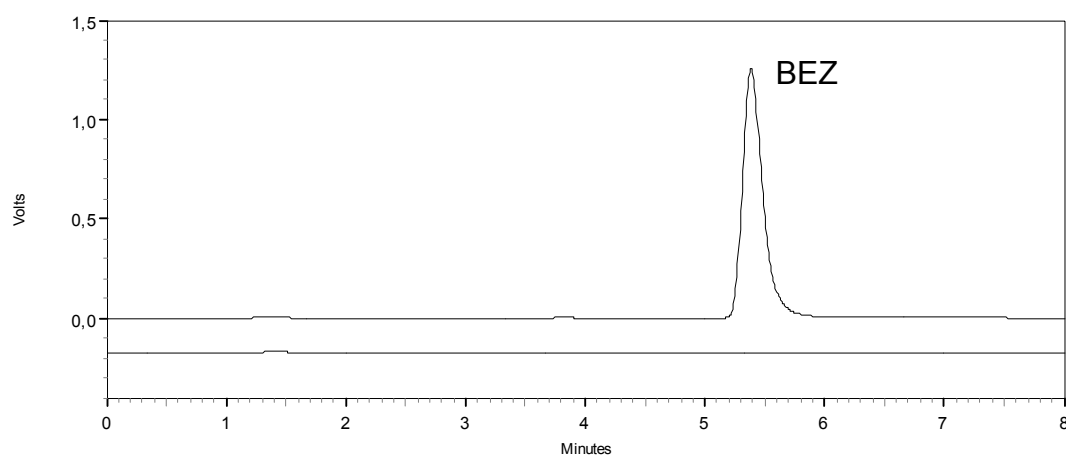


Figura 3 – Cromatograma obtido a partir da mistura de excipientes (placebo). Condições cromatográficas: Coluna Rexchrom® Regis® C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm); Fase móvel: tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 M, pH 3,5; acetonitrila: metanol (50: 40: 10, V/V/V); Fluxo: 1 mL/min; Detecção: 230 nm.

A especificidade do método foi demonstrada através da análise de uma mistura de excipientes do medicamento (placebo) e da avaliação dos produtos de degradação do fármaco obtidos por condições de estresse. Na Figura 3, observa-se que a mistura simulada não apresenta nenhum excipiente capaz de interferir significativamente no ensaio. Os cromatogramas relativos às soluções que foram submetidas às condições de estresse, juntamente com os respectivos espectros dos produtos de degradação, estão indicados nas Figuras 4, 5 e 6.

Ao contrário da fotólise, hidrólises ácida e alcalina, não foram observadas alterações na composição da SQR causadas pela exposição à solução de peróxido de hidrogênio 30 V durante 24 horas e também não foi verificada degradação do bezafibrato quando submetido à temperatura de 121°C por um período de 15 minutos.

O pico referente ao bezafibrato sofreu uma redução de 62,33%, 40,91% e 76,66% quando exposto às condições ácida, alcalina e radiação ultravioleta, respectivamente. Nestes casos, a especificidade do método foi demonstrada pela análise do detector de DAD que demonstrou e garantiu a pureza do pico do fármaco.

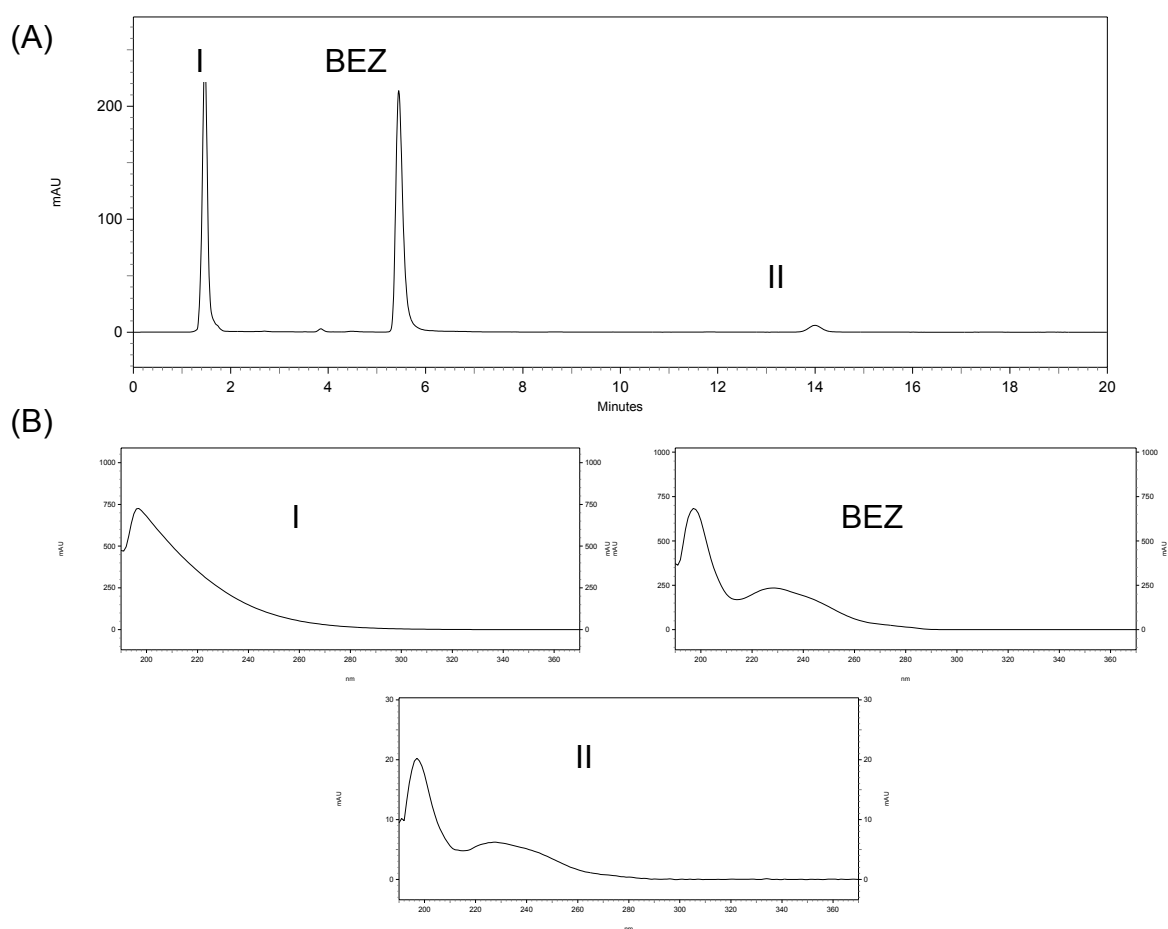


Figura 4 – (A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de BEZ após 8 horas de hidrólise ácida com ácido clorídrico 0,1 N. (B) Espectro de absorção da SQR e dos produtos de degradação I e II. Condições cromatográficas: Coluna Rexchrom® Regis® C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm); Fase móvel: tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 M, pH 3,5; acetonitrila: metanol (50: 40: 10, V/V/V); Fluxo: 1 mL/min; Detecção: 230 nm.

A linearidade do método foi demonstrada pela preparação de curvas de calibração em três dias diferentes. Os valores obtidos individualmente estão descritos na Tabela 5, a representação gráfica da curva é apresentada na Figura 7 e os resultados dos tratamentos estatísticos estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

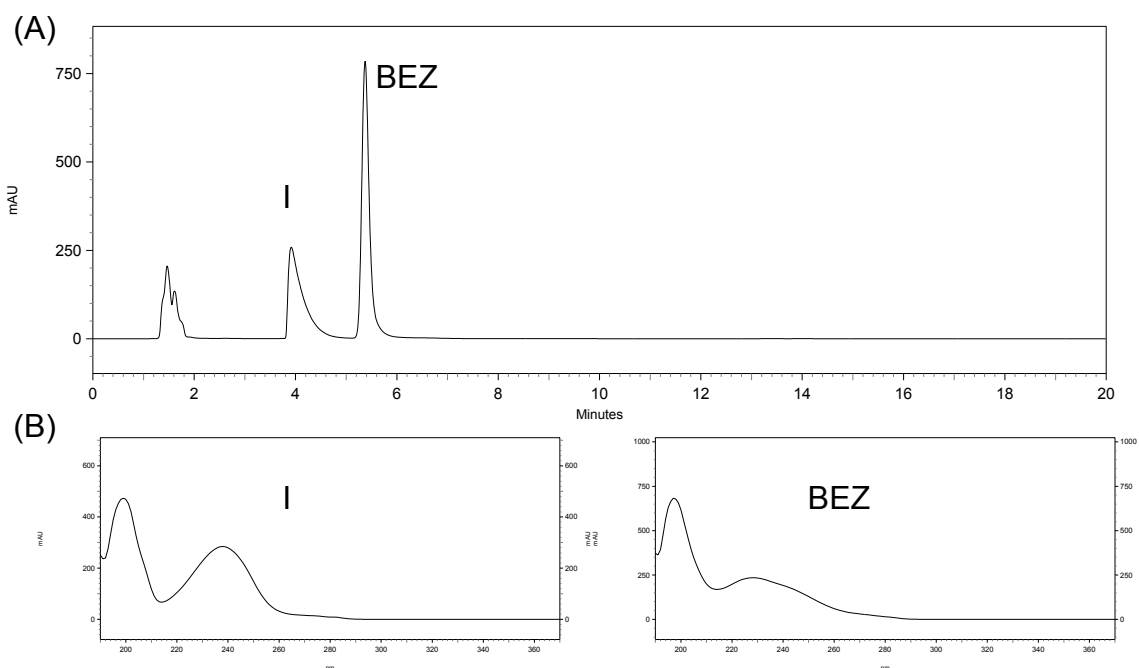


Figura 5 – (A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de BEZ após 8 horas de hidrólise alcalina com hidróxido de sódio 1 N. (B) Espectro de absorção da SQR e do produto de degradação I. Condições cromatográficas: Coluna Rexchrom® Regis® C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm); Fase móvel: tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 M, pH 3,5; acetonitrila: metanol (50: 40: 10, V/V/V); Fluxo: 1 mL/min; Detecção: 230 nm.

O objetivo para o qual o método foi validado é muito importante porque determina o intervalo de linearidade da técnica. A análise do perfil de dissolução é uma aplicação bastante realizada e exige que o método seja capaz de quantificar pequenas concentrações do analito. O procedimento descrito na literatura (MISZTAL & KOMSTA, 2005) não é apto para executar o perfil de dissolução de bezafibrato uma vez que apresenta linearidade no intervalo de 100 – 800 µg/mL, enquanto que a faixa do método proposto (1 – 500 µg/mL) é apropriada para execução do perfil.

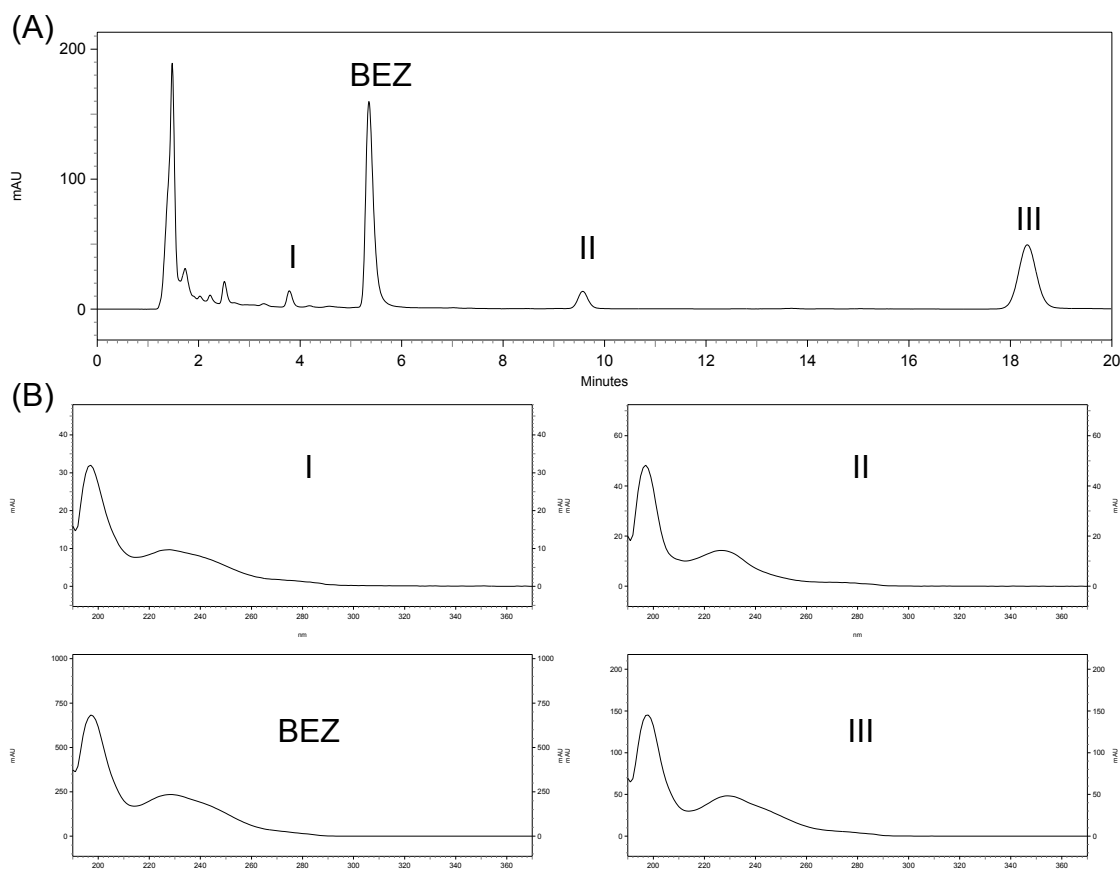


Figura 6 – (A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de BEZ após 22 horas de exposição à luz ultravioleta. (B) Espectro de absorção da SQR e dos produtos de degradação I, II e III. Condições cromatográficas: Coluna Rexchrom[®] Regis[®] C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 μ m); Fase móvel: tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 M, pH 3,5: acetonitrila: metanol (50: 40: 10, V/V/V); Fluxo: 1 mL/min; Detecção: 230 nm.

Tabela 5 – Áreas absolutas obtidas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método cromatográfico desenvolvido para avaliação de produtos farmacêuticos

Concentração (μ g/mL)	Áreas absolutas			Média	CV%
	1º dia	2º dia	3º dia		
1	63982	63831	64346	64053	0,41
10	631304	627753	638284	632447	0,85
50	2915712	2958165	2942651	2938843	0,73
100	6035997	6012560	5902202	5983586	1,19
250	14824057	14867631	14792967	14828218	0,25
500	29628401	29769654	29493168	29630408	0,47

CV% = coeficiente de variação percentual

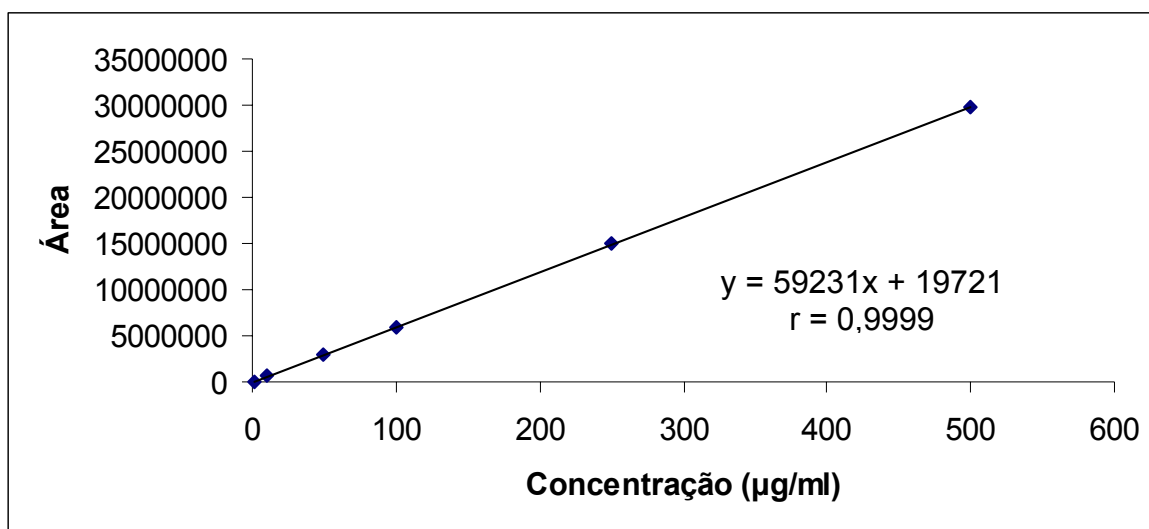


Figura 7 – Representação gráfica da curva de calibração de bezafibrato obtida pelo método cromatográfico validado para quantificação de comprimidos e cápsulas.

Tabela 6 – Resultados da curva de calibração de bezafibrato para o ensaio por HPLC para formulações, obtidos através do método dos mínimos quadrados

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	1 – 500 µg/mL
Equação da reta: $y = ax + b$	$y = 59231x + 19721$
Inclinação (a) \pm desvio padrão	$59231 \pm 262,06$
Intercepto (b) \pm desvio padrão	$19721 \pm 4181,22$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999

Tabela 7 – ANOVA das áreas absolutas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método cromatográfico desenvolvido para análise de produtos farmacêuticos

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F*
Entre concentrações	5	$1,96585 \cdot 10^{15}$	$3,932 \cdot 10^{14}$	90329 (3,10)
- regressão linear	1	$1,96584 \cdot 10^{15}$	$1,966 \cdot 10^{15}$	451642 (4,75)
- desvio da linearidade	4	$1,237 \cdot 10^{10}$	$3,093 \cdot 10^9$	0,71 (3,26)
Resíduo	12	$5,223 \cdot 10^{10}$	$4,352 \cdot 10^9$	
Total	17	$1,96591 \cdot 10^{15}$		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $p = 0,05$.
GL = Graus de liberdade / SQ = Soma dos quadrados

As Tabelas 5 e 6 e a Figura 7 revelam que a variação entre os pontos da curva nos três diferentes dias foi inferior a 2% e o coeficiente de correlação (r) das curvas foi superior a 0,999, condições estas esperadas para a validação do método.

A análise de variância (ANOVA) descrita na Tabela 7 demonstra que não houve desvio da linearidade do método uma vez que o valor F calculado foi inferior ao coeficiente F tabelado para um nível de significância de 5%.

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade foi verificada por seis determinações de concentração teórica de 250 µg/mL realizadas no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada pela análise de soluções com concentração teórica de 250 µg/mL efetuadas em dias distintos e por diferentes analistas. Os valores obtidos para comprimidos e cápsulas de bezafibrato estão apresentados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Através da análise das Tabelas 8 e 9, o método pode ser considerado preciso uma vez que a variação obtida na determinação da precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dias (precisão intermediária) não ultrapassou o limite máximo de 2%.

Tabela 8 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em comprimidos de bezafibrato pelo método cromatográfico

Amostras	Teor de bezafibrato					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)
1	97,20	243,00	99,36	248,40	98,12	245,30
2	98,82	247,05	98,47	246,18	97,36	243,40
3	98,46	246,15	99,48	248,70	98,68	246,70
4	96,81	242,02				
5	97,86	244,65				
6	97,22	243,05				
Média	97,73	244,32	99,10	247,76	98,05	245,13
CV%	0,81		0,80			

* Análises realizadas por analista diferente
CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 9 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em cápsulas de bezafibrato pelo método cromatográfico

Amostras	Teor de bezafibrato					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)
1	97,45	243,62	98,18	245,45	98,12	245,30
2	100,62	251,55	100,14	250,35	97,94	244,85
3	99,92	249,80	99,84	249,60	98,38	245,95
4	99,90	249,75				
5	99,09	247,72				
6	99,30	248,25				
Média	99,38	248,45	99,39	248,47	98,15	245,37
CV%	1,10		0,97			

* Análises realizadas por analista diferente
CV% = coeficiente de variação percentual

A exatidão do método foi determinada tanto para comprimidos quanto para cápsulas de bezafibrato através da análise de três concentrações (80, 100 e 120%) com três réplicas cada. Este parâmetro foi avaliado em três dias diferentes, sendo que uma das análises foi realizada por analista diferente. Os resultados obtidos para comprimidos e cápsulas estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Os resultados das Tabelas 10 e 11 demonstram a exatidão do método que permaneceu entre 98 e 102% tanto para comprimidos quanto para cápsulas.

Os valores teóricos referentes aos limites de detecção e quantificação foram 0,23 e 0,71 µg/mL, respectivamente. Na prática, ambos os limites revelaram boa repetibilidade, com variação de 2,49% para detecção e 1,49% para quantificação. Assim, se inferido através do sinal do ruído, o LD deveria ser considerado ainda menor em relação ao valor teórico.

Tabela 10 – Valores experimentais referentes à exatidão de comprimidos de bezafibrato pelo método cromatográfico

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)	Teor de bezafibrato						Média (%)	CV%
	1º dia*		2º dia*		3º dia*			
	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)		
200	203,26	101,63	198,62	99,31	198,42	99,21	100,05	1,37
250	248,50	99,40	248,10	99,24	251,58	100,63	99,76	0,76
300	297,09	99,03	297,90	99,30	303,63	101,21	99,85	1,19
CV%	1,41		0,04		1,03			

* Valor correspondente a três réplicas de cada concentração

CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 11 – Valores experimentais referentes à exatidão de cápsulas de bezafibrato pelo método cromatográfico

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)	Teor de bezafibrato						Média (%)	CV%
	1º dia*		2º dia*		3º dia*			
	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)		
200	200,14	100,07	203,28	101,64	200,26	100,13	100,61	0,88
250	253,35	101,34	250,80	100,32	248,78	99,51	100,39	0,91
300	302,40	100,80	299,58	99,86	302,22	100,74	100,47	0,52
CV%	0,63		0,92		0,61			

* Valor correspondente a três réplicas de cada concentração

CV% = coeficiente de variação percentual

A robustez do método foi determinada e os resultados obtidos a partir de alterações nas condições cromatográficas estão descritos na Tabela 12. O método demonstrou ser robusto para praticamente todos os parâmetros avaliados, fazendo-se exceção ao fluxo da fase móvel que deve ser cuidadosamente observado uma vez que o procedimento sofreu alterações significativas durante a variação deste parâmetro.

Tabela 12 – Resultados experimentais obtidos a partir de alterações nas condições cromatográficas do método

Condições cromatográficas	Normal	Variação	Teor*	
			(%)	(µg/mL)
Coluna de octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Regis®	Supelco®	102,29	255,72
Fase móvel (tampão fosfato: acetonitrila: metanol, V/V/V)	50:40:10	48:42:10	98,61	246,52
		52:38:10	98,61	246,52
pH (tampão fosfato)	3,5	3,3	98,92	247,30
		3,7	100,06	250,15
Fluxo da fase móvel (mL/min)	1,0	0,9	110,55	276,38
		1,1	91,11	227,78
Comprimento de onda (nm)	230	228	99,24	248,10
		232	98,06	245,15

* Valor correspondente a três determinações

5.2 Espectrofotometria com detecção UV para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos

Assim como o método cromatográfico, a técnica espectrofotométrica validada revelou vantagens em relação ao procedimento descrito na literatura (KOMSTA & MISZTAL, 2004). O emprego de solvente aquoso (hidróxido de sódio 0,1 N) tornou o método financeiramente mais viável e ecologicamente menos prejudicial. Além disso, como o método da literatura encontrava-se descrito apenas em polonês, um artigo em inglês foi publicado em revista de circulação internacional com o desenvolvimento e a validação do método proposto e comparação deste com os resultados obtidos pela técnica utilizando HPLC (MELO et al., 2008).

Os espectros de absorção da SQR, da amostra simulada de excipientes dos comprimidos e das cápsulas traçados e apresentados na Figura 8, 9 e 10 revelam que o método não sofre interferência de nenhum excipiente no comprimento de onda de análise (230 nm), podendo ser utilizado para quantificação de bezafibrato em formulações farmacêuticas.

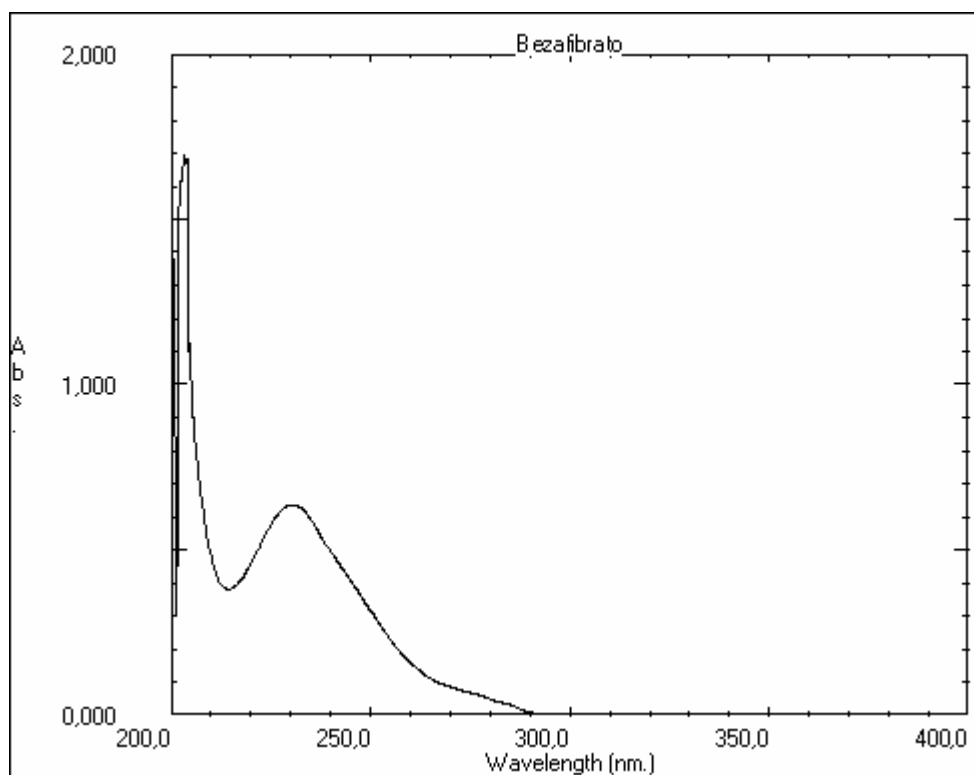


Figura 8 – Espectro de absorção característico da SQR de bezafibrato.

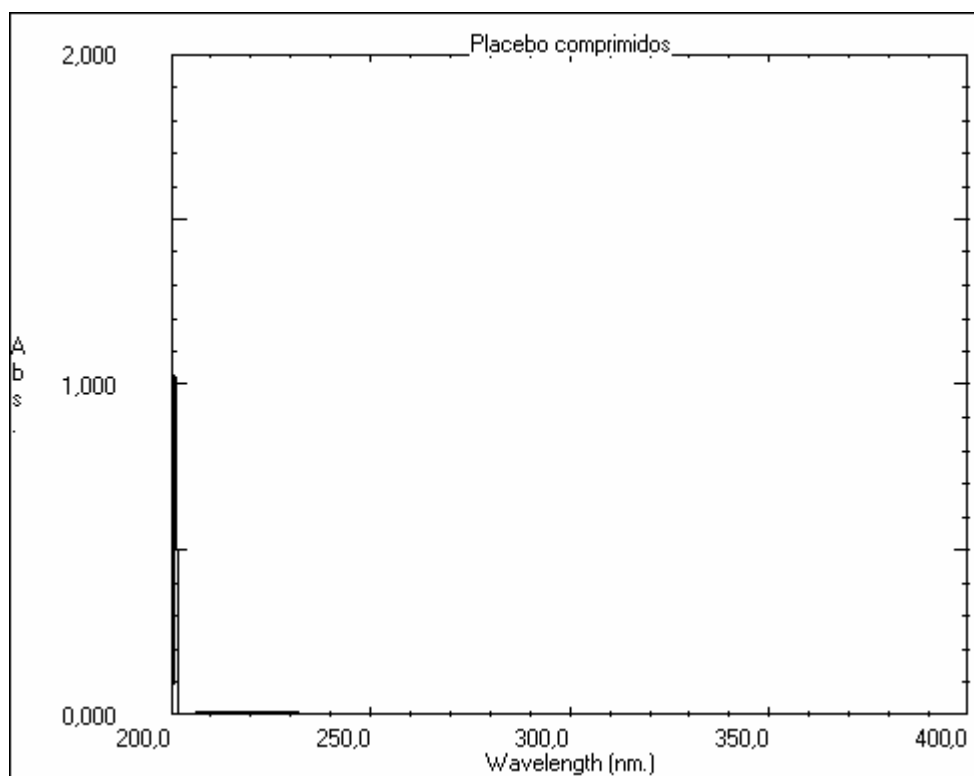


Figura 9 – Espectro de absorção referente à amostra simulada de excipientes dos comprimidos

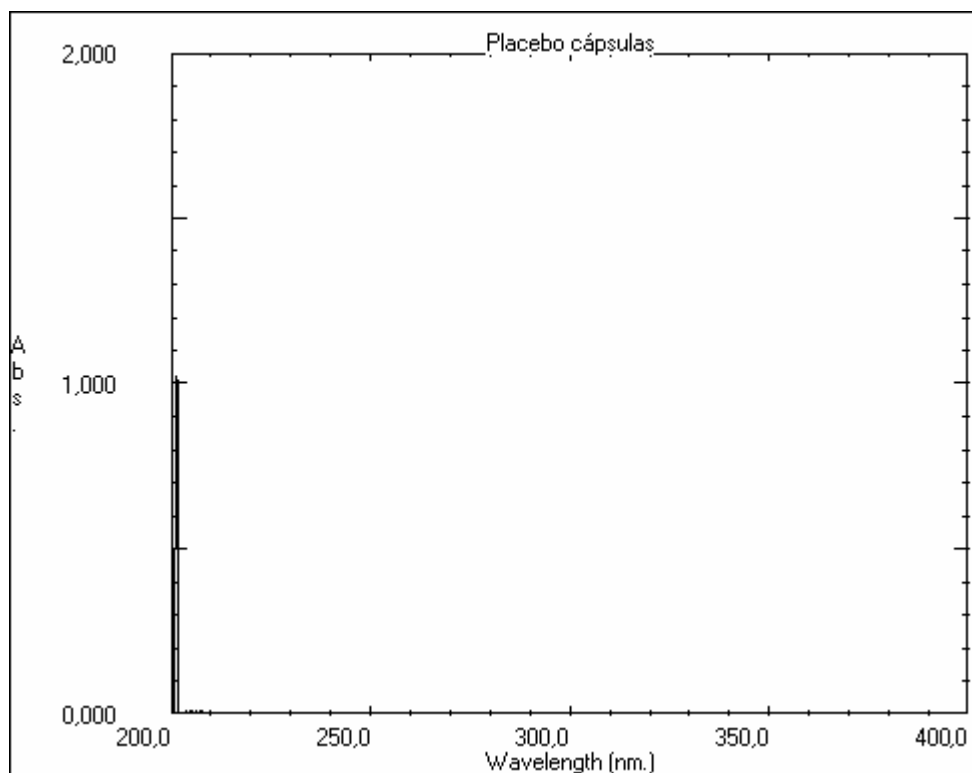


Figura 10 – Espectro de absorção referente à amostra simulada de excipientes das cápsulas manipuladas

A linearidade do método foi demonstrada pela preparação de curvas de calibração em três dias diferentes. Os valores obtidos utilizando metanol e hidróxido de sódio 0,1 N como solvente estão descritos nas Tabelas 13 e 14 respectivamente. As representações gráficas das curvas de calibração são apresentadas nas Figuras 11 e 12. Os resultados dos tratamentos estatísticos estão descritos nas Tabelas 15, 16 e 17.

Através da análise das Tabelas 13, 14, 15, 16, 17 e da visualização das Figuras 11 e 12 pode-se verificar que a variação entre os pontos da curva nos três diferentes dias foi inferior a 2% e o coeficiente de correlação (r) das curvas foi superior a 0,999, condições estas esperadas para a validação do método.

A análise de variância (ANOVA) descrita nas Tabelas 16 e 17 demonstra que não houve desvio da linearidade do método uma vez que o valor F calculado foi inferior ao coeficiente p tabelado para um nível de significância de 5%.

Tabela 13 – Valores de absorvâncias obtidas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando metanol como solvente

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias			Média	CV%
	1º dia	2º dia	3º dia		
2,5	0,135	0,140	0,137	0,137	1,83
5,0	0,289	0,290	0,282	0,287	1,52
7,5	0,437	0,434	0,430	0,434	0,81
10,0	0,588	0,579	0,584	0,584	0,77
12,5	0,729	0,709	0,720	0,719	1,39
15,0	0,880	0,865	0,864	0,870	1,03

CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 14 – Valores de absorvâncias obtidas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias			Média	CV%
	1º dia	2º dia	3º dia		
2,5	0,128	0,132	0,132	0,131	1,77
5,0	0,247	0,255	0,254	0,252	1,73
7,5	0,376	0,378	0,378	0,377	0,31
10,0	0,507	0,500	0,511	0,506	1,10
12,5	0,637	0,622	0,635	0,631	1,29
15,0	0,762	0,752	0,762	0,757	0,76

CV% = coeficiente de variação percentual

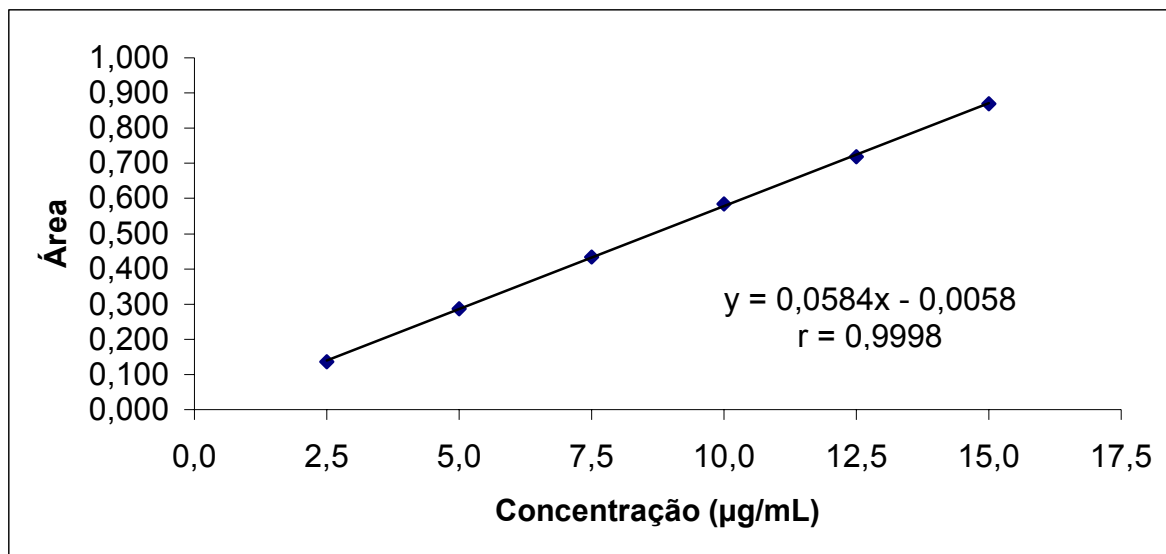


Figura 11 – Representação gráfica da curva de calibração de bezafibrato obtida por espectrofotometria utilizando metanol como solvente.

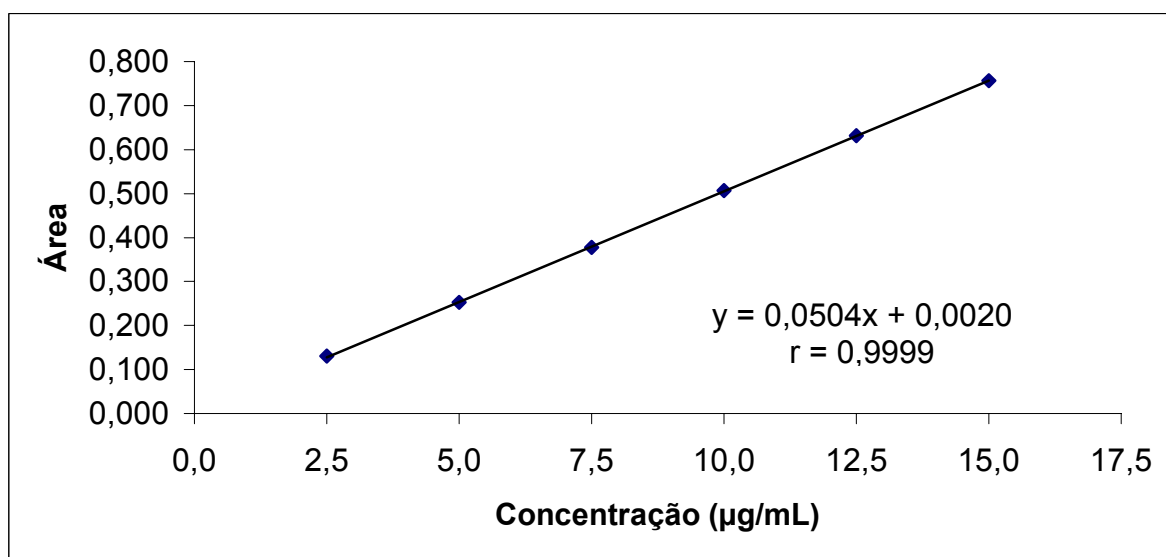


Figura 12 – Representação gráfica da curva de calibração de bezafibrato obtida por espectrofotometria utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente.

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade foi verificada por seis determinações das amostras na concentração de 10 µg/mL realizadas no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada pela análise de soluções com concentração de 10 µg/mL efetuadas em dias distintos e por diferentes analistas. Os valores obtidos para comprimidos e cápsulas de bezafibrato utilizando metanol e hidróxido de sódio 0,1 N como solventes estão descritos nas Tabelas 18, 19, 20 e 21.

Tabela 15 – Resultados da curva de calibração de bezafibrato para o ensaio por espectrofotometria, obtidos através do método dos mínimos quadrados

Parâmetros	Metanol	Hidróxido de sódio 0,1 N
Faixa de linearidade	2,5 – 15 µg/mL	2,5 – 15 µg/mL
Equação da reta: $y = ax + b$	$y = 0,0584x - 0,0058$	$y = 0,0504x + 0,0020$
Inclinação (a) \pm desvio padrão	$0,0584 \pm 0,0010$	$0,0504 \pm 0,0009$
Intercepto (b) \pm desvio padrão	$-0,0058 \pm 0,0052$	$0,0020 \pm 0,0067$
Coefficiente de correlação (r)	0,9998	0,9999

Tabela 16 – ANOVA das absorvâncias absolutas obtidas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método espectrofotométrico empregando metanol como solvente

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F*
Entre concentrações	5	1,118700	0,223740	5624,8 (3,10)
- regressão linear	1	1,118506	1,118506	28119 (4,75)
- desvio da linearidade	4	0,000195	0,000049	1,22 (3,26)
Resíduo	12	0,000477	0,00004	
Total	17	1,119178		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $p = 0,05$.
GL = Graus de liberdade / SQ = Soma dos quadrados

Tabela 17 – ANOVA das absorvâncias absolutas obtidas a partir de três curvas de calibração de bezafibrato pelo método espectrofotométrico empregando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F*
Entre concentrações	5	0,832285	0,166457	6388,5 (3,10)
- regressão linear	1	0,832223	0,832223	31940 (4,75)
- desvio da linearidade	4	0,000057	0,000014	0,55 (3,26)
Resíduo	12	0,000313	0,000026	
Total	17	0,832598		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $p = 0,05$.
GL = Graus de liberdade / SQ = Soma dos quadrados

Tabela 18 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em comprimidos de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando metanol como solvente

Amostras	Teor de bezafibrato					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)
1	99,13	9,91	98,97	9,90	98,97	9,90
2	99,22	9,92	101,16	10,12	98,89	9,89
3	100,24	10,02	99,31	9,93	99,48	9,95
4	100,15	10,01				
5	100,49	10,05				
6	100,07	10,07				
Média	99,88	9,99	99,81	9,98	99,11	9,91
CV%	0,57			0,87		

* Análises realizadas por analista diferente
CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 19 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em cápsulas de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando metanol como solvente

Amostras	Teor de bezafibrato					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)
1	99,58	9,96	99,90	9,90	100,82	10,08
2	99,50	9,95	101,33	10,13	99,90	9,99
3	99,08	9,91	100,15	10,02	100,57	10,06
4	99,25	9,92				
5	99,66	9,97				
6	98,91	9,89				
Média	99,33	9,93	100,46	10,04	100,43	10,04
CV%	0,30			0,57		

* Análises realizadas por analista diferente
CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 20 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em comprimidos de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente

Amostras	Teor de bezafibrato					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)
1	99,67	9,97	99,37	9,94	100,10	10,01
2	99,31	9,93	99,10	9,91	98,95	9,90
3	98,59	9,86	99,28	9,93	98,85	9,89
4	98,50	9,85				
5	98,59	9,86				
6	99,04	9,90				
Média	98,95	9,86	99,25	9,92	99,30	9,93
CV%	0,48		0,45			

* Análises realizadas por analista diferente
CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 21 – Valores experimentais referentes à determinação da precisão em cápsulas de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente

Amostras	Teor de bezafibrato					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)
1	100,63	10,06	99,95	9,99	99,01	9,90
2	99,82	9,98	98,32	9,83	98,74	9,87
3	99,82	9,98	99,04	9,90	97,48	9,75
4	98,46	9,85				
5	99,19	9,92				
6	99,01	9,90				
Média	99,49	9,95	99,10	9,91	98,41	9,84
CV%	0,76		0,83			

* Análises realizadas por analista diferente
CV% = coeficiente de variação percentual

A exatidão do método foi determinada tanto para comprimidos quanto para cápsulas de bezafibrato através da análise de três concentrações (80, 100 e 120%) com três réplicas cada. Este parâmetro foi avaliado em três dias diferentes, sendo que uma das análises foi realizada por analista diferente. Os resultados obtidos para comprimidos e cápsulas estão apresentados nas Tabelas 22, 23, 24 e 25.

O método apresentou adequada taxa de variação intra-dia (repetibilidade) e inter-dias (precisão intermediária) e apropriada exatidão para ambos os solventes utilizados (metanol e hidróxido de sódio 0,1 N).

Tabela 22 – Valores experimentais referentes à exatidão de comprimidos de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando metanol como solvente

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)	Teor de bezafibrato						Média (%)	CV%
	1º dia*		2º dia*		3º dia*			
	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)		
8	8,02	100,31	8,15	101,93	7,99	99,98	100,74	1,04
10	10,18	101,81	10,14	101,40	10,04	100,38	101,20	0,73
12	12,20	101,63	12,12	100,99	11,99	99,92	100,85	0,86
CV%	0,81		0,46		0,25			

* Valor correspondente a três réplicas de cada concentração
CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 23 – Valores experimentais referentes à exatidão de cápsulas de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando metanol como solvente

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)	Teor de bezafibrato						Média (%)	CV%
	1º dia*		2º dia*		3º dia*			
	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)		
8	8,19	102,42	8,18	102,28	8,10	101,21	101,97	0,65
10	10,13	101,28	10,14	101,37	10,09	100,99	101,21	0,20
12	12,14	101,13	12,07	100,57	12,12	101,03	100,91	0,30
CV%	0,69		0,84		0,12			

* Valor correspondente a três réplicas de cada concentração
CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 24 – Valores experimentais referentes à exatidão de comprimidos de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)	Teor de bezafibrato						Média (%)	CV%
	1º dia*		2º dia*		3º dia*			
	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)		
8	8,06	100,82	7,98	99,81	8,09	101,13	100,59	0,69
10	9,91	99,13	9,91	99,10	9,82	98,17	98,80	0,55
12	11,75	97,90	11,74	97,67	11,83	98,57	98,05	0,48
CV%	1,48		1,10		1,62			

* Valor correspondente a três réplicas de cada concentração

CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 25 – Valores experimentais referentes à exatidão de cápsulas de bezafibrato pelo método espectrofotométrico utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)	Teor de bezafibrato						Média (%)	CV%
	1º dia*		2º dia*		3º dia*			
	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)		
8	8,03	100,34	8,14	101,76	8,14	101,69	101,26	0,79
10	9,98	99,76	10,12	101,17	10,22	102,20	101,04	1,21
12	11,81	98,42	12,11	100,90	12,22	101,80	100,37	1,74
CV%	0,99		0,43		0,26			

* Valor correspondente a três réplicas de cada concentração

CV% = coeficiente de variação percentual

Os limites teóricos de detecção e quantificação do método utilizando metanol como solvente foram, respectivamente, 0,30 e 0,90 $\mu\text{g/mL}$. Na prática, a precisão do limite de quantificação permaneceu dentro do intervalo permitido, sendo encontrada uma variação de 1,49%. O método utilizando hidróxido de sódio 0,1 N como diluente teve 0,44 $\mu\text{g/mL}$ como limite teórico de detecção e 1,32 $\mu\text{g/mL}$ como limite de quantificação. A precisão determinada no ensaio prático do limite de quantificação para este diluente também permaneceu dentro da normalidade, ocorrendo uma variação de 1,79%.

A robustez do método espectrofotométrico foi determinada e os resultados provenientes das alterações realizadas no método podem ser visualizados na Tabela 26.

De acordo com a Tabela 26, o método não pode ser considerado robusto para a alteração da concentração do diluente hidróxido de sódio de 0,1 N para 0,01 N. Entretanto, considerando que o fármaco dissolve-se mais facilmente em meio alcalino, a redução da concentração de hidróxido de sódio pode simplesmente ter proporcionado o decréscimo da quantidade de bezafibrato diluída no meio. A modificação do fabricante do solvente metanol não alterou significativamente o método. A mudança do comprimento de onda não interferiu expressivamente no procedimento empregando ambos os solventes.

Tabela 26 – Resultados obtidos a partir de alterações nas condições experimentais do método espectrofotométrico

Condições experimentais	Normal	Variação	Teor*	
			(%)	($\mu\text{g/mL}$)
Metanol (fabricante)	Tedia [®]	J.T.Baker [®]	100,12	10,01
Comprimento de onda (nm) para metanol como solvente	230	228	98,32	9,83
		232	99,48	9,95
Hidróxido de sódio (N)	0,1	0,01	93,67	9,37
Comprimento de onda (nm) para hidróxido como solvente	230	228	101,85	10,18
		230	98,05	9,80

* Valor correspondente a três determinações

Tabela 27 – ANOVA de comparação dos resultados obtidos na determinação da precisão do método espectrofotométrico empregando metanol e hidróxido de sódio 0,1 N como solventes

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F*
Entre concentrações	1	0,468681	0,468681	1,038 (4,96)
Resíduo	10	4,515437	4,515437	
Total	11	4,984118		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $p = 0,05$.
GL = Graus de liberdade / SQ = Soma dos quadrados

Uma comparação entre resultados obtidos pelo método espectrofotométrico utilizando metanol e hidróxido de sódio 0,1 N como solventes foi realizada com a finalidade de verificar se existe alguma diferença significativa pelo emprego de determinado solvente. Os resultados da ANOVA estão apresentados na Tabela 27 e demonstram que não existe diferença entre os valores obtidos utilizando ambos solventes.

5.3 Comparação de métodos validados por cromatografia e espectrofotometria para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos

A análise de variação (ANOVA) referente à comparação entre os métodos cromatográfico e espectrofotométrico utilizando metanol e hidróxido de sódio como solventes está descrita na Tabela 28. Os resultados revelam que não há diferença significativa entre os métodos propostos uma vez que o valor F calculado foi inferior ao coeficiente F tabelado para um nível de significância de 5%.

Tabela 28 – ANOVA de comparação dos resultados obtidos na determinação da precisão dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico utilizando metanol e hidróxido de sódio 0,1 N como solventes

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F*
Entre concentrações	2	0,599299	0,299649	0,754 (3,68)
Resíduo	15	5,958571	0,397238	
Total	17	6,557870		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $p = 0,05$.
GL = Graus de liberdade / SQ = Soma dos quadrados

5.4 Controle de qualidade de produtos farmacêuticos contendo bezafibrato e aplicação do método para quantificação de formulações por cromatografia em fase reversa com detecção UV

A eficácia clínica de uma formulação farmacêutica não é atribuída somente à atividade intrínseca da substância ativa. Os componentes utilizados na preparação,

os processos de fabricação do produto e as características físicas e físico-químicas do fármaco podem afetar o comportamento do medicamento no organismo, gerando problemas de ineficácia, intoxicações e diferenças na biodisponibilidade do fármaco (ANSEL, POPOVICH & ALEN, 2004).

Quando comparadas com as demais formas farmacêuticas, as formulações sólidas de uso oral possuem uma tecnologia de preparação mais elaborada e, por isso, podem apresentar com maior frequência problemas relacionados à qualidade e, conseqüentemente, à biodisponibilidade e atividade terapêutica (ANSEL, POPOVICH & ALEN, 2004). No mercado brasileiro atual, alguns laboratórios farmacêuticos comercializam comprimidos contendo bezafibrato (Roche, EMS / Nature's Plus / Sigma Pharma). Além disso, diversas farmácias magistrais manipulam cápsulas contendo o fármaco como alternativa econômica mais acessível para o tratamento com o antilipêmico.

Considerando-se a importância do sucesso da terapia com medicamentos, torna-se imprescindível o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos. Assim, o método cromatográfico proposto no presente trabalho foi utilizado na quantificação de bezafibrato em dois tipos de formulações farmacêuticas existentes no mercado, sendo verificado o teor e a uniformidade de conteúdo bezafibrato. Adicionalmente, algumas análises gerais descritas na Farmacopéia Brasileira 4^a edição (1988) foram empregadas para avaliação do peso médio e desintegração de comprimidos e cápsulas, bem como resistência mecânica (dureza e friabilidade) de comprimidos.

As formulações testadas foram aprovadas com relação ao peso médio como pode ser observado na Tabela 29. Tanto para comprimidos quanto para cápsulas, os respectivos limites de $\pm 5\%$ e $\pm 7,5\%$ não foram ultrapassados por nenhuma das unidades.

A resistência mecânica dos comprimidos foi testada com relação à dureza e friabilidade. O resultado médio dos testes realizados está apresentado na Tabela 30. Os comprimidos revelaram resistência adequada uma vez que a dureza foi superior a 30 N (Newton) e a friabilidade inferior a 1,5%. Na Tabela 31, verifica-se que o tempo de desintegração permaneceu adequado para comprimidos e cápsulas, sendo inferior a 30 minutos em ambas as formulações.

Tabela 29 – Valores individuais (mg) obtidos na determinação do peso médio (PM) de comprimidos e cápsulas contendo bezafibrato

Unidades	Comprimidos	Cápsulas
1	310,5	378,6
2	307,9	356,6
3	304,5	374,3
4	309,5	369,5
5	309,6	367,6
6	306,0	362,1
7	311,0	353,2
8	307,4	373,0
9	315,2	377,7
10	307,8	357,7
11	314,3	357,0
12	317,4	364,9
13	312,7	368,9
14	308,6	372,0
15	311,7	357,3
16	313,0	369,5
17	314,4	359,2
18	313,1	368,5
19	306,5	355,9
20	309,5	351,6
PM ± CV%	310,5 ± 1,10%	364,8 ± 2,28%
Limite inferior	295,0 (-5%)	337,4 (-7,5%)
Limite superior	326,1 (+5%)	392,2 (+7,5%)

CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 30 – Valores médios obtidos na determinação da dureza e friabilidade de comprimidos de bezafibrato

Determinação	Resultado médio
Dureza*	74,03 N (Newton)
Friabilidade**	0,02%

* Valor médio obtido utilizando dez comprimidos

** Teste realizado simultaneamente com vinte unidades

Tabela 31 – Tempo de desintegração de comprimidos e cápsulas contendo 200 mg de bezafibrato

Produto	Tempo de Desintegração
Comprimidos	9 min e 25 s
Cápsulas	15 min e 31 s

Embora não existam parâmetros definidos por monografia para o bezafibrato, os resultados descritos na Tabela 32 revelam que o teor do fármaco quantificado nas formulações permaneceu dentro das porcentagens geralmente permitidas em monografias oficiais (95 – 105%).

Tabela 32 – Determinação do teor de bezafibrato em comprimidos e cápsulas pelo método cromatográfico em fase reversa com detecção UV

Produto	Teor médio de bezafibrato*	
	(mg)	(%)
Comprimidos	199,60	99,88
Cápsulas	200,32	100,16

* Valor correspondente a três determinações

A avaliação da uniformidade de conteúdo dos comprimidos e cápsulas foi realizada pelo método da variação de peso e o teor de cada unidade pode ser analisado na Tabela 33.

Tabela 33 – Teor de bezafibrato em comprimidos e cápsulas obtido na determinação da uniformidade de conteúdo pelo método de variação de peso

Unidades	Comprimidos		Cápsulas	
	Peso (mg)	Teor (%)*	Peso (mg)	Teor (%)*
1	310,5	100,38	277,0	103,23
2	307,9	99,54	261,5	97,45
3	304,5	98,44	274,7	102,34
4	309,5	100,06	269,8	100,52
5	309,6	100,09	268,6	100,08
6	306,0	98,93	265,4	98,91
7	311,0	100,55	259,8	96,82
8	307,4	99,38	271,3	101,11
9	315,2	101,90	274,9	102,42
10	307,8	99,51	264,9	98,72
Média	308,94	99,88	268,8	100,16

* Teor individual = (Peso individual / Peso médio) x Teor médio

5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção UV para avaliação de bezafibrato em matrizes biológicas

A Figura 13 apresenta o cromatograma referente à análise de bezafibrato em plasma humano através do método proposto por HPLC. Os tempos de retenção do fármaco (bezafibrato) e padrão interno (ezetimibe) foram, respectivamente, 5,2 e 7,4 minutos. A simetria e a resolução entre os picos cromatográficos revelaram-se apropriadas para a quantificação de bezafibrato em fluidos biológicos. Os parâmetros cromatográficos avaliados através do teste de adequabilidade do sistema (*System Suitability Test*) permaneceram dentro dos limites aceitáveis e podem ser visualizados na Tabela 34.

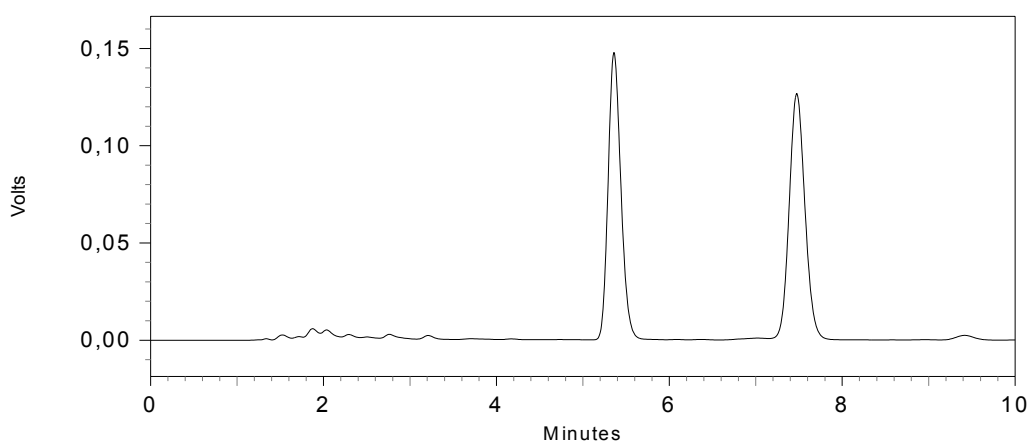


Figura 13 – Cromatograma obtido a partir da extração líquido-líquido de plasma humano contendo 20 $\mu\text{g/mL}$ de bezafibrato e 10 $\mu\text{g/mL}$ de ezetimibe adicionado como padrão interno. Condições cromatográficas: Coluna Rexchrom[®] Regis[®] C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 μm); Fase móvel: tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 M, pH 3,5: acetonitrila: metanol (50: 40: 10, V/V/V); Fluxo: 1 mL/min; Detecção: 230 nm.

Tabela 34 – Parâmetros obtidos a partir do *System Suitability Test* para o método cromatográfico desenvolvido para análise de bezafibrato em fluidos biológicos

Substância	Parâmetro	Média*	Permitido**	CV%
Bezafibrato	Simetria	1,17	<2,0	0,113
	Pratos teóricos	6565,49	>2000	0,963
	Tempo de retenção	5,311	---	0,034
	Fator de capacidade	2,54	---	0,048
Ezetimibe	Resolução	1,22	>1,0	1,037
	Simetria	1,10	<2,0	0,362
	Pratos teóricos	8229,74	>2000	0,693
	Tempo de retenção	7,367	---	0,040
	Fator de capacidade	3,91	---	0,050

* Valor correspondente a cinco determinações de cada concentração

** De acordo com a Farmacopéia Americana (USP, 2006)

Uma das principais vantagens em relação ao método descrito na literatura (MASNATTA et al., 1996) é que o procedimento desenvolvido e validado possui as mesmas condições cromatográficas do método para formulações farmacêuticas (MELO et al., 2008). Assim, a técnica proposta é capaz de analisar bezafibrato em

comprimidos, cápsulas magistrais e plasma humano. Outros benefícios relevantes são a simplificação da técnica de extração de bezafibrato a partir da matriz biológica, a redução do limite de quantificação (de 0,14 para 0,05 $\mu\text{g/mL}$) e a aplicação do método na análise do fármaco em seis voluntários sadios.

A especificidade do método foi demonstrada através da análise de plasma branco, lipêmico e hemolisado. Em nenhum dos casos, as amostras apresentaram interferentes significativos nos tempos de retenção do analito ou padrão interno. A Figura 14 representa o cromatograma de análise de uma amostra de plasma branco.

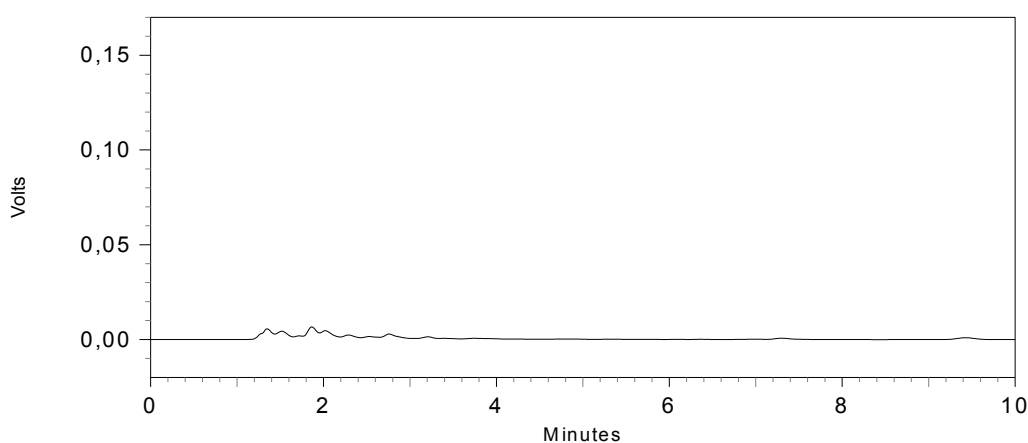


Figura 14 – Cromatograma obtido a partir da extração líquido-líquido de plasma humano branco. Condições cromatográficas: Coluna Rexchrom[®] Regis[®] C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 μm); Fase móvel: tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 M, pH 3,5: acetonitrila: metanol (50: 40: 10, V/V/V); Fluxo: 1 mL/min; Detecção: 230 nm.

A linearidade do método analítico foi demonstrada pela preparação da curva de calibração em triplicata. Os valores obtidos individualmente estão descritos na Tabela 35, a representação gráfica da curva é apresentada na Figura 15 e os resultados dos tratamentos estatísticos estão descritos nas Tabelas 36 e 37.

Tabela 35 – Razão das áreas de bezafibrato e ezetimibe obtidas na determinação da linearidade pelo método cromatográfico

Concentração (µg/mL)	Razão das áreas			Média	CV%
	1ª curva	2ª curva	3ª curva		
0,2	0,0150	0,0146	0,0150	0,0149	1,54
0,5	0,0493	0,0502	0,0435	0,0479	7,62
1	0,0721	0,0756	0,0686	0,0721	4,89
10	0,6187	0,6318	0,6733	0,6412	4,44
25	1,7782	1,6385	1,8747	1,7638	6,73
50	3,6299	3,6148	3,7458	3,6635	1,96

CV% = coeficiente de variação percentual

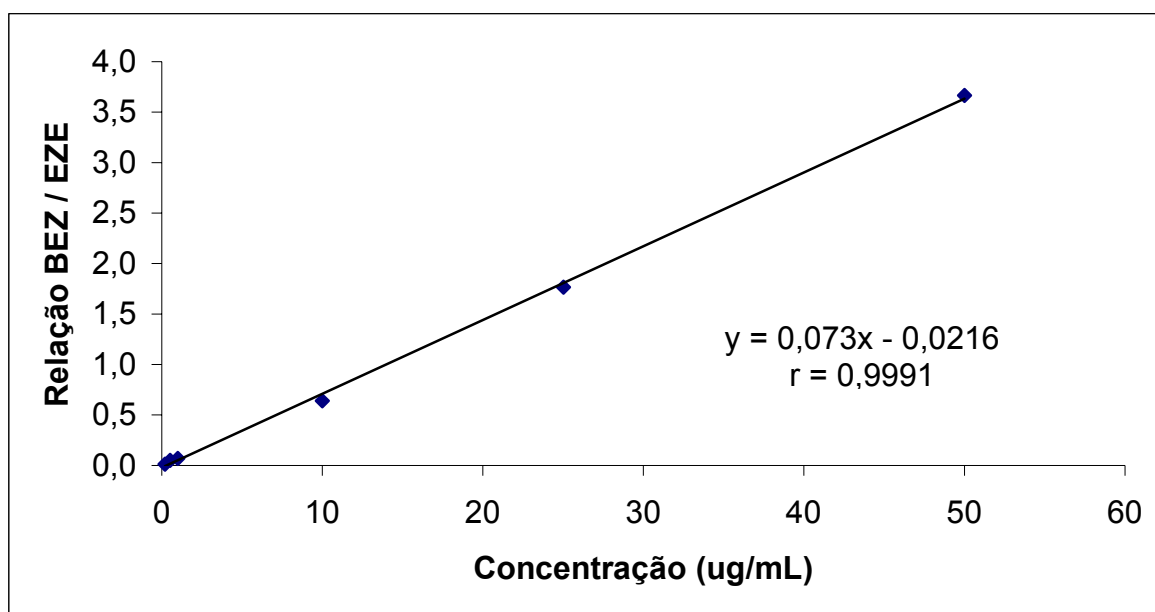


Figura 15 – Representação gráfica da curva de calibração obtida pelo método cromatográfico validado para avaliação de bezafibrato em fluidos biológicos.

As Tabelas 35 e 36 e a Figura 15 revelam que a variação entre os pontos da curva nos três diferentes dias foi inferior a 15% e o coeficiente de correlação (r) das curvas foi superior a 0,98, condições estas esperadas para a validação do método.

A análise de variância (ANOVA) descrita na Tabela 37 demonstra que não houve desvio da linearidade do método uma vez que o valor F calculado foi inferior ao coeficiente F tabelado para um nível de significância de 5%.

Tabela 36 – Resultados da curva de calibração de bezafibrato para o ensaio por HPLC para plasma humano, obtidos através do método dos mínimos quadrados

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	0,2 – 50 µg/mL
Equação da reta: $y = ax + b$	$y = 0,073x - 0,0216$
Inclinação (a) \pm desvio padrão	$0,073 \pm 0,002$
Intercepto (b) \pm desvio padrão	$0,0216 \pm 0,007$
Coefficiente de correlação (r)	0,9991

Tabela 37 – ANOVA da razão das áreas de bezafibrato e ezetimibe referente à determinação da linearidade no método cromatográfico desenvolvido para análise de bezafibrato em plasma humano

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F*
Entre concentrações	5	31,61372	6,32274	1889,2 (3,10)
- regressão linear	1	31,58585	31,58585	9437,8 (4,75)
- desvio da linearidade	4	0,02787	0,00697	2,082 (3,26)
Resíduo	12	0,04002	0,00335	
Total	17	31,65388		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $p = 0,05$.
GL = Graus de liberdade / SQ = Soma dos quadrados

Tanto a precisão quanto a exatidão do método foram determinadas através da análise de três concentrações (baixa, média e alta) com cinco réplicas cada. Este parâmetro foi avaliado em três dias diferentes, sendo que uma das análises foi realizada por analista diferente. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 38, 39 e 40.

Através da análise das Tabelas 38, 39 e 40, o método pode ser considerado preciso uma vez que a variação obtida na determinação da precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dias (precisão intermediária) não ultrapassou o limite máximo de 15%. Os resultados destas tabelas também demonstram a exatidão do método que permaneceu entre 85 e 115% em todas as concentrações de bezafibrato.

Tabela 38 – Valores experimentais obtidos na determinação da precisão e exatidão da amostra de controle de qualidade de concentração baixa (CQB) pelo método cromatográfico para avaliação de bezafibrato em matrizes biológicas

Teor de bezafibrato - CQB						
Amostras	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)
1	0,289	115,70	0,279	111,68	0,256	102,40
2	0,256	102,50	0,234	93,45	0,267	106,72
3	0,255	101,85	0,243	97,11	0,275	110,14
4	0,246	98,49	0,246	98,29	0,266	106,55
5	0,237	94,65	0,257	102,78	0,286	114,37
Média	0,257	102,64	0,252	100,66	0,270	108,04
CV% (intra)	4,15		7,74		5,43	
CV% (inter)	6,69					

* Análises realizadas por analista diferente
CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 39 – Valores experimentais obtidos na determinação da precisão e exatidão da amostra de controle de qualidade de concentração média (CQM) pelo método cromatográfico para avaliação de bezafibrato em matrizes biológicas

Teor de bezafibrato - CQM						
Amostras	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)
1	19,49	97,43	19,81	99,04	18,61	93,07
2	21,00	105,01	19,27	96,33	19,55	97,77
3	19,86	99,32	19,94	99,72	21,64	108,18
4	18,15	90,77	20,10	100,50	21,71	108,57
5	18,51	92,56	21,00	105,01	20,74	103,68
Média	19,40	97,02	20,02	100,12	20,45	102,25
CV% (intra)	6,68		5,76		3,11	
CV% (inter)	5,48					

* Análises realizadas por analista diferente
CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 40 – Valores experimentais obtidos na determinação da precisão e exatidão da amostra de controle de qualidade de concentração alta (CQA) pelo método cromatográfico para avaliação de bezafibrato em matrizes biológicas

Amostras	Teor de bezafibrato - CQA					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)
1	40,74	101,86	45,11	112,77	39,66	99,15
2	46,52	116,30	42,37	105,93	45,21	113,03
3	40,26	100,65	42,78	106,94	44,02	110,06
4	41,96	104,89	39,96	99,89	42,42	106,04
5	45,76	114,39	41,54	103,85	42,67	106,67
Média	43,05	107,62	42,35	105,88	42,80	106,99
CV% (intra)	4,90		6,70		4,42	
CV% (inter)	5,10					

* Análises realizadas por analista diferente
CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 41 – Resultados obtidos na análise da recuperação do método por HPLC proposto para a determinação de bezafibrato em plasma humano

Ensaio	Teor de bezafibrato recuperado					
	CQB		CQM		CQA	
	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)
1º dia	0,207	82,62	15,03	75,13	32,43	81,08
2º dia	0,225	90,16	15,62	78,08	35,81	89,52
3º dia	0,190	75,91	15,66	78,32	33,47	83,68
Média	0,207	82,90	15,44	77,18	33,90	84,76
CV%	8,60		2,30		5,10	

CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 42 – Resumo da estabilidade de bezafibrato em plasma humano

Estabilidade	Concentração da amostra (µg/mL) ^a		CV (%)	Bias ^b (%)
	Fresca	Em teste		
Ciclos de congelamento e descongelamento	0,28	0,24	4,33	-14,29
	21,20	19,66	4,16	-7,26
	40,82	43,66	6,29	6,96
Pós-processamento (6 horas)	0,28	0,29	6,79	3,57
	21,20	20,95	10,07	-1,18
	40,82	37,00	7,83	-9,36
Solução padrão (6 horas)	0,28	0,25	8,45	-10,35
	21,20	18,17	9,44	-14,25
	40,82	38,68	9,99	-5,24
Curta duração (4 horas)	0,28	0,27	6,15	-3,57
	21,20	21,38	1,69	0,85
	40,82	43,99	7,13	7,77
Longa duração (3 meses)	0,28	0,27	5,94	-3,57
	21,20	20,51	8,09	-3,25
	40,82	43,64	1,30	6,91

^a Média de três determinações

^b Bias = (concentração da amostra em teste – concentração da amostra fresca / concentração da amostra fresca) x 100

O ensaio de recuperação do fármaco a partir do plasma humano foi realizado em três dias diferentes e os resultados na análise estão descritos na Tabela 41. A recuperação de bezafibrato foi superior a 75,13% e inferior a 90,16%, tendo como média 81,61% de recuperação.

O comportamento e a estabilidade do bezafibrato em solução e plasma encontram-se na Tabela 42. A análise desta tabela revela que as amostras permaneceram estáveis durante os ciclos de congelamento e descongelamento, no período que antecede a análise quando expostas à temperatura ambiente por 4 horas, depois do processamento na estante do equipamento por 6 horas e durante 3 meses congeladas à temperatura de -20°C. A confirmação da estabilidade do

fármaco nestas condições deve-se à permanência da concentração das amostras testadas em $\pm 15\%$ da concentração de amostras recém-preparadas.

5.6 Estudo da biodisponibilidade de comprimidos contendo bezafibrato e aplicação do método para análise de matrizes biológicas por cromatografia em fase reversa com detecção UV

A biodisponibilidade de um medicamento significa a razão ou a extensão em que o fármaco é liberado da formulação farmacêutica para a circulação sistêmica e torna-se disponível para o sítio de ação. Geralmente, realiza-se uma distinção entre biodisponibilidade absoluta e relativa. Considera-se que produtos de administração intravenosa, aplicados diretamente na circulação sanguínea, tornam-se totalmente disponíveis para ação sistêmica (biodisponibilidade absoluta). As formulações orais, entretanto, tornam-se parcialmente disponíveis, pois precisam primeiramente sofrer absorção para passarem à circulação e exercerem a ação farmacológica esperada (biodisponibilidade relativa).

A importância da análise da biodisponibilidade deve-se à necessidade de verificar a concentração alcançada por um fármaco na circulação sanguínea para o registro de um medicamento genérico. O medicamento genérico, descrito na Lei 9.787, de 10 de fevereiro de 1999 (BRASIL, 1999), é assim definido: “medicamento similar a um produto referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela denominação comum brasileira (DCB) ou, na sua ausência, pela denominação comum internacional (DCI)”. A comprovação da eficácia e qualidade, neste caso, é realizada através de um teste de bioequivalência, verificando se as biodisponibilidades dos dois medicamentos administrados na mesma dose molar não apresentam diferenças significativas (FDA, 2001; ANVISA, 2003; ANVISA, 2006)

As pesquisas envolvendo humanos precisam ser avaliadas por um comitê que analisa as questões relacionadas à ética antes da execução do trabalho. O estudo foi realizado conforme a Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996 (CNS, 1996), que estabelece os requisitos para realização de pesquisa clínica de produtos para

saúde utilizando seres humanos. É importante destacar que a resolução utilizada está fundamentada nos principais documentos internacionais sobre pesquisas em humanos (Declaração de Helsinque).

Os voluntários que participaram da pesquisa foram três do sexo masculino e três do sexo feminino com idade média de $26,5 \pm 8,3$ anos.

O comportamento individual dos voluntários pode ser observado nas Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21, enquanto que o comportamento médio pode ser visualizado na Figura 22. Os parâmetros farmacocinéticos avaliados estão sumarizados na Tabela 43.

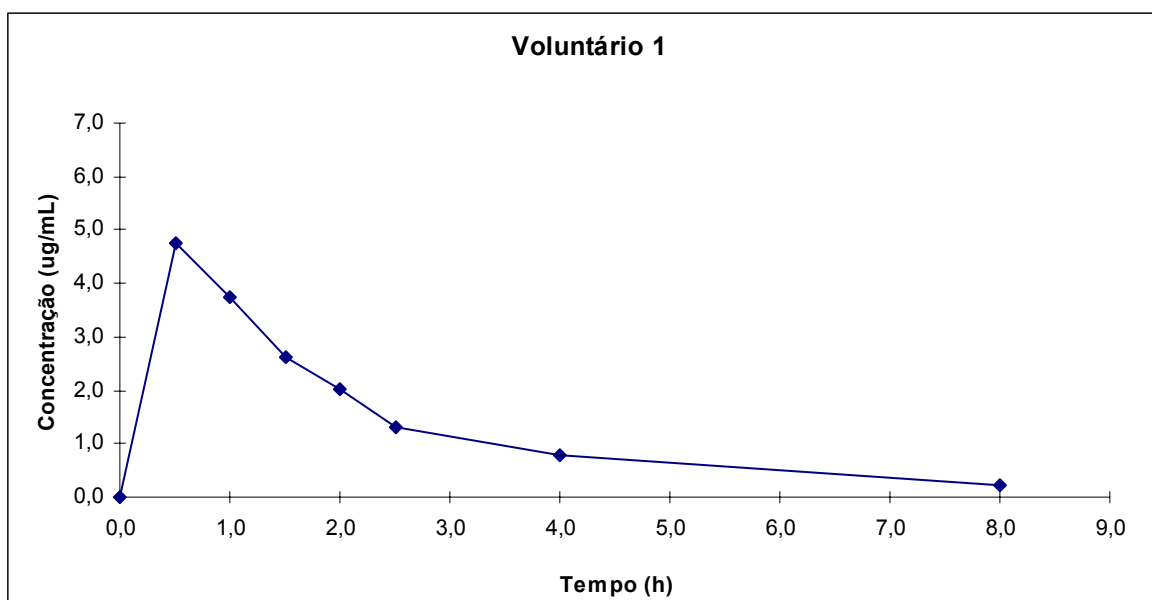


Figura 16 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 1 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg.

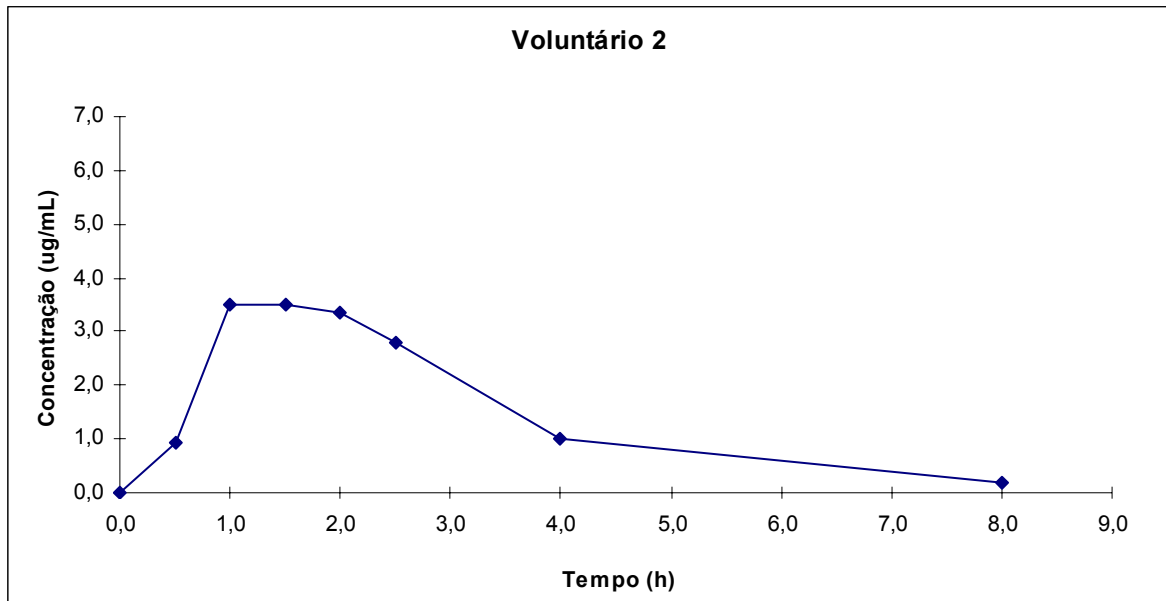


Figura 17 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 2 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg.

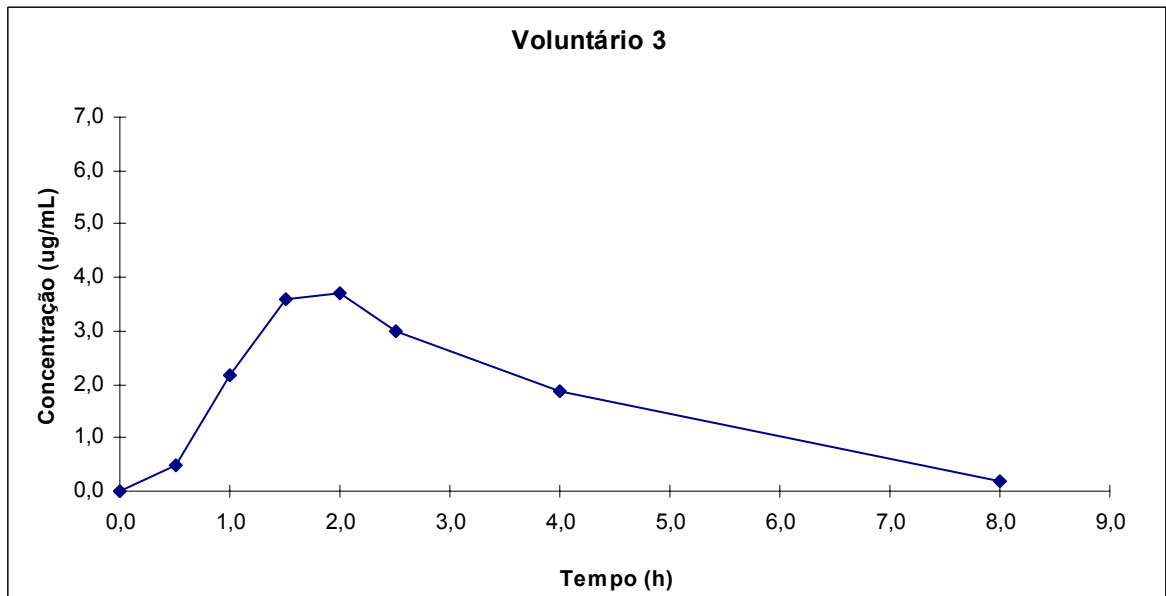


Figura 18 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 3 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg.

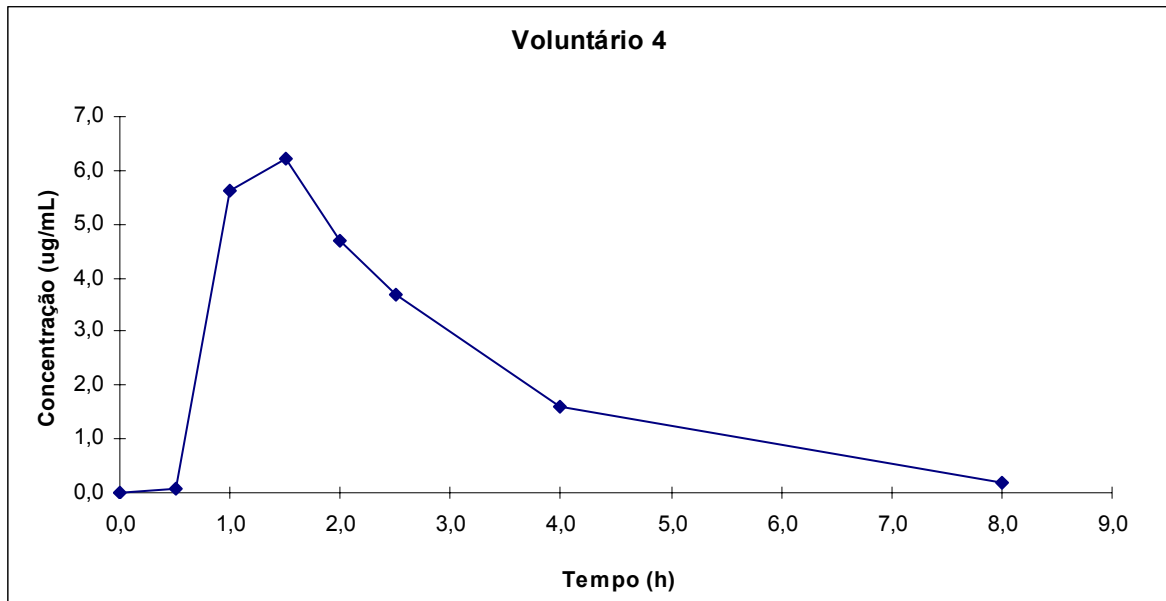


Figura 19 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 4 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg.

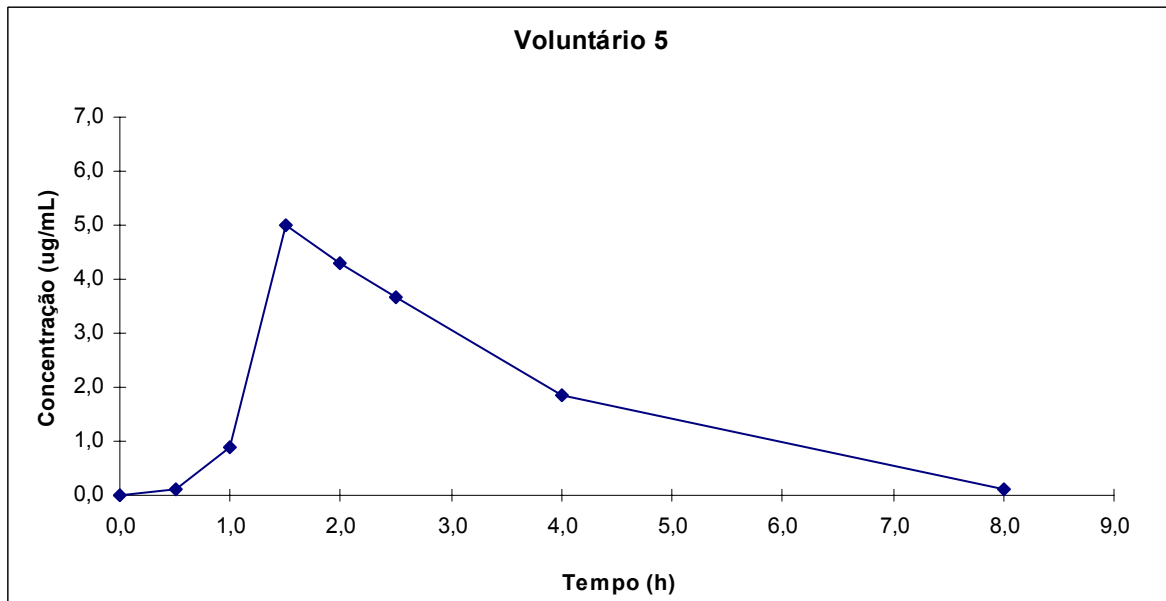


Figura 20 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 5 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg.

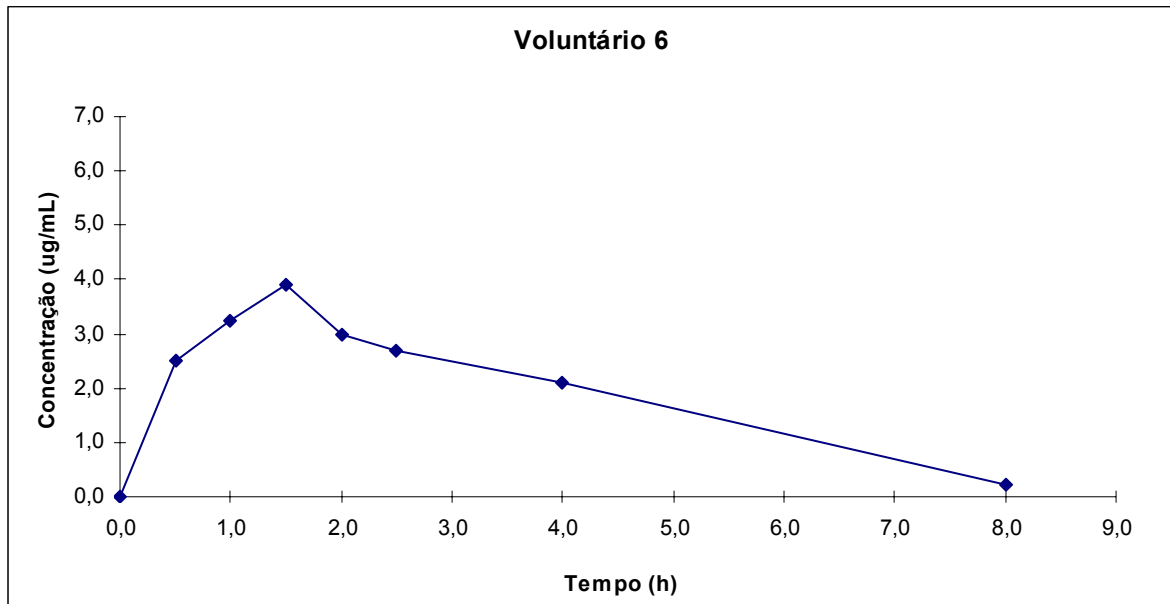


Figura 21 – Representação da curva da concentração plasmática de bezafibrato do voluntário 6 após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg.

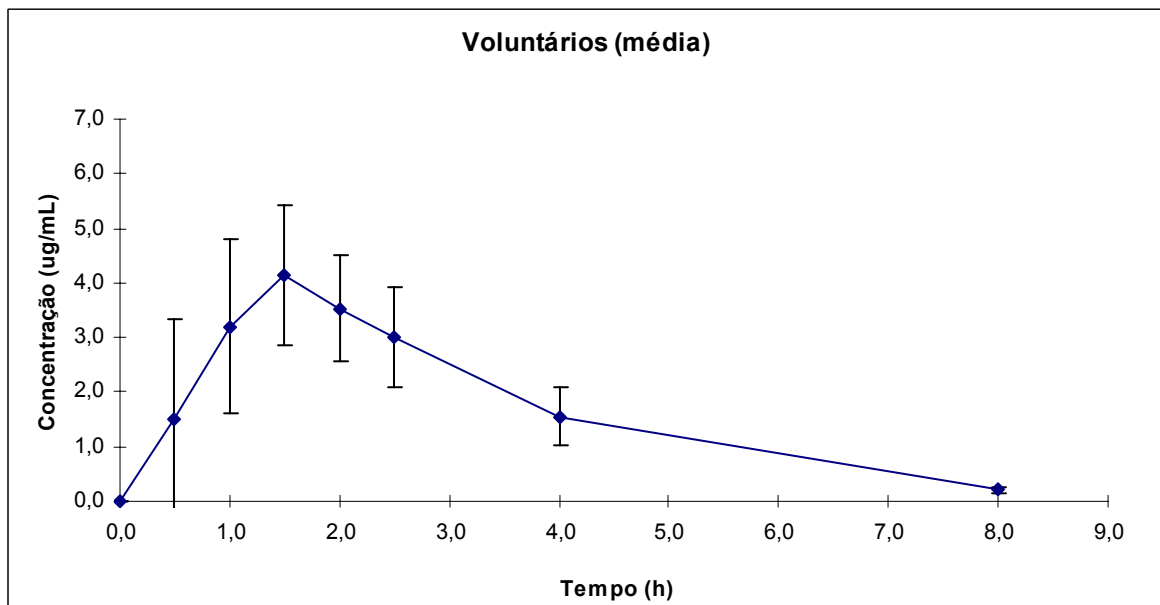


Figura 22 – Representação gráfica da curva da concentração média plasmática de bezafibrato obtida a partir de seis voluntários após administração de comprimido do fármaco contendo 200 mg.

As amostras dos voluntários foram analisadas em dois dias diferentes e a validade dos ensaios foi verificada pela análise de uma curva de calibração e pela avaliação de amostras de controle de qualidade. As curvas revelaram linearidade

adequada (coeficientes de correlação iguais a 0,9953 e 0,9992) e as amostras de controle de qualidade apresentaram precisão e exatidão apropriadas (variação entre 2,49 e 10,48%, exatidão entre 85,59 e 102,83%).

Tabela 43 – Dados farmacocinéticos obtidos a partir de seis voluntários depois da administração de dose oral de comprimido de bezafibrato contendo 200 mg

Voluntário	Parâmetros farmacocinéticos					
	AUC _{0-t}	AUC _{0-∞}	C _{máx}	t _{máx}	k _{el}	t _{1/2}
1	10,49	11,44	4,74	0,5	0,32	2,14
2	11,52	13,16	3,50	1	0,44	1,43
3	13,52	16,55	3,71	2	0,51	1,36
4	16,79	19,60	6,21	1,5	0,54	1,28
5	14,16	17,84	5,02	1,5	0,65	1,07
6	16,08	19,50	3,92	1,5	0,51	1,37
Média	13,76	16,35	4,51	1,33	0,50	1,44
CV%	17,94	20,65	22,61	38,73	20,83	25,20

CV% = coeficiente de variação percentual

Alguns dos parâmetros descritos na Tabela 41 (t_{máx}, k_{el} e t_{1/2}) podem ser considerados semelhantes aos relatados anteriormente na literatura (ALI et al., 2002). No entanto, os resultados de parâmetros como AUC e C_{máx} são bastante diferentes quando comparados com os descritos pelos pesquisadores (ALI et al., 2002). A diferença observada nestes parâmetros provavelmente está relacionada ao emprego de formulações farmacêuticas produzidas por indústrias e países diferentes nos testes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método cromatográfico em fase reversa com detecção UV foi desenvolvido e validado para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos (comprimidos e cápsulas magistrais), revelando especificidade, linearidade, precisão e exatidão. Quando comparado ao procedimento já validado e descrito na literatura (MISZTAL & KOMSTA, 2005), o método possui como vantagens as condições cromatográficas empregadas (especialmente, a fase móvel), a ampliação do intervalo de linearidade (permitindo a utilização para análise do perfil de dissolução das formulações) e a avaliação da especificidade através do estudo da degradação forçada da SQR (possibilitando que a técnica seja considerada indicativa da estabilidade).

O procedimento por espectrofotometria foi desenvolvido e validado utilizando tanto solvente orgânico (metanol) quanto diluente aquoso (hidróxido de sódio 0,1 N). A comparação dos resultados com ambos solventes foi realizada por ANOVA, comprovando que não existem diferenças significativas entre os solventes orgânico e aquoso. O método espectrofotométrico demonstrou ser específico, linear, preciso e exato. O procedimento validado e relatado na literatura (KOMSTA & MISZTAL, 2004) apresenta a técnica de espectrofotometria derivada no UV e encontra-se disponível apenas em polonês, não sendo possível sua completa compreensão e difusão pela comunidade científica em geral. As principais vantagens do método espectrofotométrico desenvolvido são a utilização de diluente aquoso (mais viável economicamente) e a publicação de um artigo em idioma universal em periódico de circulação internacional (MELO et al., 2008).

Os dois métodos analíticos (cromatografia e espectrofotometria) validados também foram comparados por ANOVA e os resultados obtidos confirmaram que não existem diferenças significativas entre os procedimentos para um nível de significância de 5%.

A cromatografia em fase reversa com detecção UV foi selecionada como método de avaliação para controle de qualidade de comprimidos e de cápsulas magistrais contendo bezafibrato. O teor de bezafibrato e a uniformidade de conteúdo das formulações, avaliados através do método por HPLC, permaneceram dentro da faixa permitida. As demais avaliações, realizadas de acordo com a Farmacopéia

Brasileira 4ª edição (1988), revelaram que ambos os produtos farmacêuticos estão dentro dos limites aceitáveis de qualidade.

Além das técnicas analíticas, um método bioanalítico foi desenvolvido e validado para determinação de bezafibrato em plasma humano. Os parâmetros avaliados confirmaram que o procedimento apresenta especificidade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade adequadas. As principais vantagens em relação à técnica descrita na literatura (MASNATTA et al., 1996) são o procedimento de extração empregado (execução mais prática, que facilita aplicação em estudos de bioequivalência), a redução do limite de quantificação e a aplicação do método em voluntários sadios.

As condições cromatográficas estabelecidas, como coluna, fase móvel, vazão e comprimento de onda foram intencionalmente mantidas idênticas tanto no método para avaliação de bezafibrato em formulações quanto para determinação do fármaco em matrizes biológicas. Assim, foi desenvolvido um método cromatográfico capaz de analisar bezafibrato em comprimidos, cápsulas manipuladas e plasma humano.

O estudo da biodisponibilidade de comprimidos de bezafibrato utilizando seis voluntários sadios foi realizado, aplicando-se o método bioanalítico desenvolvido e validado. No estudo, foram determinados os parâmetros farmacocinéticos, como a extensão da absorção (AUC), concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$), tempo máximo ($t_{m\acute{a}x}$) para que esta concentração seja atingida, constante de eliminação (k_{el}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$).

Em síntese, foram alcançados com sucesso os objetivos gerais e específicos estabelecidos na presente dissertação uma vez que todos métodos, comparações e aplicações que estavam inicialmente planejados foram realizados com êxito. Assim, procedimentos para determinação de bezafibrato em produtos farmacêuticos e matrizes biológicas por cromatografia e espectrofotometria foram desenvolvidos e validados, sendo estes métodos comparados e aplicados no controle de qualidade de formulações e na avaliação da biodisponibilidade de comprimidos de fármaco utilizando voluntários sadios.

7 CONCLUSÃO

- O método por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC) com detecção UV foi desenvolvido e validado para determinação quantitativa de bezafibrato em comprimidos e cápsulas.
- O método por espectrofotometria com detecção UV foi desenvolvido e validado para determinação quantitativa de bezafibrato em comprimidos e cápsulas.
- Os métodos cromatográfico e espectrofotométrico validados para avaliação de bezafibrato em produtos farmacêuticos foram comparados estatisticamente e não apresentaram diferenças significativas.
- O método por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção UV utilizando extração líquido-líquido foi desenvolvido e validado para quantificação de bezafibrato em matrizes biológicas (plasma).
- O procedimento por HPLC foi aplicado com sucesso para determinação do teor e uniformidade de conteúdo de formulações farmacêuticas contendo bezafibrato, bem como os ensaios físico-químicos descritos na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988) foram empregados satisfatoriamente para análise de parâmetros como peso médio, dureza, friabilidade e desintegração de comprimidos e cápsulas do fármaco.
- O procedimento por HPLC com extração líquido-líquido foi aplicado com sucesso na avaliação plasmática de bezafibrato em seis voluntários sadios e foram avaliados parâmetros farmacocinéticos como $C_{máx}$, $t_{máx}$, AUC, k_{el} e $t_{1/2}$ do fármaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, O.; KHAN, M.A.; OBAID, R.; AHMED, S.W. Bioavailability study of tablet bezafibrate 200 mg (Lipocor). **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 35-42, 2002.

ALSHEIKH-ALI, A.A.; KUVIN, J.T.; KARAS, R.H. Risk of adverse events with fibrates. **American Journal of Cardiology**, v. 94, p. 935-938, 2004.

ANCHISI, C.; FADDA, A.M.; MACCIONI, A.M.; DESSI, S. Determination of bezafibrate concentration by high performance liquid-chromatography in serum of rats treated with lead nitrate. **Il Fármaco**, v. 53, p. 690-692, 1998.

ANSEL, H.C; POPOVICH, N.G.; ALEN, L.V. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 8th edition. Philadelphia: LWW, 2004.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 2 jun. 2003. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=bioanal%c3%aditicos>> Acesso em: 7 set. 2007.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RE n. 1170, de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do "Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos". **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 24 abr. 2006. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21746&word=bioanal%c3%aditicos>> Acesso em: 7 set. 2007.

ASSMANN, G.; CULLEN, P.; JOSSA, F.; LEWIS, B.; MANCINI, B. Coronary heart disease: Reducing the risk: The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, p. 1819-1824, 1999.

BERLINER, J. A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. M.; FRANK, J. S.; DEMER, L. L.; EDWARDS, P. A.; WATSON, A. D.; LUSIS, A. J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. **Circulation**, v. 91, p. 2488-2496, 1995.

BRASIL. Lei n. 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 11 fev. 1999. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16622&word=>> Acesso em: 15 jul. 2007.

CADORNIGA, R.; HERNANEZ, M.T.; NEGRO, S.; BURGOS, M.L.; MOLINA, I.T. Dissolution kinetics of bezafibrate in two solid forms for oral administration. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 3, p. 371-378, 1991.

CANUDAS, N.; VARGAS, F.; MIRANDA, M.A. Photodegradation of bezafibrate in aqueous media. Studies of its in vitro phototoxicity. **Arzneimittelforschung**, v. 46, 694-697, 1996.

CASTOLDI, D.; MONZANI, V.; TOFANETTI, O. Determination of bezafibrate in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 344, p. 259-265, 1985.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHAPMAN, M.J.; BRUCKERT, E. The atherogenic role of triglycerides and small, dense low density lipoproteins: impact of ciprofibrate therapy. **Atherosclerosis**, v. 124 (suppl), S21-S28, 1996.

CHAPMAN, M.J.; ASSMANN, G.; FRUCHART, J.C.; SHEPHERD, J.; SIRTORI, C. Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid – a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. **Current Medical Research and Opinion**, v. 20, p. 1253-1268, 2004.

CHOY, P.C.; SIOW, Y.L.; MYMIN, D. Lipids and atherosclerosis. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 82, p. 212-224, 2004.

CNS – CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996. Estabelece os requisitos para realização de pesquisa clínica de produtos para saúde utilizando seres humanos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 16 out. 1996. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=663&word=>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; DAVIDSON, M.H. Pharmacokinetic interactions between statins and fibrates. **American Journal of Cardiology**, v. 96, p. 44-49, 2005.

CORTI, G.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; ZERROUK, N.; MURA, P. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption. I. Assessment of artificial membrane composition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 354-362, 2006.

DAVIDSON, M.H.; TOTH, P.P. Comparative effects of lipid-lowering therapies. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 47, p. 73–104, 2004.

DAVIGNON, J. Fibrates: a review of important issues and recent findings. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 10, p. 61-71B, 1994.

DIAMENT, J.; FORTI, N.; GIANNINI, S.D. Fibratos: semelhanças e diferenças. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 1, p. 83-91, 1999.

ERICSSON, C.G.; HAMSTEN, A.; NILSSON, J.; GRIP, L.; SVANE, B.; FAIRE, U. Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients. **Lancet**, v. 347, p. 849-853, 1996.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4 ed., Strasbourg, Council of Europe, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª edição, São Paulo, Atheneu, 1988.

FDA – Food and Drug Administration. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**. Rockville: Center for Drug Evaluation and Research, 2001.

FRICK, M.H.; ELLO, O.; HAAPA, K.; HEINONEN, O.P.; HEINSALMI, P.; HELO, P.; HUTTUNEN, J.K.; KAITANIEMI, P.; KOSKINEN, P.; MANNINEN, V. et al. The Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 317, p. 1237-1245, 1987.

GANDINI, R.; ASSERETO, R.; CASTOLDI, D.; CUNIETTI, E.; GARANZELLI, P.; MONZANI, W. Normal and slow-release formulations of bezafibrate: a comparative pharmacokinetic study in man. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 149-155, 1987.

GAVISH, D.; LEIBOVITZ, E.; SHAPIRA, I.; RUBINSTEIN, A. Bezafibrate and simvastatin combination therapy for diabetic dyslipidaemia: efficacy and safety. **Journal of Internal Medicine**, v. 247, p. 563-569, 2000.

GLASS, C.K.; WITZTUM, J.L. Atherosclerosis: The road ahead. **Cell**, v. 104, p. 503-516, 2001.

HIRANO, T.; KAZUMI, T.; YOSHINO, G. Long-term efficacy of bezafibrate in reduction of small, dense low-density lipoprotein by hypotriglyceridemic action. **Current Therapeutic Research**, v. 61, p. 127-136, 2000.

ICH – International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Geneva: ICH Secretariat, 2005.

KOMSTA, L.; MISZTAL, G. Application of UV-derivative spectra for determination of four antihyperlipidaemic drugs in pharmaceutical formulations. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 61, p. 9-13, 2004.

KOMSTA, L.; MISZTAL, G.; MAJCHRZAK, E.; HAUZER, A. Separation of fibrate-type antihyperlipidemic drugs by capillary electrophoresis and their quantitation in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 408-414, 2006.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara 2004/2005**. 11^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KREBS, A.; STARCZEWSKA, B.; LESZCZYNSKA, E. Spectrophotometric determination of bezafibrate by ternary complex formation with palladium (II) chloride and eosin. **Analytical Letters**, v. 39, p. 2453-2462, 2006.

LEDERMANN, H.; KAUFMAN, B. Comparative pharmacokinetics of 400 mg bezafibrate after a single oral administration of a new slow-release preparation and the currently available commercial form. **The Journal of International Medical Research**, v. 9, p. 516-520, 1981.

MAN, F.H.A.F.; BEER, F.; LAARSE A.V.; JANSEN, H.; LEUVEN, J.A.G.; SOUVERIJN, J.H.M.; VROOM, T.F.F.P.; SCHOORMANS, S.C.M.; FRUCHART, J.C.; HAVEKES, L.M.; SMELT, A.H.M. The hypolipidemic action of bezafibrate therapy in hypertriglyceridemia is mediated by upregulation of lipoprotein lipase: no effects on

VLDL substrate affinity to lipolysis or LDL receptor binding. **Atherosclerosis**, v. 153, p. 363-371, 2000.

MASNATTA, L. D.; CUNIBERTI, L.A.; REY, R.H.; WERBA, J.P. Determination of bezafibrate, ciprofibrate and fenofibric acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 687, p. 437-442, 1996.

MCCARTY, M.F. Concurrent administration of sustained-release bezafibrate may counteract the increased thrombotic risk associated with oral estrogen therapy. **Medical Hypotheses**, v. 57, p. 216-220, 2001.

MELO, J.; HURTADO, F.K.; SOUZA, M.J.; PRADO, A.W.; ROLIM, C.M.B. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of bezafibrate in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 31, p. 269-280, 2008. DOI: 10.1080/10826070701739108.

MILLER, D.B.; SPENCE, J.D. Clinical pharmacokinetics of fibric acid derivatives (Fibrates). **Clinical Pharmacokinetics**, v. 34, p. 155-162, 1998.

MISZTAL, G.; KOMSTA, L. Study of the liquid chromatography retention of some fibrate-type antihyperlipidemic drugs on C18 and CN columns: application for quantitation in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 479-489, 2005.

OHMACHI, M.; IKEGAMI, H.; KURACHI, H.; NODE, K.; MORISHIGE, K.; NISHIO, Y.; ADACHI, K.; MATUMOTO, K.; HAYAKAWA, J.; TAsAKA, K. et al. Effects of bezafibrate and simvastatin on plasma lipoproteins in hypercholesterolemia resistant to hormone replacement therapy. **Maturitas: The European Menopause Journal**, v. 38, p. 279-286, 2001.

PAPADAKIS, J.A.; GANOTAKIS, E.S.; JAGROOP, I.A.; WINDER, A.F.; MIKHAILIDIS, D.P. Statin + fibrate combination therapy: fluvastatin with bezafibrate or ciprofibrate in high risk patients with vascular disease. **International Journal of Cardiology**, v. 69, p. 237-244, 1999.

PATER, C. The current status of primary prevention of heart disease. **Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine**, v. 2, p. 24-37, 2001.

PEREIRA, A.S.; BICALHO, B.; LILLA, S.; DE NUCCI, G. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28 (suppl), p. S107-111, 2005.

RADER, D.J.; HOEG, J.M.; BREWER, H.B. Quantitation of plasma apolipoproteins in the primary and secondary prevention of coronary artery disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, p. 1012-1025, 1994.

RADER, D.J. Regulation of reverse cholesterol transport and clinical implications. **American Journal of Cardiology**, v. 92 (suppl), p. 42J– 49J, 2003.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

RUOTOLO, G.; ERICSSON, C.; TETTAMANTI, C.; KARPE, F.; GRIP, L.; SVANE, B.; NILSSON, J.; FAIRE, U.; HAMSTEN, A. Treatment effects on serum lipoproteins lipids, apolipoproteins and low density lipoproteins particle size and relationships of lipoproteins variables to progression of coronary atherosclerosis disease in the bezafibrate coronary atherosclerosis intervention trial (BECAIT). **Coronary Artery Disease**, v. 32, p. 1648-1656, 1998.

SCHMITZ, G.; LANGMANN, T. Pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. **Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 75-89, 2006.

SCHOONJANS, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, H.; MAHFOUDI, A.; KREY, G.; WAHLI, W.; GRIMALDI, P.; STAELS, B.; YAMAMOTO, T.; AUWERX, J. Induction of the acyl coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 19269-19276, 1995.

SILVA, P. et al. **Farmacologia**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

STAMLER, J.; DAVIGLUS, M.L.; GARSIDE, D.B.; DYER, A.R.; GREENLAND, P.; NEATON, J.D. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 284, p. 311-318, 2000.

SWARTZ, M.H; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p.12-20, 1998.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP), 29 ed., Rockville, United States Convention, 2006.

VENS-CAPPELL, B.; HILGENSTOCK, C.; GELLERT, M.; KUHLE, K.; REIFFERSCHIED, I.; WINCKLER, P.; BUHRENS, K.G. Comparison of the pharmacokinetics of a quick-release bezafibrate formulation with a sustained-release formulation. 1. Single-dose administration. 2. Multiple-dose administration and chronopharmacokinetics. **Arzneimittelforschung**, v. 43, p. 346-356, 1993.

VOSPER, H.; KHOUDOLI, G.A.; GRAHAM, T.L.; PALMER, C.N.A. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidaemia, and atherosclerosis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 95, p. 47-62, 2002.

WILSON, P.W.F.; D'AGOSTINO, R.B.; LEVY, D.; BELANGER, A.M.; SILBERSHATZ, H.; KANNER, W.B. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. **Circulation**, v. 97, p. 1837-1847, 1998.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de análise da SQR de bezafibrato

ANEXO B – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

ANEXO C – Artigo aceito para publicação em periódico



Roche Diagnostics
Mannheim, Germany

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Bezafibrate, Master Reference Standard

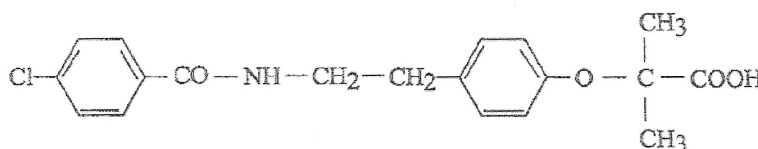
2-[4-[2-[(4-Chlorobenzoyl)amino]ethyl]phenoxy]-2-methylpropanoic acid

Roche Standard no. BM 15.075

Material no. 12044050

Lot no. MH03102088

Analysis no. 28023127



$C_{18}H_{20}ClNO_4$

Mol. wt.: 361.83

Description : An off- white crystalline powder

ANALYTICAL DATA

Identity

- IR : The infrared spectrum no. 51702 is in agreement with the Ph. Eur. reference spectrum no. 51703.
- NMR : The 1H , ^{13}C and APT spectra no. 2917 are in agreement with the proposed structure.
- MS : The EI and ESI spectra no. 2917 are in agreement with the proposed structure.
- TLC : The principal spot in the chromatogram obtained with the test solution corresponds to an equally concentrated spot of the reference solution concerning position and intensity.



Pharma

Certificate of Analysis
Bezafibrate, Master Reference Standard
BM 15.075
Lot no. MH03102088
Analysis no. 28023127
Material no. 12044050

Purity

HPLC : N-(4-Chlorobenzoyl)-tyramine (CBT) : 0.10 %
Bezafrate ethyl ester : 0.22 %
Sum of unknown impurities : 0.14 area%
Sum of all impurities : 0.46 %

Loss on drying : 0.03 %

Sulfated ash : 0.1 %

Heavy metals : ≤10 ppm

Assay ("as-is") : 99.4 %



Re-test date : November 4, 2008

Storage : Well closed and protected from light at room temperature (+15°C to +25°C)

Comment : This standard replaces the former Working Standard, material number 12040099.

Released as reference standard for analytical use only

Dr. Hartleb
(QC/QA Chemical Operations)

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
---	--

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Avaliação de Parâmetros Farmacocinéticos de Bezafibrato em Voluntários Humanos
Número do processo:23081.010002/2007-34
CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0096.0.243.000.07
Pesquisador Responsável: Clarice Madalena Bueno Rolim

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Abril/2008 Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 14/08/2007

Santa Maria, 14 de Agosto de 2007.



Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM
Registro CONEP N. 243.

Validation of HPLC and UV Spectrophotometric Methods for the Determination of Bezafibrate in Pharmaceutical Formulations

Janine de Melo,¹ Felipe Kellermann Hurtado,²
Anelise Weich Prado,¹ Marinês Jost e Souza,²
and Clarice Madalena Bueno Rolim¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Abstract: An isocratic high performance liquid chromatographic (HPLC) and a UV spectrophotometric method were developed and validated for the determination of bezafibrate in pharmaceutical formulations. Bezafibrate was performed on a C₁₈ analytical column (150 × 4.6 mm i.d., 5 μm) with 0.01 M phosphate buffer (pH 3.5):acetonitrile:methanol (50:40:10) as mobile phase, at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. For both methods, detection was made at 230 nm. Method validation evaluated parameters such as linearity, precision, accuracy, and specificity, which remained within acceptable limits. Method comparison demonstrated that there is no significant difference between the procedures (p < 0.05).

Keywords: Liquid chromatography, Spectrophotometry, Bezafibrate, Pharmaceutical formulations, Validation

Correspondence: Clarice Madalena Bueno Rolim, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97, 105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: crolim@smail.ufsm.br

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are a global problem for both the developed and developing world.^[1] Bezafibrate (BEZ), 2-[4-[2-[(4-chlorobenzoyl)amino]ethyl]phenoxy]-2-methylpropanoic acid (Figure 1), is a representative fibrate that powerfully decreases plasma triglyceride levels and increases HDL-C levels, reducing, significantly, the incidence of cardiovascular diseases.^[2]

The safety and efficacy of drug therapy can be ensured using a compendial or validated procedure to assess the quality of pharmaceutical products. The quality of formulations can be evaluated since analytical methods have been considered suitable for their intended purpose, like quantitation of active ingredients, and determination of performance characteristics (e.g., dissolution, drug release).^[3]

There has been no compendial method for determination of bezafibrate in pharmaceutical formulations so far. Some analytical procedures have been reported to evaluate this fibrate in pharmaceutical products by capillary electrophoresis,^[4] colorimeter spectrophotometry,^[5] ultraviolet spectrophotometry,^[6] and high performance liquid chromatography (HPLC).^[7] Analytical techniques by HPLC have been presented for determination of bezafibrate in human plasma^[8] and urine.^[9] Pharmacokinetic studies of immediate and modified release formulations of bezafibrate have been carried out.^[10–13]

Since validated methods are applied routinely, some essential aspects must be observed during the technique development to avoid an excessive waste of financial resource. The mobile phase is an important factor to be considered during development of the HPLC method. Thus, solvents which have a low price and extend the column life are generally chosen. This usual choice was not fully observed in the published method for the determination of bezafibrate in pharmaceuticals by HPLC,^[7] which proposed an uncommon mobile phase containing 45% propan-2-ol in 0.09 M phosphate buffer, pH 2.145.

The purpose of the procedure (e.g., identification, test for impurities, quantitation) is an important aspect that determines which parameters must be evaluated during method validation. Specificity, precision, accuracy, and linearity are some characteristics that must be assessed in procedures for the quantitation of drug substance in formulations. Since the HPLC method described in literature^[7] has a quantitative intention, the specificity of the

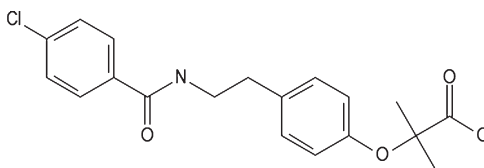


Figure 1. Chemical structure of bezafibrate.

procedure should be completely evaluated, however, only matrix effects were assessed in the method.

Furthermore, the application of the method is relevant because it determines the range of linearity. The dissolution profile is an application for the determination of drug release performance and must be able to evaluate small amounts of drug substance. Thus, the HPLC validated procedure^[7] could not be used in dissolution profile because the method has an inappropriate linear range (0.1–0.8 mg mL⁻¹).

Finally, the spectrophotometric method for determination of bezafibrate in pharmaceutical formulations reported in literature^[6] cannot be fully understood and can be considered inaccessible because it was published in the author's language (Polish).

The present work reports the development and validation of two methods that can be applied for the determination of bezafibrate in pharmaceuticals.

EXPERIMENTAL

Chemicals

The bezafibrate reference standard was kindly supplied by Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) and was certified to contain 99.4%. Cedur[®] tablets (Roche, Brazil) and compounded capsules, both containing 200 mg of bezafibrate, were obtained from commercial sources within their shelf life period.

All solvents were of HPLC grade and all reagents were of analytical grade. Acetonitrile and methanol were obtained from Tedia (USA). Potassium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide, and hydrochloric acid were obtained from Merck (Germany). Phosphoric acid was purchased from Quimex (Brazil) and hydrogen peroxide was obtained from Synth (Brazil). Water was purified with Milli-Q Plus, Millipore System (USA). All solvents and solutions were filtered through a membrane filter or filtration units (Millipore Millex-HV filter units, 0.22 μ m pore size) and degased before use.

Instrumentation and Analytical Conditions

The HPLC method for the determination of bezafibrate in pharmaceutical formulations was performed on a Shimadzu LC-10AD HPLC system (Japan), equipped with a diode array detector model SPD-M10Avp. Data integration was performed using Shimadzu Class-VP software. The analytical column was a reversed phase Rexchrom (150 \times 4.60 mm i.d, 5 μ m particle size) from Regis (USA). All analyses were carried out at room temperature (24 \pm 2°C) under isocratic conditions. The mobile phase consisted of a mixture of 0.01 M phosphate buffer (pH 3.5, adjusted with phosphoric acid): acetonitrile:methanol (50:40:10, v/v/v). The flow rate was 1.0 mL min⁻¹, the volume of injection was 20 μ L, and the detection was made at 230 nm.

The UV spectrophotometric method for quantitative assay of bezafibrate in tablets and compounded capsules was performed on a Shimadzu UV 1601 PC spectrophotometer (Japan) with detection at 230 nm, and using 1.0 cm quartz cells.

Solution and Sample Preparations

Reference Standard

Bezafibrate reference standard, 20 mg, (99.4%) accurately weighed were transferred to a 20 mL volumetric flask and dissolved in methanol for the chromatographic method (final concentration 1 mg mL^{-1}). A solution of 0.1 N sodium hydroxide (NaOH) was used to dissolve the bezafibrate reference standard for the spectrophotometric method.

Pharmaceutical Formulations

An amount equivalent to 50 mg of bezafibrate, present in tablets and compounded capsules, was transferred to a 25 mL volumetric flask with 10 mL of methanol (for the HPLC method) or 0.1 N NaOH (for the UV method). The resulting solution was sonicated during 10 minutes and diluted with methanol or 0.1 N NaOH to obtain a final concentration of 2 mg mL^{-1} . The solution obtained from the tablets was filtered on cellulose filter discs and the solution from the capsules was centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm before use.

Method Validation

The methods applied for the determination of bezafibrate in pharmaceuticals were validated according to the International Conference on Harmonisation guidelines for analytical procedures validation.^[14] Analysis of variance (ANOVA) was used to verify the validity of the assays.

Linearity

The linearity was evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least square regression method. The curves were prepared on three different days.

The calibration curves were obtained with six concentrations of reference standard solution (1, 10, 50, 100, 250, and $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ for the chromatographic method, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, and $15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ for the spectrophotometric method).

Precision

The precision of the procedures was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). Intra-day precision was evaluated by assaying samples at the same concentration and during the same day. The intermediate precision was analyzed by comparing the assays on three different days.

Six sample solutions ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the HPLC method and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the UV method) were prepared and assayed for the determination of precision.

Accuracy

The accuracy was determined by assaying three concentrations (200, 250, and $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the chromatographic method, 8, 10, and $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the spectrophotometric method) in triplicate.

Specificity

The specificity was determined by assaying placebo (tablets and capsules) and degradation components. For the UV method, the interference from the formulations matrix was evaluated. For the HPLC method, besides placebo interference, accelerated degradation studies were carried out according to the next paragraph. The possible interferences were analyzed by the peak purity, which was calculated using Shimadzu Class-VP software.

For degradation studies, reference standard solutions (1 mg mL^{-1}) were submitted to accelerated degradation. Hydrochloric acid (0.1 N) for 8 hours at 80°C , 1 N sodium hydroxide for 8 hours at 80°C , and 30% hydrogen peroxide for 24 hours at room temperature were added to the solutions; the solutions were heated at 121°C at 15 minutes and exposed to ultraviolet light ($\lambda = 254 \text{ nm}$) for 22 hours (15 cm) at room temperature.

Sensibility

For both HPLC and UV methods, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the response and the slope by using three calibration curves.

Robustness

For the HPLC method, the robustness was determined by the analysis of the samples under a variety of conditions making small changes in the buffer pH (3.3 and 3.7), in the percentage of mobile phase compounds (phosphate buffer: acetonitrile: methanol, for 48:42:10, and 52:38:10), in the flow rate (0.9 and 1.1 mL min^{-1}), in the column manufacturer (Supelco,® USA), and

changing the wavelength (228 and 232 nm). For the UV method, the robustness was evaluated by the variation of sodium hydroxide concentration (0.01 N) and wavelength (228 and 232 nm).

Method Comparison

The chromatographic and spectrophotometric methods developed and validated for determinations of bezafibrate in formulations were compared using statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Method Development

The chromatographic conditions were adjusted in order to provide a good assay performance. Mobile phase selection was based on peak parameters (tailing, resolution) and run time. Figure 2 shows a typical chromatogram obtained from the analysis of a reference standard using the proposed method. As shown in this figure, bezafibrate is represented by a symmetrical peak. The retention time observed in the assay (5.2 minutes) associated with the simple sample preparation (for tablets and capsules), allowed a rapid determination of the drug in pharmaceutical products.

The validated procedure for the determination of bezafibrate in pharmaceuticals previously described,^[7] employed a mobile phase composed of a buffer at high concentration and low pH, causing injuries in the column and in the equipment. Furthermore, propan-2-ol, an expensive and uncommon solvent for non chiral separation was used in large proportions as the solvent.

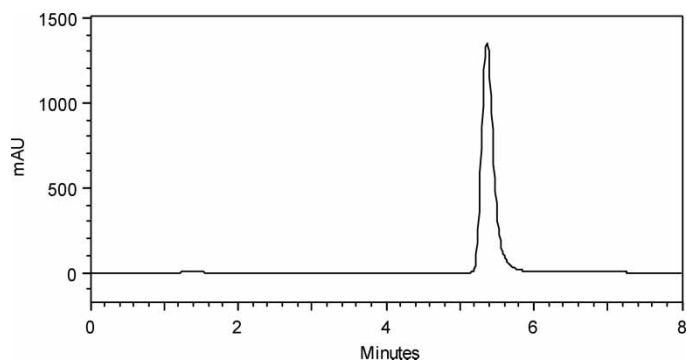


Figure 2. Chromatogram obtained from 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bezafibrate reference standard. Rexchrom Regis[®] C₁₈ column (150 \times 4.60 mm i.d, 5 μm), 0.01 M phosphate buffer (pH 3.5): acetonitrile: methanol (50:40:10, v/v/v), 1.0 mL min⁻¹ and 230 nm.

The spectrophotometric analyses were developed and validated using both aqueous (0.1 N sodium hydroxide) and organic solvent (methanol, data not reported). It is important to point out that the UV method using aqueous solvent was performed considering the reduction of financial resource waste. However, the UV method was easy to be carried out using both aqueous and organic solvents, and the comparison by ANOVA demonstrated that there is no difference between assays using both solvents (data not reported).

Method Validation

Linearity

The calibration curves of analytical methods were assessed by plotting concentration versus peak area or absorbance and showed suitable linearity in the range 1–500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the HPLC method. The representative linear equation was $y = 59231x + 19721$, with a highly significant correlation coefficient ($r = 0.9999$). For the UV method, the calibration curves showed appropriate linearity in the range 2.5–15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range. The representative linear equation was $y = 0.0504x + 0.002$ ($r = 0.9999$) with sodium hydroxide as solvent. Both calibration curves were validated by ANOVA, which indicated significant linear regression and no significant deviation from linearity ($p = 0.05$).

The linear range obtained for the procedure applied to formulations by HPLC allows one to assay a dissolution profile of tablets and compounded capsules containing 200 mg of bezafibrate. The HPLC method validated and presented in literature^[7] is inappropriate for dissolution profile of pharmaceutical dosage forms, since the calibration curve is linear to range 0.1–0.8 mg mL^{-1} and cannot evaluate an amount lower than 45% when the pharmaceuticals are diluted in 900 mL of dissolution media.

Precision and accuracy

For the chromatographic method, the relative standard deviation (RSD) values for intra-day precision were 0.81 and 1.10% for tablets and capsules, respectively. The RSD for inter-day precision were 0.80% for tablets and 0.97% for capsules. Accuracy ranged from 99.76 to 100.05% for tablets and from 100.47 to 100.61% for compounded capsules (Table 1).

The RSD for intra-day precision obtained to the spectrophotometric method developed using sodium hydroxide as solvent were 0.48% for tablets and 0.76% for capsules. The RSD for inter-day precision were 0.45 and 0.83% for tablets and compounded capsules, respectively. For tablets, the accuracy ranged from 98.05 to 100.79% and for capsules ranged from 100.97 to 101.26% (Table 1).

Table 1. Accuracy data for the methods applied to bezafibrate pharmaceutical formulations

Method	Theoretical ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Experimental ^a		
		Mean	Accuracy (%)	RSD (%)
HPLC				
Tablets	200	200.05	100.05	1.37
	250	249.40	99.76	0.76
	300	299.55	99.85	1.19
Capsules	200	201.22	100.61	0.88
	250	250.98	100.39	0.91
	300	301.41	100.47	0.52
UV (NaOH)				
Tablets	8	8.05	100.59	0.69
	10	9.88	98.80	0.55
	12	11.77	98.05	0.48
Capsules	8	8.10	101.26	0.79
	10	10.10	101.04	1.21
	12	12.12	100.97	1.74

^aMean of three determinations of each concentration.

Specificity

For both HPLC and UV methods, no interference from matrix and excipients was found in placebo of tablets or capsules.

No degradation product of bezafibrate was observed after the accelerated stress caused by heating and by adding of hydrogen peroxide. However, some degradation products were found in the presence of hydrochloric acid, sodium hydroxide, and UV light. Figures 3, 4, and 5 show that all degradation products were completely separated from the bezafibrate peak, which presented suitable purity by software analysis. Therefore, the validated procedure could be considered a stability indicative method unlike the HPLC method previously described.^[7]

Sensibility

For chromatographic and spectrophotometric methods, the theoretical limits were evaluated based on three calibration curves and then the limits calculated were analyzed experimentally.

For HPLC method, the theoretical LOD, $0.23 \mu\text{g mL}^{-1}$, was assayed giving a RSD of 2.49% and the calculated LOQ, $0.71 \mu\text{g mL}^{-1}$, was performed achieving a suitable RSD of 1.49%. For the UV method using sodium hydroxide as solvent, the assay of the calculated LOD

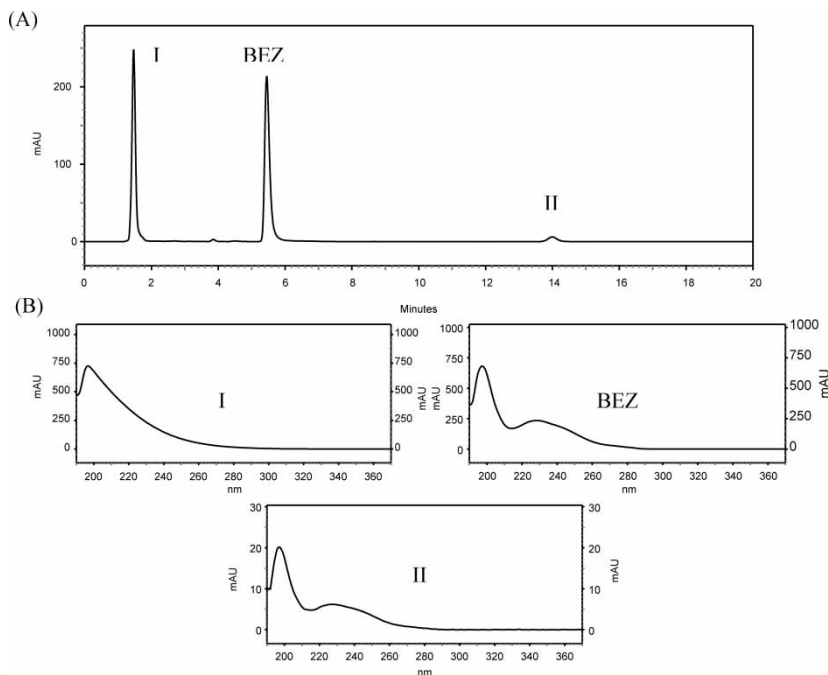


Figure 3. (A) Chromatogram of standard solution submitted to accelerated degradation using 0.1 N hydrochloric acid for 8 hours at 80°C. (B) Absorption spectrum of bezafibrate (BEZ), degradation products I and II. Rexchrom Regis[®] C₁₈ column (150 × 4.60 mm i.d, 5 μm), 0.01 M phosphate buffer (pH 3.5): acetonitrile: methanol (50:40:10, v/v/v), 1.0 mL min⁻¹ and 230 nm.

(0.44 μg mL⁻¹) gave a RSD of 14.97% and the performance of the theoretical LOQ (1.32 μg mL⁻¹) achieved a satisfactory RSD of 1.79%.

Robustness

The HPLC method demonstrated robustness for all evaluated parameters except for the flow rate of mobile phase, which caused changes in the accuracy of the procedure. The UV method remained unaffected by small changes in wavelength, but robustness was not demonstrated with the change of sodium hydroxide concentration (Table 2).

Method Comparison

In the comparison of the two methods, ANOVA demonstrated that there is no significant difference between the experimental values obtained by the

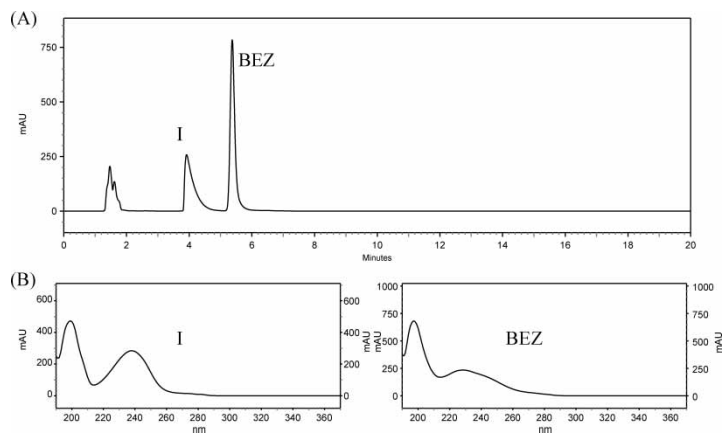


Figure 4. (A) Chromatogram of standard solution submitted to accelerated degradation using 1 N sodium hydroxide for 8 hours at 80°C. (B) Absorption spectrum of bezafibrate (BEZ) and degradation product I. Rexchrom Regis[®] C₁₈ column (150 × 4.60 mm i.d, 5 μm), 0.01 M phosphate buffer (pH 3.5): acetonitrile: methanol (50:40:10, v/v/v), 1.0 mL min⁻¹ and 230 nm.

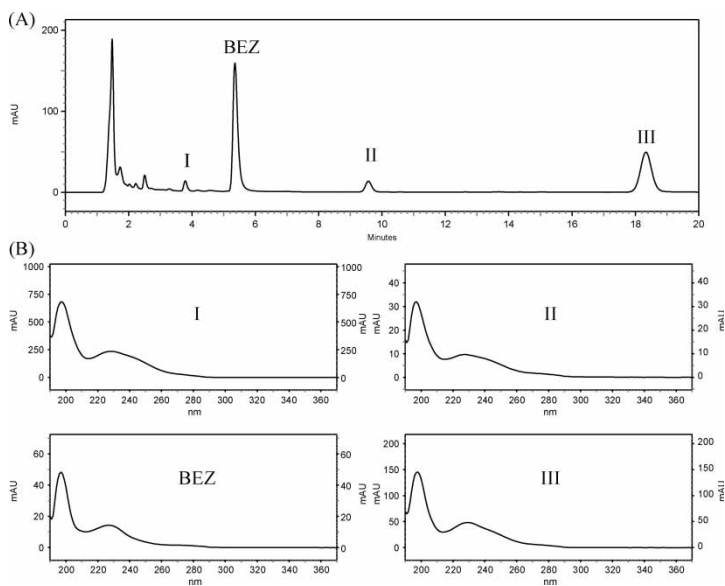


Figure 5. (A) Chromatogram of standard solution submitted to accelerated degradation using exposed to ultraviolet light ($\lambda = 254$ nm) for 22 hours at room temperature. (B) Absorption spectrum of bezafibrate (BEZ), degradation products I, II, and III. Rexchrom Regis[®] C₁₈ column (150 × 4.60 mm i.d, 5 μm), 0.01 M phosphate buffer (pH 3.5): acetonitrile: methanol (50:40:10, v/v/v), 1.0 mL min⁻¹ and 230 nm.

Table 2. Robustness of the HPLC and UV methods for determination of bezafibrate

	Normal	Variation	Bezafibrate amount ^a (%)
Chromatographic conditions			
Column C ₁₈ (150 × 4.6 mm, 5 μm)	Regis [®]	Supelco [®]	101.97
Mobile phase (phosphate buffer: acetonitrile: methanol, v/v/v)	50:40:10	48:42:10 52:38:10	98.61 98.61
pH (phosphate buffer)	3.5	3.3 3.7	98.92 100.06
Flow rate (mL min ⁻¹)	1.0	0.9 1.1	110.55 91.11
Wavelength (nm)	230	228 230	99.24 98.06
Spectrophotometric conditions			
Solvent concentration (sodium hydroxide, N)	0.1	0.01	93.67
Wavelength (nm)	230	228 232	101.85 98.05

^aMean of three determination.

procedures. The calculated F-value ($F_{\text{calc}} = 0.99$) was found to be less than the tabled F-value ($F_{\text{tab}} = 4.96$) at a 5% significance level.

CONCLUSION

The proposed HPLC and UV methods enable a quantitative determination of bezafibrate in tablets and compounded capsules. The application of these methods in routine analysis can be justified since fast sample preparation and simple reagents and solvents were used experimentally. The validation demonstrated that these procedures are suitable for the intended purpose because the methods were considered linear, precise, accurate, and specific and can be employed in control quality of pharmaceuticals containing bezafibrate. Furthermore, the HPLC method can be considered indicative of stability since degradation products were separated from bezafibrate.

REFERENCES

1. Pater, C. The current status of primary prevention of heart disease. *Curr. Control. Trials Cardiovasc. Med.* **2001**, 2, 24–37.
2. Hirano, T.; Kazumi, T.; Yoshino, G. Long-term efficacy of bezafibrate in reduction of small, dense low-density lipoprotein by hypotriglyceridemic action. *Curr. Ther. Res.* **2000**, 61, 127–136.

3. *30th United States Pharmacopeia*; United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, 2006.
4. Komsta, L.; Misztal, G.; Majchrzak, E.; Hauzer, A. Separation of fibrate-type anti-hyperlipidemic drugs by capillary electrophoresis and their quantitation in pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 408–414.
5. Krebs, A.; Starczewska, B.; Leszczynska, E. Spectrophotometric determination of bezafibrate by ternary complex formation with palladium (II) chloride and eosin. *Anal. Lett.* **2006**, *39*, 2453–2462.
6. Komsta, L.; Misztal, G. Application of UV-derivative spectra for determination of four antihyperlipidaemic drugs in pharmaceutical formulations. *Acta Pol. Pharm.* **2004**, *61*, 9–13.
7. Misztal, G.; Komsta, L. Study of the liquid chromatography retention of some fibrate-type antihyperlipidemic drugs on C18 and CN columns: application for quantitation in pharmaceutical formulations. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 479–489.
8. Masnatta, L.D.; Cuniberti, L.A.; Rey, R.H.; Werba, J.P. Determination of bezafibrate, ciprofibrate and fenofibric acid in human plasma by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **1996**, *687*, 437–442.
9. Castoldi, D.; Monzani, V.; Tofanetti, O. Determination of bezafibrate in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1985**, *344*, 259–265.
10. Ledermann, H.; Kaufman, B. Comparative pharmacokinetics of 400 mg bezafibrate after a single oral administration of a new slow-release preparation and the currently available commercial form. *J. Int. Med. Res.* **1981**, *9*, 516–520.
11. Gandini, R.; Assereto, R.; Castoldi, D.; Cuniatti, E.; Garanzelli, P.; Monzani, W. Normal and slow-release formulations of bezafibrate: a comparative pharmacokinetic study in man. *Pak. J. Pharm. Sci.* **1987**, *7*, 149–155.
12. Vens-Cappell, B.; Hilgenstock, C.; Gellert, M.; Kuhle, K.; Reifferscheid, I.; Winckler, P.; Buhrens, K.G. Comparison of the pharmacokinetics of a quick-release bezafibrate formulation with a sustained-release formulation. 1. Single-dose administration. 2. Multiple-dose administration and chronopharmacokinetics. *Arzneimittelforschung* **1993**, *43*, 346–356.
13. Ali, O.; Khan, M.A.; Obaid, R.; Ahmed, S.W. Bioavailability study of tablet bezafibrate 200 mg (Lipocor). *Pak. J. Pharm. Sci.* **2002**, *15*, 35–4.
14. ICH – international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*; ICH Secretariat: Geneva, Switzerland, 1996.

Received June 14, 2007

Accepted July 12, 2007

Manuscript 6168