

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

**“DEFLAZACORT: DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE E
ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS E
CÁPSULAS MANIPULADAS”**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GIANE MÁRCIA CORRÊA

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

“DEFLAZACORT: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE E ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS E CÁPSULAS MANIPULADAS”

por

Giane Márcia Corrêa

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.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a Simone Gonçalves Cardoso

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**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

**DEFLAZACORT: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE
ANÁLISE E ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS E CÁPSULAS
MANIPULADAS**

elaborada por
Giane Márcia Corrêa

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Simone Gonçalves Cardoso
(Presidenta/Orientadora)

Cristiane de Bona da Silva (UFRGS)

Ruy Carlos Ruver Beck (UFSM)

Santa Maria, 27 de outubro de 2006.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho ao Jorge e Tiago pelo amor, carinho e incentivo na realização desta etapa de minha vida.

Aos meus pais pelo esforço e dedicação para minha formação.

À Prof^a Dr^a Simone Gonçalves Cardoso pela orientação, apoio e amizade durante a realização dessa dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A bolsista de iniciação científica Luziane Bellé pelo auxílio em diversas etapas desta dissertação.

Aos meus colegas da pós-graduação, em especial a Anelise Weich, e Silvia Miollo, pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários, em especial a Lisiane Bajersk e Marcelo Malesuik e estagiários do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-químico, pela colaboração e amizade.

A UNIJUÍ, pela liberação do trabalho e incentivo através de bolsa de estudo.

A todos, que mesmo não citados, participaram e colaboraram com a realização desse trabalho.

RESUMO

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

DEFLAZACORT: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE E ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS E CÁPSULAS MANIPULADAS

AUTOR: GIANE MÁRCIA CORRÊA
ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. SIMONE GONÇALVES CARDOSO
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de outubro de 2006.

Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos para análise do glicocorticóide deflazacort em amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas. Os métodos utilizados para quantificação do deflazacort foram: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e espectrofotometria na região do visível. A CLAE foi conduzida em temperatura ambiente utilizando coluna de fase reversa C₁₈, usando fase móvel composta de acetonitrila e água (80:20, V/V) e detecção em 240nm. Para o método espectrofotométrico UV utilizou-se etanol como solvente e detecção em 244 nm. Outro método validado foi espectrofotometria no visível que empregou como reagentes azul de tetrazólio 0,5% em metanol e hidróxido de tetrametilamônio a 10% em metanol e como solvente utilizou-se etanol. A detecção foi em 519 nm. Os métodos apresentaram linearidade, exatidão e precisão. Desenvolveu-se e validou-se ainda, método de dissolução do deflazacort nas formas farmacêuticas em estudo. Empregou-se 900 mL de HCl 0,1N como meio, utilizando aparato pá para comprimidos e cesta para cápsulas, com velocidade de 50 rpm e quantificou-se por espectrofotometria na região do UV. Os resultados demonstraram linearidade, especificidade, exatidão e precisão adequadas.

Palavras-chaves: deflazacort, cromatografia líquida, espectrofotometria na região do ultravioleta e visível, dissolução.

ABSTRACT

Dissertation for obtaining the degree of Master
Program Post-Graduate in Pharmaceutical Science
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

DEFLAZACORT: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGIES FOR ANALYSIS AND DISSOLUTION STUDY FOR TABLET AND CAPSULE MANIPULATE

AUTHOR: GIANE MÁRCIA CORRÊA
ADVISER: PROF^a. DR^a. SIMONE GONÇALVES CARDOSO
Date and Local of the Defense: Santa Maria, 27th october of 2006.

In this work the validation and development methodologies for determination of deflazacort, a glucocorticoid, in tablets and capsules. The methods used for determination of deflazacort were: liquid chromatography (LC), ultraviolet spectrophotometry (UV) and visible spectrophotometry. The LC was operated at controlled-ambient temperature with reverse phase C₁₈, using a mobile phase composed of acetonitrile and water (80;20 V/V), detector at 240 nm. In the UV spectrophotometry method applied as solvent ethanol and detection at 244 nm. Another used method was visible spectrophotometry applied as solvent and reagent blue tetrazolium at 0,5% methanol and hydroxide tetramethylammonium at 10% in methanol and as solvent ethanol. The detection at 519 nm. The proposed method showed good linearity, precision and accuracy. Moreover, a method for the dissolution of deflazacort in solid dosage formulations was developed and validated. Studies were conducted by basket and paddle methods at in 900 mL 0,1N hydrochloric acid at 50 rpm and quantification was achieved by UV spectrophotometry. The validation showed good specificity, linearity, precision and accuracy.

Keywords: deflazacort, liquid chromatography, ultraviolet and visible spectrophotometry, dissolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura química do deflazacort.....	18
Figura 2 -	Espectro na região do infravermelho do deflazacort	23
Figura 3 -	Espectro de absorção molecular referente à solução etanólica de deflazacort, na concentração de 12 µg/mL.....	24
Figura 4 -	Cromatograma da solução de deflazacort na concentração de 30µg/mL. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex C ₁₈ (250 X 4 mm d.i. x 5 µm); fase móvel: acetonitrila e água (80:20) (V/V); vazão 1mL/min; volume injetado: 20 µL; detecção: 240 nm.....	25
Figura 5 -	Curva calorimétrica diferencial exploratória do deflazacort obtida em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) à 10°C/min.....	26
Figura 6 -	Cromatograma obtido por CLAE para deflazacort SQR (A), comprimidos (B) e cápsulas manipuladas (C) em solução com concentração de 30 µg/mL. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex C ₁₈ (250 X 4 mm d.i. x 5 µm); fase móvel: acetonitrila e água (80:20) (V/V); vazão 1mL/min; volume injetado: 20 µL. Detecção: 240 nm.....	37
Figura 7 -	Cromatograma do estudo da degradação forçada da SQR de deflazacort (concentração=30 µg/mL) em meio ácido HCl 0,1N; tempo zero (A1) e após 4 horas (A2); em meio básico NaOH 0,1 N tempo zero (B1) e 4 horas (B2) e em meio oxidativo H ₂ O ₂ 3% tempo zero (C1) e 4 horas (C2). Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex C ₁₈ (250 X 4 mm d.i. x 5 µm) ; fase móvel: acetonitrila e água (80:20) (V/V); vazão 1 mL/min; volume injetado:20µL. Detecção:240 nm.....	39
Figura 8 -	Representação gráfica da curva de calibração do deflazacort obtida por CLAE.....	40
Figura 9 -	Espectro de absorção de 200 a 400 nm da SQR de deflazacort (A), comprimidos (B), cápsulas (C) e sobrepostos (D), na concentração teórica de 12 µg/mL.....	50
Figura 10 -	Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico no ultravioleta para o deflazacort em etanol a 244 nm.....	50
Figura 11 -	Representação gráfica da curva de calibração do deflazacort	

obtida através do método espectrofotométrico na região do UV.....	52
Figura 12 - Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria na região do visível das soluções de SQR e ASE de comprimidos e ASE de cápsulas, todos realizados na concentração teórica de 8 µg/mL .	60
Figura 13 - Representação gráfica da curva de calibração do deflazacort obtida do método espectrofotométrico na região do visível.....	62
Figura 14 - Perfil de dissolução de deflazacort em cápsulas empregando aparato pá e cesta e rotação 50 e 75 rpm	85
Figura 15 - Perfil de dissolução de deflazacort em comprimido empregando aparato pá e cesta e rotação 50 e 75 rpm	86
Figura 16- Perfil de dissolução obtido para o DFZ nos meios HCl 0,1 N; água e Tp 6,8 a 37 ± 0,5°C na forma farmacêutica de cápsulas utilizando como aparato cesta e rotação de 50 rpm.....	88
Figura 17 - Perfil de dissolução obtido para o DFZ nos meios HCl 0,1 N; água e Tp 6,8 a 37 ± 0,5°C na forma farmacêutica de comprimidos utilizando como aparato pá e rotação de 50 rpm.....	88
Figura 19 - Representação gráfica da curva de calibração do deflazacort em HCl 0,1 N através da espectrofotometria na região do UV.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores obtidos da faixa de fusão do deflazacort	22
Tabela 2 -	Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método por CLAE.....	31
Tabela 3 -	Preparo das soluções para o teste de recuperação do deflazacort nas amostras de comprimidos e cápsulas por CLAE.....	35
Tabela 4 -	Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do deflazacort por CLAE.....	41
Tabela 5 -	Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, do deflazacort por CLAE.....	41
Tabela 6 -	Valores experimentais referentes a determinação de deflazacort em comprimidos por CLAE para avaliação da precisão intra e inter-dias.....	42
Tabela 7 -	Valores experimentais referentes a determinação de deflazacort em cápsulas por CLAE para avaliação da precisão intra e inter-dias.....	43
Tabela 8 -	Avaliação da robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência através da determinação de deflazacort em comprimidos.....	44
Tabela 9 -	Avaliação da robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência através da determinação de deflazacort em cápsulas.....	44
Tabela 10 -	Valores experimentais do teste de recuperação realizado em amostras de comprimidos e cápsulas de deflazacort por CLAE.....	45
Tabela 11 -	Valores obtidos para determinação de limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de deflazacort por CLAE.....	45
Tabela 12 -	Condições experimentais utilizadas para a execução do método por espectrofotometria na região do UV.....	46
Tabela 13 -	Composição percentual da amostra simulada dos excipientes.....	47
Tabela 14 -	Preparo das soluções para o teste de recuperação do	

	deflazacort, nas amostras de comprimidos e cápsulas, utilizando a espectrofotometria na região do UV.....	49
Tabela 15 -	Valores de absorvâncias obtidas para elaboração da curva de calibração do deflazacort por espectrofotometria na região do UV a 244 nm.....	51
Tabela 16 -	Resultado da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método espectrofotométrico na região do ultravioleta.....	52
Tabela 17 -	Valores experimentais obtidos para determinação do deflazacort nas amostras de comprimidos por espectrofotometria na região do UV para avaliação da precisão intra e inter-dias.....	53
Tabela 18 -	Valores experimentais obtidos para determinação do deflazacort nas amostras de cápsulas por espectrofotometria na região do UV para avaliação da precisão intra e inter-dias.....	54
Tabela 19 -	Valores experimentais obtidos do teste de recuperação realizado em amostras de comprimidos e cápsulas de deflazacort por espectrofotometria na região do UV a 244 nm.....	55
Tabela 20 -	Valores obtidos para determinação de limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) de deflazacort por espectrofotometria na região do UV.....	55
Tabela 21 -	Condições experimentais utilizadas para a execução do método por espectrofotometria na região do visível.....	56
Tabela 22 -	Preparo das soluções para o teste de recuperação do deflazacort, nas amostras de comprimidos e cápsulas, utilizando espectrofotometria na região do visível.....	59
Tabela 23 -	Tempo de repouso para as soluções reagirem com a SQR, comprimidos e cápsulas, leitura realizada na região do visível, em 519 nm.....	60
Tabela 24 -	Valores de absorvâncias obtidas para a elaboração da curva de calibração do deflazacort por espectrofotometria na região do visível a 519 nm.....	61
Tabela 25 -	Resultado da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados e análise da variância (ANOVA), para o método espectrofotométrico na região do visível.....	62
Tabela 26 -	Valores experimentais obtidos para determinação do	

	deflazacort nas amostras de comprimidos por espectrofotometria na região do visível.....	63
Tabela 27 -	Valores experimentais referentes a determinação do deflazacort nas amostras de cápsulas através da espectrofotometria na região do visível.....	64
Tabela 28 -	Valores experimentais obtidos do teste de recuperação realizado em amostras de comprimidos e cápsulas de deflazacort por espectrofotometria na região do visível a 519 nm.....	65
Tabela 29 -	Valores obtidos para determinação dos limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) de deflazacort através da espectrofotometria na região do visível.....	65
Tabela 30 -	Resultados da validação dos métodos: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e espectrofotometria na região do visível.....	68
Tabela 31 -	Análise de variância dos resultados obtidos nos doseamentos de deflazacort nas amostras de cápsulas e comprimidos, obtidos pelos métodos validados (Cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria na região do ultravioleta e espectrofotometria na região do visível).....	69
Tabela 32-	Resultados obtidos na comparação dos métodos através do teste de Tukey.....	69
Tabela 33 -	Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos e cápsulas contendo deflazacort.....	79
Tabela 34 -	Valores da Eficiência de Dissolução (%) obtidos nas diferentes condições testadas.....	87
Tabela 35 -	Resultados encontrados nas avaliações dos filtros utilizados na filtração da substância química de referência e das amostras de comprimidos e cápsulas por espectrofotometria na região do UV.....	89
Tabela 36 -	Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade da substância química de referência (SQR), amostra simulada de excipientes (ASE) de comprimidos e cápsulas, por espectrofotometria na região do UV.....	90
Tabela 37-	Valores de absorvâncias obtidas na determinação da curva de calibração do deflazacort em ácido clorídrico 0,1N por espectrofotometria na região do UV.....	91

Tabela 38 - Resultados da curva de calibração obtida pelo método dos mínimos quadrados para o método de espectrofotometria na região do UV.....	92
Tabela 39 - Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida do deflazacort em comprimidos, por espectrofotometria na região do UV.....	93
Tabela 40 - Análise da variância dos valores de percentagem dissolvida de DFZ em comprimidos, por espectrofotometria na região do UV, em diferentes dias.....	93
Tabela 41 - Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de deflazacort em cápsulas, por espectrofotometria na região do UV.....	94
Tabela 42 - Análise da variância dos valores de percentagem dissolvida de DFZ em cápsulas, por espectrofotometria na região do UV, em diferentes dias.....	94
Tabela 43 - Valores experimentais do teste de recuperação realizado nas amostras simuladas de excipiente de comprimidos e cápsulas de deflazacort por espectrofotometria na região do UV.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CV	Coeficiente de variação percentual
DAD	Detector com arranjo de fotodiodos
DFZ	Deflazacort
ED	Eficiência de dissolução
e.p.m.	Erro padrão da média
GC	Glicocorticoide
GL	Graus de liberdade
ICH	International Conference on Harmonisation
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
mL	Mililitro
r	Coeficiente de correlação de Pearson
r.p.m	Rotação por minuto
SQR	Substância química de referência
USP	The United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Considerações gerais	18
2.2 Indicações	19
2.3 Metabolismo e características farmacocinéticas	19
2.4 Formas farmacêuticas e apresentação	19
2.5 Descrição	20
3 CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	21
3.1 Introdução	21
3.2 Análise qualitativa	22
3.2.1 Determinação da faixa de fusão	22
3.2.2 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)	22
3.2.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)	23
3.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	24
3.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	25
3.3 Conclusões	26
4 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA	27
4.1 Introdução	27
4.2 Métodos de quantificação	28
4.3 Produtos farmacêuticos	29
4.4 Substância química de referência	29

4.5 Reagentes e solventes	29
4.6 Equipamentos e acessórios	30
4.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	30
4.7.1 Validação do método analítico	30
4.7.1.1 Especificidade	31
4.7.1.2 Linearidade: Curva de calibração	32
4.7.1.3 Precisão	33
4.7.1.4 Robustez	34
4.7.1.5 Exatidão (Teste de recuperação)	34
4.7.1.6 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	36
4.7.2 Resultados e discussão	36
4.8 Espectrofotometria na região do Ultravioleta (UV)	46
4.8.1 Validação do método analítico	46
4.8.1.1 Especificidade	46
4.8.1.2 Preparo da Curva de Ringbom	47
4.8.1.3 Linearidade: Curva de calibração	47
4.8.1.4 Precisão	48
4.8.1.5 Exatidão (teste de recuperação)	48
4.8.1.6 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	49
4.8.2 Resultados e discussão	49
4.9 Espectrofotometria na região do Visível	56
4.9.1 Validação do método analítico	56
4.9.1.1 Especificidade	56
4.9.1.2 Linearidade: Curva de calibração	57
4.9.1.3 Precisão	57
4.9.1.4 Exatidão (teste de recuperação)	58
4.9.1.5 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	59
4.9.2 Resultados e discussão	59
4.10 Comparação dos métodos propostos	66
5 CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS E CÁPSULAS	71

5.2 Solventes e reagentes	77
5.3 Equipamentos e acessórios	77
5.4 Escolha dos parâmetros de dissolução	78
5.5 Avaliação da influência do filtro	79
5.6 Avaliação da estabilidade de soluções SQR e amostras no meio de dissolução	80
5.7 Validação do método de análise e quantificação da percentagem de fármaco dissolvido	81
5.7.1 Avaliação da especificidade	82
5.7.2 Linearidade	82
5.7.3 Precisão	82
5.7.4 Exatidão (Teste de recuperação)	83
5.8 Resultados e discussão	83
6 CONCLUSÕES	97
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1 INTRODUÇÃO

Os glicocorticóides são conhecidos há mais de 50 anos e representam a classe mais importante e frequentemente utilizada de medicamentos antiinflamatórios. São amplamente utilizados para tratar diversas doenças respiratórias, hematológicas e do tecido conjuntivo (MARKHAM & BRYSON, 1995).

Desde o sucesso da utilização da hidrocortisona (cortisol), em 1948, vários glicocorticóides têm sido sintetizados, como a prednisolona, fluorohidrocortisona (1955), fluorometalona (1959), acetato de triamcinolona (1960), fluorandrenolona (1961), dexametasona (1962) e clobetasol (1969) (LUENGO, 2005).

Existem vários efeitos adversos na utilização dos referidos fármacos, destacando-se a osteoporose, catarata, diabetes *mellitus* e hipertensão (PATTSCHAN et al., 2001; LANNA et al., 2003).

Com o aparecimento desses efeitos secundários, iniciou-se a produção dos esteróides brandos, “soft – steroids”, como a budesonida (1978), o dipropionato de aclometasona (1982), o prednicarbato (1985) e o fluoroato de mometasona (1988). Em 1988 foi sintetizado o deflazacort, um glicocorticóide poupador de cálcio, com o objetivo de minimizar o risco de desenvolvimento de osteoporose (SCHÄCKE et al., 2002; LUENGO, 2005). Estudos demonstram que a utilização do deflazacort em substituição à prednisona traz vantagens, pois os efeitos colaterais são reduzidos (LIPPUNER et al., 1998)

O deflazacort é comercializado no Brasil na forma de comprimidos, solução oral, e na forma de cápsulas, manipuladas em farmácias magistrais.

Este fármaco tem sido estudado quanto às suas propriedades farmacológicas, sendo escassos os estudos referentes à determinação quantitativa do mesmo, como matéria-prima ou a partir das formas farmacêuticas disponíveis. São inexistentes até o momento monografias em farmacopéias.

Considerando o exposto, planejou-se desenvolver e validar métodos simples e exeqüíveis para a determinação quantitativa de deflazacort em comprimidos e cápsulas manipuladas, bem como desenvolver e validar método de dissolução, importante para avaliação *in vitro* das propriedades biofarmacêuticas das formas farmacêuticas sólidas de uso oral.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para o controle qualitativo e quantitativo e estudos de dissolução de deflazacort nas formas farmacêuticas comprimidos e cápsulas manipuladas.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Realizar a caracterização da matéria-prima a ser utilizada como substância química de referência no desenvolvimento e validação dos métodos propostos com auxílio de técnicas de análise adequadas;
2. Desenvolver e validar método para análise quantitativa de deflazacort em comprimidos e cápsulas manipuladas, por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção no ultravioleta;
3. Desenvolver e validar método para análise quantitativa de deflazacort em comprimidos e cápsulas manipuladas, por espectrofotometria na região do ultravioleta;
4. Desenvolver e validar método para análise quantitativa de deflazacort em comprimidos e cápsulas manipuladas, por espectrofotometria na região do visível;
5. Realizar estudo comparativo dos métodos propostos;
6. Desenvolver e validar método de dissolução para comprimidos e cápsulas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais

O deflazacort (figura1) é um importante glicocorticóide (GC) que possui atividade farmacológica, atuando como antiinflamatório e imunossupressor, derivado da prednisolona (WALKER, 2000).

O mecanismo de ação dos glicocorticóides pode ser genômico e não-genômico. No mecanismo genômico, os corticóides atuam através de receptores citoplasmáticos das células alvo, onde se associam às proteínas de choque térmico, formando um complexo protéico que é translocado ao núcleo celular onde ocorre a estimulação ou supressão da transcrição gênica. O mecanismo não-genômico ocorre através de sua interação com outras proteínas plasmáticas, promovendo alteração da conformação físico-química da membrana das células alvo (ABREU & ALBUQUERQUE, 2000).

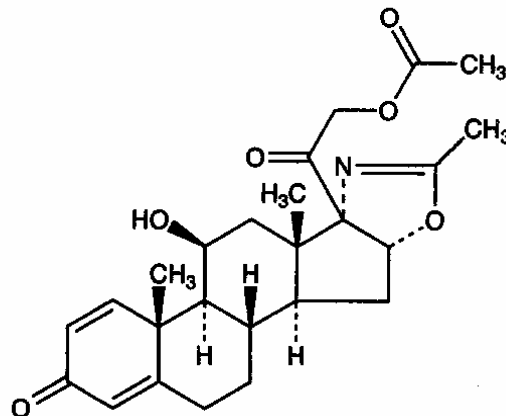


Figura 1- Estrutura química do deflazacort (BUDAVARIS, 1996).

Os GC têm vários efeitos colaterais, dentre eles destacam-se a redução da massa óssea pela redução da absorção de cálcio e pelo aumento da atividade do hormônio da paratireóide (RIZZATTO, et al., 1997). Outros efeitos colaterais são: catarata e glaucoma (olho), euforia e depressão (sistema nervoso central), diabetes,

(sistema endócrino) hipertensão (sistema cardiovascular) e úlcera péptica e pancreatite (sistema gástrico) (PATSHAN et al., 2001; LANNA et al., 2003).

O deflazacort tem menos efeitos colaterais sobre os ossos e sobre o metabolismo da glicose que os demais glicocorticóides e as mesmas atividades imunossupressoras (EBERHARDT et al., 1994; WALKER, 2000).

2.2 Indicações

O deflazacort é indicado para o tratamento de várias doenças, tais como: doenças reumáticas (artrite reumatóide, artrite crônica); doenças respiratórias (asma); doenças do tecido conjuntivo (lúpus eritematoso) e distúrbios hematológicos (púrpura trombocitopênica) (MARKHAM & BRYSON, 1995).

2.3 Metabolismo e características farmacocinéticas

Após administração oral, deflazacort é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e convertido, pelas esterases plasmáticas, em 21-hidróxideflazacort, seu principal metabólito ativo. Esse metabólito ativo alcança o pico plasmático entre 1,5 e 2 horas (MARKHAM & BRYSON, 1995). Encontra-se 40 % ligado às proteínas plasmáticas e sua meia-vida plasmática é de 1,1 à 1,9 horas. (ABREU & ALBUQUERQUE, 2002). A biodisponibilidade absoluta após administração via oral é de 68%. Não existem dados em relação à distribuição do deflazacort nos tecidos humanos. A eliminação ocorre, principalmente, pelos rins, onde 70% da dose são excretadas pela urina e o restante pelas fezes (MARKHAM & BRYSON, 1995).

2.4 Formas farmacêuticas e apresentação

Atualmente o deflazacort é comercializado na forma de comprimidos de 6 e 30 mg, solução oral com 22,75 mg/mL e cápsulas manipuladas conforme prescrição médica, variando de 7,5 a 30 mg. Alguns nomes comerciais do deflazacort na forma

de comprimidos são: Calcort[®] (Aventis Pharma), Cortrax[®] (Ativus), Deflanil[®] (Libbs), Denacen[®] (Marjan), Flazal[®] (Neo Química), Deflaimon[®] (EMS).

2.5 Descrição (BUDAVARIS, 1996)

- Nome químico: (11 β , 16 β)-21-(Acetiloxi)11-hidroxi-2'-metil-5'H-pregna-1,4-dienol [17,16-d] oxazol-3,20-diona; 11b, 21-dihidroxi-2-metil-5' β H-pregna-1,4-dienol [17-16-d] oxazol-3,20-diona 21 acetato.
- Fórmula molecular: C₂₅H₃₁NO₆
- Peso molecular: 441,52
- Faixa de fusão: 255-256,5° C
- Aparência: pó cristalino branco ou amarelado
- Solubilidade: solúvel em metanol e etanol.

3 CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)

3.1 Introdução

As substâncias utilizadas como referência em ensaios de identificação, doseamento e validação, devem apresentar elevado grau de pureza e são normalmente distribuídas pelas farmacopéias. A Farmacopéia Americana (USP 29, 2005) é a instituição que mais contribui para a distribuição de substâncias de referência. Outras instituições como Organização Mundial da Saúde (OMS), Farmacopéia Européia e Farmacopéia Brasileira também contribuem para a certificação dos padrões (GIL et al., 2005). Muitos fármacos, como o deflazacort, não possuem monografias em farmacopéias, não havendo, portanto, padrões de referência para essas substâncias.

Pelo exposto, foi adquirida da Natural Pharma Produtos farmacêutico Ltda a matéria-prima do deflazacort, com teor declarado de 97,8% e identificado pelo lote nº 3067 (dados encontrados no certificado de análise emitido pelo fornecedor), que foi submetida a diferentes ensaios para avaliação da sua pureza, com o intuito de utilizá-la como substância química de referência no desenvolvimento e validação dos métodos propostos.

Inicialmente, foram realizadas análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênios e carbonos, que comprovaram a identidade da substância. A seguir, a matéria-prima foi avaliada por: determinação da faixa de fusão, análise espectrofotométrica nas regiões do infravermelho (IV) e ultravioleta (UV), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e através de calorimetria exploratória diferencial (DSC).

3.2 Análise qualitativa

3.2.1 Determinação da faixa de fusão

O ponto de fusão é uma análise indicativa de pureza de compostos, pois cada substância apresenta uma faixa de fusão característica, e a presença de qualquer outra substância altera o resultado. A simplicidade, rapidez e baixo custo do equipamento são algumas das vantagens da aplicação da medida do ponto de fusão (GIL et al., 2005).

A faixa de fusão do deflazacort foi determinada em aparelho modelo MQAPF-301 Microquímica, em triplicata, através do método do bloco metálico aquecido. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Valores obtidos da determinação da faixa de fusão do deflazacort.

Amostra	Faixa de fusão
1	255,3-256,0°C
2	255,0-256,1°C
3	255,4-256,6°C
Média	255,2-256,2°C

Como pode ser verificada na Tabela 1, a faixa de fusão média encontrada para o deflazacort foi de 255,2-256,2°C, e encontra-se dentro da faixa descrita para o fármaco no Index Merck de 255 – 256,5 °C (BUDAVARIS, 1996).

3.2.2 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A espectrofotometria no IV é uma das técnicas mais utilizadas na identificação de matérias-primas, e se caracteriza por provocar vibrações de átomos ou grupos de átomos em um composto, que podem ter amplitudes e velocidades diferentes. Estas vibrações ocorrem em torno das ligações covalentes que une os átomos, ou grupos de átomos (WATSON, 1999; GIL et al., 2005).

O espectro de absorção no IV de deflazacort, realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC, foi obtido em espectrofotômetro IR, marca

Shimadzu modelo IR Prestige-21. Para as análises foram preparadas pastilhas de brometo de potássio (200 mg) contendo a amostra na concentração de 1%. O espectro de IV está ilustrado na Figura 2, e apresenta as seguintes bandas características: 3452, 2933, 1747, 1730, 1653 e 1614 cm^{-1} .

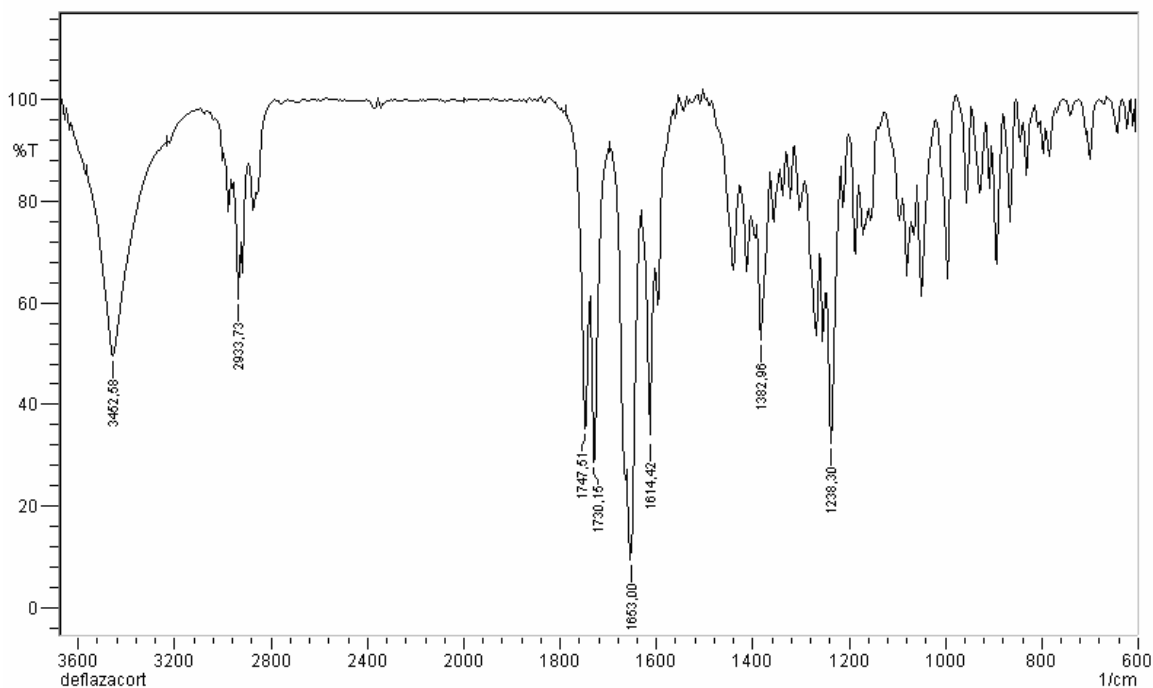


Figura 2 - Espectro na região do IV do deflazacort.

A banda larga na região de 3600 a 3200 cm^{-1} pode ser atribuída às vibrações de deformação axial dos grupos OH, enquanto que em 2933 cm^{-1} aparecem as bandas de deformação de ligação C-H. As bandas em 1747 e 1730 cm^{-1} podem ser atribuídas, respectivamente, aos grupamentos C=O não conjugados e conjugados. As bandas de deformação axial C=C encontram-se entre 1653 e 1612 cm^{-1} .

3.2.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A absorção de radiação ultravioleta (UV) ocorre numa faixa muito reduzida de comprimento de onda. Com isso, a absorção UV confere uma possibilidade menor para identificação de grupos funcionais em relação a outros métodos espectroscópicos como o infravermelho e a ressonância magnética nuclear. Contudo,

esse método é muito utilizado na identificação de substâncias, por ser um método simples, de fácil execução e com baixo custo (GOMES, 2003).

O espectro de absorção molecular do deflazacort, na região de 200-400 nm, foi obtido em espectrofotômetro UV/VIS, Milton Roy, modelo Spectronic Genesys 2, e foi realizado no Departamento de Farmácia Industrial da UFSM, utilizando solução etanólica do fármaco, na concentração de 12 µg/mL, e cubetas de quartzo com 1 cm de percurso ótico. Empregou-se etanol como branco.

No espectro de absorção obtido, apresentado na Figura 3, observa-se somente um máximo de absorção em 244 nm, o qual pode ser atribuído às transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ presentes na molécula do fármaco. Os fármacos esteroidais apresentam máximo de absorção de similar intensidade, em torno de 240 nm (WATSON, 1999).

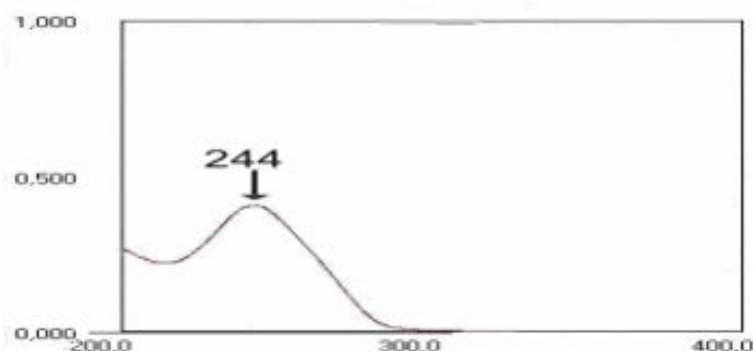


Figura 3 – Espectro de absorção molecular referente à solução etanólica de deflazacort, na concentração de 12 µg/mL.

3.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE constitui-se na técnica analítica mais empregada pelas indústrias farmacêuticas para análise de teor e de impurezas orgânicas (GIL et al., 2005). O emprego dessa técnica como método de identificação é, no entanto, menor, uma vez que é necessário padrão do fármaco para confiabilidade dos resultados. O uso do detector com arranjo de fotodiodos (DAD) permite, no entanto, indicar a pureza do pico cromatográfico eluído (WATSON, 1999).

As análises por CLAE foram realizadas conforme descrito no item 4.6.1 do Capítulo II, em cromatógrafo líquido Shimadzu SLC-10 AVP, no Departamento de

Farmácia Industrial da UFSM. O cromatograma da solução de deflazacort, na concentração de 30 µg/mL, encontra-se na figura 4. Através do detector de DAD verificou-se que o pico do deflazacort (com tempo de retenção de 3,43 minutos) apresentou pureza superior a 0,9999.

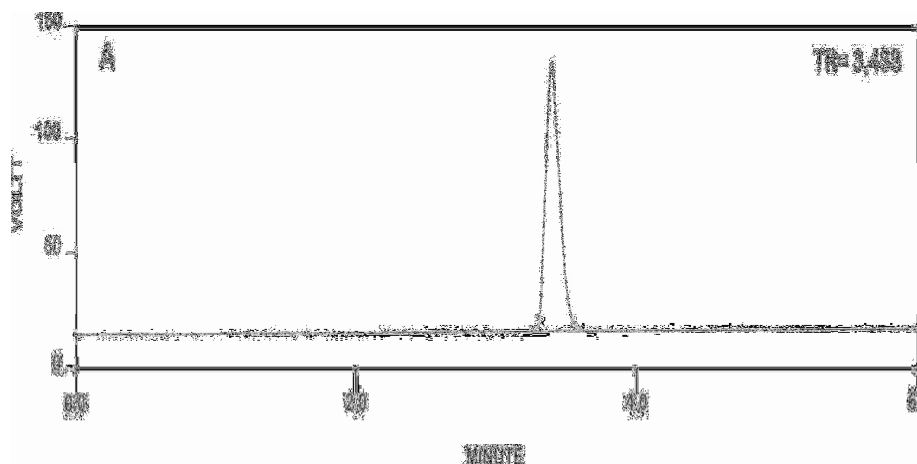


Figura 4 - Cromatograma da solução de deflazacort na concentração de 30 µg/mL. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex C₁₈ (250 x 4,6 mm d.i. x 5µm); fase móvel: acetonitrila e água (80:20) (V/V); vazão 1 mL/min; volume injetado: 20 µL; detecção: 244 nm.

3.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A DSC é o método de análise térmica amplamente utilizada para caracterização de matérias-primas e produtos acabados, na determinação do grau de pureza, e na realização de ensaios de estabilidade e cinética de decomposição (RODRIGUES et al., 2005). Fornece a temperatura e a entalpia de fusão.

A curva de DSC do deflazacort foi obtida em uma célula DSC-50 da Shimadzu, e foi realizada no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC, utilizando cápsulas de alumínio parcialmente fechadas com 2 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio (100 mL/min.) e razão de aquecimento de 10°C/min, na faixa de temperatura de 25 a 500 °C. O equipamento foi previamente calibrado com índio (ponto de fusão:156.6°C, entalpia de fusão = 28.54 J/g) e zinco (ponto de fusão 419.6 °C).

A curva de DSC do deflazacort (Figura 5) demonstra um primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura de 250 a 255 °C, com um consumo de energia de 116 J/g, característico da fusão do fármaco. Não foram encontrados na literatura

valores de entalpia de fusão para o deflazacort. Os valores de fusão foram semelhantes aos obtidos pelo método do bloco aquecido.

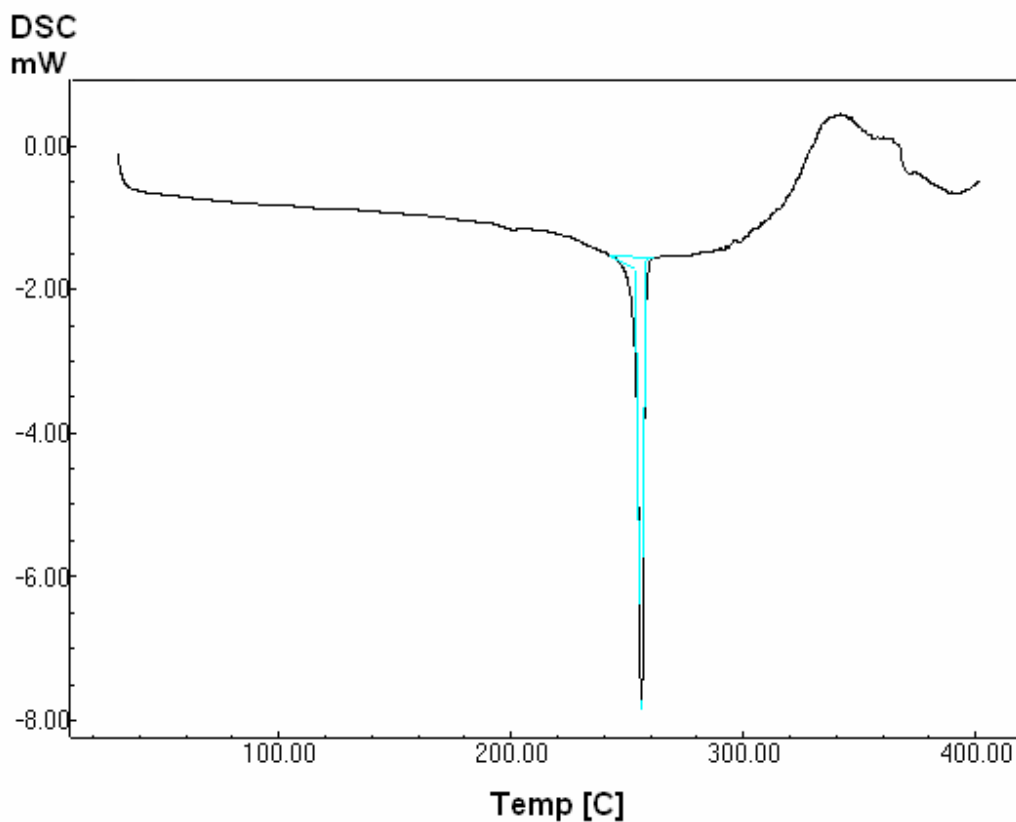


Figura 5 - Curva de calorimetria diferencial exploratória do deflazacort obtida em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) a 10 °C/min.

3.3 Conclusões

Os resultados obtidos nas análises realizadas indicaram a identidade e pureza da matéria-prima de deflazacort adquirida, permitindo a utilização da mesma como substância química de referência.

4 CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA

4.1 Introdução

O controle de qualidade tornou-se uma ferramenta imprescindível para a indústria farmacêutica, pois a partir dele pode-se garantir um medicamento seguro e eficaz. A confiabilidade dos resultados do controle de qualidade de medicamentos é alcançada através da validação dos métodos analíticos (SETHI, 1999).

Conforme a Resolução 899 (BRASIL, 2003a), a qual dispõe de um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Essa Resolução ainda ressalta que os equipamentos devem estar calibrados e os analistas devem ser qualificados e treinados.

A validação de um procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado para a análise pretendida (ICH, 2005). Segundo a USP 29 (2005) a validação é um processo no qual se estabelece, através de estudos de laboratório, que as características de desempenho do método satisfazem as exigências para a aplicação analítica pretendida.

O ICH (2005) divide os métodos analíticos em quatro categorias, incluindo os testes de identificação, os testes quantitativos de impurezas, testes para controle do limite de impurezas e os ensaios para determinação quantitativa, para avaliar potência (teor) do fármaco ou para verificação do perfil de dissolução de amostras específicas.

No presente trabalho a validação foi conduzida conforme o ICH (2005), USP 29 (2005) e RESOLUÇÃO 899 (BRASIL, 2003a). Os parâmetros analíticos que devem ser determinados durante a validação dos métodos de análise incluem a linearidade, a precisão, a exatidão, a especificidade, os limites de detecção e quantificação e a robustez.

4.2 Métodos de quantificação

Não existe método oficial para determinar deflazacort em matéria-prima e forma farmacêuticas e apenas um método foi encontrado na literatura para análise desse fármaco nas formas disponíveis. Em fluidos biológicos a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido empregada por alguns autores.

Bernareggi e colaboradores (1987) realizaram a determinação simultânea de dois metabólitos do deflazacort em plasma humano utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e detector ultravioleta.

Santos-Montes e colaboradores (1994) realizaram a extração e separação por CLAE do deflazacort e seu metabólito 21 hidroxideflazacort em amostras de urina, usando dois métodos cromatográficos: Método A) fase móvel: água:tetrahidrofurano (80:20, V/V), vazão 1,2 mL/minuto, volume de injeção 20 µL, coluna: Spherisorb 5-ODS, a uma temperatura 20°C e detecção em UV a 245 nm; Método B) fase móvel :água:tetrahidrofurano (77:23, V/V), vazão:1,0 mL/minuto, volume de injeção 20 µL,coluna:Hypersil 5-ODS, temperatura 30°C e detecção em UV a 245 nm.

Santos-Montes e colaboradores (1999), utilizando cromatografia líquida micelar, separaram mistura complexa de corticóides naturais e sintéticos. As condições utilizadas foram, fase móvel: dodecil sulfato de sódio com butanol, acetonitrila e tetrahidrofurano, vazão: 0,5 mL/minuto, coluna C₁₈ Hypersil, temperatura de 30 – 60°C e detecção a 245 nm.

Özkan e colaboradores (2003) realizaram estudos de dissolução de deflazacort e determinação deste em comprimidos e soro humano por cromatografia líquida em fase reversa. Na separação foi utilizada uma coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm) e fase móvel constituída de acetonitrila e metanol e tampão fosfato 0,067 M (27:20:53, V/V/V), ajustando o pH 6,5 com NaOH 3M. O volume injetado foi de 20µL e detecção em 244 nm.

Neste capítulo serão apresentados os métodos desenvolvidos por CLAE, espectrofotometria na região do UV e espectrofotometria na região do visível, os quais foram desenvolvidos e validados para determinação quantitativa do deflazacort em comprimidos e cápsulas manipuladas.

4.3 Produtos farmacêuticos

- Comprimidos contendo 30 mg de deflazacort, com o nome comercial de Flazal[®], produzidos pela Neo Química, com o lote número 53825, com data de fabricação de setembro de 2004 e data de validade de setembro de 2006.

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

- Cápsulas manipuladas pela farmácia Nova Derme, contendo 30 mg de deflazacort, com lote número 4821/05N D401, data de manipulação: maio de 2005 e preparação extemporânea.

Excipientes: estearato de magnésio, carboximetilcelulose, amido e lactose.

4.4 Substância Química de Referência

Como substância química de referência foi utilizada a matéria-prima deflazacort, conforme descrito no item 3.2 do capítulo I.

4.5 Reagentes e solventes

- Etanol, Tedia[®]
- Acetonitrila, Tedia[®]
- Água purificada
- Peróxido de hidrogênio, Belga Química[®]
- Azul de tretrazólio, Vetec
- Hidróxido de tetrametilamônio, Merck[®]
- Ácido clorídrico, Merck[®]
- Hidróxido de sódio, Merck[®]

4.6 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica, Sartoris®
- Banho de ultra-som, Thornon®
- Bomba de vácuo, Primar®
- Cromatógrafo líquido, Shimadzu equipado com controlador SCL-10 AD_{vp}, com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 AD_{vp}, injetor automático com com “loop” variável SIL-10 AD_{vp} e integrador automático computadorizado através do Software CLASS VP 5.0®
- Coluna cromatográfica Luna Phenomenex C₁₈ (250 x 4,6 mm d.i. x 5µm)
- Destilador, Biomatic®
- Espectrofotômetro, UV/VIS, Shimadzu®
- Espectrofotômetro, Milton Roy®
- Membrana filtrante de acetato de celulose, porosidade 0,45 µm, 13 mm, Sartorius®

4.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Este estudo teve por objetivo desenvolver e validar método através da CLAE para análise quantitativa do deflazacort em matéria-prima e em formas farmacêuticas comprimidos e cápsulas manipuladas, uma vez que essa técnica não é relatada na literatura para determinação dessa substância nas formas farmacêuticas disponíveis. Conforme já mencionado, o deflazacort tem sido determinado em fluidos biológicos por CLAE com detector ultravioleta a 245 nm (SANTOS-MONTES et al., 1994; SANTOS-MONTES et al., 1999; ÖZKAN et al., 2003).

4.7.1 Validação do método analítico

Os parâmetros que foram avaliados na validação do método foram: linearidade, especificidade, precisão, robustez, exatidão e limite de detecção e limite de quantificação.

As condições cromatográficas estabelecidas para a análise do deflazacort estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método por CLAE.

Características	Descrição
Coluna	Luna Phenomenex C ₁₈ (250 x 4,6 mm d.i. x 5µm)
Fase móvel	Acetonitrila:água (80:20, V/V)
Vazão	1 mL/min
Comprimento de onda	240 nm
Volume injetado	20 µL

A fase móvel foi preparada a partir da mistura de acetonitrila e água, na proporção 80:20 (V/V). A fase móvel foi filtrada sob vácuo, através de membrana de nylon, com porosidade 0,45 µm e 47 mm de diâmetro.

As soluções das amostras e da SQR foram filtradas em membranas de celulose regeneradas com porosidade 0,45 µm e 13 mm de diâmetro, antes de serem analisadas.

A coluna foi previamente estabilizada, através da passagem de fase móvel durante 30 minutos, com vazão de 1 mL/min. Após a estabilização do sistema foram injetados 20 µL de SQR e amostras.

4.7.1.1 Especificidade

O ensaio de especificidade do método analítico foi avaliado através do estudo de degradação forçada da SQR, que foi submetida a hidrólise ácida, alcalina e oxidativa (SINGH & BAKSHI, 2000). No acompanhamento desse estudo de degradação forçada foram avaliados os seguintes parâmetros: pureza do pico e porcentagem da área referente ao deflazacort, realizada através do programa CLASS VP 6.14. Os espectros do deflazacort e dos produtos de degradação foram obtidos por detector com arranjo de fotodiodos (DAD), e foram traçados na faixa de 200 a 400 nm.

- Preparo da SQR nas condições normais (tempo zero)

Pesou-se, analiticamente, 20 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Completou-se o volume com acetonitrila, obtendo uma solução com concentração de 1000 µg/mL. Transferiu-se alíquota de 1,5 mL dessa solução para balão de 50 mL e completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se solução com concentração final de 30 µg/mL.

- Hidrólise ácida e alcalina

Pesou-se, analiticamente, 20 mg de SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se 10 mL de acetonitrila e 10 mL de HCl 0,1N, e em outro balão adicionou-se 10 mL de acetonitrila e 10 mL de NaOH 0,1N, obtendo-se soluções com concentração de 1000 µg/mL. Deixou-se em refluxo a 80°C, durante 4 horas. Após, transferiram-se alíquotas de 1,5 mL dessas soluções para balões volumétricos de 50 mL, acrescentando-se 1,5 mL de NaOH 0,1M e 1,5 mL de HCl 0,1N, os volumes foram completados com acetonitrila, obtendo-se soluções com concentrações teóricas de 30 µg/mL.

- Oxidação

Pesou-se, analiticamente, 20 mg de SQR e transferiu-se para balão de 20 mL. Adicionou-se 10 mL de acetonitrila e 10 mL de H₂O₂ 3%. Em balão volumétrico de 50 mL transferiu-se 1,5 mL dessa solução e completou-se o volume com acetonitrila. Foram realizadas análises imediatamente após a retirada das alíquotas e, após 4 horas, retirou-se 1,5 mL da solução inicial colocou-se em balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com acetonitrila, obtendo uma concentração de 30 µg/mL.

4.7.1.2 Linearidade: Curva de calibração

Para a obtenção da curva de calibração pesou-se, analiticamente, 25 mg da SQR e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume

com acetonitrila, obtendo-se uma solução com concentração de 250 µg/mL. A partir dessa solução foram transferidas alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL, com o auxílio de uma bureta, para balões volumétricos de 25 mL. Os volumes foram completados com fase móvel, obtendo-se soluções com concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL, respectivamente. As curvas foram preparadas em três dias diferentes.

4.7.1.3 Precisão

Foi determinado o peso médio de 20 cápsulas e de 20 comprimidos, conforme Farmacopéia Brasileira IV Edição (1988). O conteúdo das cápsulas foi misturado e os comprimidos foram triturados em gral até a formação de um pó homogêneo. Pesaram-se, dos pós, quantidades equivalentes a 15 mg de deflazacort e transferiram-se para balões volumétricos de 50 mL, com auxílio de 30 mL de acetonitrila. As soluções foram submetidas a ultra-som, por 15 minutos, e completaram-se os volumes com acetonitrila. As soluções foram filtradas e transferiram-se alíquotas de 5 mL para balões volumétricos de 50 mL e completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se soluções com concentração teórica de 30 µg/mL. Para ambas as amostras foram realizadas determinações no mesmo dia (n = 6), e em diferentes dias (n = 3).

Preparou-se, simultaneamente, uma solução de SQR contendo 30 µg/mL de deflazacort, em acetonitrila.

A concentração do deflazacort nas amostras foi determinada pela equação:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

C_A = Concentração de deflazacort na amostra

A_A = Área média absoluta da amostra

C_{SQR} = Concentração da SQR

A_{SQR} = Área média absoluta da SQR

O valor percentual de deflazacort nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

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

Onde:

C_A % = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de deflazacort encontrada na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_T = Concentração teórica de deflazacort na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

4.7.1.4 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da observação de modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: utilização de coluna de diferentes fabricantes (Luna, Phenomenex[®] para Hypersil[®]) com as mesmas condições especificadas, modificação no comprimento de onda, de 240 para 235 e 245 nm, modificação na vazão de 1,0 para 0,8 mL e alteração na fase móvel de 80:20 (acetonitrila e água) para 85:25 e 75:25. Para este ensaio foram preparadas soluções de deflazacort SQR, e amostras de cápsulas e comprimidos, na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, conforme item 4.6.1.3.

4.7.1.5 Exatidão (Teste de Recuperação)

A partir do pó das amostras preparado de acordo com item 4.6.1.3 quantidade equivalente a 10 mg de deflazacort e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, com o auxílio de 30 mL de acetonitrila. A solução foi submetida ao ultra-som, por 15 minutos. Completou-se o volume com acetonitrila e filtrou-se. Foram transferidas alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 50 mL, denominados R_1 , R_2 , R_3 . A cada balão volumétrico acrescentou-se, respectivamente, 1,0; 2,0 e 3,0 mL da solução contendo 20,0 $\mu\text{g/mL}$ de deflazacort SQR e completou-se o volume com

acetonitrila, obtendo-se soluções com concentrações finais de 24,0; 28,0 e 32µg /mL de deflazacort. Simultaneamente foram preparadas soluções das amostras e de SQR na concentração de 20,0 µg /mL de deflazacort, denominadas de A e SQR, respectivamente. A Tabela 3 representa, esquematicamente, o preparo das soluções para o teste de recuperação.

Tabela 3 - Preparo das soluções para o teste de recuperação do deflazacort nas amostras de comprimidos e cápsulas por CLAE.

Amostras	Volume (mL) da solução amostra (200,0 µg/mL)	Volume (mL) da solução de SQR (200,0 µg/mL)	Concentração final (µg/mL)
A	5,0	-	20,0
R ₁	5,0	1,0	24,0
R ₂	5,0	2,0	28,0
R ₃	5,0	3,0	32,0
SQR	-	5,0	20,0

As percentagens de recuperação (R%) do deflazacort SQR foram calculadas pela seguinte equação, segundo a AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1990):

$$R\% = [(C_A - C_{NA}) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Onde:

C_A = concentração de deflazacort encontrado na amostra adicionada de SQR

C_{NA} = concentração de deflazacort encontrado na amostra não adicionada de SQR

C_{SQR} = concentração da SQR adicionada à amostra

4.7.1.6 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

Os LQ e LD teóricos foram calculados a partir das fórmulas descritas no ICH (2005), baseadas no desvio padrão do intercepto (σ) e na inclinação da curva de calibração (IC), empregando as equações a seguir:

$\text{LQ} = \frac{10 \sigma}{\text{IC}}$	$\text{LD} = \frac{3,3 \sigma}{\text{IC}}$
---	--

4.7.2 Resultados e discussão

No desenvolvimento do método por CLAE utilizou-se coluna cromatográfica C₁₈, por ser amplamente utilizada em laboratórios farmacêuticos de controle de qualidade e permitir a utilização das fases móveis sem tampões os quais são danosos as colunas. Nesse sentido, diversas fases móveis foram elaboradas metanol:água, acetonitrila:água em diferentes proporções e utilizadas para a execução do método analítico.

Os resultados não foram satisfatórios, pois não se obteve reprodutibilidade entre as áreas e os tempos de retenção, além de obter picos não simétricos nas condições avaliadas.

Testou-se, então, acetonitrila e água como solventes, em várias proporções. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e água (80:20 V/V), a qual mostrou-se mais adequada, proporcionando um tempo de retenção reprodutível de, aproximadamente, 3,4 minutos, obtendo-se boa eficiência (prato teóricos > 3000) e picos simétricos (< 2). Não foram observadas interferências de solventes, impurezas ou excipientes nos cromatogramas, conforme Figura 6.

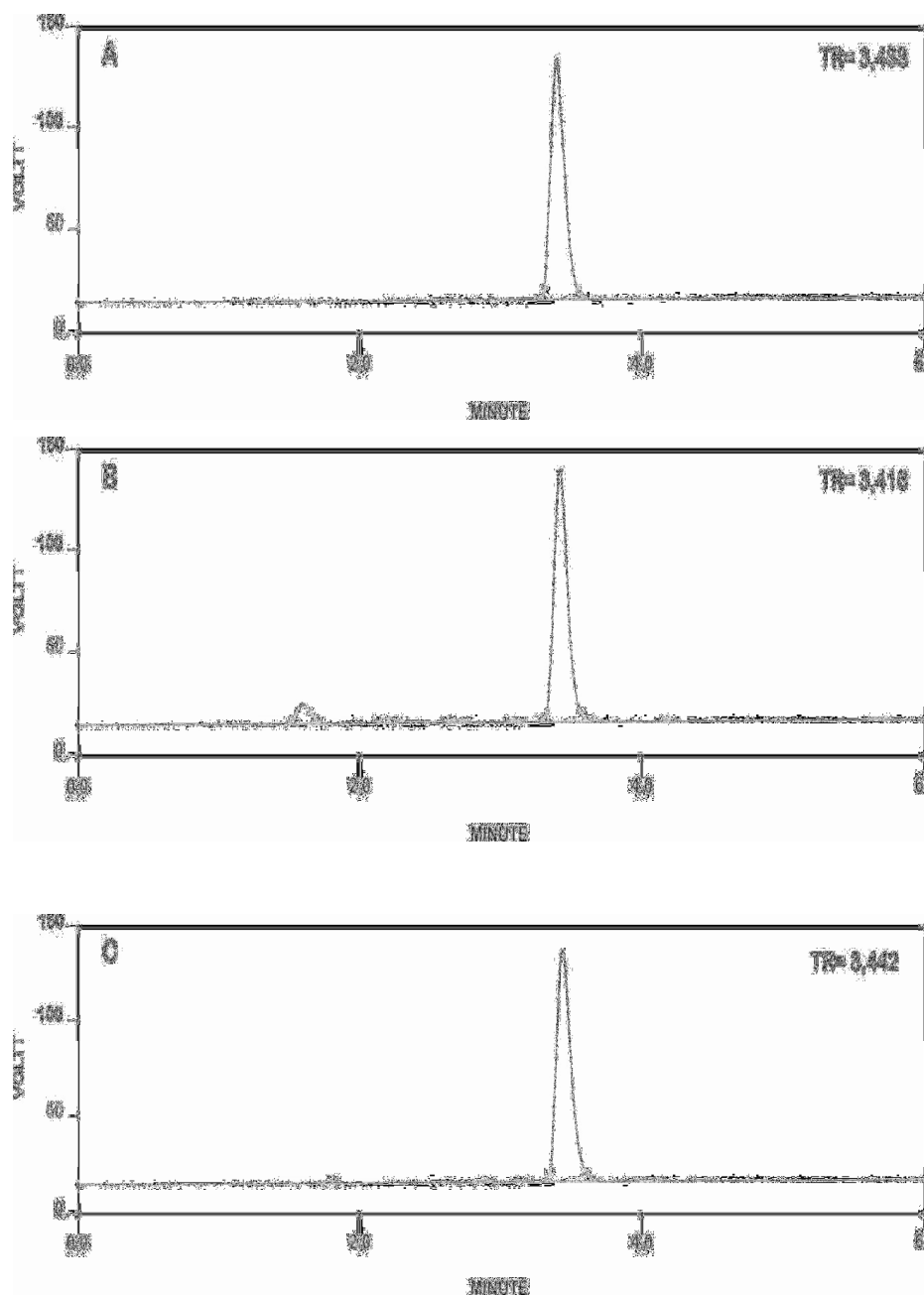


Figura 6 – Cromatogramas obtidos por CLAE para deflazacort SQR (A), comprimidos (B) e cápsulas manipuladas (C), para as soluções com concentração de 30 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex C_{18} (250 x 4,6 mm d.i. x 5 μm); fase móvel: acetonitrila e água (80:20) (V/V); vazão 1 mL/min; volume injetado: 20 μL . Detecção: 240 nm.

A especificidade do método analítico foi avaliada através da degradação forçada em meio ácido, básico e oxidativo. Os cromatogramas das soluções no tempo zero (solução imediatamente após ser submetida à degradação) e após o período de degradação de 4 horas estão ilustrados na Figura 7.

Na condição ácida testada (ácido clorídrico 0,1N) observou-se a formação de um pico adicional em 2,8 minutos já no tempo zero (solução imediatamente após ser

submetida à degradação). Houve um aumento da área absoluta desse em função do tempo e um decréscimo da área absoluta do pico do deflazacort. Após 4 horas, este representava 91% da área referente ao pico no tempo zero.

Em meio básico (hidróxido de sódio 0,1N) houve a formação de um pico adicional em 3,0 minutos. Houve um aumento da área desse em função do tempo, igualmente ocorreu com a área absoluta do pico do deflazacort. Após 4 horas, a área absoluta do deflazacort representava somente 25,6% da área original do pico em tempo zero.

A estabilidade do deflazacort em meio oxidativo foi avaliada em peróxido de hidrogênio à 3%. Nessas condições houve formação de pico adicional em 2,6 minutos, que é o pico correspondente ao peróxido de hidrogênio, não havendo modificação na área absoluta do pico do deflazacort (3,4 min) em relação ao tempo zero. Decorridos 4 horas de degradação, esse representava 99,32% da área original do pico em tempo zero.

Conforme pode ser observado nos cromatogramas obtidos de degradação acelerada, os picos em 2,8 min e 3,0 min encontram-se bem resolvidos em relação ao pico referente ao deflazacort. Utilizando-se o detector de diodos, pode-se verificar que a SQR permaneceu com elevada pureza em todas as determinações. Os picos obtidos da degradação não interferiram na resolução do pico do deflazacort. Sugere-se que o método possui especificidade, podendo ser indicativo de estabilidade.

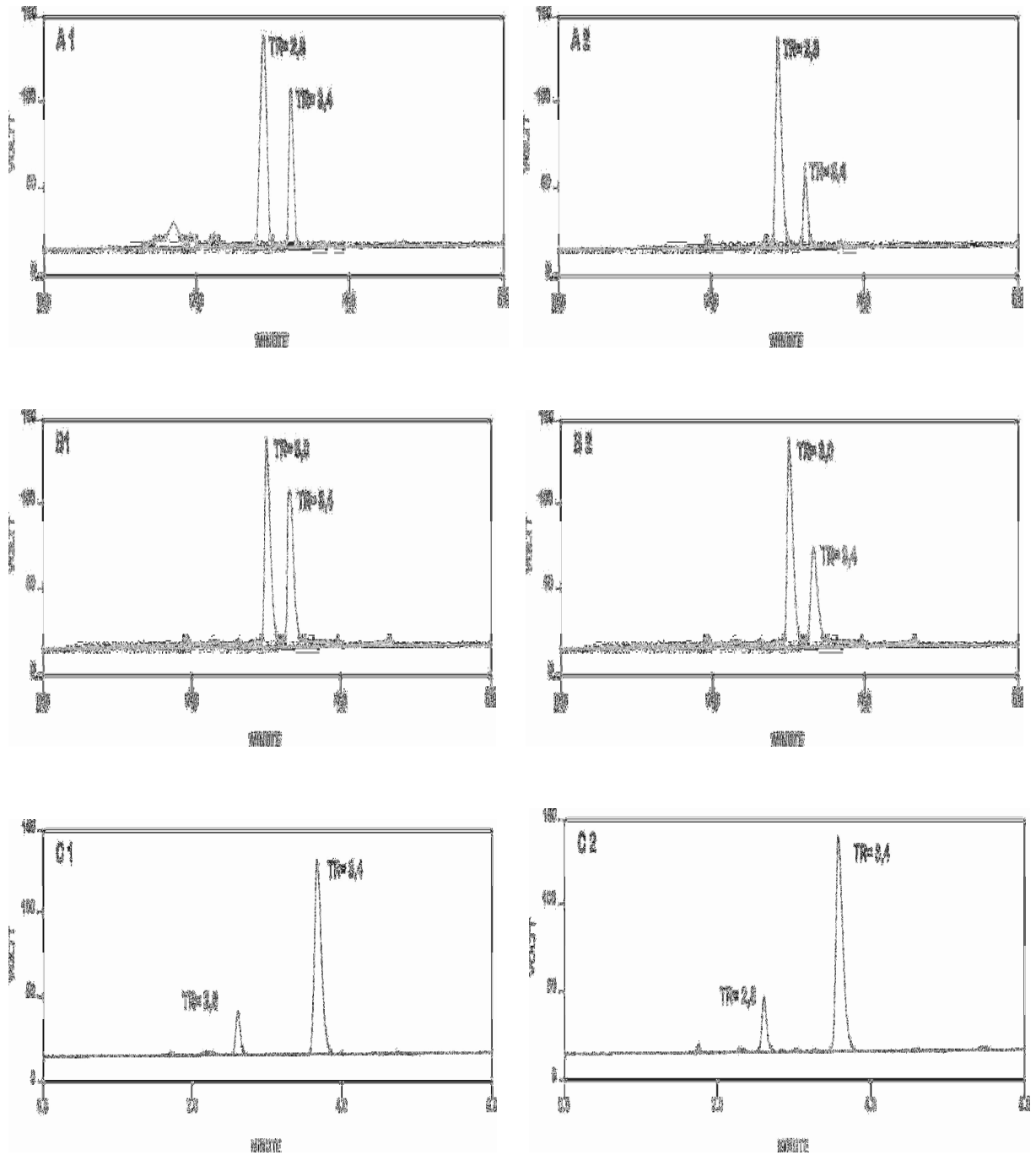


Figura 7 – Cromatograma do estudo de degradação forçada da SQR de deflazacort (concentração=30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em meio ácido HCl 0,1N; tempo zero (A1) e após 4 horas (A2); em meio básico NaOH 0,1 N tempo zero (B1) e 4 horas (B2) e em meio oxidativo H_2O_2 3% tempo zero (C1) e 4 horas (C2). Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex C_{18} (250 x 4,6 mm d.i. x 5 μm); fase móvel: acetonitrila e água (80:20) (V/V); vazão 1 mL/min; volume injetado: 20 μL . Detecção: 240 nm.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade do método demonstraram que as soluções de deflazacort SQR apresentaram correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações, nos intervalos utilizados. Gráficos de concentração *versus* áreas absolutas foram plotados e demonstram boa linearidade na faixa de concentração de 10,0 a 50,0 µg/mL (Figura 8). A equação da reta para o método foi: $y = 38038x + 12598$ com coeficiente de correlação superior a 0,9999. A Tabela 4 apresenta as áreas absolutas correspondentes a cada uma das diluições de deflazacort SQR para as três curvas padrão construídas. A análise da variância (ANOVA) realizada sobre os valores de áreas absolutas da curva de calibração do deflazacort, apresentados na Tabela 5, demonstra que a regressão linear foi significativa ($P \leq 0,05$), não havendo desvio da linearidade.

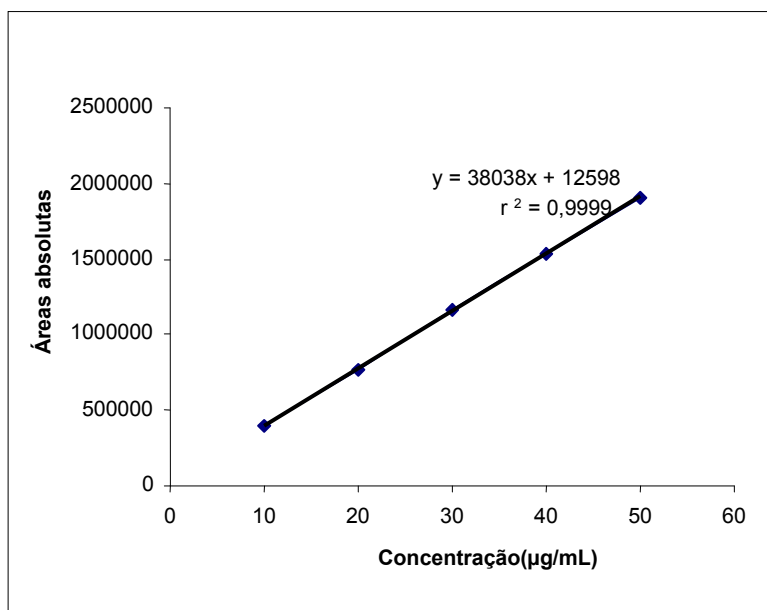


Figura 8 – Representação gráfica da curva de calibração do deflazacort obtida por CLAE.

Tabela 4 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do deflazacort por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Áreas absolutas			Média \pm e.p.m	CV%
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
10	388992	392987	389822	390600 \pm 1218	0,54
20	770332	778584	768484	772466 \pm 3108	0,70
30	115938	115956	115446	115780 \pm 167,2	0,25
40	153635	153986	153833	153818 \pm 101,7	0,11
50	188349	195466	189078	190964 \pm 1103	2,00

CV% = coeficiente de variação percentual
e.p.m = erro padrão da média

Tabela 5 – Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, do deflazacort por CLAE.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	10 - 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$
Equação: $y = bx + a$	$y = 38038 x + 12598$
Inclinação (b) \pm desvio padrão	38038 \pm 11053
Inclinação (a) \pm desvio padrão	12598 \pm 705
Coeficiente de correlação (r)	0,9999
Análise da variância	
Regressão linear	13.754 (4,96)*
Desvio da linearidade	0,20 (3,71)*

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P \leq 0,05$

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (inter-dias). Os valores experimentais médios obtidos para a determinação do deflazacort nas amostras analisadas no primeiro dia foi de 97,64% para comprimidos e 99,45% para cápsulas. Nas análises realizadas no segundo e terceiro dias obteve-se 99,81% e 97,69% para comprimidos e 99,84% e

100,16% para cápsulas, respectivamente (Tabelas 6 e 7). Verificou-se por ANOVA que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos diferentes dias. Os valores de F calculados foram 3,68 e 0,68, respectivamente, para comprimidos e cápsulas (F tabelado: 4,26).

Tabela 6 – Valores experimentais referentes a determinação de deflazacort em comprimidos por CLAE para avaliação da precisão intra e inter-dias.

Amostras	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	(%)	(%)	(%)
1	96,72	99,62	97,69
2	97,00	99,61	97,60
3	97,60	99,90	98,69
4	96,22		
5	97,89		
6	100,45		
% média intra-dias \pm e.p.m.	97,64 \pm 0,61	99,81 \pm 0,09	97,69 \pm 0,32
CV%	1,53	0,16	0,56
% média inter-dia \pm e.p.m.		98,38 \pm 0,71	
CV%		1,25	
Análise da variância			
Inter-dias	3,68 (4,26)*		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P \leq 0,05$
e.p.m.= erro padrão da média

Tabela 7 – Valores experimentais referentes a determinação de deflazacort em cápsulas por CLAE para avaliação da precisão intra e inter-dias.

Amostras	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	(%)	(%)	(%)
1	99,80	99,55	100,00
2	98,89	101,71	99,98
3	99,42	98,28	100,50
4	99,61		
5	99,07		
6	99,91		
% média intra-dias \pm e.p.m.	99,45 \pm 0,16	99,84 \pm 1,00	100,16 \pm 0,17
CV%	0,40	1,70	0,29
% média inter-dia \pm e.p.m.		99,81 \pm 0,20	
CV%		0,35	
Análise da variância			
Inter-dias	0,68 (4,26)*		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P \leq 0,05$
e.p.m.= erro padrão da média

Na avaliação da robustez observou-se que mudando as condições cromatográficas como coluna, comprimento de onda, vazão e proporção da fase móvel para os comprimidos (Tabela 8) e cápsulas (Tabela 9) obteve-se um CV inferior a 2%. Quando houve a troca da coluna houve uma mudança no tempo de retenção de 3,4 para 3,8 minutos. Também houve mudanças no tempo de retenção quando se alterou a fase móvel para 85:15 (tempo de retenção 3,2 min.) e 75:25 (tempo de retenção mudou para 3,6 min) e o fluxo(tempo de retenção 4,2 min). Em ambos os casos o perfil cromatográfico não sofreu alterações significativas. Não houve alteração no tempo de retenção com a variação do comprimento de onda.

Quando avaliados os teores, após as modificações nas condições cromatográficas, observa-se que os mesmos não tiveram alterações significativas sendo o CV inferior a 2%.

Conforme os resultados obtidos, pode-se afirmar que o método é robusto, pois permitiu a quantificação do deflazacort apesar das variações aplicadas ao método analítico.

Tabela 8 - Avaliação da robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência através da determinação de deflazacort em comprimidos.

Condição	Teor		CV
	mg	%	
Método proposto ^a	29,33	97,79	
Fase móvel (85:15)	30,97	97,96	0,12
Fase móvel (75:25)	29,55	98,52	0,52
Vazão 0,8 mL	29,55	98,51	0,52
Coluna Hypersil [®]	29,73	99,13	0,95
λ 235 nm	29,34	97,82	0,02
λ 245 nm	29,17	97,25	0,38

^a Fase móvel: acetonitrila/água (80:20, V/V); vazão: 1,0 mL; Coluna Luna, Phenomenex[®]; Detecção: 240nm

Tabela 9 - Avaliação da robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência através da determinação de deflazacort em cápsulas.

Condição	Teor		CV
	mg	%	
Método proposto ^a	30,14	100,47	
Fase móvel (85:15)	29,93	99,79	0,25
Fase móvel (75:25)	29,97	99,90	0,49
Vazão 0,8 mL	29,92	99,76	0,51
Coluna Hypersil [®]	29,92	99,74	0,51
λ 235 nm	30,03	100,11	0,25
λ 245 nm	29,99	99,99	0,38

^a Fase móvel: acetonitrila/água (80:20, V/V); vazão: 1,0 mL; Coluna Luna, Phenomenex[®]; Detecção: 240nm

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação, cujos valores estão apresentados na Tabela 10, sendo que a média das recuperações foi de 100,52% e 97,63% para cápsulas e comprimidos, respectivamente, demonstrando que o método apresentou exatidão adequada.

Tabela 10 – Valores experimentais no teste de recuperação realizado em amostras de comprimidos e cápsulas de deflazacort por CLAE.

Amostras	Quantidade de (SQR)		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada	Recuperada		
Comprimidos	4,00	3,98	99,50	97,63
	8,00	7,86	98,25	
	12,00	11,42	95,16	
Cápsulas	4,00	4,11	102,75	100,52
	8,00	7,98	99,75	
	12,00	11,89	99,08	

A sensibilidade do método foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de deflazacort no sistema cromatográfico empregado. Os valores obtidos para o LD e LQ, Tabela 11, indicam que o método é sensível, pois os valores foram inferiores a 1 µg/mL.

Tabela 11 - Valores obtidos para determinação de limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) de deflazacort por CLAE.

Parâmetro analítico	Deflazacort
LD (µg/mL)	0,18
LQ (µg/mL)	0,55

O método empregado mostrou-se adequado, apresentando especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, podendo ser empregado para o controle de qualidade de deflazacort em comprimidos e cápsulas.

4.8 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A espectrofotometria na região do UV tem sido utilizada nos laboratórios para o controle de qualidade, por ser de baixo custo e de fácil execução.

As condições experimentais desenvolvidas para análise do deflazacort, pelo método espectrofotométrico na região do UV, encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Condições experimentais utilizadas para a execução do método por espectrofotometria na região do UV.

Características	Descrição
Diluyente	Etanol
Cubeta	Quartzo com 1 cm de percurso ótico
Comprimento de onda	244 nm

4.8.1 Validação do método analítico

Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção e quantificação (ICH, 2005; USP 29, 2005).

4.8.1.1 Especificidade

Avaliou-se a possível interferência dos excipientes na determinação do deflazacort. Soluções de amostras simuladas dos excipientes (ASE) contidos nas cápsulas e comprimidos foram preparadas em diluições equivalentes à SQR, (12 µg/mL em etanol), conforme Tabela 13. A seguir foram traçados espectros de absorção destas soluções na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

Tabela 13 - Composição em percentual da amostra simulada dos excipientes.

Excipiente	Comprimidos^a	Cápsulas^b
Amido pré-gelatinizado	20	20
Dióxido de silício	2	-
Celulose microcristalina	1	-
Estearato de magnésio	1	1
Lactose	74	59
Carboximetilcelulose	-	20

^aDeterminadas de acordo com as especificações de concentrações percentuais médias descritas para cada excipiente (KIBBE,2000).

^bInformação obtida do fornecedor.

4.8.1.2 Preparo da Curva de Ringbom

A construção da curva de Ringbom tem por finalidade determinar a faixa de concentração do fármaco em que o método apresenta linearidade.

Pesou-se analiticamente, 30 mg de deflazacort SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, com o auxílio de 30 mL de etanol. Após 15 minutos em banho de ultra-som, o volume foi completado com o mesmo solvente, obtendo-se uma solução com concentração de 120 µg/mL. A partir desta solução foram transferidas, alíquotas com o auxílio de uma bureta, para balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com etanol. A curva foi construída com 14 pontos, com concentrações variando de 3 a 42 µg/mL. As leituras de transmitância foram realizadas em 244 nm, utilizando etanol como branco. A curva de Ringbom foi obtida plotando-se os valores de 100% T em função da concentração, em escala logarítmica.

4.8.1.3 Linearidade: Curva de calibração

Uma solução de deflazacort SQR equivalente a 120 µg/mL foi preparada em etanol. A partir dessa solução foram transferidas alíquotas de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mL, com o auxílio de uma bureta, para balões volumétricos de 20 mL. Os

volumes foram completados com etanol, obtendo-se soluções com concentrações de 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0; 21,0 e 24,0 $\mu\text{g/mL}$. As leituras foram efetuadas em 244 nm, utilizando etanol como branco. Com os valores obtidos das absorvâncias em função da concentração do deflazacort foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da reta da curva de calibração. As curvas foram preparadas em três dias diferentes.

4.8.1.4 Precisão

Pesaram-se dos pós dos comprimidos e das cápsulas (preparados conforme item 4.6.1.3), quantidades equivalentes a 30 mg de deflazacort os quais foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL, com o auxílio de 30 mL de etanol. As soluções foram submetidas ao ultra-som, por 15 minutos, e após, completou-se os volumes com etanol. As soluções foram filtradas em filtro quantitativo. Dessa solução retirou-se 2 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se uma solução com concentração de 12 $\mu\text{g/mL}$. Para ambas as amostras foram realizadas determinações no mesmo dia ($n=6$) e em diferentes dias ($n=3$). O etanol foi utilizado como branco. Preparou-se, simultaneamente, uma solução com a SQR, na concentração de 12 $\mu\text{g/mL}$.

A concentração do deflazacort nas amostras foi determinada utilizando as equações descritas no item 4.6.1.3.

4.8.1.5 Exatidão (Teste de recuperação)

Foram preparadas soluções, em etanol, de deflazacort SQR e das amostras dos produtos farmacêuticos (comprimidos e cápsulas), ambas na concentração teórica de 300 $\mu\text{g/mL}$.

Alíquotas de 1 mL das soluções das formas farmacêuticas (comprimidos e cápsulas) foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, os quais foram denominados de R_1 , R_2 e R_3 . Da solução de deflazacort SQR foram retiradas alíquotas de 1,0 mL; 2,0 mL e 3,0 mL e adicionadas, respectivamente, aos balões R_1 , R_2 e R_3 . Os balões volumétricos de 50 mL foram completados com etanol,

obtendo-se concentrações teóricas de 12,0; 18,0 e 24 µg/mL. Simultaneamente, foram preparadas soluções das amostras e da substância química de referência na concentração de 6 µg/mL de deflazacort, denominados A e SQR, respectivamente, conforme Tabela 14. O etanol foi utilizado como branco e as leituras foram efetuadas em 244 nm.

As percentagens de recuperação do deflazacort SQR foram calculadas conforme descrito no item 4.6.1.5.

Tabela 14 - Preparo das soluções para o teste de recuperação do deflazacort, nas amostras de comprimidos e cápsulas, utilizando a espectrofotometria na região do UV.

Amostras	Volume (mL) da solução amostra (300,0 µg/mL)	Volume (mL) da solução de SQR (300,0 µg/mL)	Concentração final (µg/mL)
A	1,0	-	6,0
R ₁	1,0	1,0	12,0
R ₂	1,0	2,0	18,0
R ₃	1,0	3,0	24,0
SQR	-	1,0	6,0

4.8.1.6 Limite de quantificação e de detecção

Foram calculados conforme o ICH (2005), baseados no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Os valores teóricos do LD e LD foram calculados conforme descritos no item 4.6.1.6.

4.8.2 Resultados e discussão

Para esse estudo avaliou-se o espectro de absorção do deflazacort em diferentes solventes, como etanol, metanol e ácido clorídrico. O deflazacort, em etanol, tem seu máximo de absorção em 244 nm (Figura 9). Os espectros das amostras de comprimidos e cápsulas demonstram o mesmo máximo de absorção que a SQR.

O etanol foi o solvente escolhido devido à solubilidade do fármaco nesse solvente, à menor toxicidade desse solvente, quando comparado ao metanol, e por não ter sido verificada interferência dos excipientes (Figura 9).

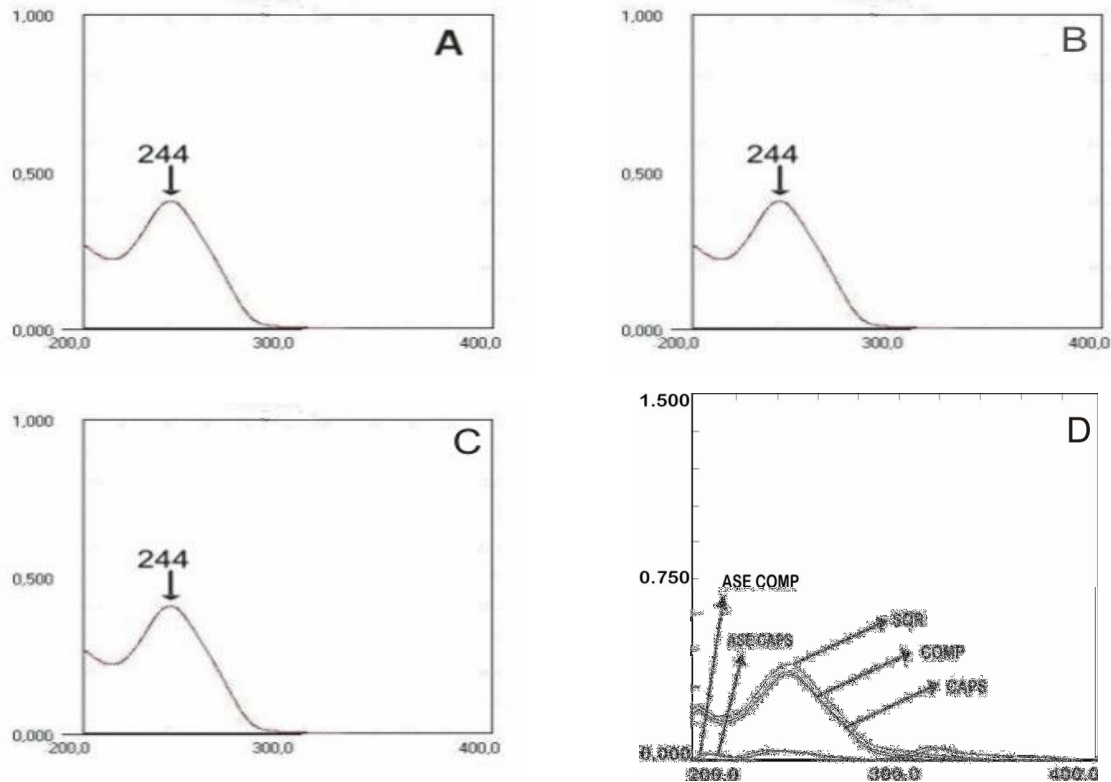


Figura 9 - Espectro de absorção de 200 a 400 nm da SQR de deflazacort (A), comprimidos (B), cápsulas (C) e sobrepostos (D), todos com concentração de 12 $\mu\text{g/mL}$.

A curva de Ringbon, representada na figura 10, foi estabelecida na faixa de concentração de 3 a 42 $\mu\text{g/mL}$. A partir dessa curva observou-se que houve linearidade na faixa de 6 a 24 $\mu\text{g/mL}$, obedecendo a Lei de Lambert-Beer.

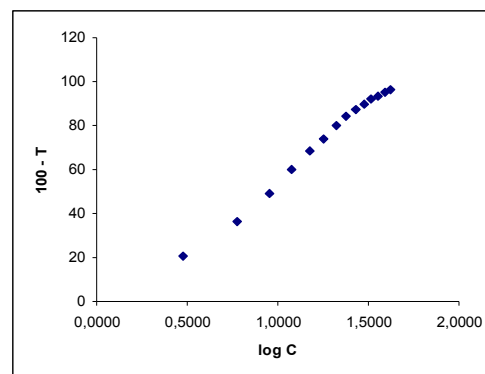


Figura 10 - Curva de Ringbon obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para o deflazacort em etanol, a 244 nm.

Foram desenvolvidas curvas em três diferentes dias, sendo calculadas as absorvâncias médias obtidas para traçar uma curva de calibração (Tabela 15), cuja representação encontra-se na Figura 11.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as soluções de deflazacort SQR apresentaram correlação entre absorvância e concentração, nos intervalos utilizados. A equação da reta para o método foi de $y = 0,034 x + 0,0089$, com coeficiente de correlação de 0,9998. A análise da variância (ANOVA) demonstra que a regressão linear foi significativa e não houve desvio significativo da linearidade ($P = 0,05$) conforme Tabela 16. Os resultados obtidos conferem a validade do método desenvolvido em termos de linearidade.

Tabela 15– Valores de absorvâncias obtidas para elaboração da curva de calibração do deflazacort por espectrofotometria na região do UV, a 244 nm.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias			Média	CV%
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
6	0,211	0,208	0,216	0,211	1,90
9	0,319	0,314	0,314	0,315	0,91
12	0,415	0,416	0,410	0,413	0,77
15	0,515	0,528	0,521	0,521	1,24
18	0,609	0,624	0,620	0,617	1,25
21	0,714	0,734	0,721	0,723	1,40
24	0,824	0,841	0,833	0,832	1,02

CV% - coeficiente de variação percentual

Tabela 16 - Resultado da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	6 - 24 µg /mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,034x + 0,0089$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,0343 \pm 0,0089$
Inclinação (a) ± desvio padrão	$0,0089 \pm 0,0095$
Coeficiente de correlação (r)	0,9998
Análise da variância	
Regressão linear	6,938 (4,96)*
Desvio da linearidade	0,61 (3,71)*

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$

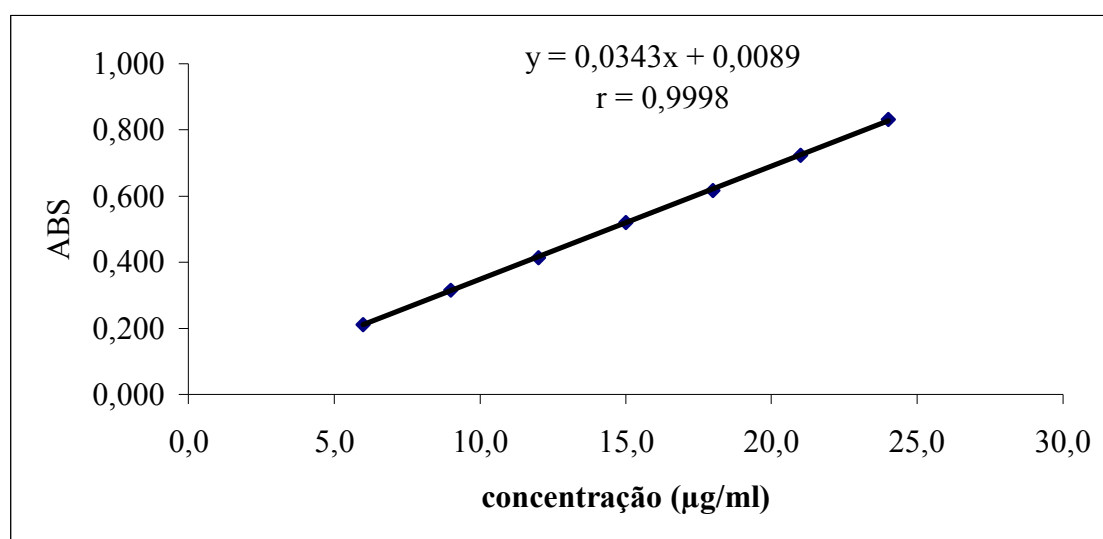


Figura 11 – Representação gráfica da curva de calibração do deflazacort obtida através do método espectrofotométrico na região do UV.

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). O valor experimental obtido para o deflazacort nas amostras analisadas no mesmo dia, sob as condições experimentais foi de 97,17% e 97,82% para comprimidos e cápsulas, respectivamente, com CV de 1,1% e 0,6%. Nas análises realizadas no segundo e terceiro dia, obteve-se 97,23% e 97,32% para comprimidos e 97,98% e 97,06% para cápsulas. Os coeficientes de

variação obtidos (< 2) confirmam a precisão do método analítico. A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as análises realizadas na avaliação da precisão do método (Tabela 17 e 18).

Tabela 17 – Valores experimentais obtidos para determinação do deflazacort nas amostras de comprimidos através da espectrofotometria na região do UV para avaliação da precisão intra e inter-dias.

Amostras	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	(%)	(%)	(%)
1	97,50	97,08	97,08
2	96,60	98,03	97,08
3	98,20	96,60	97,80
4	95,60		
5	98,50		
6	96,60		
% média intra-dias \pm e.p.m.	97,17 \pm 0,45	97,23 \pm 0,42	97,32 \pm 0,24
CV%	1,10	0,70	0,40
% média inter-dia \pm e.p.m.		97,24 \pm 0,04	
CV%		0,07	
Análise da variância			
Inter-dias	0,03 (4,26)*		

*Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P \leq 0,05$
e.p.m. = erro padrão da média

Tabela 18 - Valores experimentais obtidos para determinação do deflazacort nas amostras de cápsulas através da espectrofotometria na região do UV para avaliação da precisão intra e inter-dias.

Amostras	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	(%)	(%)	(%)
1	97,56	96,80	96,80
2	97,32	97,00	98,70
3	98,03	97,30	98,20
4	97,09		
5	98,70		
6	98,27		
% média intra-dias \pm e.p.m.	97,82 \pm 0,24	97,06 \pm 0,14	97,98 \pm 0,56
CV%	0,63	0,25	1,00
% média inter-dia \pm e.p.m.		97,62 \pm 0,28	
CV%		0,5	
Análise da variância			
Inter-dias	1,73 (4,26)*		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P \leq 0,05$
e.p.m. = erro padrão da média

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação, cujos valores estão apresentados na Tabela 19. A média das recuperações foi de 100,70% para comprimidos e 100,52% para cápsulas, demonstrando que o método apresentou exatidão adequada.

Tabela 19 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação realizado em amostras de comprimidos e cápsulas de deflazacort por espectrofotometria na região do UV, a 244 nm.

Amostras	Quantidade de (SQR)		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada	Recuperada		
Comprimidos	6,00	6,06	101,00	100,70
	12,00	12,05	100,70	
	18,00	18,12	100,60	
Cápsulas	6,00	5,91	98,50	100,20
	12,00	12,17	101,41	
	18,00	17,89	100,77	

A sensibilidade do método foi avaliada pela determinação dos limites de quantificação e (LQ) e de detecção (LD) de DFZ. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 20, indicando boa sensibilidade do método, pois os valores foram inferiores a 1µg/mL.

Tabela 20 - Valores obtidos para determinação de limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) de deflazacort através da espectrofotometria na região do UV.

Parâmetro analítico	Deflazacort
LD (µg/mL)	0,12
LQ (µg/mL)	0,37

O método apresentado mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, precisão, linearidade e exatidão, podendo ser usado tanto para fins de quantificação como de identificação de deflazacort em comprimidos e cápsulas.

4.9 Espectrofotometria na região do visível

A espectrofotometria na região do visível é um método que pode ser utilizado nos laboratórios para o controle de qualidade, pois é de baixo custo e requer equipamentos de menor custo e de fácil execução.

O desenvolvimento desse método foi adaptado a partir do doseamento geral para esteróides descrito na Farmacopéia Americana (USP, 2005).

As condições experimentais otimizadas para análise do deflazacort, através do método espectrofotométrico na região do visível, encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21 - Condições experimentais utilizadas para a execução do método por espectrofotometria na região do visível.

Características	Descrição
Diluyente	etanol
Reagentes	azul de tetrazólio 0,5% em metanol (2 mL) hidróxido de tetrametilamônio a 10% em metanol (2 mL)
Comprimento de onda	519 nm
Cubeta	quartzo com 1 cm de percurso ótico

4.9.1 Validação do método analítico

Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, e limite de quantificação e de detecção.

4.9.1.1 Especificidade

Para a avaliação da especificidade foi preparada uma solução SQR de deflazacort, na concentração de 8 µg/mL, conforme item 4.8.1.3. Soluções de amostras simuladas de excipientes contidos nos comprimidos e nas cápsulas foram preparadas em diluições equivalentes à SQR, conforme Tabela 13. Em seguida foram traçados os espectros de absorção dessas soluções nas faixas de

comprimento de onda de 400 a 800 nm, para avaliar a possível interferência dos excipientes na determinação do deflazacort.

4.9.1.2 Linearidade: Curva de calibração

Pesou-se, analiticamente, 12,5 mg de SQR, e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com etanol, obtendo-se uma solução de 250 µg/mL. A partir dessa solução foram transferidas alíquotas de 0,5; 1,0; 2,0 ; 3,0 e 4,0 mL, com o auxílio da bureta, para balões volumétricos de 25 mL. Os volumes foram completados com etanol, obtendo-se soluções de concentrações de 5; 10; 20; 30 e 40 µg/mL. Transferiu-se 10 mL de cada solução para balões volumétricos de 25 mL e acrescentaram-se 2 mL de azul de tetrazólio 0,5%, em metanol, 2 mL de hidróxido de tetrametilamônio 10%, em metanol e o volume dos balões volumétricos foi completado com etanol, obtendo-se soluções com concentrações de 2; 4; 8; 12 e 16 µg/mL. As soluções foram envoltas em papel alumínio e, após 40 minutos, efetuaram-se as leituras em 519 nm, sendo que o branco foi tratado da mesma maneira, apenas omitindo-se a amostra. Com os valores obtidos das absorvâncias em função da concentração do deflazacort foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da reta da curva de calibração. As curvas foram preparadas em três diferentes dias.

4.9.1.3 Precisão

Pesaram-se dos pós dos comprimidos e das cápsulas (preparados conforme item 4.6.1.3) quantidades equivalentes a 12,5 mg de deflazacort, e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se uma solução de concentração de 250 µg/mL. Após, filtrou-se em filtro quantitativo e transferiu-se 2,0 mL dessa solução para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com etanol. Dessa última solução transferiu-se alíquota de 10 mL para balão volumétrico de 25 mL ao qual foi adicionado 2 mL azul de tetrazólio 0,5% em metanol, 2 mL de hidróxido de tetrametilamônio 10%, em metanol e o volume do balão volumétrico foi completado com etanol, obtendo-se uma solução com concentração de 8 µg/mL. A

solução foi envolta em papel alumínio e, após 40 minutos, efetuaram-se as leituras em 519 nm, sendo que o branco foi tratado da mesma maneira, apenas omitindo a amostra. Foram realizadas análises no mesmo dia (n=6), e em diferentes dias (n=3) para os comprimidos e cápsulas. Preparou-se, simultaneamente uma solução da SQR de deflazacort na mesma concentração, tratada da mesma forma que as amostras.

A concentração do deflazacort nas amostras foi determinada utilizando as equações descritas no item 4.6.1.3.

4.9.1.4 Exatidão (Teste de Recuperação)

Prepararam-se soluções de amostras e SQR, ambas na concentração de 250 µg/mL em etanol. Alíquotas de 1 mL das soluções das amostras (comprimidos e cápsulas) foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, os quais foram denominados R₁, R₂ e R₃. Da solução de deflazacort SQR foram retiradas alíquotas de 1,0; 2,0 e 3,0 mL e adicionadas respectivamente aos balões R₁, R₂ e R₃. Acrescentaram-se aos balões 2mL de azul de tetrazólio 0,5% em metanol e 2mL de hidróxido de tetrametilamônio 10% em metanol, completando-se os volumes com etanol, obtendo-se soluções com concentrações teóricas de 8, 12 e 16 µg/mL. Após repouso de 40 minutos, realizaram-se as leituras em 519 nm. O branco foi preparado conforme item 4.8.1.2

Simultaneamente, foram preparadas soluções das amostras e da SQR na concentração e 4 µg/mL, tratadas como descrito anteriormente (Tabela 22).

Tabela 22 – Preparo das soluções para o teste de recuperação do deflazacort, nas amostras de comprimidos e cápsulas, utilizando espectrofotometria na região do visível.

Amostra	Volume (mL) da solução amostra (100,0 µg/mL)	Volume (mL) da solução de SQR (100,0 µg/mL)	Concentração final (µg/mL)
A	1,0	-	4,0
R ₁	1,0	1,0	8,0
R ₂	1,0	2,0	12,0
R ₃	1,0	3,0	16,0
SQR	-	1,0	4,0

4.9.1.5 Limite de quantificação e de detecção

Foram calculados conforme o ICH (2005), baseados no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Os valores teóricos de LQ e LD foram calculados conforme equações descritas no item 4.6.1.6.

4.9.2 Resultados e discussão

A aplicação de um método para quantificação de deflazacort na região do visível, alternativo aos métodos propostos por CLAE e UV, foi investigada. Devido à natureza esteroideal do deflazacort, avaliou-se o emprego do método geral para esteróides descrito na Farmacopéia Americana (USP 29, 2005). Esse método é baseado na redução do azul de tetrazólio pelo fármaco, em meio fortemente alcalino (hidróxido de tetrametilamônio), formando uma solução rósea, com máximo de absorção em torno de 545 nm. Em relação ao método geral, houve modificação apenas em relação ao tempo de reação. Conforme estudos realizados, verificou-se que um tempo de 40 minutos foi suficiente para produzir uma absorvância máxima e reprodutível.

Para avaliar a especificidade foram preparadas amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas que foram submetidas à reação com azul de tetrazólio e, após, os espectros de absorção molecular obtidos foram sobrepostos

com o espectro do deflazacort SQR. A Figura 12 apresenta essa comparação, onde se verifica que houve absorção dos excipientes no comprimento de onda de leitura proposto (519 nm), indicando que o método não foi específico. A verificação da interferência dos excipientes deve ser um dos primeiros parâmetros a ser avaliado no desenvolvimento de um método. No presente estudo, no entanto, essa verificação somente foi realizada após os parâmetros de linearidade, precisão e exatidão terem sido avaliados. Devido ao número limitado de amostras, não foi possível otimizar as condições propostas para tentar eliminar essa interferência.

Foram traçados espectros com o SQR, comprimidos e cápsulas visando otimizar o tempo de repouso para as soluções reagirem, conforme Tabela 23.

Tabela 23 - Tempo de repouso para as soluções reagirem com a substância química de referência (SQR), comprimidos e cápsulas, leitura realizada na região do visível, a 519 nm.

Tempos (minutos)	SQR	comprimidos	cápsulas
20	0,229	0,254	0,278
30	0,261	0,283	0,306
40	0,276	0,300	0,316
60	0,276	0,300	0,318

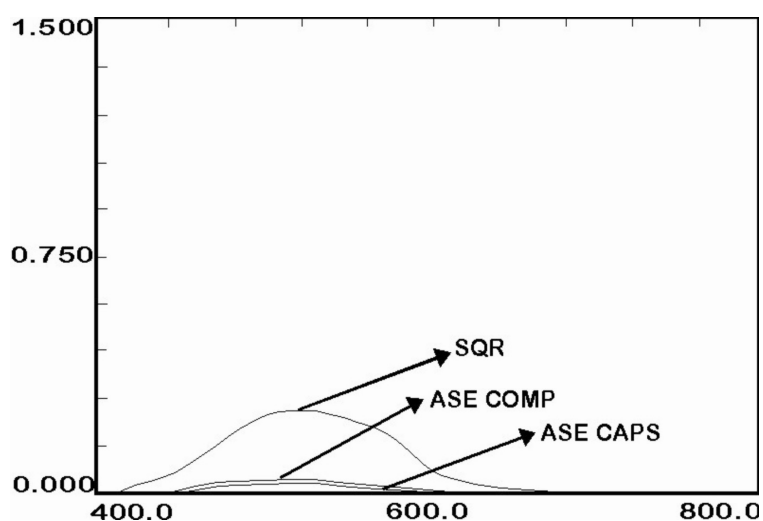


Figura 12 - Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria na região do visível das soluções de SQR e ASE de comprimidos e ASE de cápsulas, todos realizados na concentração teórica de 8 µg/mL.

Observou-se que o tempo de repouso para a SQR, comprimidos e cápsulas reagirem com o azul de tetrazólio em metanol a 0,5% e o hidróxido de tetrametilamônio em metanol a 10% pode ser de 40 minutos, pois em 60 minutos, conforme indicado na USP 29 (2005), a leitura da absorvância foi a mesma.

Para avaliar a especificidade do método foi realizada uma sobreposição dos espectros de absorção do deflazacort SQR e das ASE de excipientes de comprimidos e cápsulas na região do visível. Observou-se uma interferência dos excipientes, o que indica que o método não é específico. A Figura 12 apresenta a comparação dos espectros de absorção obtidos no estudo da interferência dos excipientes no método proposto.

Foram desenvolvidas curvas em três diferentes dias, sendo calculadas as absorvâncias médias obtidas para traçar a curva de calibração (Tabela 24), cuja representação encontra-se na Figura 13.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstram correlação entre as absorvâncias e concentração, nos intervalos utilizados. A equação da reta para o método foi de: $y = 0,0554x + 0,0135$, com coeficiente de correlação de 0,9999. A análise da variância (ANOVA) demonstra que a regressão linear foi significativa, não havendo desvio da linearidade ($P \leq 0,05$), conforme tabela 25. Os resultados comprovam a validade do método em relação à linearidade.

Tabela 24 – Valores de absorvâncias obtidas para a elaboração da curva de calibração do deflazacort por espectrofotometria na região do visível, a 519 nm.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias			Média	CV%
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
2,0	0,123	0,125	0,126	0,125	1,23
4,0	0,236	0,229	0,231	0,232	1,55
8,0	0,456	0,462	0,464	0,461	0,90
12,0	0,641	0,699	0,690	0,677	4,61
16,0	0,898	0,896	0,902	0,899	0,34

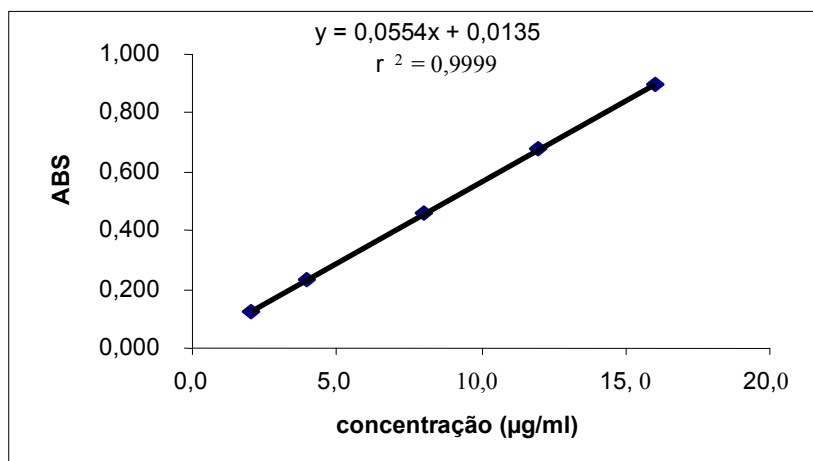


Figura 13 – Representação gráfica da curva de calibração do deflazacort obtida para o método espectrofotométrico na região do visível.

Tabela 25 – Resultado da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados e análise da variância (ANOVA), para o método espectrofotométrico na região do visível.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	2 - 16 µg /mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0554 x + 0,0135$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,0554 \pm 0,0009$
Inclinação (a) ± desvio padrão	$0,0135 \pm 0,0010$
Coeficiente de correlação (r)	0,9999
Análise da variância	
Regressão linear	5933,96 (4,96)*
Desvio da linearidade	0,15 (3,71)*

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P \leq 0,05$

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). Os valores experimentais médios obtidos para a determinação do deflazacort nas amostras analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, foi de 101,18% para comprimidos e 103,34% para cápsulas, ambas com um CV de 1,9%, conforme Tabelas 29 e 31. O teor médio observado interdia nas análises foi de 102,19% e 103,50% para comprimidos e

cápsulas, respectivamente. A análise da variância (ANOVA), indicou que não houve diferença significativa entre as análises realizadas na avaliação da precisão do método. Os coeficientes de variação obtidos tanto para precisão intradia e interdia foram inferiores a 2 % confirmando a precisão do método analítico. Os valores experimentais obtidos nos doseamentos de comprimidos e cápsulas de deflazacort, referentes à precisão do método, encontram-se nas Tabelas 26 e 27, respectivamente.

Tabela 26 – Valores experimentais obtidos para determinação do deflazacort nas amostras de comprimidos por espectrofotometria na região do visível.

Amostras	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	(%)	(%)	(%)
1	98,60	103,80	100,30
2	102,80	102,10	102,90
3	100,30	103,00	102,60
4	101,30		
5	104,10		
6	103,00		
% média intra-dias ± e.p.m.	101,68 ± 0,87	102,96 ± 0,49	101,93 ± 0,82
CV%	1,90	0,80	1,30
% média inter-dia ± e.p.m.		102,19 ± 0,39	
CV%		0,66	
Análise da variância			
Inter-dias	0,59 (4,26)*		

*Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P \leq 0,05$.

Tabela 27 – Valores experimentais referentes a determinação do deflazacort nas amostras de cápsulas por espectrofotometria na região do visível.

Amostras	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	(%)	(%)	(%)
1	102,43	104,70	100,30
2	103,49	103,20	102,90
3	104,54	102,20	102,60
4	104,96		
5	104,96		
6	99,69		
% média intra-dias \pm e.p.m.	103,30 \pm 0,83	103,30 \pm 0,73	102,57 \pm 0,65
CV%	1,97	1,21	1,09
% média inter-dia \pm e.p.m.		103,09 \pm 0,26	
CV%		0,43	
Análise da variância			
Inter-dias	0,23 (4,26)*		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P \leq 0,05$.

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação, cujos valores estão apresentados na Tabela 28. A média das recuperações foi de 99,25% e 95,83% para comprimidos e cápsulas, respectivamente, demonstrando que o método apresentou exatidão adequada.

Tabela 28 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação realizado em amostras de comprimidos e cápsulas de deflazacort por espectrofotometria na região do visível, a 519 nm.

Amostras	Quantidade de SQR ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação (%)	Media (%)
	Adicionada	Recuperada		
Comprimidos	4,00	3,85	97,90	99,25
	8,00	7,98	99,80	
	12,00	12,04	100,05	
Cápsulas	4,00	3,82	95,50	95,83
	8,00	7,60	95,00	
	12,00	11,64	97,00	

A sensibilidade do método foi avaliada através do limite de quantificação (LQ) e de detecção (LD). Os valores encontrados estão na Tabela 29, demonstrando boa sensibilidade do método, pois se obteve valores inferiores a 1 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 29 - Valores obtidos para determinação de limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) de deflazacort através da espectrofotometria na região do visível.

Parâmetro analítico	Deflazacort
LD ($\mu\text{g/mL}$)	0,23
LQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,66

O método espectrofotométrico empregando reação com azul de tetrazólio apresentou linearidade, precisão e exatidão. Apresentou, no entanto, interferência dos excipientes, e deve ter suas condições otimizadas (como modificação no processo de filtração ou no procedimento de reação) antes de ser utilizado para quantificação de deflazacort em comprimidos e cápsulas.

4.10 Comparação dos métodos propostos

Neste estudo, foram desenvolvidos e validados três métodos: a cromatografia líquida de alta eficiência, a espectrofotometria na região do ultravioleta e a espectrofotometria na região do visível.

Vários requisitos devem ser considerados na escolha de um método analítico de quantificação de uma substância ativa. Além dos parâmetros de validação, tais como especificidade, linearidade, precisão e exatidão, deve-se levar em conta, também, a simplicidade de execução, tempo de análise, geração de resíduos e os custos dos equipamentos necessários para o seu desenvolvimento.

No que se refere ao custo e facilidade de execução, pode-se indicar que, dentre os métodos propostos, a cromatografia líquida tem a vantagem de permitir a avaliação de interferentes, como produtos de degradação, mas é um método oneroso, quando comparado à espectrofotometria, pois requer equipamentos e reagentes caros, o que pode se tornar uma limitação para alguns laboratórios de controle de qualidade de medicamentos. Além disso, requer maior treinamento por parte do analista. Os métodos espectrofotométricos são de menor custo, quando comparado à CLAE, entretanto, podem apresentar maior interferência de excipientes, por exemplo.

Independente do método analítico escolhido deve-se demonstrar, através da validação, que o mesmo é adequado para o fim proposto. Segundo o ICH (2005), os parâmetros essenciais para garantir a *performance* do método para fins de quantificação da substância ativa são: especificidade, linearidade, exatidão e precisão.

A especificidade de um método analítico representa sua capacidade em medir a substância em exame na presença de outros componentes que possam existir na amostra. Pode-se avaliar esse parâmetro acrescentando impurezas, produtos de degradação e compostos relacionados ou ingredientes do placebo à amostra para verificar a interferência dos mesmos nos métodos propostos. No método por CLAE a especificidade foi avaliada através da degradação forçada da SQR. O método permitiu a determinação do deflazacort na presença dos produtos formados, indicando a especificidade do mesmo. A especificidade do método por espectrofotometria na região do UV a pôde ser demonstrada através do preparo de

amostras simuladas de excipientes, sendo que as mesmas não apresentaram absorção significativa no comprimento de onda analítico. No método da região do visível, a especificidade foi avaliada através do preparo de amostras simuladas de excipientes. No entanto, através do espectro de absorção, observou-se, que houve interferência dos excipientes. Sugere-se que a otimização do método antes de ser utilizado para fins de quantificação do deflazacort em comprimidos e cápsulas.

Em relação à linearidade, verificou-se que todos os métodos apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,999 (Tabela 30) conforme preconizado pela literatura (USP 29, 2005; ICH, 2005), indicando haver uma relação linear entre concentração e variáveis estudadas.

A precisão dos métodos foi avaliada através do coeficiente de variação percentual (CV%). Os CV observados para todos os métodos desenvolvidos foram menores que 2% (Tabela 30), indicando que os mesmos são precisos nas condições estabelecidas.

A exatidão foi avaliada através da percentagem de recuperação de quantidades conhecidas adicionadas às amostras ou misturas de excipientes. Os percentuais médios obtidos para todos os métodos encontram-se entre 95,00% e 101,41% (Tabela 30), indicando que os mesmos possuem exatidão adequada.

De acordo com o ICH (2005), a USP 29 (2005) e a Resolução 899 (2003), a quantificação de fármacos em formas farmacêuticas e matéria-prima, não é necessário determinar o limite de quantificação. Esse parâmetro foi, no entanto, calculado e verificou-se que para todos os métodos o limite foi inferior a 1,0 µg/mL, indicando a boa sensibilidade dos métodos.

Tabela 30 - Resultados da validação dos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e espectrofotometria na região do visível (VIS).

Parâmetro de validação	CLAE	UV	VIS
Especificidade	Ausência de interferentes	Ausência de interferentes	Presença de interferentes
Linearidade	10,0 a 50,0 µg/mL	6,0 a 24,0 µg/mL	2,0 a 16,0 µg/mL
Precisão intra-dia ^a	1,53%	1,10%	1,9%
Precisão inter-dia ^a	1,25%	0,07%	0,66%
Precisão intra-dia ^b	0,40%	0,63%	1,90%
Precisão inter-dia ^b	0,35%	0,50%	0,43%
Exatidão ^a	95,16% - 99,50%	100,60% - 101,00%	97,90% - 100,05%
Exatidão ^b	99,08% - 102,75%	98,50% - 101,41%	95,00% - 97,00%
Limite de quantificação	0,55 µg/mL	0,37 µg/mL	0,66 µg/mL
Limite de detecção	0,18 µg/mL	0,12 µg/mL	0,23 µg/mL

^a Refere-se a comprimidos.

^b Refere-se a cápsulas.

Com o objetivo de avaliar se havia diferença significativa entre os teores obtidos pelos métodos propostos, realizou-se análise comparativa através de ANOVA, a qual indica se a diferença é significativa ou se pode ser atribuída ao acaso (MILLER e MILLER, 2000). Como pode ser observada na Tabela 31, a avaliação estatística demonstrou diferença significativa entre os teores obtidos pelos três métodos, para um nível de significância de $P < 0,01$, indicando que os métodos não foram equivalentes.

Tabela 31 - Análise de variância dos resultados obtidos nos doseamentos de deflazacort nas amostras de cápsulas e comprimidos, obtidos pelos métodos validados (Cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria na região do ultravioleta e espectrofotometria na região do visível).

Forma farmacêutica	Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados		F
			Variância		
Comprimidos	Entre métodos	2	73,85	36,92	14,70(6,26)*
	Resíduo	15	37,67	2,51	
	Total	17	111,52		
Cápsulas	Entre métodos	2	96,47	48,23	30,72(6,26)*
	Resíduo	15	23,55	1,57	
	Total	17	120,02		

* Valores entre parênteses correspondem ao valor crítico de F para $P \leq 0,01$.

Para evidenciar entre quais métodos havia diferença significativa, aplicou-se o teste de Tukey, utilizando o programa Sigma Stat 3.0, cujos resultados encontram-se na Tabela 32.

Tabela 32 – Resultados obtidos na comparação dos métodos através do teste de Tukey.

Forma farmacêutica	Método	Diferença entre as médias	q	p	$P < 0,05$
Comprimidos	VIS x UV	4,517	6,981	< 0,001	SIG
	VIS X CLAE	4,037	6,239	0,001	SIG
	CLAE X UV	0,480	0,742	0,861	NS
Cápsulas	VIS x UV	5,517	10,784	< 0,001	SIG
	VIS X CLAE	3,895	7,614	< 0,001	SIG
	CLAE X UV	1,622	3,170	0,096	NS

VIS = espectrofotometria na região do visível; SIG: significativo; NS: não significativo.

Observou-se, através do Teste de Tukey, que a diferença entre os métodos pode ser atribuída ao método por espectrofotometria na região do visível. Esse resultado era esperado, já que os valores de teor obtidos para o método na região

do visível foram superiores àqueles obtidos por CLAE e UV, devido à interferência demonstrada dos excipientes no mesmo.

5 CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS E CÁPSULAS

5.1 Teste de Dissolução

As formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral são amplamente prescritas na prática médica e têm muitas vantagens na sua utilização, tais como praticidade, economia, segurança e melhor estabilidade em comparação com as formas líquidas. Sendo assim, há uma boa adesão do paciente ao tratamento, contribuindo para a eficácia da terapêutica prescrita (STORPIRTIS, 1991).

No entanto, para que um fármaco administrado por via oral possa exercer sua ação, o mesmo deve ser absorvido e transportado ao tecido ou órgão alvo, para interagir com o receptor e estimular a resposta farmacológica (GENNARO, 1990). Diversos fatores relacionados ao fármaco e a formulação tornam o processo de absorção complexo e variável. Qualquer fator que afete a desagregação ou a dissolução pode afetar a biodisponibilidade do fármaco (STORPIRTIS et al., 1999; DOKOUMETZIDIS & MACHERAS, 2006). Assim, é imprescindível que a forma farmacêutica libere o princípio ativo tornando-o disponível para ser absorvido no trato gastrointestinal (LE HIR, 1995).

Nos últimos anos a importância do teste de dissolução para formas farmacêuticas sólidas tem aumentado, pois fornece informações úteis tanto para pesquisa e desenvolvimento, quanto na produção e controle de qualidade de medicamentos. Os resultados obtidos no teste de dissolução auxiliam no desenvolvimento e avaliação de novas formulações; permitem verificar a estabilidade dessas formulações possibilitam a avaliação da possível correlação *in vivo* – *in vitro*, e fazem parte da documentação para registro de novos produtos junto às autoridades regulatórias (MARQUES & BROWN, 2002).

O teste de dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido, em um determinado volume de meio, mantido à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, depois de determinado período de tempo, utilizando-se equipamento com dispositivo para promover agitação do meio, a uma dada velocidade de agitação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988; USP 29, 2005). Para formulações de liberação imediata, a porcentagem dissolvida de fármaco é determinada, normalmente, após um único

tempo de coleta. A avaliação da porcentagem dissolvida em vários tempos de coleta (perfil de dissolução) é, no entanto, mais conclusiva em relação à coleta em um único ponto (ADAMS et al., 2001; MARCOLONGO, 2002).

Muitos fármacos não possuem monografia oficial, sendo necessário desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos (MANADAS et al., 2002). Ainda são escassos na literatura estudos de desenvolvimento de métodos de dissolução. No entanto, a avaliação do perfil de dissolução, em três diferentes meios, na faixa de pH fisiológico (pH de 1,5 a 7,5) é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução, bem como no estabelecimento de correlações *in vivo-in vitro* (ADAMS et al., 2001; MOORE & FLANNER, 1996; FDA, 1997).

Segundo Marques e Brown (2002), são vários os desafios no desenvolvimento e validação de métodos de dissolução, devido à variabilidade intrínseca do método e devido à variabilidade de fatores que podem afetar o processo de dissolução. Dessa forma, um controle cuidadoso das condições experimentais é necessário para reduzir a variabilidade teste-a-teste, para garantir a sua confiabilidade e reprodutibilidade para garantir que pequenas alterações na formulação ou no processo de produção sejam detectadas (MARQUES & BROWN, 2002; FORTUNATO, 2005).

Encontram-se, na literatura, alguns artigos que têm abordado aspectos relacionados aos testes de dissolução, tais como: fatores que afetam a dissolução (STORPIRTIS et al., 1999), fontes de variabilidade dos testes de dissolução (QURESHI & MCGILVERAY, 1995; SIEWERT et al., 2002), dissolução de fármacos em formas farmacêutica de liberação modificada (MANADAS et al., 2002), desenvolvimento de testes de dissolução para formas de liberação imediata (MARQUES & BROWN, 2002; FORTUNATO, 2005), dissolução de fármacos pouco solúveis (BROWN et al., 2004), entre outros. MARCOLONGO realizou, em 2003, uma ampla revisão referente aos fundamentos dos testes de dissolução, em sua dissertação de mestrado, envolvendo desde aspectos históricos até aspectos regulatórios.

Dokoumetzidis e Macheras (2006) publicaram uma revisão sobre a evolução dos testes de dissolução, desde 1897, quando Noyes e Whitney conduziram os primeiros experimentos e publicaram o primeiro artigo envolvendo a dissolução de

sólidos, até o presente, quando se discute a aplicação do sistema de classificação biofarmacêutica.

Para dar credibilidade aos resultados deve-se fazer uma seleção criteriosa das condições do ensaio, no sentido de obter o máximo de poder discriminativo e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos (MANADAS et al., 2002).

Inicialmente, deve-se compilar os seguintes dados sobre o produto: pKa (indica o grau de ionização do fármaco) em determinado pH, solubilidade e estabilidade do fármaco em função do pH (que pode limitar a faixa de pH a ser utilizado), da temperatura, da umidade e da luz, bem como a faixa de dosagem, tipos de excipientes, forma farmacêutica e método de análise. Na seqüência, deve-se escolher o meio de dissolução, o aparato, o método de quantificação e as especificações para o teste. A influência do método de filtração e a estabilidade do fármaco no meio devem, igualmente ser avaliadas (FDA, 1997; MARQUES & BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2002; FORTUNATO, 2005).

a) *Escolha do meio de dissolução e volume:*

Os meios de dissolução visam mimetizar as condições fisiológicas do trato gastrointestinal (TGI) e fatores como pH, estabilidade do fármaco no meio e condições *sink* devem ser avaliados. O meio deve permitir, como mencionado, a detecção de desvios da qualidade.

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica pode ser considerado nessa escolha. Fármacos da classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade) dissolvem-se bem em qualquer meio aquoso, enquanto que para os da classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) deve-se avaliar o grau de ionização do fármaco na escolha do meio (MARCOLONGO, 2003). Alguns autores (YAZDANIAN et al., 2004) têm discutido, no entanto, a classificação de fármacos por esse sistema.

Os meios de dissolução preferíveis são o HCl (0,01 a 0,05 N), soluções tampões (fosfato ou acetato) de pH 1,2 a 6,8 e a água (embora algumas condições como pH e tensão superficial possam variar conforme sua procedência, não sendo indicada por alguns autores) (MARCOLONGO, 2003).

O volume de meio a ser utilizado em um teste de dissolução depende da condição *sink*, que pode ser definida como uma quantidade de solvente não inferior a 3 vezes o volume de meio necessário para obter a solução saturada do fármaco.

Entretanto, se aceita atualmente que um volume de 5 a 10 vezes o necessário para saturação seja suficiente para manter as condições *sink* (MARQUES & BROWN, 2002). Isto deve ser mantido para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste. Também, devido às condições *sink* obtidas naturalmente *in vivo*, os estudos para determinar as taxas de dissolução *in vitro* devem ser conduzidos obedecendo a esse parâmetro (MARQUES & BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003). Os meios devem ser mantidos a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e devem ser desaerados, conforme indicado anteriormente (USP 29, 2005).

A filtração do meio antes da quantificação é necessária para remover partículas não dissolvidas tanto da substância quanto de excipientes insolúveis que podem causar problemas na quantificação. Os filtros não devem alterar a concentração do fármaco. Para esses estudos, deve-se preparar soluções do fármaco no meio de dissolução, as quais devem ser analisadas antes e após filtração, através de filtros descartáveis de diferentes porosidades (normalmente entre 0,2 e 10 μm). O filtro será adequado se os resultados obtidos em ambas as soluções forem próximos, ou seja, entre 98 a 102% (MARQUES & BROWN, 2003; MARCOLONGO, 2003).

b) *Escolha do aparato e rotação:*

A escolha deve ser baseada na sua capacidade de manter condições *sink*, apresentar resultados consistentes e admitir algum grau de automação. Normalmente utiliza-se o aparato pá para comprimidos e cesta para cápsulas. O aparato cesta é geralmente utilizado para formas não desintegrantes, com velocidade de agitação entre 50 a 150 rpm (FDA, 1997). A velocidade de rotação deve permitir a liberação adequada do fármaco, não acelerando nem retardando o processo de dissolução (MARQUES & BROWN, 2003).

c) *Escolha do método*

O método de quantificação não deve sofrer influência dos excipientes presentes na formulação. Devido à simplicidade e rapidez, o método por espectrofotometria no ultravioleta tem sido muito utilizado, desde que o fármaco tenha cromóforos e não seja demonstrada a interferência de excipientes. A

cromatografia líquida é outro método utilizado, devido a sua versatilidade e possibilidade de automação (FORTUNATO, 2005).

d) *Validação*

O objetivo da validação é demonstrar que o método é adequado para o fim pretendido (ICH, 1996, BRASIL, 2003b). Os equipamentos devem calibrados e os analistas devem ser qualificados para esse fim.

A validação de métodos analíticos utilizados para determinação de características de desempenho, como é o caso dos testes de dissolução, deve incluir, no mínimo, a avaliação da especificidade, linearidade, precisão e exatidão (USP 29, 2005; MARQUES e BROWN, 2003; ICH, 1996, BRASIL, 2003b).

A interferência do placebo ou amostra simulada de excipientes deve ser realizada para demonstrar a especificidade do método. A linearidade deve ser estabelecida com no mínimo 5 soluções do fármaco, com concentrações variando de $\pm 20\%$ da concentração mais baixa até $\pm 20\%$ da concentração mais alta, calculando-se a regressão pelo método dos mínimos quadrados. A precisão pode ser verificada avaliando comprimidos no mesmo dia e em dias diferentes e é, normalmente, expressa pelo coeficiente de variação percentual. A precisão tem sido o parâmetro considerado de extrema importância para garantir a confiabilidade dos resultados e inclusive pode ser um dos fatores a ser considerado na escolha dos meios. A exatidão pode ser realizada pelo teste de recuperação do padrão adicionado à amostra simulada de excipientes ou placebo dos produtos, e deve estar entre 95 a 105% das quantidades adicionadas.

e) *Especificações*

As especificações têm por objetivo principal garantir a consistência entre lotes e devem indicar a percentagem mínima dissolvida do fármaco em determinado intervalo de tempo. Muitas monografias de medicamentos de liberação imediata estabelecem que não menos de 75% do fármaco devem estar dissolvidos em 45 minutos (MARCOLONGO, 2003). Para fármacos altamente solúveis, de dissolução rápida, uma especificação de único ponto, como 85% dissolvidos em 60 minutos ou menos, é suficiente como teste de controle de qualidade lote a lote. Para fármacos pouco solúveis e formas farmacêuticas de dissolução lenta, uma especificação de

dois pontos (por exemplo, 25 e 30, 45 ou 60 minutos), é recomendada para garantir a qualidade do produto (MARCOLONGO, 2003).

Segundo a legislação brasileira, testes de dissolução em um único ponto têm sido utilizados para garantir a manutenção da qualidade e desempenho do medicamento quando se quer avaliar o aumento da escala de fabricação e alterações pós-registro. Para comparar produtos de fabricantes diferentes recomenda-se a comparação dos perfis de dissolução (BRASIL, 2003b).

Observam-se na literatura vários métodos para comparar os perfis de dissolução, os quais são divididos em métodos baseados na análise da variância (ANOVA), método modelo-dependente (modelo de primeira ordem, modelo de Weibull, entre outros) e método modelo-independente (Área Sob a Curva e f_1/f_2) (MANADAS, 2002; YUKSEL, 2000).

Métodos baseados na análise da variância (ANOVA) utilizam dados em sua forma original e sua análise é capaz de mostrar diferenças estatísticas de nível (tamanho) e formato (paralelismo). Estes métodos estatísticos baseados em ANOVA, apesar de sua aplicação ser mais complexa, fornecem os melhores resultados (MARCOLONGO, 2003).

Outra forma de avaliar o perfil de dissolução é através da eficiência de dissolução (ED%) (KHAN & RHODES, 1975), a qual é definida como a área sob a curva da dissolução em um determinado tempo t , e expressa como uma porcentagem da área do retângulo correspondente a 100% da dissolução no mesmo período. A ED% ser calculada pela seguinte fórmula:

$$ED \% = \frac{ASC}{A_{ret}} \times 100$$

Onde:

ED = eficiência de dissolução

AUC = área sob a curva de dissolução em função do tempo

A_{ret} = área total do retângulo

Através desse cálculo é possível avaliar não apenas a quantidade que se liberou em um determinado tempo, mas a cinética de liberação ao longo do período (MANADAS, 2002).

Özkan e colaboradores (2003), desenvolveram método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de deflazacort em formas farmacêuticas,

amostras de sangue humano e estudos de dissolução *in vitro*. Os autores indicam que as condições de dissolução utilizadas foram 900 mL de ácido clorídrico 0,1M, mantido à temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e aparato pá com velocidade de 75 rpm. Os autores não apresentaram a dissolução em diferentes meios, como preconizado na literatura para fármacos sem monografia oficial (MARCOLONGO, 2003).

Pelo exposto e devido à inexistência de monografia oficial, foi desenvolvido e validado um método para avaliar a percentagem de dissolução do referido fármaco em comprimidos e cápsulas manipuladas. Os aspectos abordados anteriormente, tais como, escolha do meio, influência do filtro, estabilidade e validação do método de quantificação, foram considerados nesse desenvolvimento, baseados nos trabalhos desenvolvidos por MARCOLONGO (2003); MARQUES & BROWN (2002) e na USP 29 (2005).

5.2 Solventes e reagentes

- Ácido clorídrico fumegante, Tedia[®]
- Água destilada
- Etanol, Tedia[®]
- Fosfato de Potássio monobásico, Tedia[®]
- Hidróxido de sódio 1N, Merck[®]

5.3 Equipamentos e acessórios

- Aparelho para teste de dissolução, Pharma Test[®]
- Balança analítica, Sartorius[®]
- Banho de ultra-som, Thornton[®]
- Bomba de vácuo, Primar[®]
- Destilador, Biomatic[®]
- Espectrofotômetro UV-VIS, Shimadzu[®]
- Membrana de acetato de celulose, porosidade 0,45 μm
- Filtro quantitativo faixa preta, Schleicher & Schuell[®]
- Pipetador Transferpette, Brand[®]
- Termômetro de imersão, Incoterm[®]

5.4 Escolha dos parâmetros de dissolução

Foram testadas diversas condições de dissolução, conforme método geral da USP 29 (2005), utilizando o equipamento de dissolução Pharma Test, equipado com seis cubas. Os aparatos testados foram: aparato 1 (cesta) e aparato 2 (pá), com velocidades de rotação de 50 e 75 rpm.

Inicialmente, foram empregados três meios de dissolução: água, ácido clorídrico 0,1N e tampão fosfato pH 6,8. Os meios de dissolução, após o preparo, foram aquecidos à 41°C, filtrados e degaseificados em ultra-som, durante 10 minutos. Em seguida, foram aquecidos a 38°C antes de serem colocados nas cubas, onde foram mantidos a $37,0 \pm 0,5$ °C.

As coletas de 5 mL de meio foram realizadas manualmente, nos tempos de 5, 10, 15, 30 e 40 minutos, com a reposição do mesmo volume de meio a $37,0 \pm 0,5$ °C.

A percentagem dissolvida do fármaco foi determinada, por espectrofotometria na região do UV, após diluição de 3 mL do meio coletado em balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se uma solução com concentração final de 10 µg/mL. As leituras foram realizadas após filtração das amostras em filtro quantitativo. Nos cálculos de percentagem dissolvida levou-se em consideração o teor do fármaco.

As condições testadas estão indicadas na Tabela 31, sendo que para cada condição foram calculadas as Áreas Sob a Curva (ASC), e a percentagem de eficiência de dissolução (ED%), para a comparação dos perfis.

Tabela 33 – Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos e cápsulas contendo deflazacort.

Condição	Forma Farmacêutica	Meio(900 mL)	Velocidade(rpm)	Aparato
I	cápsula	HCl 0,1 N	50 rpm	pá/cesta
II	cápsula	água	50 rpm	pá/cesta
III	cápsula	TP pH 6,8	50 rpm	pá/cesta
IV	cápsula	HCl 0,1 N	75 rpm	pá/cesta
V	cápsula	água	75 rpm	pá/cesta
VI	cápsula	TP pH 6,8	75 rpm	pá/cesta
VII	comprimido	HCl 0,1 N	50 rpm	pá/cesta
VIII	comprimido	água	50 rpm	pá/cesta
IX	comprimido	TP pH 6,8	50 rpm	pá/cesta
X	comprimido	HCl 0,1 N	75 rpm	pá/cesta
XI	comprimido	água	75 rpm	pá/cesta
XII	comprimido	TP pH 6,8	75 rpm	pá/cesta

TP pH 6,8: Tampão fosfato pH 6,8

5.5 Avaliação da influência do filtro

Realizou-se a filtração do meio após a coleta, antes de efetuar a diluição e quantificação para eliminar a possível interferência de excipientes insolúveis e partículas não dissolvidas. Para tal, foram preparadas soluções de SQR e amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas, no meio de dissolução, comparando-se a concentração de deflazacort antes e após a filtração, utilizando a espectrofotometria na região do UV.

- Avaliação da SQR

Pesou-se 10 mg de SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de 10 mL de etanol. Após solubilização, o volume foi completado com HCl 0,1 N. Em seguida retirou-se alíquota de 2 mL dessa solução, transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com HCl 0,1N, obtendo-se uma solução de concentração final de 10 µg/mL. Realizou-se a leitura de absorvância da solução da SQR, a qual foi utilizada como referência. Alíquotas dessa solução foram filtradas em papel filtro quantitativo e em membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 µm, e as leituras de absorvâncias foram realizadas após cada filtração.

- Avaliação das amostras

Foram preparadas amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas, adicionadas de 30 mg de SQR. As amostras foram avaliadas em 900 mL de HCl 0,1N, mantido a $37,0 \pm 0,5$ °C, empregando aparato pá para comprimidos e aparato cesta para cápsulas, ambos na velocidade 50 rpm. Após 30 minutos, alíquotas de 15 mL foram retiradas e filtradas com papel filtro quantitativo e com membrana acetato de celulose com poro de 0,45 µm, descartando-se os primeiros cinco mililitros. Alíquotas de 3,0 mL foram diluídas em balões volumétricos de 10 mL com HCl 0,1 N, obtendo-se soluções com concentração final de 10 µg/mL.

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

As soluções da SQR e das amostras simuladas de excipientes foram mantidas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por um período de 24 horas e à temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C, durante 2 horas. Após, as soluções foram quantificadas por espectrofotometria na região do UV.

- Preparo da SQR

Pesou-se 10 mg de deflazacort e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL, com auxílio de 10 mL de etanol. Acrescentou-se 500 mL de HCl 0,1N, deixou-se no ultra-som durante 10 minutos, e após, o volume foi completado com o mesmo solvente, obtendo-se uma solução com concentração de 10 µg/mL, que foi analisada por espectrofotometria na região do UV. Uma alíquota de 100 mL dessa solução foi mantida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 24 horas. O restante da solução (900 mL) foi transferido para uma cuba de dissolução, que foi mantida à temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C por 2 horas. Depois de decorridos os respectivos tempos, foram retiradas alíquotas dessas soluções, as quais foram filtradas, diluídas adequadamente, e analisadas por espectrofotometria na região do UV.

- Preparo das amostras

Amostras simuladas de excipientes de cápsulas e comprimidos, acrescidas de 10 mg de SQR, foram transferidas para balões volumétricos de 1000 mL, com o auxílio de 10 mL de etanol. Deixou-se no ultra-som por 10 minutos, e após, completaram-se os volumes com HCl 0,1N, obtendo-se soluções com concentração de 10 µg/mL, que foram analisadas por espectrofotometria na região do UV. Retiraram-se alíquotas de 100 mL dessas soluções, que foram mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 24 horas. O restante das soluções (900 mL) foram transferidas para cubas de dissolução, em temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C, por 2 horas. Depois de decorridos os tempos, as soluções foram filtradas, diluídas adequadamente, e analisadas por espectrofotometria na região do UV.

5.7 Validação do método de análise e quantificação da percentagem de fármaco dissolvido

O método por espectrofotometria na região do UV foi validado quanto à especificidade, linearidade, precisão e exatidão (ICH, 2005; USP 29, 2005; BRASIL, 2003b).

5.7.1 Avaliação da especificidade

Foram preparadas amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas, que foram avaliadas empregando as seguintes condições: 900 mL de ácido clorídrico 0,1N, mantido à $37,0 \pm 0,5$ °C, aparato pá para comprimidos e aparato cesta para cápsulas, rotação de 50 rpm. Após 30 minutos, as amostras foram filtradas através de filtro quantitativo, diluídas até uma concentração de 10 µg/mL em, ácido clorídrico 0,1N, e seus espectros foram traçados na faixa de 200 a 400 nm.

5.7.2 Linearidade

Pesou-se 10 mg da SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1N, obtendo-se uma solução de concentração de 100 µg/mL. A partir dessa solução foram preparadas soluções, as quais foram diluídas em ácido clorídrico 0,1N, nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL. As leituras de absorvância foram realizadas em 244 nm, utilizando HCl 0,1N como branco. Com os valores obtidos das absorvâncias em função das concentrações do deflazacort foram calculados os coeficientes de correlação e a equação da reta de calibração.

5.7.3 Precisão

Foram avaliados seis comprimidos e cápsulas do mesmo lote, no mesmo dia e num segundo dia, empregando-se as mesmas condições descritas no item 5.7.1. Após 30 minutos, as amostras foram filtradas através de filtro quantitativo, diluídas até concentração de 10 µg/mL, em ácido clorídrico 0,1N e as leituras de absorvância foram realizadas em 244 nm, utilizando ácido clorídrico 0,1N como branco. As médias das porcentagens dissolvidas e coeficiente de variação foram calculados.

5.7.4 Exatidão (Teste de recuperação)

A exatidão do método foi avaliada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida de SQR adicionada às amostras simuladas de excipientes.

Prepararam-se três amostras simuladas de excipientes de cada forma farmacêutica, às quais foram adicionadas 90, 120 e 150 % da quantidade declarada de SQR.

Procedeu-se à dissolução por 30 minutos, utilizando as condições descritas no item 5.7.1. Após 30 minutos, as amostras foram filtradas através de filtro quantitativo, e diluídas a uma concentração de 10 µg/mL em ácido clorídrico 0,1N. As leituras de absorvância foram realizadas em 244 nm, empregando ácido clorídrico 0,1N como branco.

5.8 Resultados e discussão

Os estudos de dissolução são indispensáveis nas etapas de desenvolvimento de formulações, na identificação de variáveis críticas, na produção, e controle de qualidade de medicamentos bem como permite estabelecer as correlações *in vivo/in vitro* (MANADAS, 2002). Nesse sentido, foi desenvolvido e otimizado teste de dissolução para o fármaco deflazacort nas formas farmacêuticas de cápsulas e comprimidos.

Para desenvolver um método de dissolução deve-se escolher os equipamentos adequados às formulações e as condições do teste, bem como o meio de dissolução, o volume de meio e a velocidade de agitação (MARQUES & BROWN, 2002).

A solubilidade de um fármaco constitui-se em requisito prévio à absorção e à obtenção de resposta clínica e deve ser considerada, junto com a permeabilidade, no desenvolvimento de um teste de dissolução. Para que os ensaios de dissolução possam prever o comportamento *in vivo*, deve-se utilizar meios que se assemelhem às condições fisiológicas, e deve-se considerar, também, fatores como condições *sink*, presença de tensoativos, estabilidade do fármaco no meio de dissolução, entre

outros. As condições *sink* devem ser mantidas para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste. O método precisa ser discriminativo para a finalidade que se propõe. A precisão dos resultados obtidos é outro fator relevante a ser considerado.

Foram então testadas várias condições, enumeradas de I a XVII (Tabela 32), com o objetivo de verificar qual apresentaria melhor poder discriminativo na liberação do deflazacort nas formas farmacêuticas estudadas.

Conforme já mencionado, o volume do meio de dissolução pode variar de 500 a 1000 mL, sendo 900 mL o volume mais utilizado (MARQUES & BROWN, 2002). No presente trabalho verificou-se que volumes de 900 mL de ácido clorídrico 0,1N, de água ou de tampão fosfato pH 6,8 foram suficientes para garantir a solubilidade do fármaco e a condição *sink*.

Os perfis de dissolução obtidos nas diferentes condições testadas (Tabela 32) encontram-se nas Figuras 14 e 15.

Em relação às velocidades de rotação de 50 e 75 rpm verificou-se, tanto para cápsulas (Figura 14) como para comprimidos (Figura 15), que elas foram discriminativas. As velocidades de rotação normalmente utilizadas para cápsulas variam de 50 a 100 rpm. Para comprimidos, as velocidades mais utilizadas são 50 ou 75 rpm (MARQUES & BROWN, 2002).

Quanto aos aparatos, foram observadas algumas diferenças entre os perfis gerados com aparato pá e aqueles gerados com aparato cesta, dependendo do meio utilizado. Com o aparato pá, as cápsulas ficaram flutuando. O aparato cesta é, rotineiramente, utilizado para cápsulas, enquanto que o aparato pá é rotineiramente empregado para comprimidos (MARQUES & BROWN, 2002).

Pelo exposto, considerou-se que a rotação de 50 rpm seria adequada para ambas as formas farmacêuticas, utilizando aparato pá para comprimidos e cesta para cápsulas. Essa avaliação é devido à observação dos valores da eficiência de dissolução obtida nas diferentes condições testadas.

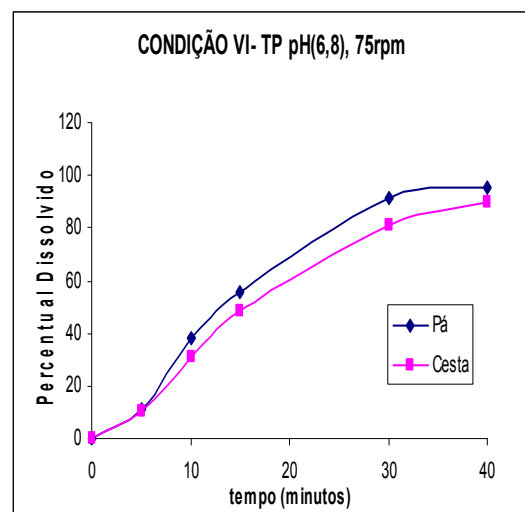
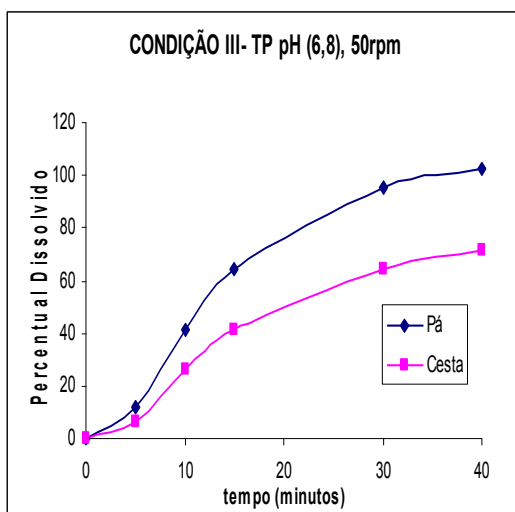
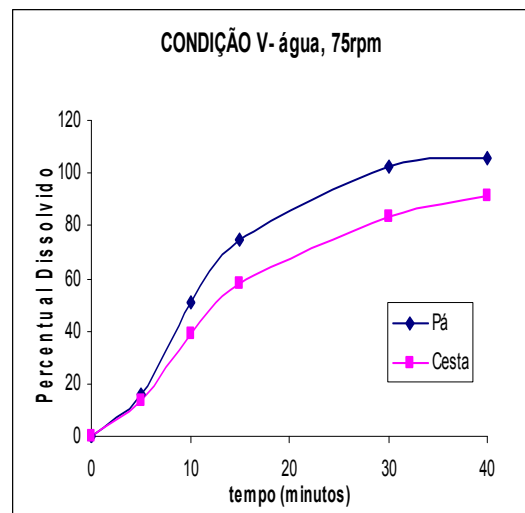
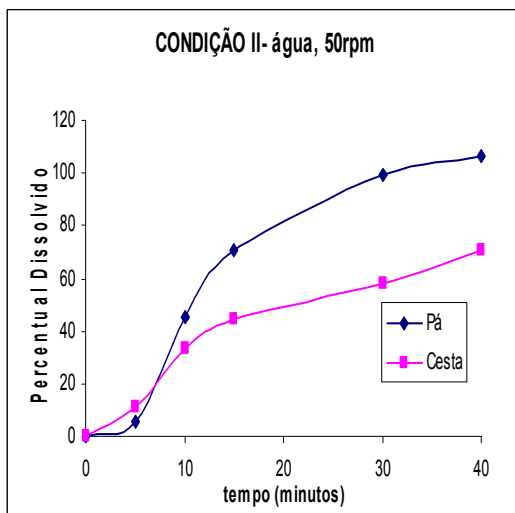
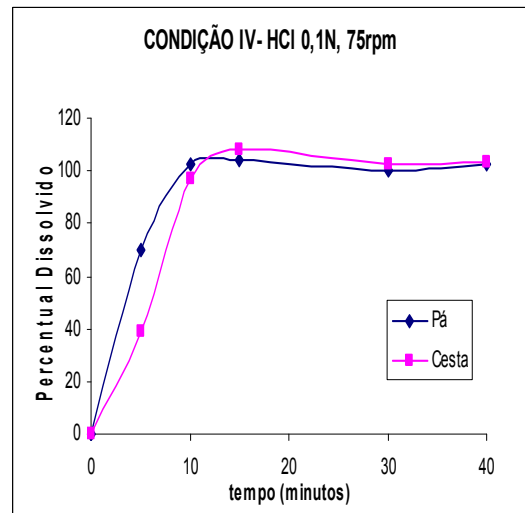
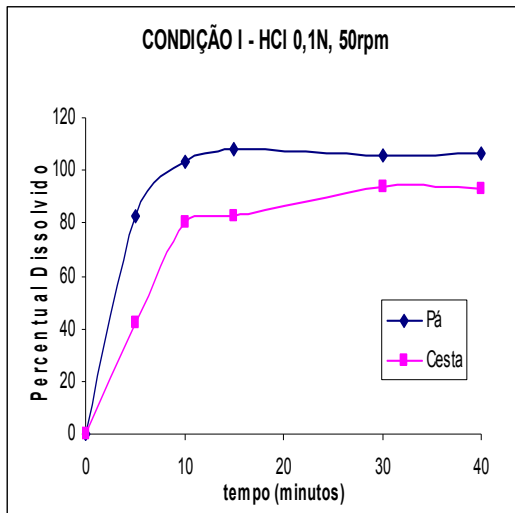


Figura 14- Perfil de dissolução de dissolução em cápsulas empregando diferentes meios, aparato pá e cesta e rotação de 50 e 75 rpm.

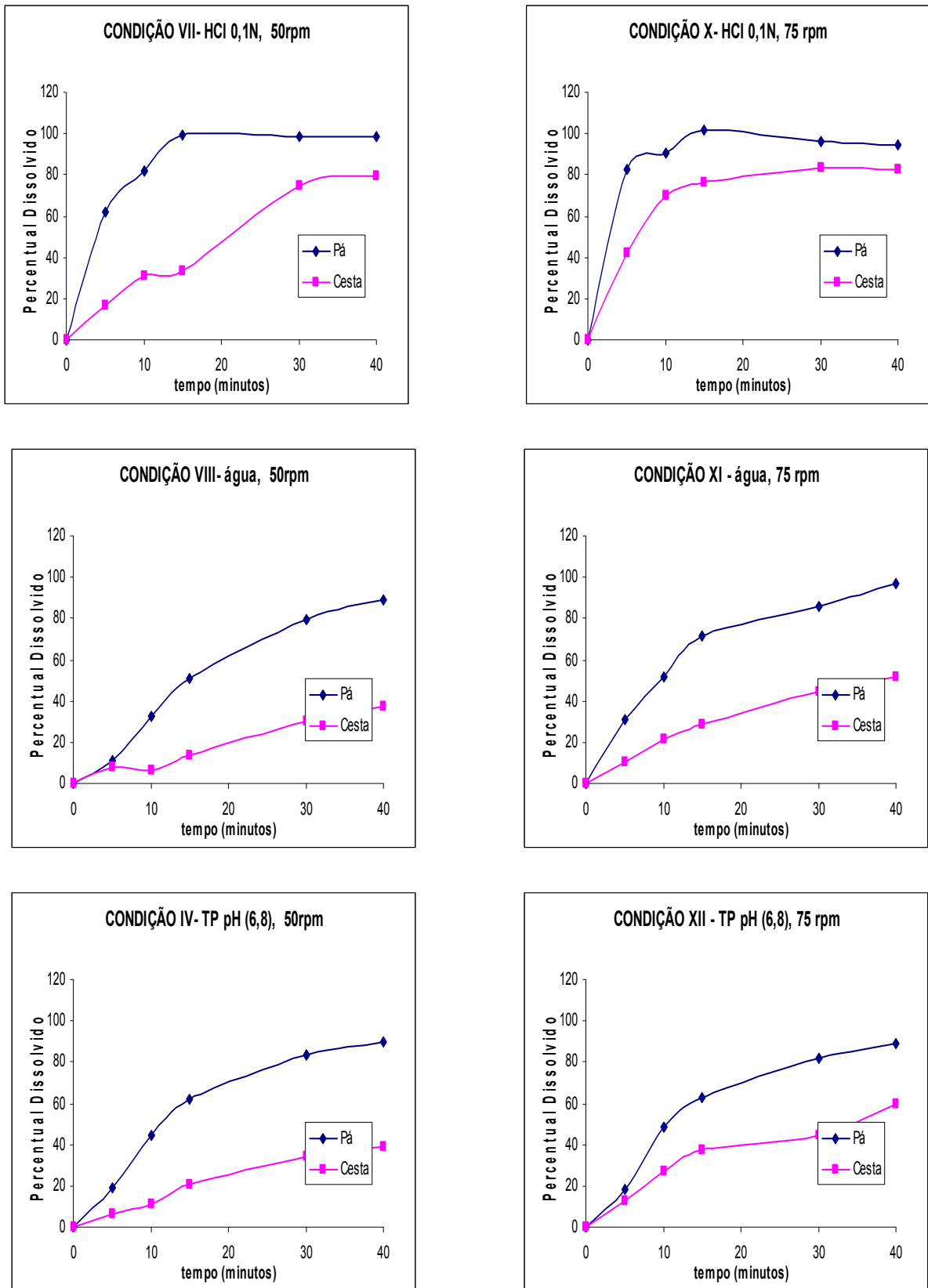


Figura 15 – Perfil de dissolução de deflazacort em comprimidos empregando diferentes meios, aparato pá e cesta e rotação de 50 e 75 rpm.

Quanto aos três meios testados, verificaram-se diferenças significativas nas porcentagens de fármaco dissolvido com o tempo.

A eficiência de dissolução permite comparar os perfis de dissolução e essa variável está relacionada com a quantidade real de fármaco que se encontra dissolvido no meio e assim pode-se ter um melhor prognóstico dos resultados *in vivo* (AGUIAR et al., 2005). Dessa forma, a eficiência de dissolução foi calculada, para subsidiar a escolha do meio de dissolução.

Verifica-se, na Tabela 34, que os maiores valores de eficiência de dissolução para comprimidos foram obtidos quando se utilizou ácido clorídrico 0,1N como meio, havendo diferenças entre pá e cesta. Para cápsulas, o meio que permitiu maior valor de eficiência de dissolução também foi ácido clorídrico 0,1N, mas as diferenças entre pá e cesta foram maiores.

Tabela 34 - Valores da Eficiência de Dissolução (%) obtidos nas diferentes condições testadas.

Forma		Meios de Dissolução			
Farmacêutica	rotação	Aparato	HCl 0,1N	Água	TP pH 6,8
Comprimido	50rpm	pá	81,3%	53,6%	59,4%
		cesta	46,5%	18,7%	22,4%
	75 rpm	pá	83,8%	65,2%	59,3%
		cesta	66,8%	30,7%	34,6%
Cápsulas	50 rpm	pá	92,9%	68,1%	64,8%
		cesta	74,3%	43,0%	43,3%
	75 rpm	pá	88,7%	71,8%	59,8%
		cesta	92,2%	57,5%	53,0%

TP 6,8: tampão fosfato pH 6,8

Para melhor elucidar a escolha do meio de dissolução, depois de escolhidos os aparatos e a rotação, foram representados nas Figuras 16 e 17, os perfis obtidos para cápsulas e comprimidos, respectivamente, de acordo com os parâmetros selecionados (50 rpm e cesta ou pás, para cápsulas e comprimidos, respectivamente) e nos três meios: ácido clorídrico, solução tampão fosfato pH 6,8 e água.

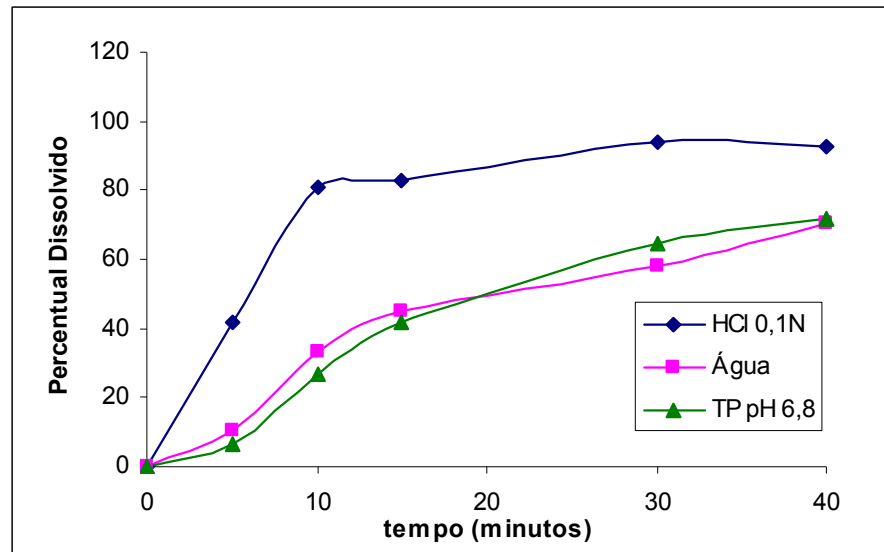


Figura 16 – Perfil de dissolução obtido para o DFZ nos meios HCl 0,1 N; água e tampão fosfato (TP) pH 6,8, a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, na forma farmacêutica de cápsulas, utilizando como aparato cesta e velocidade de rotação de 50 rpm.

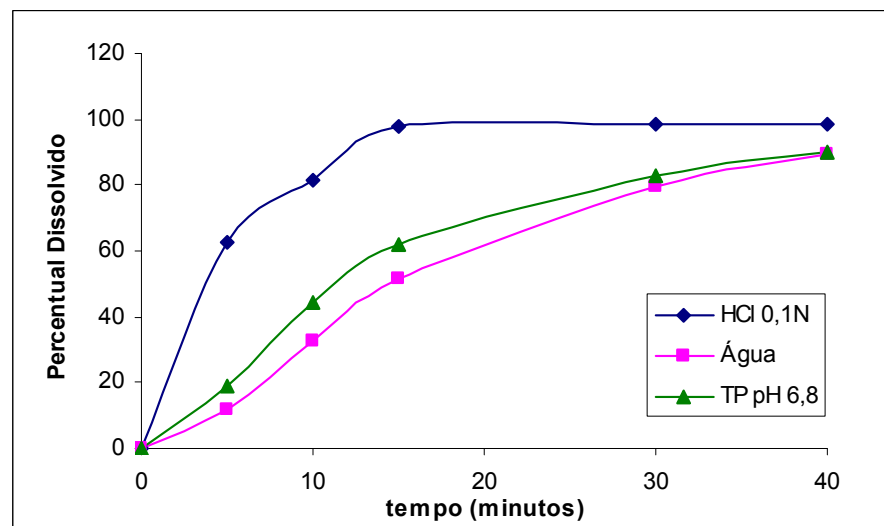


Figura 17 - Perfil de dissolução obtido para o DFZ nos meios HCl 0,1 N; água e tampão fosfato (TP) pH 6,8, a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, na forma farmacêutica de comprimidos, utilizando como aparato pá e rotação de 50 rpm.

As condições I (aparato cesta, 900 mL de HCl 0,1N e rotação 50 rpm) e VII (aparato pá, 900 mL HCl 0,1N e rotação 50 rpm) foram consideradas mais adequadas para verificar o percentual dissolvido do fármaco em função do tempo para cápsulas e comprimidos, respectivamente. Embora as cápsulas tenham

apresentado maior ED% com a velocidade de rotação de 75 rpm, essa velocidade não foi a escolhida devido à maior variabilidade (CV%) observada entre as cubas.

Assim que foram definidas as condições de dissolução, avaliou-se a influência do filtro, a estabilidade das soluções no meio de dissolução e, em seguida, realizou-se a validação do método de quantificação. O método utilizado para avaliar a porcentagem de fármaco dissolvida foi a espectrofotometria no ultravioleta, empregando HCl 0,1N e leitura em 244 nm.

A avaliação da influência do filtro tem como objetivo verificar se existem alterações significativas na concentração do fármaco, após a filtração. Os resultados da análise da influência do filtro na SQR e amostras encontram-se na Tabela 35. Observou-se que não houve alteração significativa nas leituras das absorvâncias antes e após a filtração com filtro quantitativo ou com membrana de acetato de celulose (poro de 0,45 µm). Dessa forma utilizou-se o filtro quantitativo para as amostras, devido ao menor custo.

Tabela 35 – Resultados encontrados nas avaliações dos filtros utilizados na filtração da substância química de referência (SQR) e das amostras de cápsulas e comprimidos por espectrofotometria no UV.

Tipo de filtração	Absorvâncias		
	SQR	cápsula	comprimido
Sem filtração	0,355	0,307	0,364
Filtro quantitativo	0,355	0,299	0,358
Membrana de acetato de celulose com poro 0,45 µm	0,365	0,298	0,356

Os estudos de estabilidade do fármaco no meio de dissolução foram realizados mantendo-se a SQR e amostras por 2h, a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em HCl 0,1N, e por 24 horas, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Conforme FORTUNATO (2005), para avaliar a estabilidade das soluções deve-se considerar uma variação menor que 3 %. Verificou-se que o fármaco foi estável nas condições avaliadas (Tabela 36), com variação na faixa de 98 a 102% (FORTUNATO, 2005; MARQUES & BROWN, 2002).

Tabela 36 – Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade da (SQR) e amostra simulada de excipientes (ASE) de comprimidos e cápsulas, por espectrofotometria no UV.

Amostra	%		
	SQR	ASE Cápsula	ASE Comprimido
Recém preparada	-	99,8	101,7
2 horas à 37,0 ± 0,5°C	100,4	99,6	98,0
24 horas à temperatura ambiente	99,1	98,0	98,0

O método de quantificação a ser utilizado na avaliação da percentagem dissolvida de fármaco deve cumprir com os parâmetros de validação, tais como especificidade, linearidade, precisão e exatidão (USP 29, 2005; ICH, 2005).

Para avaliar a especificidade do método proposto foram traçados os espectros da SQR e de amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas (Figura 18). Observou-se que não houve interferência dos excipientes quando analisados por espectrofotometria no UV.

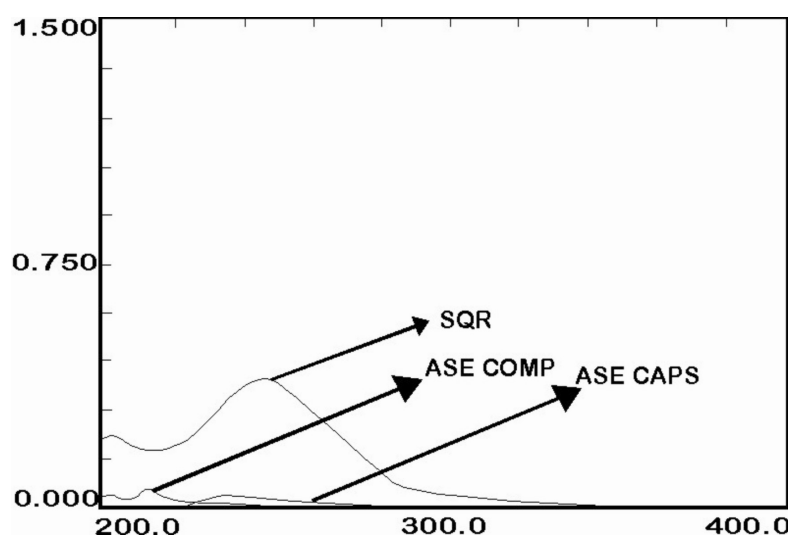


Figura 18 - Espectros de absorção na região do UV obtidos com SQR, ASE de comprimidos e ASE de cápsulas, após dissolução em HCl 0,1N, a 37 ± 0,5 °C, com rotação de 50 rpm e aparatos pá e cestas para comprimidos e cápsulas, respectivamente.

Os resultados da curva de calibração da SQR do deflazacort em HCl 0,1N demonstram que existe correlação linear entre as respostas (absorvâncias) e as concentrações, na faixa de 5 a 25 µg/mL (Figura 19). A Tabela 37 apresenta as absorvâncias correspondentes a cada uma das diluições de deflazacort SQR para as três curvas de calibração construídas. A equação da reta para o método foi: $y = 0,00359 x + 0,0064$, conforme a Tabela 38, com coeficiente de correlação superior a 0,999. A análise da variância (ANOVA) realizada sobre os valores das absorvâncias das curvas de calibração de deflazacort demonstra regressão linear significativa, sem desvio da linearidade ($P \leq 0,05$) (Tabela 38).

Tabela 37 – Valores de absorvâncias obtidas na determinação da curva de calibração do deflazacort em ácido clorídrico 0,1 N por espectrofotometria na região do UV.

Concentração (µg/mL)	Absorvâncias			média	CV%
	1° dia	2° dia	3° dia		
5	0,185	0,187	0,189	0,187	1,0
10	0,367	0,369	0,354	0,364	1,9
15	0,548	0,545	0,544	0,545	0,3
20	0,727	0,719	0,719	0,721	0,6
25	0,917	0,902	0,895	0,904	1,2

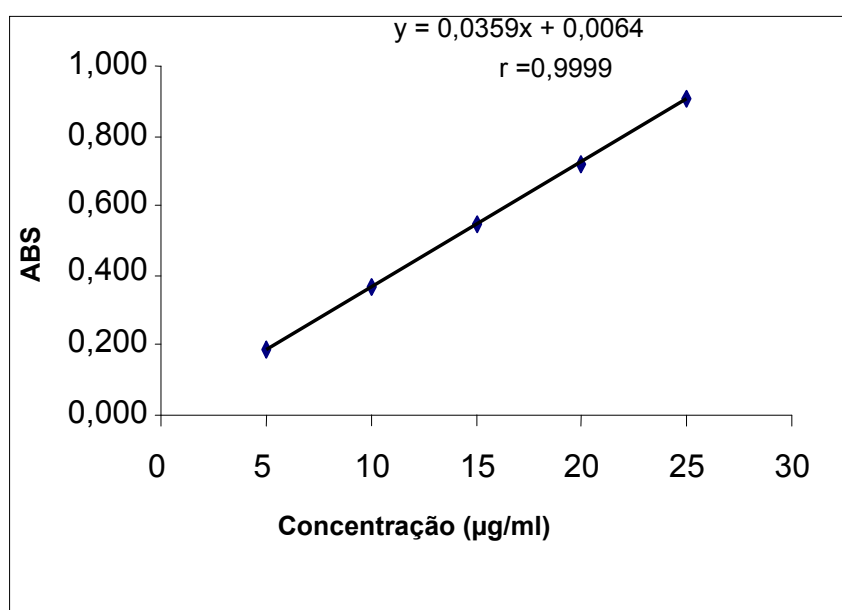


Figura 19 – Representação gráfica da curva de calibração do deflazacort em HCl 0,1N, por espectrofotometria na região do UV.

Tabela 38 – Resultados da curva de calibração obtida pelo método dos mínimos quadrados para o método espectrofotométrico na região do UV.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	5 a 25 µg /mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0359 x + 0,0064$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,0064 \pm 0,0006$
Inclinação (a) ± desvio padrão	$0,0359 \pm 0,0006$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999
Análise da variância	
Regressão linear	21 705 (4,96)*
Desvio da linearidade	0,32 (3,71)*

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). Ambas foram avaliadas com 6 comprimidos ou 6 cápsulas. Os valores experimentais médios obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta, para a dissolução do deflazacort em comprimidos, nas amostras analisadas no primeiro dia foi de 98,21% e, no segundo dia foi de 96,22% (Tabela 39). Os coeficientes de variação obtidos foram de 0,94 e 1,6 para o primeiro e segundo dia, respectivamente, sendo valores inferiores a 5%, indicando boa precisão do método. A análise da variância indicou que não houve diferença significativa entre as análises realizadas em diferentes dias, como mostra a Tabela 40.

Tabela 39 - Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de deflazacort em comprimidos com ácido clorídrico 0,1N, aparato pá, por espectrofotometria na região do UV.

Amostras	% dissolvida de deflazacort	
	Dia 1	Dia 2
1	98,53	95,51
2	96,88	97,43
3	99,63	98,25
4	98,53	95,24
5	97,98	96,06
6	97,71	99,08
Média	98,21	96,22
CV%	0,94	1,60

CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 40 - Análise da variância dos valores de percentagem dissolvida de DFZ em comprimidos, por espectrofotometria na região do UV, em diferentes dias.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre dias	1	4,96	4,96	2,99 (4,96)*
Resíduo	10	16,55	1,65	
Total	11	21,52		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P \leq 0,05$

Quando foi avaliada a precisão do método para a dissolução do deflazacort em cápsulas por espectrofotometria na região do UV, os resultados dos valores experimentais foram de 82,11% e 83,19% no primeiro e segundo dias, respectivamente (Tabela 41). A análise da variância indicou que não houve diferença significativa entre as análises realizadas em diferentes dias (Tabela 42).

Tabela 41 - Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de deflazacort em cápsulas, com ácido clorídrico 0,1N, aparato cesta, por espectrofotometria na região do UV.

Amostras	% dissolvida de deflazacort	
	Dia 1	Dia 2
1	79,84	76,21
2	75,09	81,79
3	85,98	87,65
4	84,02	85,98
5	83,46	82,07
6	84,30	86,54
Média	82,11	83,19
CV%	4,86	5,10

CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 42 - Análise da variância dos valores de percentagem dissolvida de DFZ em cápsulas, por espectrofotometria na região do UV em diferentes dias.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre dias	1	4,75	4,75	0,27(4,96)*
Resíduo	10	170,30	17,03	
Total	11	175,05		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P \leq 0,05$.

A percentagem de recuperação média para os comprimidos foi de 101,16% e de 96,66% para cápsulas, conforme Tabela 43. Os resultados obtidos para o método proposto encontram-se conforme o especificado, pois segundo Marques e Brown (2002) a recuperação deve estar entre 95 – 105%.

Tabela 43 - Valores experimentais do teste de recuperação realizado nas amostras simuladas de excipiente de comprimidos e cápsulas de deflazacort por espectrofotometria na região do UV.

Amostras	Quantidade de SQR (mg)		% de Recuperação	% Média de Recuperação
	Adicionada	Recuperada		
Comprimidos	5	5,19	101,0	101,16
	10	10,14	102,9	
	15	15,08	99,6	
Cápsulas	5	5,15	95,8	96,66
	10	10,19	98,3	
	15	14,75	95,9	

As especificações para quantidade de fármaco dissolvido envolvem uma quantidade mínima dissolvida em determinado intervalo de tempo. Muitas monografias oficiais estabelecem que não menos que 75% do fármaco devem dissolver em 45 minutos (MARCOLONGO, 2003). A Farmacopéia Britânica adota esse critério para quase todas as suas monografias (BP, 2003). As Farmacopéias Brasileira e Americana adotam critérios diferentes para cada fármaco e estabelecem, ainda, três estágios diferentes, antes da aprovação ou não do produto. No primeiro estágio, cada unidade deve liberar a quantidade mínima estabelecida (T) mais 5%. Se o produto não cumpre com o primeiro estágio, deve ser realizado um segundo estágio com mais seis unidades, e o produto será aprovado se o valor médio das 12 unidades (6 unidade de cada estágio) for superior ao valor mínimo especificado, e nenhuma unidade apresentar valor inferior a T menos 15%. Se o produto não cumprir com o segundo estágio, deve ser realizado um terceiro estágio, com doze unidades, e o valor médio das 24 unidades testadas (6 unidades do primeiro, 6 unidades do segundo e 12 unidades do terceiro estágio) deve ser superior ao valor mínimo especificado (T), no máximo duas unidades podem apresentar valores de T menos 15% e não pode existir unidades com valores menores que T menos 25%.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 40), poderia ser estabelecido, para comprimidos de deflazacort, um valor de T de 80%. Conforme as Farmacopéias Brasileira (1988) e Americana (USP 29, 2005), para ser aprovado no primeiro estágio, cada um dos seis comprimidos testados deveria liberar 85% (80% + 5%). Para cápsulas, verificou-se que a porcentagem liberada variou de 75,09 a 85,98% (Tabela 41), e talvez um valor de T de 70% (como indicado na Farmacopéia Americana para o glicocorticóide prednisolona) fosse mais adequado para essa forma farmacêutica. Essa menor dissolução nas cápsulas pode ser atribuída à menor velocidade de rotação empregada (50 rpm) ou à presença de carboximetilcelulose, que aumenta a viscosidade em meios aquosos, atuando como agente modulador da liberação de fármacos (WADE e WELLER, 1994; LOPES et al.; 2005).

Assim, para estabelecer adequadamente as especificações para o teste de dissolução de DFZ em comprimidos e cápsulas, devem ser realizados testes adicionais com outros lotes e outras especialidades farmacêuticas.

6 CONCLUSÕES

- A identidade e a pureza da matéria-prima utilizada como substância química de referência foram atestadas através de análises de ponto de fusão, espectrofotometria nas regiões do infravermelho e ultravioleta, calorimetria diferencial exploratória e cromatografia líquida de alta eficiência.
- O método desenvolvido utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para a análise quantitativa de deflazacort em comprimidos e cápsulas, podendo ser utilizado, também, como método de identificação.
- A espectrofotometria na região do ultravioleta, em 244 nm, utilizando o etanol como diluente, mostrou-se sensível, precisa, linear, específica e exata para a análise quantitativa de deflazacort em comprimidos e cápsulas, podendo ser utilizada, também, como método de identificação.
- A espectrofotometria na região do visível, em 519 nm, utilizando como reagentes o azul de tetrazólio 0,5% em metanol e o hidróxido de tetrametilamônio a 10% em metanol, e etanol como solvente, mostrou-se linear, sensível, preciso e exato para a análise quantitativa de deflazacort em comprimidos e cápsulas. Apresentou, no entanto, interferência dos excipientes e deve ser otimizado antes de ser utilizado para fins de quantificação do deflazacort em comprimidos e cápsulas.
- A análise comparativa entre os métodos propostos para determinação quantitativa do deflazacort mostrou, através de ANOVA, que há diferença significativa entre os teores obtidos. A diferença entre os teores obtidos foi atribuída, através de Tukey, ao método por espectrofotometria na região do visível.
- O uso de 900 mL de ácido clorídrico 0,1N, a $37,0 \pm 0,5$ °C, aparato pá (comprimidos) e cesta (cápsulas), ambos com velocidade 50 rpm,

demonstram resultados satisfatórios para analisar a dissolução das duas formas farmacêuticas contendo deflazacort.

- Sugere-se para comprimidos um valor de $T \geq 80\%$ de percentual dissolvido e para cápsulas um valor de $T \geq 70\%$. No entanto, para estabelecer as especificações para o teste de dissolução de deflazacort em comprimidos e cápsulas, devem ser realizados testes adicionais com outros lotes e outras especialidades farmacêuticas.
- O método por espectrofotometria na região do ultravioleta pode ser empregado para a quantificação do deflazacort dissolvido, nas amostras obtidas no teste de dissolução.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU M. M.; ALBUQUERQUE. Uso de corticóide na prática reumatológica. **Boletim da Sociedade de Reumatologia do Rio de Janeiro**. v.30, n. 106, out/dez., 2000.

ADAMS, E.; COOMANS, D.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L. Application of linear mixed effects models to the evaluation of dissolution profiles. **Journal Pharmaceutical**. v.226, p.107-25, 2001.

AGUIAR, G.; FARIA, H.G.; SERRA, C. H. R.; PORTA, V. Avaliação biofarmacêutica in vitro de formas farmacêuticas sólidas contendo doxicilina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.41, n.4, p. 452 – 458, 2005.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 15 ed. Arlington. V.1, p.27, 1990.

BERNAREGGI I.A.; POLETT P.; ZANOLO G. & ZERILLI L. F.; **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.2, v.5, p. 177-181, 1987.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de jun. 2003a.

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

BRITISH PHARMACOPEIA (BP), Her Majesty's Stationary Office, London, 2003.

BROWN, C.K.; CHOKSHI, .P.; NICHRESON, B.; REED, R.A.; ROHRS, B.R.; SHSH, P. Dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technologies**. p. 56-65, 2004..

BUDAVARI, S (eds.) The Merck Index. 12 ed. London:Merck, 1996.

COSTA, P. An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. **Journal Pharmaceutical**. Amsterdam, v. 220, p. 77- 83, 2001.

DOKOUMETZIDIS, A, MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whytney to the Biopharmaceutical Classification System. **International Journal of Pharmaceutics** v.321 p.1-11, 2006.

EBERHARDT R.; KRÜGER K.; REITER W.; GROSS W.; ZWINGERS Jr.; Long-term Therapy with the New Glucocorticoid Deflazacort in Rheumatoid Arthritis. v.44, p. 642 - 647, 1994.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, IV ed, Atheneu, São Paulo, 1988.

FDA: Guidance for Industry: Dissolution Testing of Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms. US Department of Health and Human Services (CDER), 13p.,1997.

FORTUNATO, D. Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. **Dissolution Technologies**. p.12 – 14, 2005.

GIL, E.S; ORLANDO, R.M.; MATIAS, R.; SERRANO, S.H.P. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos, Campo Grande: Editora UNIDERP, 438p.,2005.

GENNARO, A. R. Remington's pharmaceutical sciences. 17, ed. Eastm:Mack, 2000, p.,1990.

GOMES, P. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade em rosiglitazona em comprimidos revestidos. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. UFRGS, Porto Alegre, 2003.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on Validation of Analytical Procedure Q2 (R1): Text and Methodology, 2005.

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

KIBBE, A. H. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Washington: **American Pharmaceutical Association**. 665p., 2000.

LANNA, C.M.M.; MONTENEGRO JR. R.M.; PAULA, F.J.A. Fisiopatologia da Osteoporose Induzida por Glicocorticóide. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabolismo**. v.47, n.1, p.9-16, 2003.

LE HIR, A Farmácia Galênica. Barcelona:Masson, 383 p.,1995.

LIPPUNER. K.; CASEZ. J-P.;HORBER, F.F.; JAEGER, P. Effects of Deflazacort *versus* Prednisone on Bone Mass, Body Composition, and Lipid Profile: A Radomized, Double Blind Study in Kidney Transplant Patients. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.83, n.11, p. 3795-3802, 1998.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.41, n.2, 2005.

LUENGO, M.B. Uma revisão histórica dos principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entendimento e tratamento das doenças inflamatórias. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.2(2), p.64-72, 2005.

MANADAS R, PINA ME, VEIGA F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.38, n.4, p.375-399, 2002.

MARCOLONGO R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica [Dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, USP; 2003.

MARQUES M.R.C. & BROWN, E. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analítica**.v.1,p.48-51,2002.

MARKHAM A.;BRYSON M. H.; Deflazacort. A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy. Aids International Limited, Auckland, New Zeland. v.50, p.317-333, 1995.

MEHTA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v.122, p. 83R-88R, 1997.

MENDEZ, A. S. L.; Validação de metodologia de análise para antibiótico carbapenêmico – Meropenem. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. Statistics for analytics chemistry, 4^a ed. Chichester: Ellis Horwood, 2000.

MOORE, J.W.; FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical Technologies**. v.20, n.6, p.64-74,1996.

ÖZKAN Y.; SAVASER A.; TAS Ç.; USLU B.; ÖZKAN S. A.; Drug Dissolution Studies and Determination of Deflazacort in Pharmaceutical Formulations and Human Serum Samples by RP-HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v.26; n.13; p.2141-2156, 2003.

PATSCHAN, K.; LODDENKEMPER. K.; BUTTGEREIT. F. Molecular Mechanisms of Glucocorticoid-induced Osteoporosis. Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité Hospital of the Humboldt-Universität of Berlin, Berlin, Germany, v.29, n.6, p.498-505, 2001.

QURESHI, S.A; MCGILVERAY, I.J Typical variability in drugs dissolution testing: study with USP and FDA calibrators tablets and a marketed drug (glibenclamide) product. **European Journal Pharmaceutical**. v.7,p.249- 58, 1999.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C.S.F.;MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.0, 1-x, 2004.

RIZZATO, A.; RIBOLDI. A.; IMBIMBO, B.; TORRESIM, A.; MILANI. S. The long-term efficacy and safety two different corticosteroids in chronic sarcoidosis. **Respiratory Medicine**. v.91, p.441- 460, 1997.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S. MATOS, J. R. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.24 n.3, p.383-387, 2005.

SANTOS-MONTES A.; GONZALO-LUMBRERAS R.; GASCO-LOPES A.I.; ISQUIERDO-HORNILLOS R.; Extraction and High-performance liquid chromatographic separation of Deflazacort and its metabolite 21-hydroxydeflazacort. Application to urine samples. **Journal of Chromatography B**. v. 657, p.248-253, 1994.

SANTOS-MONTES A.; IZQUIERDO-HORNILLOS R.; Optimization of separation of a complex mixture of natural and synthetic corticoids by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate. Application to urine samples. **Journal of Chromatography B**. v. 724, p. 53-63, 1999.

SCHÄCKE. H.; DÖCKE. W-D.; ASADILLA, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, p.23 – 43, 2002.

SIEWERT, M., WEINANDY, L., WHITEMAN, D., JUDKINS, C. Typical variability and evaluation of sources of variability in drug dissolution testing. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical** v.53, p.9-14, 2002.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER F. X. Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos, 6ª ed., **Livros Técnicos e Científicos**. Rio de Janeiro, 2000.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. **Pharmaceutical Technology**. On-Line. p.1-14, 2000.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO. R.; GASPAROTTO. F.; VILANOVA, C. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Revista Infarma**. v.16, n.9-10, p.51-56, 2004.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de ciências farmacêuticas**. v.35, n.1, p.1-11, 1999.

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

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 29 ed. Rockville, United States Convention, 2005.

WALKER B. W. Deflazacort: towards selective glucocorticoid receptor modulation? **Clinical Endocrinology**. v. 52, p.13-15, 2000.

WATSON, D.G. *Pharmaceutical Analysis – A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, Ed. Churchill Livingstone, Glasgow, UK, 1999.

YAZDANIAN, M.; BRIGGS, K.; JANKOVSKY, C.; HAWI, A. The “high solubility” of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs. **Pharmaceutical Research**, v.21, n.2, 2004.

YUKSEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of *in vitro* dissolution profiles by ANOVA-based, Model-dependent and independent methods. **Int. Journal Pharmaceutical**, Amsterdam, v. 209, p. 57-67, 2000.