

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

**OTIMIZAÇÃO DA AVALIAÇÃO DO FÁRMACO
E COMPRIMIDOS DE ATENOLOL:
APLICAÇÃO
EM PRODUÇÃO, CONTROLE E REGISTRO DE
MEDICAMENTO GENÉRICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Anelise Weich

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**OTIMIZAÇÃO DA AVALIAÇÃO DO FÁRMACO E
COMPRIMIDOS DE ATENOLOL: APLICAÇÃO
EM PRODUÇÃO, CONTROLE E REGISTRO DE
MEDICAMENTO GENÉRICO**

por

Anelise Weich

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 Clarice Madalena Bueno Rolim

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

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

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

**OTIMIZAÇÃO DA AVALIAÇÃO DO FÁRMACO E
COMPRIMIDOS DE ATENOLOL: APLICAÇÃO EM
PRODUÇÃO, CONTROLE E REGISTRO DE
MEDICAMENTO GENÉRICO**

elaborada por
Anelise Weich

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof. Dr^a. Marta Palma Alves (UNIFRA)

Prof^a Dr^a Simone Gonçalves Cardoso (UFSM)

Santa Maria, 07 de março de 2007.

Dedico este trabalho ao meu marido e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Bom, o homem não vive só, logo ele também não produz só. Nesta jornada necessitamos de conhecimento, de amor, de carinho, de fé, de apoio, de esclarecimento, de ajuda.

Não existem palavras para definir a minha gratidão a todos vocês que de alguma maneira estiveram presentes durante todo este trabalho. Muito obrigada e um beijo no coração.

À Professora Dra Clarice Madalena Bueno Rolim, amada orientadora, meu orgulho, meu exemplo, pessoa maravilhosa, cheia de vida, mãe, profissional, competente.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo conhecimento doado, pela amizade, pela cumplicidade.

Ao professor Marcos Antonio Segatto, da Universidade Federal de Santa Catarina, por ter realizado gentilmente as análises de calorimetria diferencial exploratória.

Aos colegas, pela troca de conhecimento, pelas vivências, por aqueles chimarrões que davam força para assistir e compreender as aulas.

À Giane, pessoa m-a-r-a-v-i-l-h-o-s-a, exemplo de garra, de perseverança, de objetivo. Muitas vezes, encontrei forças no teu exemplo para seguir em frente. Obrigada pelo carinho, pela amizade, pela torcida e pela força e incentivo que sempre me destes.

À Daniele, amiga, colega, atenciosa, prestativa. Obrigado pela força e carinho.

À Elaide Minatto, sempre atenciosa, disposta e sempre pronta a ajudar.

Aos professores Augusto Haubold e Ruy Beck, por cederem o laboratório para realizarmos as análises de caracterização da matéria prima.

À Karin, orientada na iniciação científica, competentíssima, sempre pronta a ajudar nas horas atribuladas.

À Daiane, literalmente, meu braço direito, minha discípula, exemplo de disciplina, competência e força. Obrigada pela ajuda incansável que me deste...

À Josélia, amiga do peito e de toda hora, agradeço a ajuda na escolha do tema, apoio e força inclusive nas etapas finais deste trabalho.

À todo pessoal do laboratório, pela força, carinho, apoio e toda ajuda necessária para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada a Márcia, a Jamile, a Aline e ao Leandro (pela força com a estatística e o excel).

Aos doutores Luiz Donaduzzi e Carmen Donaduzzi, por apoiarem este trabalho incondicionalmente.

À minha família amada mãe, pai, vó, irmãos. As manas Chele e Carol pela caminha sempre arrumada quando eu chegava de madrugada cansada e com frio, obrigado pelo amor e carinho.

Aos meus sogros e a Graci, pelo carinho e incentivo.

E finalmente ao meu amor, Beto, exemplo de marido. Obrigado pelo apoio, pelo amor, carinho, afeto, por não deixar que eu desistisse nas horas difíceis, pelas idas e vindas da rodoviária, pelos domingos que ficaste sozinho sem reclamar, por me incentivar quando eu cansava, por não se importar que eu passasse os fins de semana estudando, enfim, por tudo isso que vivemos nestes últimos dois anos. Te amo!

A consciência de sabermos mais, nos leva a
consciência de sabermos pouco.

José Saramago

RESUMO

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

OTIMIZAÇÃO DA AVALIAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA E COMPRIMIDOS DE ATENOLOL: APLICAÇÃO EM PRODUÇÃO, CONTROLE E REGISTRO DE MEDICAMENTO GENÉRICO

AUTORA: ANELISE WEICH

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de março de 2007.

O atenolol é um betabloqueador seletivo que age preferencialmente sobre os receptores adrenérgicos beta-1 do coração, utilizado no controle da hipertensão arterial, angina pectoris, arritmias cardíacas e no tratamento do infarto do miocárdio. Este trabalho tem o objetivo de otimizar as metodologias descritas para a avaliação do fármaco e comprimidos de atenolol, através do desenvolvimento e validação de métodos simples e mais acessíveis para avaliação de comprimidos e matéria prima de atenolol. Procura, também, destacar as características ideais para o fármaco na fase de pré-formulação e desenvolvimento da forma farmacêutica. Neste contexto, foram desenvolvidas e validadas metodologias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria no ultravioleta para quantificação de atenolol em comprimidos. Foram também aplicadas técnicas de caracterização da matéria prima para classificação da mesma na fase de pré-formulação. O método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência apresenta vantagens sobre o método farmacopeico por estabelecer uma análise sem utilização de reagente de pareamento iônico, heptanossulfonato, por ser mais rápido e simples. Ambos os métodos quantitativos desenvolveram-se lineares, específicos, exatos, precisos, robustos, e equivalentes entre si. Para o estudo de dissolução realizado com as formulações farmacêuticas de atenolol, após a análise de eficiência de dissolução, não se observou variação significativa entre as curvas de dissolução obtidas através dos métodos desenvolvidos e da metodologia farmacopeica. A análise da matéria-prima de atenolol permitiu sua caracterização, garantindo um emprego adequado na fabricação da forma farmacêutica. As análises comparativas entre o medicamento teste e o medicamento referência permitem afirmar que as duas formulações são semelhantes e com mesmo desempenho *in vitro*, isto é, são equivalentes farmacêuticos. Os métodos descritos são úteis em análise de controle de qualidade rotineira de formulações farmacêuticas de atenolol e a análise comparativa entre os métodos propostos e a metodologia oficial, demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa, caracterizando a equivalência dos mesmos.

Palavras-chave: atenolol; CLAE; espectrofotometria; dissolução; equivalência farmacêutica.

ABSTRACT

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

OPTIMIZATION OF ATENOLOL RAW MATERIAL AND TABLETS EVALUATION: APPLICATION IN PRODUCTION, CONTROL AND REGISTER OF GENERIC DRUGS

AUTHORA: ANELISE WEICH

ADVISER: PROF^a. DR^a. CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Place and Date of Defense: Santa Maria, march, 2007.

The atenolol is a selective β -blocker that acts specially on β -one adrenergic receptors of the heart, used in the control of high blood pressure, pectoris angine, cardiac arrhythmias and the treatment of miocardic stroke. This paper aimed to optimize the described methodologies for drugs and tablets of atenolol. It proposes to develop and validate simple and more accessible tests to evaluate atenolol tablets and raw material. It also emphasizes the ideal characteristics for drugs in the pre-formulation and development of the pharmaceutical form. Methodologies were developed and validated by HPLC and UV spectrophotometric for the quantification of atenolol in tablets. Raw material characterization techniques were also applied for the classification of atenolol in the pre-formulation. A pharmaceutical equivalence test was performed and compared to the national market reference drug. The HPLC developed method presents advantages over the official methodology to establish an analysis without the use of ionic pareator heptane sulphonate, for being faster and more simple. Both quantitative development methods were linear, specific exact, precise, robust and equivalent between themselves. For the dissolution performed with atenolol pharmaceutical form, after the dissolution efficiency analysis no meaningful difference were observed between the obtained dissolution curves through developed methods and the pharmacopeial methodology. The atenolol raw material analysis permitted its characterization, assuring an adequate use in the pharmaceutical form manufacturing. The comparative analysis between the test drug and reference drug allowed to claim that the two formulations are similar and with the some in vitro performance, i.e., they are pharmaceutical equivalent. The described methods are useful in routine quality analysis control of atenolol. The comparative analysis between the proposed methods and official methodology demonstrated that there is no statistical meaningful differences characterizing their equivalence.

Keywords: atenolol, HPLC, spectrophotometry, dissolution, pharmaceutical equivalence.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Resultados obtidos para a determinação de umidade, resíduo de incineração (ignição), rotação óptica específica e ângulo de repouso.....	43
TABELA 2: Resultados de teor do fármaco atenolol.....	44
TABELA 3: Resultados obtidos na determinação da compressibilidade.....	45
TABELA 4: Resultados da determinação da densidade.....	45
TABELA 5: Resultados do diâmetro médio da partícula obtidos no teste de granulometria.....	46
TABELA 6: Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do atenolol por cromatografia líquida.....	62
TABELA 7: Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método por cromatografia líquida.....	63
TABELA 8: Análise de variância das absorbâncias obtidas nas três curvas de calibração do atenolol por cromatografia líquida de alta eficiência.....	63
TABELA 9: Valores experimentais referentes à determinação de atenolol em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência para precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária).....	64
TABELA 10: Análise de variância dos teores obtidos na determinação de atenolol por cromatografia líquida.....	64
TABELA 11: Valores experimentais obtidos no parâmetro exatidão em amostras de comprimidos de atenolol por cromatografia líquida de alta eficiência.....	65
TABELA 12: Valores experimentais obtidos a partir das modificações nas condições cromatográficas.....	65
TABELA 13: Absorbâncias obtidas na determinação da curva de calibração do atenolol por espectrofotometria no ultravioleta.....	72
TABELA 14: Análise de variância das absorbâncias obtidas nas três curvas de calibração do atenolol por espectrofotometria no ultravioleta.....	72
TABELA 15: Valores experimentais referentes à determinação de atenolol em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta para precisão intra-dia	

(repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária).....	74
TABELA 16: Análise de variância dos teores obtidos na determinação de atenolol por espectrofotometria no ultravioleta.....	75
TABELA 17: Valores experimentais obtidos no parâmetro exatidão em amostras de comprimidos de atenolol por espectrofotometria no ultravioleta.....	75
TABELA 18: Valores experimentais obtidos a partir das modificações nas condições do método espectrofotométrico.....	76
TABELA 19: Análise de variância dos teores obtidos na determinação de atenolol em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta, cromatografia líquida e o método oficial.....	76
TABELA 20: Parâmetros utilizados para avaliação da % dissolvida de comprimidos de atenolol (USP 29, 2006).....	82
TABELA 21: Valores individuais em “mg” obtidos para determinação de peso-médio (PM), desvio padrão (DP) e limites inferior e superior para os comprimidos analisados.....	84
TABELA 22: Resultados obtidos para o teste de desintegração de atenolol comprimidos.....	85
TABELA 23: Resultados obtidos para a determinação de umidade por Karl Fischer...	85
TABELA 24: Resultados obtidos para a determinação de dureza e friabilidade.....	86
TABELA 25: Valores experimentais obtidos para a análise de teor de atenolol comprimidos.....	86
TABELA 26: Valores de porcentagens dissolvidas (%) de atenolol obtidos por espectrofotometria de ultravioleta.....	87
TABELA 27: Valores da eficiência de dissolução (%) obtidos, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).....	88
TABELA 28: Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de atenolol comprimidos (100 mg).....	89
TABELA 29: Valores experimentais (%) obtidos na determinação da uniformidade de conteúdo de atenolol comprimidos.....	90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química do atenolol (CAS 29122-68-7).....	22
FIGURA 2: Eficiência da dissolução (ED)(KHAN, 1975).....	33
FIGURA 3: Espectros obtidos para a SQR de atenolol (1), Fornecedor A (2), Fornecedor B (3) e Fornecedor C (4).....	42
FIGURA 4: Termograma obtido para o Fornecedor A, demonstrando o intervalo de fusão de 148,97 a 158,04 °C, assim como o ponto exato da fusão 152,77 °C.....	47
FIGURA 5: Termograma obtido para o Fornecedor B, demonstrando o intervalo de fusão de 149,91 a 158,78 °C, assim como o ponto exato da fusão 153,48 °C.....	47
FIGURA 6: Termograma obtido para o Fornecedor C, demonstrando o intervalo de fusão de 152,97 a 160,92 °C, assim como o ponto exato da fusão 155,79 °C.....	48
FIGURA 7: Cromatograma obtido com a solução de SQR na concentração de 250 µg/mL Fase móvel tampão acetato de amônia: Acetonitrila (80:20 v/v), coluna C ₁₈ , 275 nm, 0,8 mL/min.....	60
FIGURA 8: Cromatogramas obtidos com a degradação forçada da solução amostra submetida à (a) hidrólise básica (NaOH 1,0 N), (b) hidrólise ácida (HCl 0,5 N) e (c) reação de oxidação (H ₂ O ₂ 10%); por 12 horas a 35°C. Fase móvel: tampão acetato de amônia: acetonitrila (80:20 v/v), coluna C ₁₈ , detecção: 275 nm, vazão: 0,8 mL/min....	60
FIGURA 9: Cromatograma obtido da contaminação da amostra com 125 µg/mL de ASE. Fase móvel tampão acetato de amônia: Acetonitrila (80:20 v/v), coluna C ₁₈ , 275 nm, 0,8 mL/min.....	61
FIGURA 10: Representação gráfica da curva de calibração média do atenolol obtida através do método de cromatografia líquida.....	62
FIGURA 11: Espectros de varredura da SQR de atenolol (verde) e da ASE (azul).....	71
FIGURA 12 Representação gráfica da curva de calibração do atenolol obtida através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta.....	73
FIGURA 13 Perfil de dissolução comparativo entre os lotes A, B, C, D, E e R.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA: Análise de Variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
ASE: Amostra Simulada de Excipientes
CAS: Chemical Abstract Service
°C: Grau Celsius
CLAE/HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
cm: centímetros
DMF: Drug Master File
DPR: Desvio Padrão Relativo.
DSC: Calorimetria Diferencial Exploratória
ED: Eficiência da Dissolução.
EMA: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
e.p.m: Erro Padrão da Média
 f_1 : Fator de Semelhança
 f_2 : Fatores de Diferença
FDA: Food and Drug Administration
FFSOLI: Forma Farmacêutica Sólida de Liberação Imediata
GL: Graus de Liberdade
ICH: International Conference on Harmonisation
IV: Infravermelho.
LD: Limite de Detecção.
LQ: Limite de Quantificação.
mg: miligrama
min: minuto
mL: mililitros
mm: milímetros
nm: nanômetros
OMS: Organização Mundial da Saúde
PDA: Photo-diodo array
PM: Peso Médio
REBLAS: Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde

SQR: Substância Química de Referência

TFA: Trifluoroacético

TGA: Termogravimetria

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography

UV: Ultravioleta.

XRD: Difração de Raios X

μm : Micrômetro

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Objetivo.....	21
1.1.1 Objetivos gerais.....	21
1.1.2 Objetivos específicos.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Considerações Gerais.....	22
2.2 Mecanismo de Ação.....	23
2.3 A Hipertensão.....	24
2.4 Metodologias de Avaliação.....	25
2.5 Caracterização e Qualificação do Fármaco.....	27
2.6 Formas Farmacêuticas Sólidas.....	31
2.7 Equivalência Farmacêutica.....	34
2.8 Registro De Medicamento Genérico.....	34
3 CAPÍTULO I- AVALIAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA DE ATENOLOL.....	36
3.1 Introdução.....	36
3.2 Amostras.....	36
3.3 Solventes e Reagentes.....	36

3.4 Equipamentos e Acessórios.....	37
3.5 Parâmetros Avaliados.....	38
3.5.1 Identificação.....	38
3.5.1.1 Arraste de Fotodiodos.....	38
3.5.2 Determinação de Umidade por Karl Fischer.....	38
3.5.3 Resíduo de Incineração e resíduo de Ignição.....	39
3.5.4 Rotação Óptica Específica.....	39
3.5.5 Teor.....	40
3.5.6 Cloretos.....	40
3.5.7 Ângulo de Repouso.....	40
3.5.8 Capacidade de Compactação ou Compressibilidade.....	41
3.5.9 Densidade.....	41
3.5.10 Granulometria.....	41
3.5.11 Calorimetria Diferencial Exploratória.....	42
3.6 Resultados e Discussão.....	42
3.6.1 Arraste de Fotodiodos.....	42
3.6.2 Determinação de Umidade por Karl Fischer.....	43
3.6.3 Teor.....	44
3.6.4 Limite de Cloretos.....	44
3.6.5 Capacidade de Compactação e Compressibilidade.....	45
3.6.6 Densidade Aparente.....	45
3.6.7 Granulometria.....	46
3.6.8 Calorimetria Diferencial Exploratória.....	47
4 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DE ATENOLOL.....	49

4.1 Introdução.....	49
4.2 Parâmetros Avaliativos durante a Validação do Método Analítico.....	49
4.2.1 Especificidade.....	49
4.2.2 Linearidade.....	49
4.2.3 Precisão.....	50
4.2.4 Exatidão.....	51
4.2.5 Limite de Detecção.....	51
4.2.6 Limite de Quantificação.....	52
4.2.7 Robustez.....	52
4.3 Produtos Farmacêuticos.....	52
4.4 Solventes e Reagentes.....	53
4.5 Equipamentos e Acessórios.....	53
4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	54
4.6.1 Validação do Método Analítico.....	55
4.6.1.1 Preparo das soluções.....	55
4.6.1.2 Especificidade.....	56
4.6.1.3 Linearidade.....	57
4.6.1.4 Precisão.....	57
4.6.1.5 Exatidão.....	58
4.6.1.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	58
4.6.1.7 Robustez.....	58
4.6.2 Resultados e Discussão.....	59
4.7 Espectrofotometria no Ultravioleta.....	66

4.7.1 Validação do Método Analítico.....	66
4.7.1.1 Preparo das Soluções.....	67
4.7.1.2 Especificidade.....	67
4.7.1.3 Linearidade.....	68
4.7.1.4 Precisão.....	69
4.7.1.5 Exatidão.....	69
4.7.1.6 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD).....	70
4.7.1.7 Robustez.....	70
4.7.2 Resultados e Discussão.....	70
4.8 Comparação dos Métodos propostos e da Metodologia Oficial.....	76
5 CAPÍTULO III - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O MEDICAMENTO TESTE E O MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA.....	78
5.1 Introdução.....	78
5.2 Amostras Utilizadas no Estudo.....	78
5.3 Solventes e Reagentes.....	79
5.4 Equipamentos e Acessórios.....	79
5.5 Determinação do Peso Médio dos Comprimidos.....	80
5.6 Determinação do Tempo de Desintegração dos Comprimidos.....	80
5.7 Determinação da Umidade por Karl Fischer.....	80
5.8 Determinação de Resistência Mecânica em Comprimidos.....	81
5.8.1 Friabilidade.....	81
5.8.2 Dureza.....	81
5.9 Identificação do Atenolol nas Amostras.....	81
5.10 Doseamento de Atenolol nas Amostras.....	81

5.11 Teste de Dissolução.....	82
5.12 Perfil de Dissolução.....	82
5.13 Uniformidade de Doses Unitárias nas Amostras.....	82
5.14 Resultados e Discussão.....	83
6 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, política de medicamentos é um conjunto de diretrizes com a finalidade de assegurar para a população uma provisão adequada de medicamentos seguros, eficazes e de boa qualidade (WHO, 1995).

Considerando que no Brasil 86% dos fármacos registrados estão fora de proteção patentária, e que mais de 50% da população brasileira não tem acesso a medicamentos por problemas econômicos, conclui-se que os medicamentos genéricos, além de serem uma realidade irreversível, correspondem a um mercado em franco desenvolvimento (HISTÓRIA, 2005).

Em 1999, a Lei 9.787 de 10 de fevereiro, instituiu o medicamento genérico no país de acordo com as normas internacionais (EMEA, FDA e OMS), com o intuito de garantir que a qualidade dos medicamentos genéricos no Brasil fosse comparada à dos medicamentos genéricos fabricados no restante do mundo. A referida lei foi regulamentada pela Resolução 391 de 09/08/99, mais tarde revogada pela Resolução 135 de 29/05/03 que apresenta todos os critérios sobre produção, ensaios de bioequivalência, ensaios de biodisponibilidade, registro, prescrição e dispensação de medicamentos genéricos (HISTÓRIA, 2005; BRASIL, 1999 e BRASIL, 2003b).

A partir da publicação da Lei 9.787 dá-se início uma nova fase no mercado farmacêutico brasileiro, reflexo do que já vinha acontecendo no cenário mundial, como por exemplo, na Alemanha, Japão, Estados Unidos, Índia e China. Apesar do avanço regulatório ocorrido nos últimos anos, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas. Uma delas diz respeito à regulamentação do setor farmoquímico, que atualmente não conta com critérios rígidos que garantam a procedência e a qualidade dos fármacos comercializados no Brasil (HISTÓRIA, 2005). A qualidade de um medicamento começa durante os estudos de desenvolvimento farmacêutico, sendo uma de suas funções identificar os parâmetros que podem influenciar a qualidade (pureza) do produto. “Um desenvolvimento farmacêutico apropriado e estudos adequados de desempenho e de compatibilidade entre a substância ativa

e os excipientes podem identificar precocemente a presença de impurezas, podendo adotar uma abordagem para evitar a sua presença” (BANAKAR, 1999). 20

A prevalência estimada de hipertensão no Brasil atualmente é de 35% da população acima de 40 anos. Isso representa, em números absolutos, um total de 17 milhões de portadores da doença, segundo estimativa de 2004 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Segundo dados do Programa Hiperdia do governo federal, o Brasil possui hoje mais 3 milhões de hipertensos (DATASUS, 2006).

A hipertensão é uma doença muito comum em todo o mundo e atinge jovens, adultos e idosos, pessoas de ambos os sexos, de todas as raças e de qualquer padrão social. Os fármacos bloqueadores β -adrenérgicos são muito utilizados no tratamento da hipertensão, assim como em algumas patologias cardíacas (GOODMAN & GILMAN, 2003). O atenolol é indicado terapêuticamente no controle da hipertensão arterial, da angina pectoris, de arritmias cardíacas e no tratamento do infarto do miocárdio (WADWORTH et al, 1991). É um bloqueador seletivo de receptores β 1-adrenérgicos (GOODMAN & GILMAN, 2003). É comercializado nas dosagens de 25 mg, 50 mg e 100 mg, estando em 34º lugar no ranking dos medicamentos mais comercializados no Brasil (GENÉRICO INFO, 2005).

Com a política de medicamentos genéricos implantada e em franca expansão em nosso país a abordagem de uma otimização na avaliação do fármaco atenolol e a sua forma farmacêutica comprimido, torna-se relevante na medida em que muitos são os fatores que devem ser considerados para que o medicamento possa garantir sua eficácia e terapêutica, inclusive por se tratar de um medicamento utilizado em doenças crônicas e por longos períodos de tempo. Ainda, se quer demonstrar subsídios que as indústrias possam estar agregando aos seus controles de qualidade para que a uniformidade lote a lote seja assegurada, isso inclui estudos sobre a solubilidade do fármaco, aspectos físicos da matéria prima como o tamanho da partícula, o polimorfismo, características importantes para evitar problemas na formulação.

Apesar de muitas publicações envolvendo o fármaco atenolol e o fato de o mesmo possuir monografia oficial nas farmacopéias americana e britânica, ainda existe muito a pesquisar a respeito. Neste contexto, este trabalho sugere um estudo de otimização da avaliação analítica do fármaco e das formulações farmacêuticas de atenolol: aplicação em produção, controle e registro de medicamento genérico.

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi a otimização da avaliação do fármaco e comprimidos de atenolol, através da proposição de metodologias alternativamente mais viáveis em relação às oficiais, avaliação detalhada do fármaco utilizado na fabricação dos comprimidos, avaliação da intercambialidade entre medicamento teste e referência e comparação das metodologias propostas com as oficiais existentes.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensaios físicos e físico-químicos para qualificação da matéria-prima de atenolol incluindo: identificação, umidade, resíduo de ignição, rotação ótica específica, teor de fármaco, limite de cloretos, ângulo de repouso, % compressibilidade, densidade, granulometria, calorimetria diferencial exploratória;
- Desenvolver e validar método analítico para quantificação de atenolol por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção em PDA e por espectrofotometria no ultravioleta e aplicação em testes de dissolução, bem como comparar os resultados obtidos nas metodologias utilizadas para quantificação de atenolol;
- Realizar ensaios físicos e físico-químicos (teor de fármaco, peso médio, uniformidade de conteúdo, dureza, friabilidade, umidade) em amostras de comprimidos de atenolol, bem como realizar ensaio de perfil de dissolução.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações Gerais

O atenolol, figura 1, (4 - [2 - hidroxí - 3 - [(1 - metiletil) amino] propoxi] benzenoacetamida) pode ser quimicamente descrito como uma benzenoacetamida. Sua fórmula molecular é $C_{14}H_{22}N_2O_3$ (BUDAVARI, 2001). É um composto hidrofílico relativamente polar, solúvel em água (26,5 mg/mL a 37°C), em HCl 1N (300 mg/mL a 25°C) e pouco solúvel em clorofórmio (3 mg/mL a 25°C), é uma mistura racêmica (PDR GENERICS, 1997).

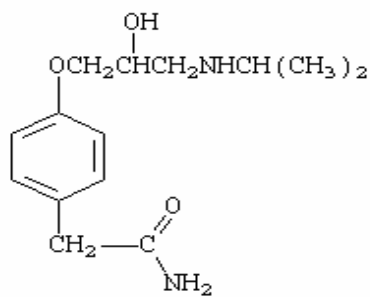


Figura 1 – Estrutura química do atenolol (CAS 29122-68-7)

A administração de dose oral única de atenolol de 50 mg e de 100 mg tem resultado em redução significativa da pressão sanguínea sistólica e diastólica e da frequência cardíaca (WADWORTH et al., 1991). Comparações do atenolol e do metoprolol com β -bloqueadores não seletivos em pacientes hipertensos revelaram que cada um dos fármacos reduziu a pressão sanguínea sistólica em grau comparável, nas doses terapêuticas habituais. Entretanto, durante a infusão de adrenalina e, presumivelmente, o estresse, os pacientes tratados com atenolol ou metoprolol sofreram elevação muito menor das pressões sanguíneas sistólica e diastólica do que os indivíduos que receberam antagonista não seletivo. Isto é esperado, pois a dilatação vascular mediada pela adrenalina, que envolve receptores β_2 não é bloqueada pelos agentes seletivos β_1 (GOODMAN & GILMAN, 2003).

No homem, a absorção de uma dose oral é rápida e consistente, porém incompleta. Aproximadamente 50% de uma dose oral é absorvida no trato gastrointestinal, o restante é excretado inalterado nas fezes. Os picos sanguíneos estão entre 2 e 4 horas após a ingestão.

Ao contrário do propranolol ou metoprolol, o atenolol não é metabolizado no fígado e a porção absorvida é eliminada, principalmente por excreção renal. O atenolol também é diferente do propranolol porque somente uma pequena quantidade (6%-16%) está ligada às proteínas plasmáticas (GOODMAN & GILMAN, 2003).

A meia-vida de eliminação do atenolol é aproximadamente de 5 a 7 horas. Menos de 5% da dose absorvida está ligada as proteínas plasmáticas. O metabolismo do atenolol é mínimo, cerca de 85% da dose absorvida é excretada inalterada na urina (WADWORTH et al., 1991).

O estudo dos parâmetros farmacocinéticos para os enantiômeros (+) e (-) do atenolol em humanos, utilizando doses orais únicas, indicou uma pequena diferença entre eles. Entretanto, quando considerado as propriedades farmacocinéticas na extensa variação inter e intra-individual nenhuma diferença significativa foi evidenciada (WADWORTH et al., 1991).

Moffat; Osselton; Widdop (2004), verificaram que após a administração de dose única de 100 mg de atenolol em 12 sujeitos sadios, o pico da concentração plasmática foi de 0,41 a 0,87 mg/L, atingido em torno de 3 horas. Administrando diariamente doses orais de 25, 50 e 100 mg para 7, 7 e 6 sujeitos respectivamente, as concentrações máximas foram de 0,12, 0,22 e 0,39 mg/L obtidos após 4 horas.

2.2 Mecanismo de Ação

Os agentes anti-hipertensivos podem ser classificados de acordo com seus locais ou mecanismos de ação. Como a pressão arterial é o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica, ela pode ser reduzida pelas ações dos fármacos na resistência periférica e/ou no débito cardíaco (GOODMAN & GILMAN, 2003).

O antagonismo dos receptores β -adrenérgicos afeta a regulação da circulação através de vários mecanismos, incluindo redução na contratilidade miocárdia e no débito cardíaco. As evidências indicam que a redução na angiotensina II, com seus múltiplos efeitos no controle circulatório da aldosterona, contribui de forma importante para a ação anti-hipertensiva desta classe de agentes (GOODMAN & GILMAN, 2003).

2.3 A Hipertensão

A hipertensão é um distúrbio comum e geralmente progressivo, a qual, se não for tratada eficazmente, aumenta consideravelmente a probabilidade de trombose coronariana, acidentes vasculares cerebrais e insuficiência renal. Até 1950, não havia nenhum tratamento eficaz, e o desenvolvimento de fármacos anti-hipertensivos, que aumentam significativamente a expectativa de vida, foi um grande marco na história de sucesso terapêutico, embora pouco celebrada (RANG et al., 1997).

A hipertensão em geral é definida como uma elevação da pressão arterial sistólica e/ou diastólica e um valor de 140/90 mm Hg costuma ser aceito como o limite superior da pressão arterial normal. Alguns fatores de risco, como, hipercolesterolemia, diabetes, fumo e história familiar de doença vascular, juntos com a hipertensão predisõem à arteriosclerose e, conseqüentemente, a morbidade e mortalidade cardiovasculares. Os benefícios do tratamento anti-hipertensivo são evitar a hipertensão acelerada ou maligna, diminuir a incidência de insuficiência renal devida à hipertensão e minimizar a incidência de acidente vascular cerebral e hemorrágico e insuficiência cardíaca. Apenas recentemente demonstrou-se que um intenso cuidado com pacientes portadores de hipertensão diastólica leve (90 a 104 mm Hg) pode, aparentemente, diminuir a incidência de infarto no miocárdio. Os fármacos bloqueadores β -adrenérgicos têm recebido muita atenção por causa da sua utilidade no tratamento de distúrbios cardiovasculares, inclusive hipertensão, angina do peito e arritmias cardíacas (GOODMAN & GILMAN, 2003).

O termo β -bloqueador deve ser reservado exclusivamente àquelas substâncias que demonstram antagonismo específico ao estímulo β , endógeno ou exógeno. Todos os β -bloqueadores inibem competitivamente os efeitos das catecolaminas no local do receptor β . Isso significa que na presença do antagonista uma maior concentração do agonista será requerida para produzir o mesmo efeito (PENILDON, 2002).

Os β -bloqueadores podem ser classicamente divididos de acordo com três propriedades farmacológicas: atividade simpaticomimética intrínseca, cardiosseletividade e ação estabilizadora da membrana (PENILDON, 2002).

2.4 Metodologias de Avaliação

Metodologia oficial para avaliação de atenolol comprimidos pode ser encontrada nas farmacopéias americana e britânica. A farmacopéia americana descreve método para quantificação de atenolol utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando como fase móvel heptanosulfonato de sódio, fosfato de sódio bibásico e metanol (70:30), detecção em 226 nm, coluna C₁₈ 3,9 mm x 30 cm, fluxo de 0,6 mL/min (UNITED STATES, 2006). A farmacopéia britânica descreve método para quantificação de comprimidos de atenolol utilizando espectrofotometria no ultravioleta com um comprimento de onda de 275 nm (BP, 2007). Já a farmacopéia europeia descreve a quantificação do fármaco atenolol utilizando técnica de titulação com ácido perclórico (EP, 2005).

Kubán et al. (2006), compararam o método HPLC de detecção por condutividade com o método por detecção no UV, para análise de β -bloqueadores em formulações farmacêuticas. O sistema cromatográfico adotado consiste de coluna C18, fluxo de 0,7 mL/min e fase móvel 20% de acetonitrila, 20% metanol em ácido trifluoroacético (TFA) 0,01%.

El-Gindy et al. (2005), desenvolveram método para quantificação simultânea de atenolol, cloridrato de amilorida e clortalidona em formulações através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de fase reversa C18, fase móvel constituída de acetonitrila e heptanosulfonato de sódio 5Mm (20:80, v/v, pH 4,4), com detecção no UV em 274 nm.

Al-Ghannam (2006), desenvolveu um método simples de determinação espectrofotométrica de betabloqueadores em formulações, utilizando a formação de complexos de pareamento iônico através do uso de tinturas ácidas como azul de bromofenol, azul de bromotimol e púrpura de bromocresol, com absorção na região do visível (415 nm).

Gölcü et al. (2004), desenvolveram método espectrofotométrico para determinação de alguns betabloqueadores em formulações farmacêuticas, baseado na formação de complexos com cobre II e cobalto II, utilizando comprimentos de onda de 613, 694, 548, e 614 nm, para os complexos Cloridrato de acebutalol – Co (II), Atenolol-Cu (II), Cloridrato de propranolol-Cu (II) e Cloridrato de propranolol-Co (II), respectivamente.

Salem (2002), determinou espectrofotometricamente agentes betabloqueadores adrenérgicos puros e em formulações farmacêuticas via reação com aceptores σ e π , a fim de obter complexos corados com absorção na região do visível, variando de 365 a 840 nm, de acordo com cada complexo.

Singh et al. (2001), desenvolveram e validaram método para cromatografia líquida quiral para determinação dos enantiômeros do atenolol e metoprolol em comprimidos. Para o atenolol foi utilizada coluna Chiralcel OD® (250 x 4,6 mm), a fase móvel era composta de hexano/etanol/dietilamina/ácido acético (60:40:0,2:0,2) e fluxo de 1,0 mL/min. A detecção foi no ultravioleta em 276 nm.

Abdel-Hamid (2000), realizou análise comparativa entre cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas e cromatografia líquida de alta eficiência para selecionar medicamentos antiepiléticos e betabloqueadores. O método por HPLC utilizou eluição isocrática, coluna Hypersil C18 (150 x 4,6 mm), como fase móvel metanol e solução de ácido acético, fluxo de 1,5 mL/min e detecção por arraste de fotodiodos.

Briguenti e Bonato (2005) e Shafaati e Clark (1996) realizaram a quantificação de atenolol em preparações farmacêuticas utilizando eletroforese capilar.

Wren e Tchelitcheff (2006), desenvolveram método para identificação de betabloqueadores utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) e espectrometria de massas, comparando os mesmos ao método por HPLC. No sistema de gradiente utilizou como fase móvel A ácido trifluoroacético (TFA) em água 0,1% e fase móvel B TFA em acetonitrila 0,1% (gradiente: 20% de B até 10 min e então 50% de B). A coluna utilizada foi a C₁₈, o fluxo 0,5 mL/min com detecção em 270 nm.

Andrisano et al. (1999), realizou estudos de fotodegradação de atenolol utilizando a cromatografia líquida. A fase móvel empregada foi tampão de acetato de trietilamônio pH 4,0 (0,01 M) e acetonitrila (96:4) v/v. A coluna foi C₁₈ com fluxo de 0,8 mL/min.

Modamio et al. (1996), desenvolveram e validaram método para quantificação de propranolol, metoprolol, atenolol e bisoprolol através de cromatografia líquida de alta eficiência. Utilizaram coluna Nucleosil C₁₈ (125 x 4,0 mm), fase móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH 3,0 com 0,2% de trietilamina.

Delamoye et al. (2004), determinaram simultaneamente trinta betabloqueadores e um metabólito em plasma utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em gradiente com detecção por arraste de fotodiodos (PDA). Utilizaram coluna Hypurity C₁₈ (250 x 4,6 mm), como fase móvel acetonitrila e tampão fosfato pH 3,8 e fluxo de 1,0 mL/min. A detecção foi em 220 nm.

Abreu et al. (2003), quantificaram atenolol em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, para aplicação em estudo de bioequivalência. Como fase móvel utilizaram uma mistura de acetonitrila, metanol e tampão

fosfato (pH 6,0). A coluna foi Lichrosorb 10 μm RP 18 – 250 x 4,6 mm, fluxo de 1,2 mL/min e fluorescência monitorada em $\lambda_{\text{EX}} = 258 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{Em}} = 300 \text{ nm}$.

Ranta et al. (2002), desenvolveram método por cromatografia líquida de alta eficiência em gradiente, combinando detecção por ultravioleta e fluorescência, para determinar simultaneamente oito betabloqueadores (alprenolol, atenolol, metoprolol, nadolol, pindolol, propranolol, sotalol e timolol). Utilizaram coluna Kromasil C₈ (150 x 4,6 mm), como solução A utilizaram água contendo 0,03% de ácido trifluoracético e como solução B acetonitrila: água (50:50) contendo 0,03% de ácido trifluoracético. A detecção por UV foi em 205 nm e por fluorescência a excitação se deu em 230 nm e a emissão em 302nm.

Giachetti et al. (1997), determinaram simultaneamente atenolol e clortalidona em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência, para aplicação em estudos farmacocinéticos em humanos. Utilizaram coluna Supelcosil LC-18, 5 μm , 250 x 4 mm, fase móvel 0,05 M SDS em tampão fosfato (pH 5,8) e n-propanol, fluxo de 1,3 mL/min, detector de fluorescência ($\lambda_{\text{EX}} = 222 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{Em}} = 300 \text{ nm}$).

Amin et al. (2002), desenvolveram método colorimétrico para determinação de alguns betabloqueadores baseado na formação de complexos de transferência de carga com 4-cloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol. Os produtos de cor laranja apresentaram absorção nos comprimentos de onda 485, 470, 465 e 462 nm para atenolol, metoprolol, sotalol e nadolol, respectivamente.

2.5 Caracterização e Qualificação do Fármaco

Os fabricantes de produtos farmacêuticos devem tomar os cuidados necessários no sentido de garantir a qualidade dos insumos que farão parte de suas formulações, pois são os responsáveis pela segurança, eficácia e qualidade destes produtos. Muitos países em desenvolvimento, no qual incluí-se o Brasil, são totalmente dependentes da importação de matérias-primas para produção dos medicamentos. Após sua fabricação, as matérias-primas freqüentemente passam por vários intermediários da cadeia de distribuição antes de chegar ao seu destino final, ou seja, à indústria farmacêutica. A primeira etapa de um programa de qualificação é o entendimento de que a qualidade dos produtos farmacêuticos está diretamente ligada a qualidade dos insumos e matérias-primas farmacêuticas. Para tanto, a qualificação deve assegurar que as mesmas atendam aos requisitos farmacêuticos especificados, sejam

produzidas, manipuladas e distribuídas de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (MORETTO, 2005; BRASIL, 2003d).

O formato externo do cristal pode afetar as propriedades do fármaco e adjuvantes. Cristais com diferentes formatos externos não apenas apresentam velocidades de dissolução diferenciadas como também podem ter propriedades de fluxo e de sedimentação modificadas. O fluxo de pós é importante, por exemplo, no enchimento da matriz da máquina de comprimir com um determinado volume, no qual este fluxo deverá ser bom o suficiente para garantir a uniformidade de conteúdo do produto (BUCKTON, 2005).

O ângulo de repouso tem sido utilizado como um método indireto de quantificar a fluxibilidade de um pó, em função da sua relação com a coesão entre as partículas. Um objeto ou partícula começará a deslizar quando o ângulo de inclinação for suficientemente acentuado para superar as forças de atrito. De modo inverso, um objeto em movimento cessará o deslize quando o ângulo de inclinação estiver abaixo do valor necessário para vencer a coesão/adesão. Esse equilíbrio de forças faz com que um pó vertido a partir de um recipiente sobre uma superfície horizontal forme um montículo. Nos primeiros momentos, as partículas amontoam-se, formando um ângulo elevado o suficiente para superar o atrito interparticular, no qual as partículas deslizam e rolam umas sobre as outras até que as forças gravitacional e interparticulares equilibrem-se. As laterais do montículo originado formam um ângulo com o plano horizontal, o qual é denominado ângulo de repouso, que é característico das forças de atrito interno ou coesividade das partículas (STANIFORTH, 2005; LACHMAN, 2001).

Um conjunto de partículas pode estar contido dentro de um volume de espaço, de modo a constituir um leito de pó, o qual está em equilíbrio estático em decorrência da interação entre as forças gravitacional e de adesão e coesão. Perante uma vibração leve, as partículas desse leito podem ser deslocadas e, se a vibração é interrompida, o leito estará novamente em equilíbrio estático, contudo, ocupando um volume diferente do anterior. Nesse caso, a alteração do volume bruto foi resultado de um rearranjo na geometria de empacotamento dessas partículas. Assim, as partículas de pós com empacotamento mais firme exigem forças motrizes de fluxo maiores para fluírem, se comparadas com as partículas desse mesmo pó com empacotamento menos denso. A porosidade do leito pode ser expressa, em geral, em porcentagem através da razão volume de partícula (V_P)/volume bruto do pó (V_B), de acordo com a equação 01 (STANIFORTH, 2005).

$$E = \frac{1 - V_p}{V_B}$$

Equação 01

A densidade bruta de um pó é dependente do empacotamento das partículas e modifica-se à medida que o pó consolida-se. Existem dispositivos de compactação ou volúmetro vibratório, utilizados para acompanhar as alterações de empacotamento do pó. O pó contido em um cilindro graduado é submetido à compactação mecânica (à velocidade constante). Desse modo, a densidade bruta inicial, D_0 , passa para uma densidade bruta final, D_f , quando o pó atinge um estado maior de equilíbrio, ou seja, um arranjo de empacotamento invariável. Outro método indireto para a mensuração do fluxo de um pó a partir das densidades brutas é o método preconizado por Carr (1965). O percentual de compressibilidade de um pó constitui uma medida direta da resistência potencial dos arcos ou das pontes de um pó, isto é, da sua estabilidade, e que pode ser calculada através da equação 02 (STANIFORTH, 2005).

$$\% \text{ compressibilidade} = \frac{D_f - D_0}{D_f} \times 100$$

Equação 02

Hausner (1967) verificou que a razão D_f/D_0 relacionava-se com o atrito entre as partículas e, como tal, poderia ser utilizada para prever as propriedades de fluxo de um pó. Ele comprovou que pós de escasso atrito entre as partículas, como é o caso de esferas de tamanho grosseiro, apresentaram razões de aproximadamente 1,2, enquanto pós de maior coesividade, de fluxo restrito, como os de formato lamelar, apresentaram razões de Hausner superiores a 1,6 (STANIFORTH, 2005).

A existência de polimorfismo pode influenciar a biodisponibilidade, a estabilidade química e física do fármaco e ter implicações no desenvolvimento e estabilidade da forma farmacêutica, levando-se em consideração as alterações ocorridas nas características dos cristais. Define-se polimorfismo como a propriedade que certas substâncias apresentam de cristalizar sob distintas formas cristalinas, quimicamente idênticas, mas com diferentes propriedades físicas (ponto de fusão, solubilidade). Tal fato decorre das condições

empregadas na síntese e purificação da substância, dependendo, por exemplo, do tipo de solvente utilizado e da temperatura da reação (STORPIRTIS et al., 2004).

Dois polimorfos de um mesmo composto podem ser tão diferentes em estrutura cristalina e propriedades como dois compostos distintos, sendo que essas diferenças manifestam-se enquanto o fármaco está em estado sólido, ou seja, uma vez obtida a solução as diferentes formas não podem mais ser distinguidas (STORPIRTIS et al., 2004). Portanto, podem ser esperadas diferenças na ação do fármaco, em termos farmacológicos e terapêuticos devido à presença de polimorfos em formas farmacêuticas sólidas, assim como em suspensões líquidas (ANSEL; POPOVICH; ALEN, 2004). Outro fator importante é que o polimorfo menos estável tende a se transformar no polimorfo mais estável (transição polimórfica), o que pode ocorrer em função do tempo e da temperatura de armazenamento, do tipo de processo de compressão utilizado e da redução do tamanho de partículas (SHARGEL & YU, 1999).

Uma das propriedades características dos cristais é o ponto de fusão, que é definido como a temperatura na qual a rede cristalina é desestruturada, fazendo com que as moléculas ganhem, a partir do aquecimento, energia suficiente para vencer as forças de atração que mantêm o cristal coeso (BUCKTON, 2005).

A solubilidade, o polimorfismo, a cristalinidade e o hábito cristalino de um ingrediente ativo farmacêutico, desempenham funções críticas na cadeia de valores de formulação, fabricação e desenvolvimento farmacêuticos. O polimorfismo de um ingrediente ativo determina suas propriedades mecânicas, superficiais, cinéticas, espectroscópicas, termodinâmicas e de compactação no estado sólido (LEE et al., 2006).

Métodos térmicos, e em particular a calorimetria diferencial exploratória (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*), tem sido um dos métodos para o estudo de polimorfos, colaborando para sua identificação e caracterização. Vale considerar o número de novas técnicas térmicas que têm sido reintroduzidas ou recentemente descobertas no meio farmacêutico nos últimos anos (CRAIG, 2006).

A DSC é uma técnica térmica na qual as diferenças no fluxo de calor na substância e referência são medidas como uma função da temperatura da amostra enquanto as duas estão submetidas a um programa de temperatura controlada. Os experimentos de calorimetria exploratória diferencial são normalmente realizados em modo de varredura de temperatura, mas ocasionalmente também são encontrados experimentos isotérmicos. Tem se tornado um dos mais usados de todos os métodos térmicos. Os métodos térmicos diferenciais têm encontrado larga aplicação na indústria farmacêutica para teste de pureza de amostras de fármacos (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002). Moneghini et al. (1998), avaliaram

diferentes formulações de comprimidos de atenolol quanto a sua solubilidade utilizando difração de raios-X (XRD) e calorimetria diferencial exploratória (DSC), o fluxo de calor foi de 10°C/ min de 90 a 180°C. Pyramides et al. (1995), utilizaram DSC combinada a análise termogravimétrica (TGA) para analisar comprimidos de atenolol e seus componentes, o DSC foi explorado da temperatura ambiente até 335°C e o TGA da temperatura ambiente até 600°C, na calibração do DSC foi utilizado índio (156°C) e chumbo (327°C) na mesma corrida.

2.6 Formas Farmacêuticas Sólidas

Os processos envolvidos na fabricação dos medicamentos também podem influenciar a dissolução e a biodisponibilidade. Comprimidos obtidos por compressão direta, granulação via seca ou via úmida podem apresentar comportamentos *in vitro* e *in vivo* diferentes. Aspectos como forma e condições de secagem do granulado, tempo de mistura ou agitação, velocidade e força de compressão também podem alterar significativamente o desempenho da forma farmacêutica no organismo (STORPIRTIS *et al.*, 2004).

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação, da dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal. Devido à natureza crítica dos dois primeiros, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo*. Com base nestas considerações gerais, os ensaios de dissolução para formas farmacêuticas de liberação imediata (FFSOLI), tais como comprimidos e cápsulas, são utilizados para garantir a qualidade lote-a-lote dos medicamentos, para orientar o desenvolvimento de novas formulações e para garantir a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento depois de determinadas alterações (BRASIL, 2003a).

O conhecimento relacionado à solubilidade, permeabilidade, dissolução e farmacocinética deve ser considerado para a definição de especificações de dissolução, visando à aprovação do registro do medicamento (BRASIL, 2004). A biodisponibilidade de formas farmacêuticas sólidas está intimamente ligada à capacidade do fármaco nela incorporado ser absorvido adequadamente, em termos de quantidade e velocidade, o que dependerá da dissolução ou solubilização dessa forma farmacêutica em condições fisiológicas e da permeabilidade do fármaco através das membranas do trato gastrointestinal. Desse modo, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para o desempenho *in vivo*, posto que é o passo inicial que deverá ser dado antes dos ensaios clínicos (AMIDON *et al.*, 1995). Os produtos

farmacêuticos submetidos ao registro na ANVISA, além dos dados relacionados à formulação, processo de fabricação, controle de qualidade e biodisponibilidade, os quais são indicativos da eficácia e do desempenho do medicamento, devem incluir também os resultados de dissolução (BRASIL, 2003a).

Para mensurar o sucesso do ensaio de dissolução alguns métodos são utilizados. Acredita-se que entre todos os métodos possíveis os fatores de semelhança, f_1 , e diferença, f_2 , são os mais usados pela facilidade de aplicação e interpretação, o que leva vários órgãos regulatórios, como FDA, ANVISA e EMEA a empregá-los, especialmente f_2 , como indicativo da semelhança entre perfis de dissolução. O método modelo independente simples consiste em dois fatores: f_1 , que calcula a porcentagem de diferença entre dois perfis avaliados em tempos de coletas iguais e corresponde a uma medida de erro relativo entre os perfis, e f_2 que é uma medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas de ambos perfis.

Esses fatores foram propostos em 1996 por Moore e Flanner e são representados por duas equações que avaliam a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvido por unidade de tempo entre um produto teste e outra referência (MOORE & FLANNER, 1996).

São definidos pelas seguintes equações:

$$f_1 = \left\{ \left[\sum_{t=1}^n (R_t - T_t) \right] / \left[\sum_{t=1}^n R_t \right] \right\} \times 100$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \right\} \times 100$$

Equação 03

Onde:

n = número de tempos de coleta;

R_t = valor de porcentagem dissolvida no tempo t , obtido com o medicamento de referência ou com a formulação original (antes da alteração);

T_t = valor de porcentagem dissolvida do produto teste ou da formulação alterada, no tempo t .

Para que os dois perfis sejam considerados semelhantes deve-se observar: $f_1 = 0$ a 15 e $f_2 = 50$ a 100. A equação correspondente ao fator f_1 aproxima o erro percentual das duas

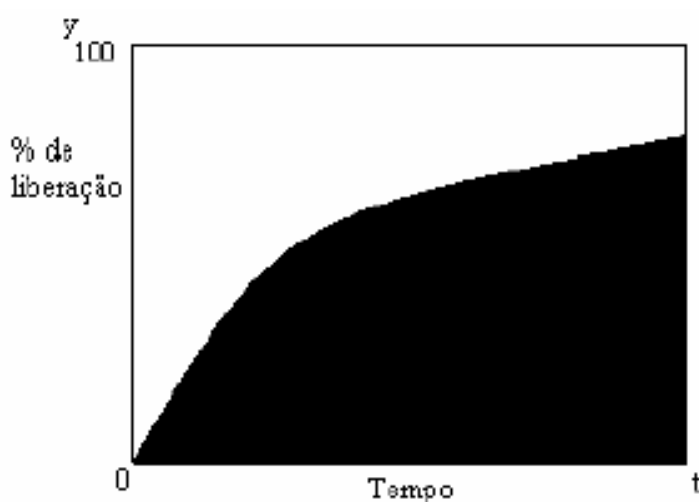
curvas. O erro é zero quando os perfis do teste e referência são idênticos e aumenta proporcionalmente com a diferença entre os perfis (MOORE & FLANNER, 1996).

A equação de f_2 é uma transformação logarítmica da soma do quadrado do erro. O resultado é 100 quando as curvas são idênticas e diminui, podendo chegar a 0, conforme a diferença entre os perfis aumenta (MOORE & FLANNER, 1996). Para aplicar os parâmetros de comparação f_1/f_2 é importante considerar:

- a avaliação de doze unidades;
- empregar no mínimo cinco pontos de coleta;
- incluir apenas um ponto acima de 85% de dissolução para ambos os produtos;
- para permitir o uso de médias, os coeficientes de variação para os primeiros pontos (15 minutos, por exemplo) não devem exceder 20%. Para os demais pontos considera-se o máximo de 10%;

Existem situações em que a dissolução é muito rápida, apresentando valor igual ou superior a 85% de fármaco dissolvido em 15 minutos, para estes casos os fatores f_1 e f_2 perdem o seu poder discriminatório e, portanto, não é necessário empregá-los (BRASIL, 2004).

A eficiência de dissolução é outro parâmetro utilizado para fazer a comparação entre formulações. Esta pode ser definida como área sob a curva de dissolução até um tempo t expressa como porcentagem da área do retângulo que corresponderia a 100% de dissolução no mesmo tempo (Figura 2).



$$ED\% = \frac{\text{Área sob a curva}}{\text{Retângulo } y^{100}} \times 100$$

Figura 2 – Eficiência da dissolução (ED) (KHAN, 1975).

Para realizar comparações é necessário estabelecer previamente o intervalo e aplicá-lo a todas as formulações testadas. O parâmetro de comparação, eficiência de dissolução, apresenta algumas vantagens, tais como a plotagem dos dados em um único gráfico, permitindo que se faça uma rápida comparação entre um grande número de formulações e a correlação com dados *in vivo* da absorção (KHAN, 1975; MARCOLONGO, 2003).

2.7 Equivalência Farmacêutica

A equivalência farmacêutica entre dois medicamentos exige a comprovação de que ambos contenham o mesmo fármaco, na mesma dosagem e forma farmacêutica, o que pode ser avaliado por meio de testes *in vitro*. Assim, pode ser considerada como um indicativo da bioequivalência entre os medicamentos em estudo, sem, contudo garanti-la (STORPIRTIS et al., 2004).

A legislação brasileira, tendo como base a regulamentação técnica e a experiência de diversos países na área de medicamentos genéricos, estabelece que, para um medicamento ser registrado como genérico, é necessário que se comprove sua equivalência farmacêutica e bioequivalência em relação ao medicamento de referência indicado pela ANVISA (BRASIL, 2003b; BRASIL, 2003c).

O teste de equivalência farmacêutica implica na execução de testes físicos e físico-químicos comparativos entre o candidato a genérico e seu respectivo medicamento de referência, realizado por centros habilitados pela Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS – ANVISA) (STORPIRTIS et al., 2004).

2.8 Registro de Medicamento Genérico

Para registrar um medicamento genérico no Brasil é necessário cumprir com a legislação sanitária. São vários os estudos solicitados, os quais devem ser apresentados juntamente com toda documentação referente ao produto. Salienta-se entre as exigências cópias de dossiês completos de produção e controle de qualidade, com inclusão de ordem de produção, processo de produção detalhado e controle em processo, referentes aos três lotes-piloto fabricados ou a três lotes industriais produzidos nos três últimos anos. No caso de

medicamentos com três ou mais concentrações diferentes e formulações proporcionais, deve-se apresentar os dossiês da menor e da maior concentração (BRASIL, 2003b).

Devem ser apresentados, também, resultados do estudo de estabilidade acelerada de um lote do medicamento produzido com o fármaco correspondente a cada fabricante apresentado, conforme os critérios do guia para a realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2005). Também se faz necessário apresentar perfil de dissolução comparativo de todas as concentrações do medicamento, definindo aquele que foi submetido ao estudo de bioequivalência (BRASIL, 2003b).

A documentação referente ao relatório de controle de qualidade das matérias-primas deve incluir desde a metodologia de análise de todos os excipientes utilizados na formulação do medicamento, até o material de embalagem. Podem ser qualificados até três fabricantes do fármaco a que se pretende produzir o genérico, sendo que, para cada um destes, deve-se apresentar um “Drug Master File” (DMF), documento enviado pelo próprio fabricante que traz informações tais como: quantificação e limites dos principais contaminantes; dados sobre os teores dos estereoisômeros, no caso de fármacos que apresentam quiralidade, cuja proporção de estereoisômeros possa comprometer a eficácia e a segurança do medicamento; informações e determinação dos prováveis polimorfos e a metodologia analítica para fármacos que apresentem polimorfismo; validação do método analítico; estudo de estabilidade. É necessário especificar o fabricante do fármaco utilizado na produção do lote submetido ao estudo de equivalência farmacêutica e bioequivalência (BRASIL, 2003b). E finalmente para o produto acabado deve ser apresentado um relatório contendo todo o controle de qualidade e documentos de comprovação, dentre os quais citam-se: a validação dos métodos analíticos empregados, conforme o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; relatório de equivalência farmacêutica, conforme guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica (BRASIL, 2003b, BRASIL, 2004).

3 CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA DE ATENOLOL

3.1 Introdução

Considerando a forma farmacêutica sólida em estudo, comprimidos de atenolol, e que esta deve dissolver-se adequadamente para garantir a eficácia terapêutica, o estudo detalhado do fármaco faz-se necessária. Qualquer fator que altere os processos de desagregação e dissolução poderá afetar diretamente a biodisponibilidade, expressa em termos de quantidade de fármaco absorvido e velocidade do processo de absorção (STORPIRTIS et al., 1999).

Este capítulo descreve uma série de análises que podem ser realizadas no estudo de pré-formulação e de controle de qualidade do fármaco que será utilizado no medicamento. Algumas dessas análises constam na monografia, outras são sugeridas no sentido de prever fenômenos ligados a produção do medicamento e que poderiam afetar profundamente a dissolução e conseqüentemente a biodisponibilidade.

3.2 Amostras

Foram utilizados três fornecedores do fármaco, e os mesmos foram denominados conforme abaixo:

- Fornecedor A
- Fornecedor B
- Fornecedor C

3.3 Solventes e Reagentes

- Acetato de amônio, CQA

- Acetonitrila, Merck
- Ácido clorídrico, Nuclear
- Ácido nítrico, Merck

- Água ultra-pura Milli Q, Milipore
- Metanol, Nuclear
- Nitrato de prata, CQA
- Reagente Karl Fischer, Hydranal

3.4 Equipamentos e Acessórios

- Balança microanalítica, Metler Toledo
- Calorímetro Sistema TGA-50 Célula DSC-60, Shimadzu
- Banho ultra-sônico, Logen Sonic
- Bomba de vácuo, Tecnal
- Coluna cromatográfica de fase reversa PurospHer® RP-18 (250 mm x 4.6 mm) 5 µm, Merck
- Cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20AT, equipado com bomba LC-20AT, detector de arraste de fotodiodos SPD-M20A, amostrador automático SIL-20^A, forno para coluna modelo CTO-10AS e integrador automático computadorizado através do software Labsolution
- Destilador, Quimis
- Espectrofotômetro UV-VIS, Spectro Vision DB 1880 S
- Karl Fischer, Metron
- Membrana filtrante HVHPO, porosidade 0,45 µm, 13 mm
- Membrana filtrante FH (Fluoropore), porosidade 0,50 µm, 47 mm
- Mufla, Quimis
- Multipicnômetro à gás, Quantachrome
- Polarímetro, WX G-4
- Purificador de água Mili Q, Millipore
- Volúmetro de compactação PT-TD, PHarma-Test
- Tamizes, Bronzinox

3.5 Parâmetros Avaliados

3.5.1 Identificação

O atenolol é um pó branco ou quase branco, frugalmente solúvel em água, solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em cloreto de metileno e praticamente insolúvel em éter (EP, 2005).

3.5.1.1 Arraste de Fotodiodos

Para obter a varredura no detector de fotodiodos para o fármaco atenolol, foi preparada amostra conforme item 4.6.1.2. do Capítulo 2.

3.5.2 Determinação de Umidade por Karl Fischer

Para determinar a umidade contida no fármaco de atenolol foi utilizado o método de Karl Fischer, empregando titulador automático, segundo a Farmacopéia Brasileira IV (1988). Foram pesadas aproximadamente 200 mg do fármaco. Para determinar a percentagem de umidade contida nos produtos utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{(\text{gasto do reagente de Karl Fischer} \times \text{FC}) \times 100}{\text{quantidade de amostra (mg)}}$$

Equação 04

Onde:

FC = fator de correção do reagente de Karl Fischer

3.5.3 Resíduo de Incineração ou Resíduo de Ignição

Foi pesado, exatamente, em balança analítica, 1 g de amostra em cadinho previamente dessecado (m_i). Em seguida foi acrescentado 1 mL de ácido sulfúrico reagente e realizou-se o aquecimento da amostra até o total desprendimento de fumaça branca. Após, a amostra foi colocada em mufla a 600 °C por 2 h. Depois da amostra resfriar em dessecador ela foi novamente pesada (m_f). Para calcular o resíduo, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\%resíduo = \frac{(m_f - m_i) \times 100}{m_a}$$

Equação 05

Em que, m_i e m_f , são, respectivamente, a massa inicial e a final do cadinho, em g, e m_a é a massa da amostra utilizada, em g.

3.5.4 Rotação Óptica Específica

Para preparar a solução amostra pesou-se 200 mg do fármaco atenolol previamente dessecado. Este foi transferido para um balão volumétrico de 20 mL e solubilizado em 10 mL de água deionizada, agitando até completa solubilização. Após o volume foi completado com o mesmo solvente. No equipamento polarímetro foram executadas as análises das amostras dos diferentes lotes do fármaco. A rotação específica foi calculada pela fórmula abaixo:

$$[\alpha] = \frac{Q \times 100}{L \times C}$$

Equação 06

Em que, Q é o ângulo de rotação medido utilizando a luz de sódio (589,3 nm), L é o comprimento da coluna da solução (tubo de vidro), em dm, e C é a concentração da solução amostra, em percentagem.

3.5.5 Teor

A análise de teor foi realizada utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência conforme metodologia analítica descrita no item 4.6.1.2 do Capítulo 2. As análises foram realizadas em duplicata.

3.5.6 Limite de Cloretos

Para a análise de cloretos 1 g de atenolol foi dissolvido em 100 mL de ácido nítrico 0,15 N (solução amostra). A solução resultante foi comparada com uma solução preparada com 1 mL de nitrato de prata SR, 1,4 mL de ácido clorídrico 0,02 N diluídos em 100 mL de ácido nítrico 0,15 N (solução padrão). A solução amostra não deve apresentar turbidez superior a solução padrão, cumprindo com o limite de cloretos (0,1%) (USP 29, 2006).

3.5.7 Ângulo de Repouso

Para realizar o ensaio de ângulo de repouso foi utilizado aparato conforme Lachman (2001), assim através de um funil suspenso foi transferido 4 g da amostra, previamente pesada. Na base do suporte um papel milimetrado foi utilizado como receptor da amostra. Do cone formado foram tiradas todas as medidas necessárias para calcular o ângulo de repouso pela fórmula:

$$\operatorname{tg} \theta = \frac{2h}{d}$$

Equação 07

Onde, tg é a tangente do ângulo de repouso, h é a altura do cone, d é o diâmetro do cone e θ ângulo de repouso.

3.5.8 Capacidade de Compactação ou Compressibilidade ou Índice de Carr

A capacidade de compactação foi determinada utilizando equipamento específico (Volúmetro de compactação), no qual foi acoplada uma proveta graduada. Para cada um dos fornecedores foram pesados 6 g de fármaco, esta massa foi submetida a 5, 50 e 500 batidas respectivamente (LACHMAN, 2001).

3.5.9 Densidade

A densidade do fármaco para os três fornecedores foi determinada através de picnômetro a gás. Foram determinados o peso da célula vazia e o peso da célula preenchida com o fármaco, a análise foi realizada em triplicata (LACHMAN, 2001).

$$d = \frac{m}{V}$$

Equação 08

3.5.10 Granulometria

O ensaio granulométrico foi realizado conforme descrito por Lachman (2001), utilizando conjunto de tamises. Os mesmos, foram dispostos em ordem decrescente na forma de uma coluna, sendo que o tamis de malha mais fina foi colocado logo acima do prato coletor.

$$\text{Diâmetro médio} = \frac{\Sigma \text{ da coluna}}{\% \text{ retida na peneira inf}}$$

Equação 09

3.5.11 Calorimetria diferencial exploratória

A análise térmica foi realizada utilizando sistema TGA-50, com célula DSC-60. O intervalo de temperatura foi da temperatura ambiente (25°C) até 500 °C. A razão de aquecimento foi de 10 °C/ min. O elemento utilizado na calibração do sistema TGA foi o oxalato de cálcio, já para a célula de DSC utilizou-se o elemento índio.

3.6 Resultados e Discussão

3.6.1 Arraste de Fotodiodos

A Figura 3 apresenta os espectros obtidos para a SQR de atenolol (1), Fornecedor A (2), Fornecedor B (3) e Fornecedor C (4).

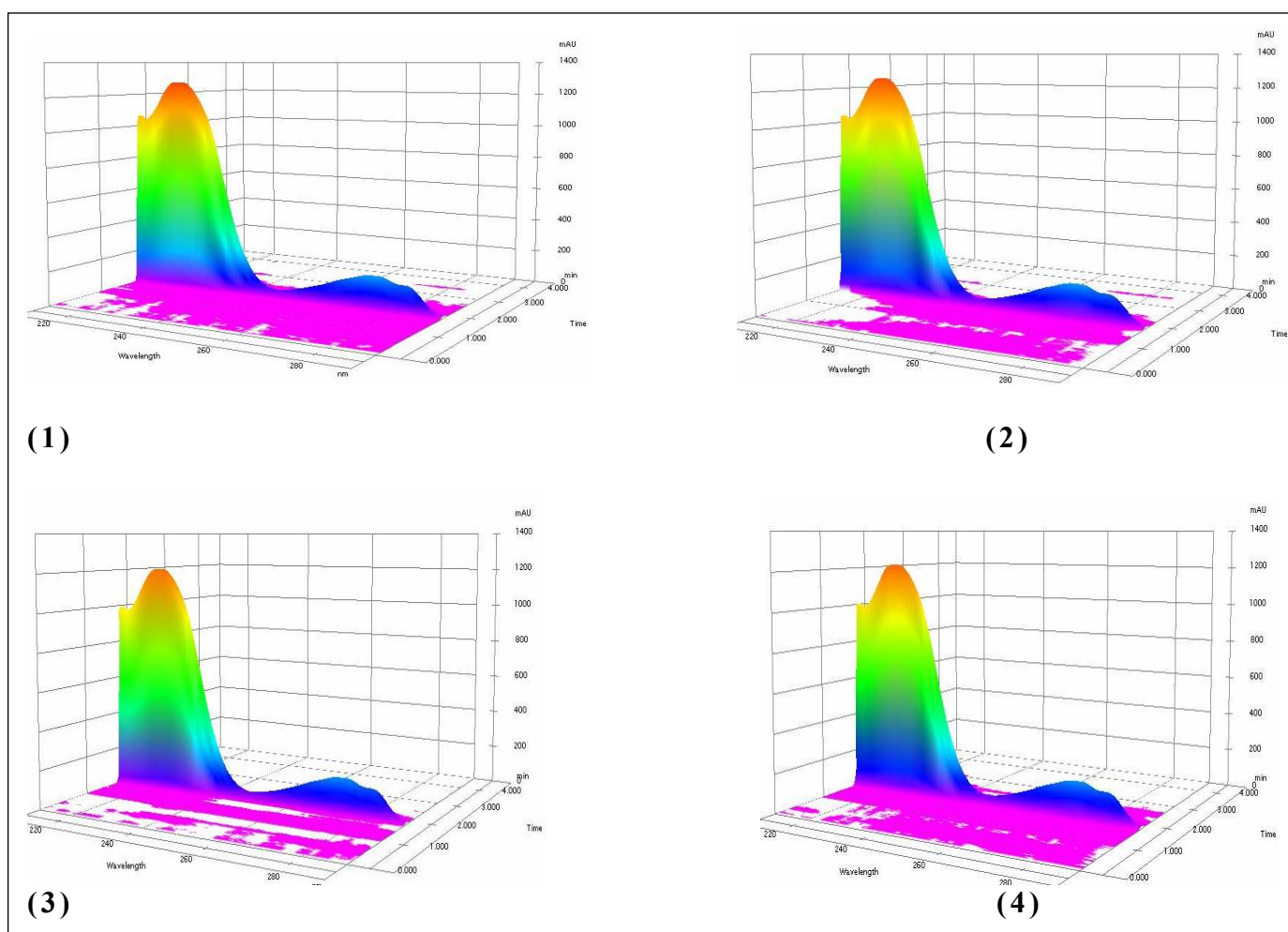


Figura 3- Espectros obtidos para a SQR de atenolol (1), Fornecedor A (2), Fornecedor B (3) e Fornecedor C (4).

A análise de identificação do fármaco atenolol através de varredura utilizando detector de arraste de fotodiodos demonstrou a similaridade dos espectros conforme pode ser visualizado na figura 3, onde se observam os máximos: 226 nm e 275 nm.

3.6.2 Determinação de Umidade por Karl Fischer, Resíduo de Incineração, Rotação Óptica Específica e Ângulo de Repouso.

A Tabela 1 demonstra os resultados obtidos para a determinação da umidade, resíduo de incineração (ignição), rotação óptica específica e ângulo de repouso nos diferentes fornecedores do fármaco.

Tabela 1 – Resultados obtidos para a determinação de umidade, resíduo de incineração (ignição), rotação óptica específica e ângulo de repouso.

Fornecedor	Umidade (%)	% Resíduo de ignição	Rotação óptica específica	Ângulo de repouso
A	0,47	0,06	0,0°	42,99°
B	0,46	0,09	0,0°	39,96°
C	0,46	0,09	0,0°	34,82°

A avaliação da umidade apresentou resultados dentro da especificação de 0,5%, recomendada pelas Farmacopéias Americana, Européia e Britânica. Conforme preconizado pela Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) para o ensaio de resíduo de incineração (resíduo de ignição) o limite aceitável é de 0,2%. Para todos os fornecedores avaliados os resultados dessa análise ficaram abaixo de 0,1%.

O atenolol é um racemato e, portanto, avaliar a rotação óptica específica é fundamental para garantir a mistura racêmica adequada. As Farmacopéias Européia e

Britânica definem que o ângulo de rotação óptica é de $+ 0,10^\circ$ a $- 0,10^\circ$. Para os três fornecedores de atenolol avaliados não foi evidenciado desvio da luz polarizada.

Segundo Lachman (2001), pós com ângulo de repouso de até 40° , traduzem normalmente uma capacidade de escoamento razoável. Os pós com ângulos de repouso maiores que 50° possuem, como regra geral, propriedades de fluxo deficientes, enquanto ângulos de repouso mínimos, próximos de 25° correspondem a propriedades de fluxo muito boas (STANIFORTH, 2005). Para os fornecedores A, B e C, os resultados ficaram próximos a 40° , o que traduziria em um escoamento razoável do pó.

3.6.3 Teor

A Tabela 2 demonstra os resultados de teor obtidos para o fármaco atenolol.

Tabela 2 – Resultados de teor do fármaco atenolol.

Fornecedor	Teor %
A	99,01
B	101,70
C	99,44

Segundo a Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) o teor do fármaco atenolol deve estar entre 98 a 102%, calculado com base na substância seca. Já para as Farmacopéias Européia e Britânica o teor deve estar entre 99 e 101%, calculado da mesma maneira. Os resultados obtidos para os fornecedores A e C se enquadram nas três farmacopéias, já o fornecedor B satisfaz apenas a especificação da Farmacopéia Americana.

3.6.4 Limite de Cloretos

Para o ensaio de limite de cloretos todos os fornecedores avaliados A, B e C cumpriram os limites de 0,1%, conforme as Farmacopéias Americana (USP 29, 2006), Européia (2005) e Britânica (2007).

3.6.5 Compressibilidade ou Índice de Carr

A Tabela 3 exibe os resultados do teste de compressibilidade para o fármaco atenolol, quando o pó foi submetido a 500 batidas.

Tabela 3 – Resultados obtidos na determinação da % de compressibilidade.

Fornecedor	500 batidas
A	36,36
B	29,99
C	35,71

A capacidade de compactação ou % de compressibilidade de um pó está relacionada ao fluxo que ele pode apresentar. Para Lachman (2001) e Staniforth (2005), os valores encontrados para 500 batidas revelam fluidez pobre ou muito pobre para todos os fornecedores. O fator de Hausner também foi calculado com base nos resultados obtidos. Para os fornecedores A, B e C, evidenciou-se os seguintes fatores, respectivamente, 1,57; 1,43 e 1,55. Segundo Hausner (1967), valores inferiores a 1,25 indicam um bom fluxo e valores superiores a 1,6 caracterizam pós de fluxo restrito.

3.6.6 Densidade Aparente

A Tabela 4 exibe os resultados obtidos na determinação da densidade do fármaco para os três fornecedores.

Tabela 4 – Resultados da determinação da densidade.

Fornecedor	Densidade *	DPR%
A	1,1813	2,22
B	1,0615	0,19
C	1,1810	2,09

*Média de três determinações

Os fornecedores A e C apresentaram densidades muito semelhantes, em relação àquela observada para o fornecedor B. Para Carr (1965), a densidade aparente não é usada normalmente para avaliar o fluxo de uma substância, contudo, possui efeito sobre a compressibilidade, considerando ainda, que pós de fluxo livre possuem uma alta densidade e pós de fluxo pobre apresentam densidade baixa.

3.6.7 Granulometria

A tabela 5 apresenta resultados referentes aos diâmetros médios das partículas encontrados no teste de granulometria.

Tabela 5 – Resultados do diâmetro médio da partícula obtidos no teste de granulometria.

Fornecedor	Diâmetro médio da partícula (μm)
A	247,95
B	247,48
C	246,11

Para Staniforth (2005), o tamanho das partículas pode afetar diretamente as propriedades de fluxo dos pós, a homogeneidade da formulação (mistura), bem como a dissolução e, conseqüentemente, a biodisponibilidade. A fluxibilidade de um pó é influenciada pelo tamanho da partícula. As partículas com tamanho maior que 250 μm apresentam, normalmente, características de fluxo livre. Contudo, à medida que o tamanho torna-se menor que 100 μm , os pós tendem a ser coesivos, e os problemas de fluxo surgem com maior probabilidade. Não está exatamente definido na literatura a granulometria adequada para cada fármaco, e desta forma, não há uma especificação de qual seria a granulometria do atenolol. O que podemos concluir é que os testes realizados neste estudo definem este fármaco como um pó de fluidez restrita ou pobre.

3.6.8 Calorimetria Diferencial Exploratória

As Figuras 4, 5 e 6 apresentam os termogramas obtidos na análise de calorimetria diferencial exploratória dos diferentes fornecedores do fármaco.

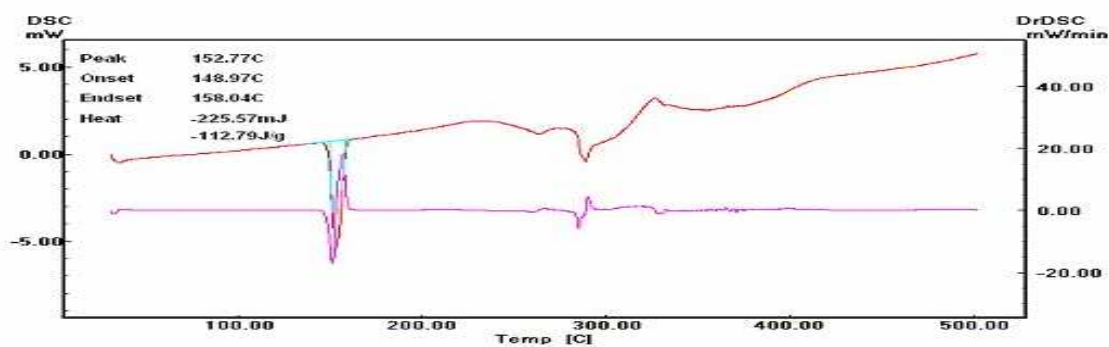


Figura 4 – Termograma obtido para o Fornecedor A, demonstrando o intervalo de fusão de 148,97 a 158,04 °C, assim como o ponto exato da fusão 152,77 °C.

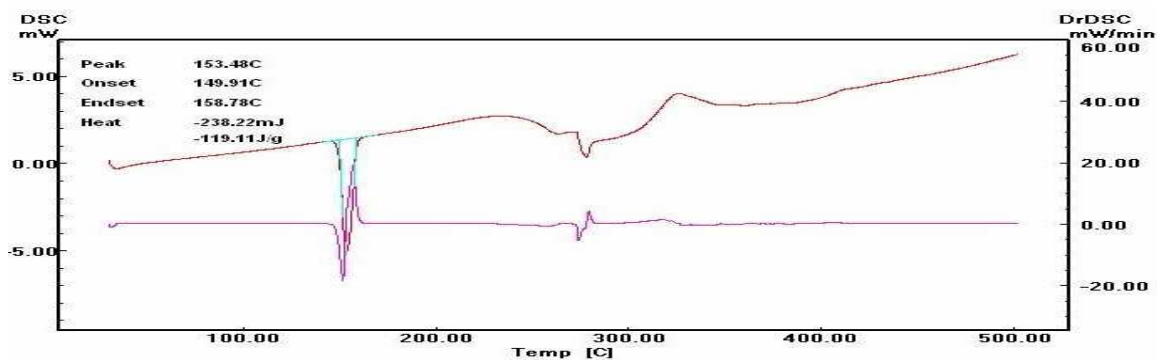


Figura 5 – Termograma obtido para o Fornecedor B, demonstrando o intervalo de fusão de 149,91 a 158,78 °C, assim como o ponto exato da fusão 153,48 °C.

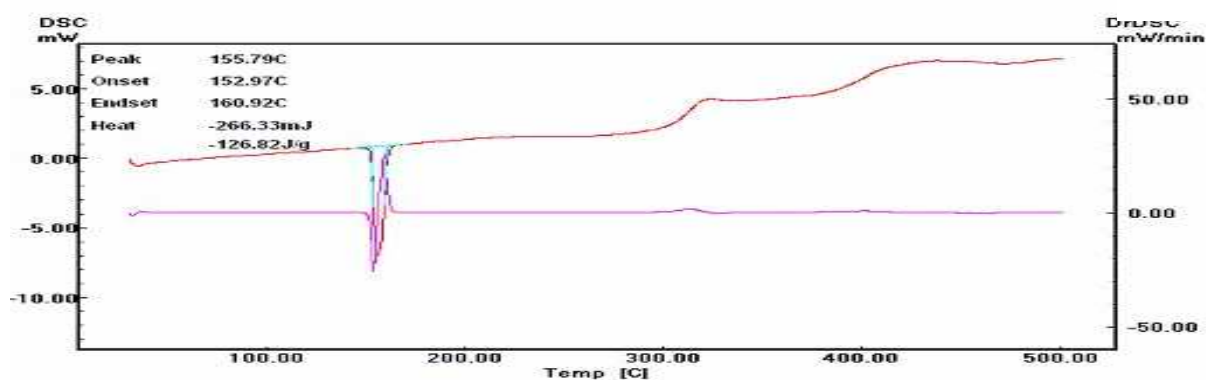


Figura 6 – Termograma obtido para o Fornecedor C, demonstrando o intervalo de fusão de 152,97 a 160,92 °C, assim como o ponto exato da fusão 155,79 °C.

Durante os estudos de pré-formulação a presença de polimorfos na matéria prima é uma característica que deve ser exaustivamente avaliada. A análise de DSC passa, então, a ser uma ferramenta importante nesta caracterização. A confirmação mediante espectroscopia IV e difração de raios X se faz necessária (WELLS, 2005). Os termogramas de DSC do fármaco atenolol apresentados nas Figuras 4, 5 e 6, para os fornecedores A, B e C, respectivamente, demonstraram que nenhum apresentou polimorfismo, não houve picos paralelos característicos de cristalização, oxidação ou decomposição. Os pontos de fusão para os fornecedores A e B se apresentaram de acordo com a especificação preconizada pelas Farmacopéias Americana (152 a 156,5 °C), Européia e Britânica (152 a 155 °C). O fornecedor C, no entanto, está em desacordo.

4 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DE ATENOLOL

4.1 Introdução

Alternativamente aos métodos encontrados na revisão da literatura e na monografia oficial do medicamento, foi desenvolvida e validada metodologia para quantificação de atenolol através de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria no ultravioleta. A filosofia de trabalho consistiu em desenvolver métodos que fossem simples, rápidos e acessíveis e que pudessem ser adotados facilmente nas rotinas de controle de qualidade.

A validação do método analítico é um processo usado para confirmar que o procedimento analítico empregado para testes específicos é apropriado ao fim que se destina (HUBER, 1999). O objetivo de testar um método é para que ele forneça dados confiáveis e exatos seja para fins de aprovação, liberação, estudos de estabilidade ou farmacocinéticos de produtos farmacêuticos (FDA, 1994). A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. Para registro de medicamentos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação da metodologia analítica e, para isso, a maioria deles têm estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (ICH, 2005; BRASIL, 2003a; USP, 2006; FDA, 1994).

4.2. Parâmetros Avaliados Durante a Validação dos Métodos Analíticos

4.2.1. Especificidade

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente a substância em exame na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (excipientes).

4.2.2 Linearidade

É a habilidade de um método analítico produzir resultados que sejam proporcionais às concentrações das substâncias analisadas, dentro de uma faixa específica. Para tanto, os resultados obtidos de cada diluição da SQR são plotados em um gráfico da resposta absoluta *versus* concentração. A equação da reta, para a representação gráfica da curva de calibração, é determinada pelo estudo de regressão linear (método dos mínimos quadrados) e validada pela análise de variância (ANOVA).

4.2.3 Precisão

Precisão avalia o grau de concordância dos resultados obtidos de análises individuais quando o método é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, seguindo condições idênticas de teste. O parâmetro precisão pode ser considerado em três diferentes níveis, sendo estes a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade.

A repetibilidade do método é a concordância entre os resultados encontrados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, sendo verificada por no mínimo nove determinações que contemplem o intervalo linear do método. Pode ser analisada com três concentrações, alta, média e baixa, com três réplicas cada ou através de seis determinações a 100 % da concentração teste. A precisão intermediária é realizada no mesmo laboratório, avaliando o efeito da variação de diferentes dias, analistas e equipamentos. A reprodutibilidade representa a realização da análise através da mesma metodologia em diferentes laboratórios.

A precisão dos métodos desenvolvidos neste trabalho foi determinada a partir da análise de seis amostras a 100 % da concentração de trabalho, sob as mesmas condições, da maior concentração nominal do comprimido de atenolol (100 mg). A precisão intermediária foi avaliada a partir de análises em diferentes dias e variando o analista. A precisão é expressa normalmente como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%), de uma série de medidas.

$$\text{DPR}\% = \frac{\text{Desvio padrão}}{[\] \text{ média experimental}} \times 100$$

Equação 10

4.2.4 Exatidão

É a medida de quanto os resultados obtidos se aproximam do valor verdadeiro. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação de quantidade conhecida de analito adicionada ao placebo. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Equação 11

4.2.5 Limite de Detecção

O limite de detecção representa a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectado, com confiabilidade através de uma metodologia experimental estabelecida.

4.2.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância que está sendo examinada, que possa ser detectada com exatidão e precisão através de metodologia experimental estabelecida.

4.2.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal. Como exemplos destas variações têm: comprimento de onda, temperatura, proporção e pH da fase móvel, entre outras.

O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser investigados (KRULL & SWARTZ, 1998). Segundo os guias consultados, para ensaios de determinação quantitativa, a especificidade, a precisão, a exatidão e a linearidade devem ser consideradas (ICH, 2005; USP 29, 2006; FDA, 1994).

4.3. Produtos Farmacêuticos

- Comprimidos contendo 100 mg de atenolol, medicamento candidato a genérico, fabricado pela Prati, Donaduzzi.

Excipientes: carbonato de magnésio, amido de milho, lauril sulfato de sódio, gelatina, estearato de magnésio e croscarmelose sódica.

- Comprimidos contendo 100 mg de atenolol, como o nome comercial de Atenol®, fabricado pela Astrazeneca, lote 44700.

Excipientes: carbonato de magnésio, amido de milho, lauril sulfato de sódio, gelatina e estearato de magnésio.

- Substância Química de Referência (SQR): Atenolol, Farmacopéia Brasileira, Lote 1028, pureza: 99,6%.

4.4 Solventes e reagentes

- Acetato de amônio, CQA
- Acetato de sódio, Synth
- Acetonitrila, Merck
- Ácido acético glacial, Tédia
- Ácido clorídrico, Nuclear
- Ácido fosfórico, Carlo Erba
- Água ultra-pura Milli Q, Milipore
- Dibutilamina, Vetec
- Fosfato de sódio dibásico, Merck
- Hidróxido de sódio, Merck
- Heptanosulfonato de sódio, Vetec
- Metanol, Carlo Erba
- Peróxido de hidrogênio, Nuclear

4.5 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético, Nova Ética
- Balança microanalítica, Metler Toledo
- Banho ultra-sônico, Logen Sonic
- Bomba de vácuo, Tecnal

- Coluna cromatográfica de fase reversa PurospHer® RP-18 (250 mm x 4.6 mm) 5 µm, Merck
- Coluna cromatográfica de fase reversa Luna® RP-18 (300 mm x 4.6 mm) 5 µm, PHenomenex
- Cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20AT, equipado com bomba LC-20AT, detector de arraste de fotodiodos SPD-M20A, amostrador automático SIL-20^A, forno para coluna modelo CTO-10AS e integrador automático computadorizado através do software Labsolution
- Destilador, Quimis
- Espectrofotômetro UV-VIS, Spectro Vision DB 1880 S
- Membrana filtrante HVHPO, porosidade 0,45 µm, 13 mm
- Membrana filtrante FH (Fluoropore), porosidade 0,50 µm, 47 mm
- Pipetador automático, Gilson
- Potenciômetro, Digimed
- Purificador de água Mili Q, Millipore

4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As condições experimentais estabelecidas para análise de atenolol, através de cromatografia líquida de alta eficiência, encontram-se no quadro abaixo.

Características	Descrição
Coluna	Purospher RP-18e (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm)
Fase móvel	Tampão acetato de amônia: Acetonitrila (80:20 v/v)
Vazão	0,8 mL/min
Comprimento de onda	275 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura do forno	40 °C

Parâmetros utilizados para execução do método por cromatografia líquida de alta eficiência

Os constituintes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de nylon com porosidade de 0,45 μm e 47 mm de diâmetro, e degaseificados através de ultra-som. A coluna foi previamente estabilizada, através da passagem de fase móvel, durante 20 minutos, com fluxo de 1,0 mL/min.

4.6.1 Validação do Método Analítico

A validação foi conduzida de acordo com ICH (2005) e USP 29 (2006). Os parâmetros de validação utilizados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez, exatidão e limites de detecção e quantificação.

4.6.1.1 Preparo das soluções

a) Preparo da solução amostra

Foi determinado o peso médio de 20 comprimidos, conforme a Farmacopéia Brasileira IV (1988). Os comprimidos foram triturados até a formação de um pó homogêneo. Quantidades equivalentes a 10 mg de atenolol, foram pesadas e transferidas para balões volumétricos de 20 mL com auxílio de 5 mL de fase móvel. Completaram-se os volumes com fase móvel, homogeneizando-se as soluções obtidas. Transferiram-se 5 mL das soluções formadas para balões volumétricos de 10 mL obtendo-se soluções com concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$.

b) Preparo da solução com a substância química de referência

Pesaram-se, exatamente, 10,0 mg de SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Completou-se o volume com fase móvel. Transferiram-se 5 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se solução com concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$.

c) Preparo da fase móvel

Para o preparo do tampão acetato de amônio 0,01M, foram transferidos 0,77 g de acetato de amônio grau HPLC para balão volumétrico de 1000 mL e solubilizados com água purificada (o pH foi ajustado para 7,0). O tampão acetato de amônio 0,01M pH 7,0 e a acetonitrila foram então misturados na proporção 80:20.

4.6.1.2 Especificidade

A especificidade do método analítico foi determinada através da avaliação de possíveis interferências dos excipientes da formulação na determinação de atenolol. Foram preparadas seis amostras na concentração de 250 µg/mL, conforme descrito no item 4.6.1.1 a) Estas foram contaminadas duas a duas, com amostra simulada de excipientes (ASE), de acordo com o descrito a seguir:

Após realizar análise de PM de 20 comprimidos conforme Farmacopéia Brasileira IV (1988) diminuiu-se do valor obtido, o teor nominal declarado nos comprimidos, ou seja, 100 mg de atenolol, considerando-se o valor obtido como o total em mg de excipientes presente em cada comprimido, obtendo-se a quantidade de excipientes em mg presente na concentração de trabalho.

Soluções amostra de atenolol (250 µg/mL), foram contaminadas com soluções de ASE de 25, 62,5 e 125 µg/mL. Os estudos foram complementados com a realização de degradação forçada do fármaco. Soluções amostra de atenolol (250 µg/mL), foram submetidas às seguintes condições:

- a) hidrólise básica através da adição de hidróxido de sódio 1,0 N por 12 h a temperatura de 35°C;
- b) hidrólise ácida utilizando-se ácido clorídrico 0,5 N por 12 h a temperatura de 35°C;
- c) reação de oxidação através do uso de peróxido de hidrogênio 10% por 12 h a temperatura de 35°C;

4.6.1.3 Linearidade

Para preparar a curva de calibração pesou-se, analiticamente, 31,25 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com a fase móvel, obtendo-se solução com concentração de 1,25 mg/mL. Foram transferidas alíquotas de 2, 3, 4, 5 e 6 mL, com auxílio de pipetas volumétricas, para balões volumétricos de 20 mL. Os volumes foram completados com fase móvel, obtendo-se soluções com concentrações de 125, 187, 250, 312 e 375 µg/ mL, respectivamente. As curvas foram preparadas em três dias diferentes.

4.6.1.4 Precisão

Para a avaliação da precisão foram realizadas seis determinações conforme item 4.6.1.1 a) em um único dia (n=6), enquanto para a avaliação da precisão intermediária foram avaliadas seis determinações em três diferentes dias.

- Cálculos

A concentração de atenolol nas amostras foi obtida através da equação abaixo:

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

Equação 11

Onde:

$C_A\%$ = Concentração de atenolol na amostra em porcentagem

A_A = Área da amostra

$C_{SQR}\%$ = Concentração da SQR em porcentagem

A_{SQR} = Área da SQR

4.6.1.5 Exatidão

Conforme previsto pelo ICH (2005), a exatidão foi realizada utilizando-se ASE. Para isso, pesou-se, do pó preparado no item 4.6.1.1 a, quantidade equivalente a 10 mg de atenolol e transferiu-se para três balões volumétricos de 20 mL. Foram transferidas alíquotas de 8, 10 e 12 mL da solução padrão estoque com o auxílio de bureta para balões volumétricos de 100 mL, equivalentes a 80, 100 e 120 %, respectivamente, da concentração de trabalho definida como 250 µg/mL. As três soluções foram contaminadas com ASE correspondentes a 100 % da concentração existente no comprimido de 100 mg.

As porcentagens de recuperação foram calculadas pela expressão abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental} \times 100}{\text{concentração teórica}}$$

Equação 12

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

Para a determinação do LD e LQ, uma solução mãe de 10 µg/mL foi preparada. Esta concentração foi baseada no LQ e LD determinados por 10 e 3,3 vezes o sinal-ruído respectivamente, calculados pelo software do cromatógrafo. A partir da solução-mãe foram preparadas diluições com 0,2; 0,4; 0,6 e 2,4 µg/mL. As amostras diluídas e inclusive a solução mãe foram injetadas em duplicata, e os picos resposta obtidos foram comparados ao da solução padrão preparada de acordo com o item 4.6.1.1 b).

4.6.1.7 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada por pequenas modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: mudança na temperatura do forno para 35 °C, variação do fluxo da fase móvel para 0,9 mL/min, uso de diferentes lotes de coluna cromatográfica, variação no pH da fase móvel para 6,5 e variação na concentração da fase móvel (85:15).

Para avaliar a influência destes fatores sobre o método realizou-se análise de teor (conforme descrito no item 4.6.1.1 a) dos comprimidos de atenolol.

4.6.2 Resultados e Discussão

De acordo com a literatura há muitos métodos para a quantificação de atenolol utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. Poucos métodos faziam alusão a quantificação na forma farmacêutica comprimidos e muitos utilizavam algum tipo de pareador iônico na fase móvel, como por exemplo, o heptanosulfonato.

No desenvolvimento do método foi utilizada a coluna C₁₈, a mesma empregada na metodologia oficial, descrita na farmacopéia americana (USP, 2006). Várias fases móveis foram testadas empregando diferentes tampões tais como: tampão ácido fosfórico 0,1% : acetonitrila (80:20 v/v), tampão ácido acético 0,1% : metanol (80:20 v/v), tampão acetato de amônio 10 Mm pH 7,0 : metanol (90:10). A fase móvel constituída de tampão acetato de amônio 10 Mm pH 7,0: acetonitrila (80:20), mostrou-se adequada, reproduzindo o tempo de retenção de aproximadamente 2,7 min, proporcionando uma boa eficiência (pratos teóricos > 3000), picos de boa resolução, seletividade e simetria (< 2%), conforme pode ser observado na Figura 7.

Os cromatogramas das soluções submetidas à degradação forçada e a adição de ASE para estabelecer a especificidade do método, na concentração teórica de 250 µg/mL, estão apresentados na figura 8.

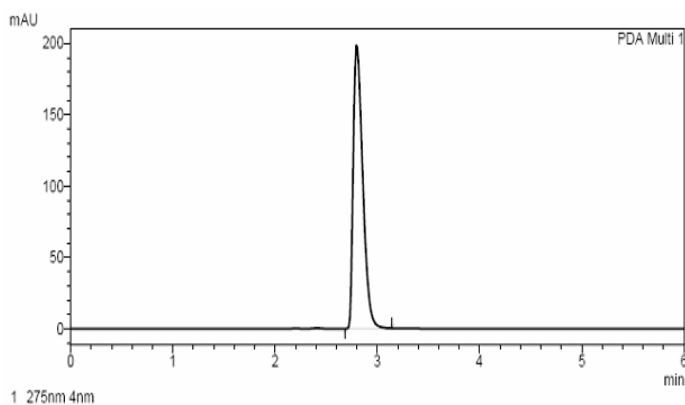
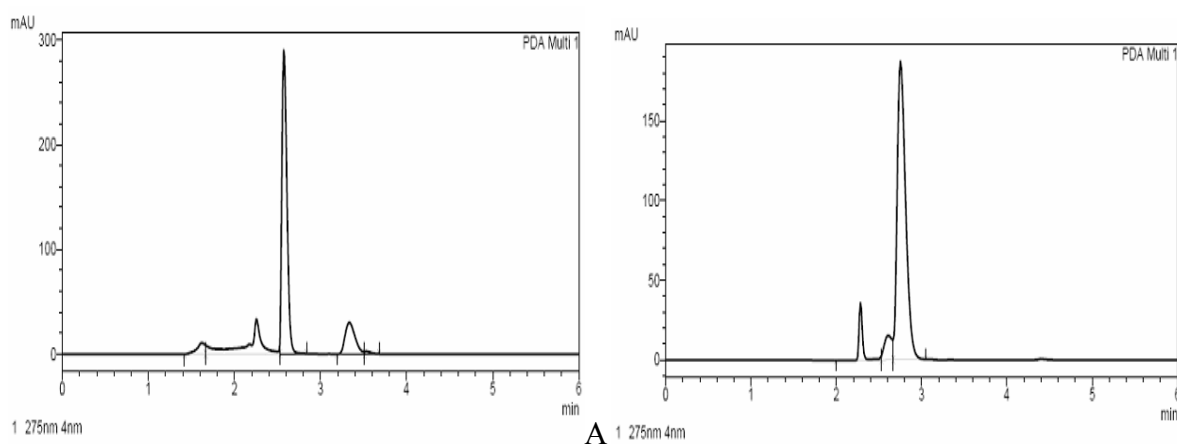


Figura 7 – Cromatograma obtido com a solução de SQR na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Fase móvel: tampão acetato de amônia: acetonitrila (80:20 v/v), coluna C_{18} , detecção: 275 nm, vazão: 0,8 mL/min.



B

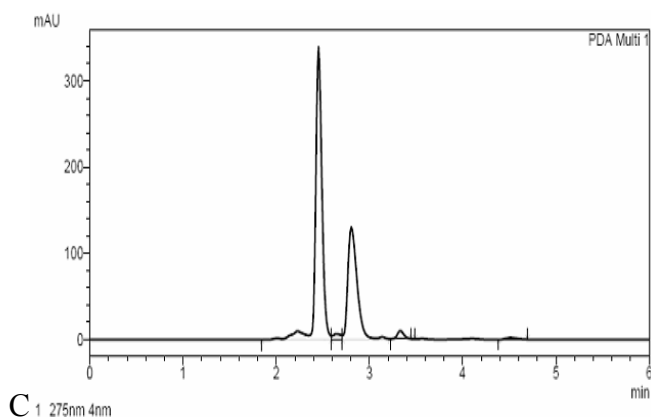


Figura 8 – Cromatogramas obtidos com a degradação forçada da solução amostra submetida à (a) hidrólise básica (NaOH 1,0 N), (b) hidrólise ácida (HCl 0,5 N) e (c) reação de oxidação (H_2O_2 10%); por 12 horas a 35°C . Fase móvel: tampão acetato de amônia: acetonitrila (80:20

v/v), coluna C₁₈, detecção: 275 nm, vazão: 0,8 mL/min.

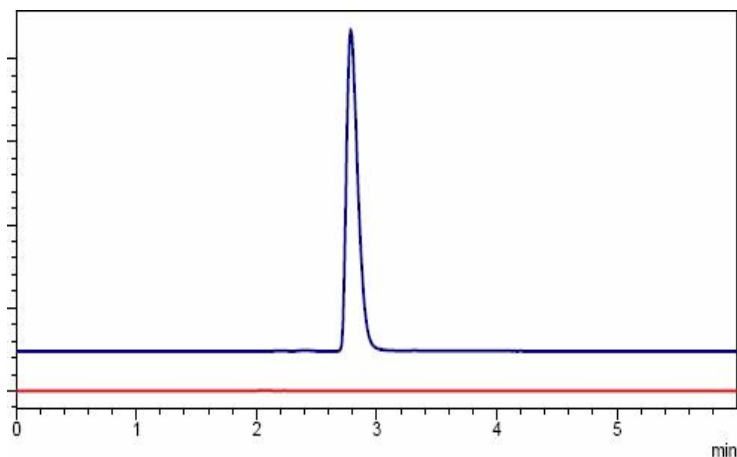


Figura 9: Cromatograma obtido da contaminação da amostra (azul) com 125 µg/mL de ASE (vermelho). Fase móvel tampão acetato de amônia: acetonitrila (80:20 v/v), coluna C₁₈, 275 nm, 0,8 mL/min.

A Figura 7 apresenta o cromatograma da solução de SQR sem degradação, com pureza de 99,6%, na concentração de 250 µg/mL. Após 12 h a 35 °C, na hidrólise básica, houve diminuição (91,91 %) da área referente ao pico da SQR, não houve variação no tempo de retenção como pode ser observado na Figura 8 (a). Na hidrólise ácida, após 12 h a 35 °C, não houve diminuição (99,35%) da área referente ao pico da SQR, Figura 8 (b). Na oxidação química, Figura 8 (c), com H₂O₂ 10 %, por 12 horas a 35 °C, a percentagem de degradação foi de 30,76%. Conforme observado nos cromatogramas apresentados os picos dos produtos formados apresentam resolução adequada (2,1) em relação ao pico principal da SQR, demonstrando que o método possui especificidade, podendo ser indicativo de estabilidade. Também na avaliação da especificidade a amostra foi contaminada com quantidades conhecidas de ASE. Como mostra a Figura 9, não houve interferência da ASE no pico resposta do atenolol.

Os valores experimentais obtidos na realização das três diferentes curvas de calibração de atenolol encontram-se dispostos na Tabela 6, e a representação na Figura 10.

Tabela 6 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do atenolol por cromatografia líquida.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas absolutas			Média \pm e.p.m.	CV%
125	626313	644919	639095	636776 \pm 5501	1,49
187	944182	936696	962680	947853 \pm 7731	1,41
250	1243275	1245528	1274431	1254411 \pm 10043	1,39
312	1557197	1548128	1581198	1562174 \pm 9877	1,09
375	1810330	1849395	1847549	1835758 \pm 12740	1,20

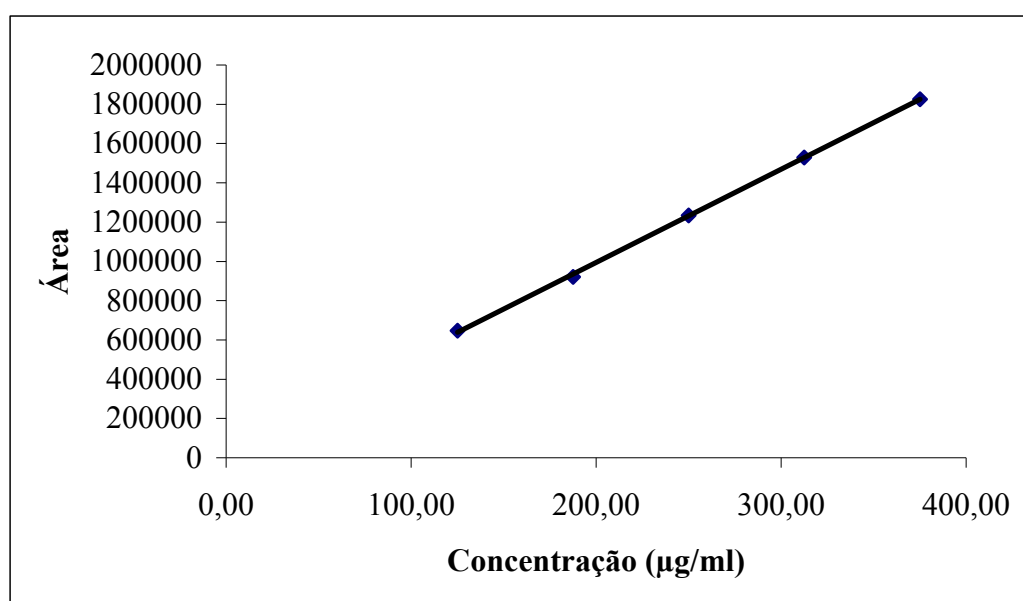


Figura 10 – Representação gráfica da curva de calibração média do atenolol obtida através do método de cromatografia líquida.

As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva de calibração.

Tabela 7 – Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método por cromatografia líquida.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	125 – 375 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$4747,0x + 44777,3$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$4747,0 \pm 110,8$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$44777,3 \pm 14492,6$
Coefficiente de correlação	0,9999

Tabela 8 – Análise de variância das áreas obtidas nas três curvas de calibração do atenolol por cromatografia líquida de alta eficiência.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	4	$2,72 \cdot 10^{12}$	$6,81 \cdot 10^{11}$	2524 (3,48)
Regressão linear	1	$2,72 \cdot 10^{12}$	$2,72 \cdot 10^{12}$	10089 (4,96)
Desvio da linearidade	3	$1,50 \cdot 10^9$	$5,01 \cdot 10^8$	1,86 (3,71)
Resíduo	10	$2,70 \cdot 10^9$	$2,70 \cdot 10^8$	
Total	14			

Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $p = 0,05$.

No parâmetro linearidade os resultados obtidos demonstram que as soluções de atenolol SQR apresentam correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações, nos intervalos utilizados. Gráficos de concentração *versus* área absoluta foram plotados e mostraram linearidade adequada na faixa de 125 a 375 µg/mL (Figura 11). A equação da reta para o método foi $y = 4747,0x + 44777,3$, com coeficiente de correlação (r) de 0,9999. A análise de variância (ANOVA) efetuada sobre os valores de áreas absolutas das curvas de calibração de atenolol, cujos elementos estão determinados na tabela 8, demonstram que a regressão linear foi significativa, não havendo desvio da linearidade ($p < 0,05$), comprovando a validade do método em relação a linearidade.

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos dos comprimidos de atenolol, referentes à precisão intra-dia e inter-dia do método, encontram-se dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores experimentais referentes à determinação de atenolol em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência para precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária).

Amostras	Teor de Atenolol (%)		
	Primeiro Dia	Segundo Dia	Terceiro Dia (variando analista e equipamento)
1	99,56	100,68	100,29
2	99,29	99,85	100,25
3	101,33	101,07	100,96
4	100,88	100,57	99,54
5	101,01	99,33	99,85
6	101,77	99,42	99,63
Média	100,59	100,20	100,23
e.p.m. (±)	0,39	0,29	0,22
DPR (%)	0,95	0,72	0,53
DPR intermediário (%)		0,77	

Tabela 10 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de atenolol por cromatografia líquida de alta eficiência.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	1,09	0,55	0,92 (3,68)
Resíduo	15	8,93	0,60	
Total	17	10,02		

Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $p = 0,05$.

Os baixos valores de DPR obtidos (< 1%) confirmam a adequada precisão do método analítico. A ANOVA indicou não haver diferença significativa entre as diferentes análises realizadas na avaliação da precisão do método (Tabela 10).

Os resultados obtidos no parâmetro exatidão, através do método por cromatografia líquida de alta eficiência estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores experimentais obtidos na avaliação da exatidão em amostras de comprimidos de atenolol por cromatografia líquida de alta eficiência.

Quantidade de SQR		
Concentração µg/mL	% Recuperação dia 1	% Recuperação dia 2
20,00	99,32	98,81
25,00	101,04	99,15
30,00	99,06	99,43
Média	99,80	99,13

A percentagem de recuperação média obtida foi, para o primeiro dia, de 99,80% e para o segundo dia foi de 99,13%. Uma vez que estes valores estão dentro dos limites de 98 – 102%, a exatidão satisfatória do método foi demonstrada (Tabela 11).

A sensibilidade do método foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os valores obtidos para LD e LQ foram de 0,2 e 0,4 µg/mL, respectivamente, indicando boa sensibilidade do método cromatográfico.

A tabela 12 apresenta os resultados obtidos na avaliação do parâmetro robustez.

Tabela 12 – Valores experimentais na avaliação da robustez do método obtidos a partir das modificações nas condições cromatográficas

Parâmetro	Teor* (%)	DPR (%)
pH (0,5)	99,16	1,71
Fase Móvel (5%)	97,92	1,34
Temperatura (5 °C)	98,26	1,21
Fluxo (0,1)	97,93	0,91
Coluna	98,48	1,38
Média de três determinações		

Para o parâmetro robustez, os resultados obtidos demonstraram para as análises realizadas, que os coeficientes de variação entre o teor médio das amostras para o método analítico foram menores que 2%, definindo a robustez do método. Contudo, é importante considerar que para as alterações de fluxo e concentração da fase móvel o método apresentou variações relevantes, o que não apresenta robustez nestas para estas modificações (Tabela 12). Desta forma, o método proposto mostrou-se adequado, pois é específico, simples, robusto, preciso e exato, podendo ser empregado no controle de qualidade de comprimidos de atenolol.

4.7 Espectrofotometria no Ultravioleta

As condições experimentais desenvolvidas para análise de atenolol através de método espectrofotométrico na região do ultravioleta encontram-se estabelecidas no quadro abaixo.

Características	Descrição
Solução diluente	Tampão acetato de sódio 0,1N pH 4,6
Cubeta	Quartzo com 1 cm de percurso ótico
Comprimento de onda	226 nm (máxima absorção)

4.7.1 Validação do Método Analítico

A validação foi conduzida de acordo com ICH (2005) e USP 29 (2006). Os parâmetros de validação utilizados foram linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), especificidade, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação.

4.7.1.1 Preparo das Soluções

a) Preparo da substância química de referência

Para obtenção da curva de calibração pesou-se, analiticamente, 13,88 mg de SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com solução diluente obtendo-se solução com concentração de 138,8 µg/mL (solução padrão estoque).

b) Preparo das amostras

Foi determinado o peso médio (PM) de 20 comprimidos, conforme Farmacopéia Brasileira IV (1988). Os comprimidos foram triturados até a formação de um pó homogêneo. Pesou-se, deste pó, quantidades equivalentes a 13,88 mg de atenolol, que foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL, com auxílio de 50 mL de solução diluente. Os volumes foram completados com o mesmo diluente e homogeneizados. Transferiu-se 1,0 mL das soluções para balões volumétricos de 10 mL, completaram-se os volumes com a solução diluente e homogeneizou-se, obtendo-se soluções com concentrações de 13,88 µg/mL.

c) Preparo da solução diluente

Para obtenção do tampão acetato de sódio 0,1N, foram preparadas duas soluções:

a) solução de acetato de sódio 0,1N: foram pesados, analiticamente, 13,6g de acetato de sódio, transferidos para balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado com água deionizada.

b) solução de ácido acético 0,1N: foram medidos 5,8 mL de ácido acético glacial e transferidos para balão volumétrico de 1000 mL, o volume foi completado com água deionizada.

O tampão foi obtido a partir da mistura das soluções (a) e (b) na proporção de 44,9% e 55,1%, respectivamente. O pH foi ajustado para 4,6 com ácido acético.

4.7.1.2 Especificidade

Para a avaliação de possíveis interferências dos excipientes na determinação de atenolol, foram preparadas seis amostras na concentração de 13,88 µg/mL conforme descrito

no item 4.7.1.1. Estas, foram contaminadas duas a duas, com ASE, de acordo com o descrito abaixo.

Após realizar-se análise do PM de 20 comprimidos conforme Farmacopéia Brasileira IV (1988) diminuiu-se do valor obtido, o teor nominal declarado nos comprimidos, ou seja, 100 mg de atenolol, considerando-se o valor obtido como o total em mg de excipientes presente em cada comprimido. Soluções amostra de atenolol (13,88 µg/mL) foram contaminadas com soluções de ASE de 110%, 125% e 150%.

Os estudos foram complementados com a realização de degradação forçada do fármaco. Soluções amostra de atenolol (13,88 µg/mL), foram submetidas às seguintes condições:

- d) Hidrólise básica através da adição de hidróxido de sódio 1,0 N por 12 h a temperatura de 35°C;
- e) Hidrólise ácida utilizando-se ácido clorídrico 0,5 N por 12 h a temperatura de 35°C;
- f) Reação de oxidação através do uso de peróxido de hidrogênio 10% por 12 h a temperatura de 35°C;

4.7.1.3 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através de cinco diferentes concentrações em três dias.

A partir da solução padrão estoque, com o auxílio de bureta, foram transferidas alíquotas de 6,0; 8,0; 10,0; 11,0 e 12,0 mL para balões volumétricos de 100 mL. Os volumes foram completados com tampão fosfato de sódio pH 4,6, obtendo-se soluções com concentrações de 8,28; 11,04; 13,88; 15,18; e 16,60 µg/mL. O branco foi a mesma solução diluente utilizada no preparo das amostras. As leituras foram efetuadas em 226 nm. As curvas foram preparadas em três dias diferentes.

4.7.1.4 Precisão

Para a avaliação da precisão foram realizadas seis determinações em um único dia (n=6), para a avaliação da precisão intermediária também foram avaliadas seis determinações em três diferentes dias.

- Cálculos

A concentração de atenolol nas amostras foi obtida através da equação abaixo:

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

Equação 13

Onde:

$C_A\%$ = Concentração de Atenolol na amostra em porcentagem

A_A = Absorbância da amostra

$C_{SQR\%}$ = Concentração da SQR em porcentagem

A_{SQR} = Absorbância da SQR

4.7.1.5 Exatidão

Foram transferidas alíquotas de 8, 10 e 12 mL da solução padrão estoque com o auxílio de bureta para balões volumétricos de 100 mL, equivalente a 80,100 e 120 %, respectivamente, da concentração de trabalho definida como 13,88 µg/mL.

As três soluções foram contaminadas com ASE correspondentes a 100 % da concentração existente no comprimido de 100 mg. A quantidade de placebo foi obtida através do peso médio obtido conforme item 4.7.1.3.

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

Para a determinação do LD e LQ, foram preparadas soluções de atenolol nas diluições de 10,0; 2,0; 1,0 e 0,5 e 0,4 µg/mL. As amostras diluídas foram lidas em duplicata e as absorvâncias obtidas foram comparadas com a solução padrão preparada de acordo com o item 4.7.1.1.

4.7.1.7 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada por pequenas modificações nas condições estabelecidas, tais como: mudança na temperatura da amostra para 20 °C, variação do lote do solvente utilizado, variação no pH do solvente de 4,6 para 5,1.

Para avaliar a influência destes fatores sobre o método realizou-se análise de teor (conforme descrito no item 4.7.1.1) dos comprimidos de atenolol.

4.7.2 Resultados e Discussão

A literatura, incluindo a farmacopéia britânica, apresenta vários métodos para quantificação de atenolol em comprimidos. Existem, no entanto, testes aplicados na rotina do controle de qualidade de medicamentos que exigem rapidez, simplicidade e principalmente custo. Neste contexto, um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver e validar metodologia analítica espectrofotométrica para quantificação de comprimidos de atenolol em ensaios de dissolução.

A revisão da literatura apontou métodos espectrofotométricos para quantificação de atenolol, contudo, os mesmos utilizam a faixa do visível e geralmente necessitam trabalhosas reações químicas antes do processo de quantificação (AL-GHANNAM, 2006; GÖLCÜ et al., 2004; SALEM, 2002; AMIN et al., 2002)

Como o método espectrofotométrico foi desenvolvido para posterior utilização na quantificação de amostras para o ensaio de dissolução do medicamento, a concentração de trabalho escolhida para a validação da metodologia é a mesma utilizada para o ensaio de

dissolução. A fim de tornar o método ainda mais prático, optou-se em utilizar o meio de dissolução (proposto pela USP 29) como diluente, no qual o fármaco demonstrou boa solubilidade.

Inicialmente realizou-se varredura com substância química de referência (SQR) de atenolol, a qual foi preparada utilizando a solução diluente (tampão acetato de sódio pH 4,6), com concentração de 13,88 µg/ mL. A solução foi levada ao espectrofotômetro para obtenção dos picos de maior absorbância e escolha do melhor comprimento de onda de trabalho. O espectro de varredura encontra-se apresentado na Figura 11.

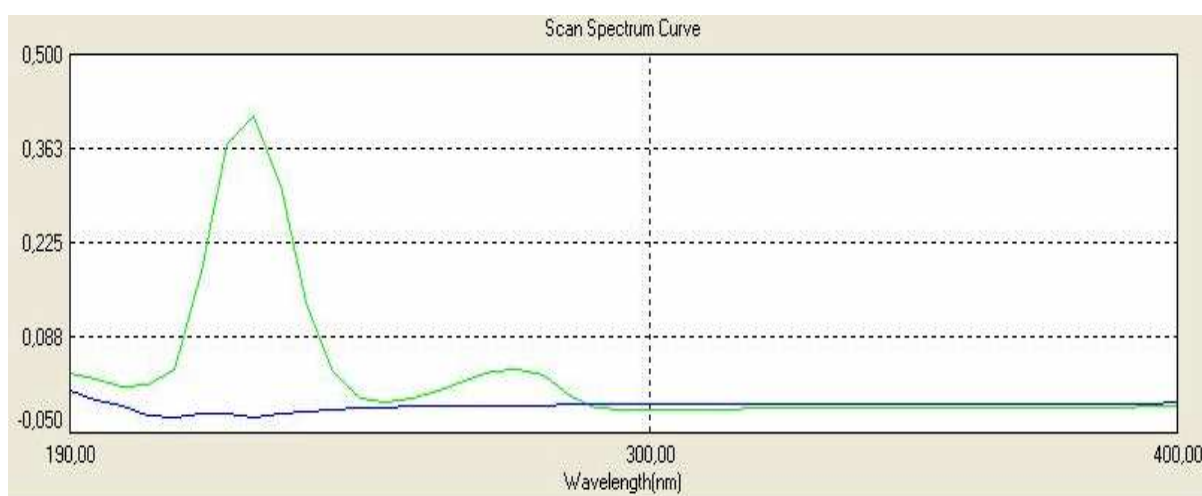


Figura 11 – Espectros de varredura da SQR de atenolol (verde) e da ASE (azul).

Não foram observadas influências devido aos excipientes da formulação, solução diluente ou outras impurezas nas condições otimizadas, o que pode ser verificado nos espectros obtidos com a SQR e as respectivas amostras simuladas de excipientes apresentadas na Figura 11, demonstrando a especificidade do método.

A SQR também foi submetida à degradação estresse, após 12 h a 35 °C, na hidrólise básica, houve diminuição do teor (97,5 %). Na hidrólise ácida, após 12 h a 35 °C, não houve redução do teor da SQR (99,3 %). Na oxidação química com H₂O₂ 10 %, por 12 horas a 35 °C, a percentagem de degradação foi de 30,00%.

O comprimento de onda escolhido para realização das análises foi 226 nm.

Os valores experimentais obtidos na realização das três diferentes curvas de calibração de atenolol encontram-se dispostos na Tabela 13.

Tabela 13 – Absorbâncias obtidas na determinação da curva de calibração do atenolol por espectrofotometria no ultravioleta.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbâncias			Média \pm e.p.m.	CV%
8,28	0,270	0,275	0,273	$0,273 \pm 0,001$	0,92
11,04	0,360	0,369	0,360	$0,363 \pm 0,003$	1,43
13,88	0,455	0,447	0,450	$0,451 \pm 0,002$	0,90
15,18	0,488	0,501	0,503	$0,497 \pm 0,005$	1,64
16,60	0,530	0,529	0,535	$0,531 \pm 0,002$	0,60

A Tabela 14 apresenta a análise de variância dos resultados obtidos na curva de calibração do atenolol por espectrofotometria de ultravioleta.

Tabela 14 – Análise de variância das absorbâncias obtidas nas três curvas de calibração do atenolol por espectrofotometria no ultravioleta.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	4	$1,33 \cdot 10^{-1}$	$3,32 \cdot 10^{-2}$	1313 (3,36)
- regressão linear	1	$1,32 \cdot 10^{-1}$	$1,32 \cdot 10^{-1}$	5244 (4,84)
- desvio da linearidade	3	$1,90 \cdot 10^{-4}$	$6,30 \cdot 10^{-5}$	2,51 (3,59)
Resíduo	10	$2,53 \cdot 10^{-4}$	$2,50 \cdot 10^{-5}$	
Total	14	$1,33 \cdot 10^{-1}$		

Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $p = 0,05$.

A representação da curva de calibração encontra-se na Figura 12.

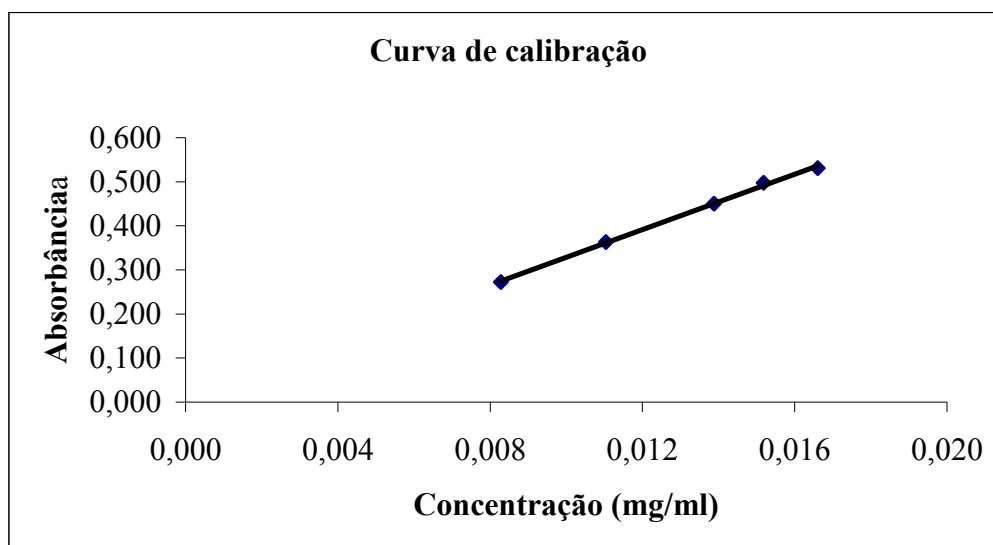


Figura 12 – Representação gráfica da curva de calibração do atenolol obtida através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstram que as soluções de atenolol apresentaram correlação entre as absorbâncias e as concentrações nos intervalos utilizados. O gráfico de concentração *versus* absorbância média entre as curvas obtidas foi plotado e pode ser observado na figura 12, mostrando linearidade adequada na faixa de 8,28 – 16,6 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta para o método foi $y = 31,465x + 0,0141$, com coeficiente de correlação de 0,9986. A análise de variância (ANOVA) efetuada sobre os valores de absorbância das curvas de calibração de atenolol, cujos elementos estão determinados na Tabela 14, demonstra que a regressão linear foi significativa, não havendo desvio da linearidade com $p = 0,05$. Os resultados comprovam a validade do método em relação à linearidade.

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos dos comprimidos de atenolol, referentes à precisão intra-dia e inter-dia do método, encontram-se dispostos na Tabela 15.

Tabela 15 – Valores experimentais referentes à determinação de atenolol em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta para precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária).

Amostras	Teor de Atenolol (%)		
	Primeiro Dia	Segundo Dia	Terceiro Dia (variando analista e equipamento)
1	100,12	98,76	99,68
2	100,12	98,53	101,77
3	98,00	99,89	100,45
4	99,18	100,56	98,08
5	99,65	100,11	99,20
6	99,88	100,7	98,97
Média	99,49	99,76	99,69
e.p.m	0,33	0,37	0,52
DPR%	0,81	0,91	1,28
DPR intermediário (%)		0,97	

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). O valor experimental obtido para a determinação do atenolol nas amostras analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, foi de 99,49%. Nas análises realizadas no segundo dia obteve-se 99,76% e, nas análises realizadas no terceiro dia, variando-se o analista e o equipamento, obteve-se o valor de 99,69% (Tabela 17). Os coeficientes de variação obtidos foram menores que 2%, confirmando a adequada precisão do método analítico. A ANOVA indicou não haver diferença significativa entre as diferentes análises realizadas na avaliação da precisão do método (Tabela 16).

Tabela 16 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de atenolol por espectrofotometria no ultravioleta.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	0,23	0,12	0,11 (3,68)
Resíduo	15	15,72	1,05	
Total	17	15,95		

Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $p = 0,05$.

Os resultados obtidos no teste de exatidão de atenolol, através do método por espectrofotometria no ultravioleta, estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 – Valores experimentais obtidos no parâmetro exatidão em amostras de comprimidos de atenolol por espectrofotometria no ultravioleta.

Quantidade de SQR	% Recuperação		
	Concentração $\mu\text{g/mL}$	Dia 1	Dia 2
	11,04	101,02	101,12
	13,88	101,69	101,03
	16,60	99,13	99,83
	Média	100,61	100,66

A percentagem de recuperação média obtida para o primeiro dia foi de 100,61% e para o segundo dia de 100,66%. Uma vez que está dentro dos limites de 98 – 102%, a exatidão satisfatória do método foi demonstrada (Tabela 17).

A sensibilidade do método foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os valores obtidos para LD e LQ foram de 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicando boa sensibilidade do método.

A tabela 18 apresenta os resultados obtidos na avaliação do parâmetro robustez.

Tabela 18 – Valores experimentais obtidos a partir das modificações nas condições do método espectrofotométrico.

Parâmetro	Teor* (%)	DPR (%)
pH (0,5)	98,64	0,39
Lote de solvente	101,59	0,13
Temperatura (5 °C)	99,63	0,13

Média de três determinações

A avaliação da robustez analítica não indicou prováveis considerações inerentes ao método utilizado por não demonstrar variações significativas nos resultados obtidos com as alterações realizadas no mesmo.

O método demonstrou ser adequado para a análise de comprimidos de atenolol, por mostrar-se preciso, robusto, específico, linear e exato.

4.8 Comparação dos métodos propostos e da metodologia oficial

Os resultados obtidos com os métodos por cromatografia líquida e por espectrofotometria no ultravioleta foram comparados com o método oficial (USP 29, 2006) por ANOVA e estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de atenolol em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta, cromatografia líquida e o método oficial.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre métodos	2	5,81	2,90	3,29 (3,68)
Resíduo	15	13,22	0,88	
Total	17	19,03		

Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $p = 0,05$.

Como pode ser observado na tabela acima, a análise estatística por ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre os teores obtidos com os diferentes métodos ($p = 0,05$).

Assim, com base nos resultados apresentados neste capítulo, pode-se dizer que tanto o método por cromatografia líquida, quanto o método de espectrofotometria no ultravioleta são adequados para as análises de rotina em controle de qualidade de atenolol comprimidos, sendo equiparáveis à metodologia oficial.

Ambos os métodos são rápidos, de fácil execução, acessíveis e cumprem com os requisitos de validação.

5. CAPÍTULO III - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O MEDICAMENTO TESTE E O MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA

5.1 Introdução

Medicamento genérico é a especialidade farmacêutica fabricada para ser intercambiável com o produto inovador (produto original; aquele que obteve o primeiro registro para comercialização no país). Sua produção ocorre sem a licença da empresa inovadora, após a expiração da patente ou de outros direitos de exclusividade. Pode ser comercializado com o nome genérico do princípio ativo ou sob nova marca, em formas farmacêuticas idênticas ou não aos produtos originais (GENÉRICO INFO, 2005).

O progresso na área das Ciências Farmacêuticas, desde o surgimento da Biofarmacotécnica na década de sessenta, veio esclarecer à comunidade farmacêutica, a respeito de que o produto deve liberar o princípio ativo na quantidade e na velocidade adequadas ao seu objetivo terapêutico, possibilitando a constatação de que além do produto ser tecnicamente perfeito, estável e de aparência estética, deve também assegurar que sejam obtidos parâmetros de segurança e eficácia clínica após a administração (PORTA, 1999).

Com base na Resolução RE nº 310, de 01 de setembro de 2004 (Brasil, 2004), que trata sobre os estudos de equivalência farmacêutica e nas metodologias já citadas nos capítulos anteriores, realizou-se estudo comparativo entre diferentes lotes de Atenolol comprimido e o medicamento referência. Os parâmetros levados em consideração foram: peso médio, desintegração, umidade, resistência mecânica em comprimidos (dureza e friabilidade), identificação do princípio ativo, doseamento, teste de dissolução, perfil de dissolução e uniformidade de conteúdo.

5.2 Amostras Utilizadas no Estudo

- Comprimidos contendo 100 mg de atenolol, medicamento candidato a genérico, fabricado pela Prati, Donaduzzi, Lotes A, B, C, D e E .
- Comprimidos contendo 100 mg de atenolol, com o nome comercial de Atenol®, fabricado pela Astra Zeneca, lote 44700, doravante denominado lote R.

5.3 Solventes e Reagentes

- Acetato de amônio, CQA
- Acetato de sódio, Synth
- Acetonitrila, Merck
- Ácido acético glacial, Tédia
- Ácido fosfórico, Carlo Erba
- Água ultra-pura, Milli Q
- Dibutilamina, Vetec
- Fosfato de sódio dibásico, Merck
- Heptanosulfonato de sódio, Vetec
- Metanol, Carlo Erba

5.4 Equipamentos e Acessórios

- Agitador magnético, Nova Ética
- Balança microanalítica, Metler Toledo
- Banho ultra-sônico, Logen Sonic
- Bomba de vácuo, Tecnal
- Coluna cromatográfica de fase reversa PurospHer® RP-18 (250 mm x 4.6 mm) 5 µm, Merck
- Cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20AT, equipado com bomba LC-20AT, detector de arraste de fotodiodos SPD-M20A, amostrador automático SIL-20^A, forno para coluna modelo CTO-10AS e integrador automático computadorizado através do software Labsolution
- Desintegrador, Nova Ética
- Destilador, Quimis
- Dissolutor Erweka DT 700
- Durômetro de bancada, Erweka
- Espectrofotômetro UV-VIS, Spectro Vision DB 1880 S
- Friabilômetro, Nova Ética
- Membrana filtrante HVHPO, porosidade 0,45 µm, 13 mm

- Membrana filtrante FH (Fluoropore), porosidade 0,50 μm , 47 mm
- Karl Fischer, Metron
- Pipetador automático, Gilson
- Potenciômetro, Digimed
- Purificador de água Mili Q, Millipore

5.5 Determinação do Peso Médio dos Comprimidos

A determinação do peso médio dos comprimidos de atenolol foi realizada segundo metodologia da Farmacopéia Brasileira IV (1988), através da pesagem de vinte unidades individuais, escolhidas aleatoriamente, de cada um dos lotes. O cálculo do peso médio e a variação permitida foram realizados de acordo com a mesma farmacopéia.

5.6 Determinação do Tempo de Desintegração dos Comprimidos

O tempo de desintegração dos comprimidos foi determinado em água, mantida a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, segundo a Farmacopéia Brasileira IV (1988).

Foram utilizadas seis unidades de cada lote de produto, considerando-se como tempo final de desintegração o tempo em minutos e segundos em que se pode perceber a desintegração total dos comprimidos.

5.7 Determinação da Umidade por Karl Fischer

Para determinar a umidade contida nas formulações foi utilizado o método de Karl Fischer, empregando titulador automático, segundo a Farmacopéia Brasileira IV (1998). Foram pesadas aproximadamente 200 mg dos comprimidos triturados. Para determinar a percentagem de umidade contida nos produtos utilizou-se a Equação 04, já citada anteriormente.

5.8 Determinação de Resistência Mecânica em Comprimidos

5.8.1 Friabilidade

A determinação da friabilidade nos comprimidos foi realizada seguindo-se metodologia da Farmacopéia Brasileira IV (1988). Foram pesados, com exatidão, vinte comprimidos, os quais foram introduzidos no aparelho e submetidos a cem rotações num período de cinco minutos. Após, todos os resíduos de poeira foram removidos e os comprimidos foram pesados novamente. A diferença entre o peso final e inicial representou a friabilidade em função da porcentagem de pó perdido durante o teste.

5.8.2 Dureza

O ensaio de dureza foi realizado segundo a Farmacopéia Brasileira IV (1988). Dez comprimidos foram submetidos, individualmente, à ação do aparelho, sendo medida a força em quilograma força (kgf) necessária para esmagá-lo.

5.9 Identificação do atenolol nas amostras

A identificação das amostras foi realizada utilizando-se a mesma metodologia do teste de doseamento (item 4.6.1.1 do Capítulo 2), através da comparação entre os cromatogramas obtidos para as soluções amostra de cada lote e para a solução padrão, através da comparação entre os picos e tempos de retenção.

5.10 Doseamento de Atenolol nas Amostras

O doseamento dos comprimidos de atenolol foi realizado utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência conforme metodologia analítica descrita no item 4.6.1.1 do Capítulo 2. As análises foram realizadas em duplicata.

5.11 Teste de Dissolução

O teste de dissolução dos comprimidos de atenolol foi realizado seguindo-se as condições citadas na Tabela 20. A percentagem dissolvida do fármaco foi determinada através de espectrofotometria de ultravioleta, conforme descrito no item 4.7.1.1 do Capítulo 2.

Tabela 20 – Parâmetros utilizados para avaliação da % dissolvida de comprimidos de atenolol (USP 29, 2006).

Parâmetros	
Meio	Tampão acetato de sódio 0,1 N pH 4,6
Volume	900 mL
Aparato	Pá (2)
Velocidade de rotação	50 rpm
Volume coletado	15 mL
Tempo de coleta	30 minutos
Temperatura	37 °C ± 0,5 °C

5.12 Perfil de Dissolução

A avaliação dos perfis de dissolução foi realizada seguindo-se as condições analíticas citadas no item 5.11, Tabela 20. As coletas foram realizadas nos tempos 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. Doze unidades de cada produto foram submetidas ao teste, e a quantificação da percentagem dissolvida foi realizada por espectrofotometria de ultravioleta.

Para realizar a comparação entre perfis, utilizou-se o parâmetro do cálculo de eficiência de dissolução.

5.13 Uniformidade de Doses Unitárias nas Amostras

Foram avaliadas, individualmente, dez unidades dos medicamentos teste e dez unidades do medicamento referência, utilizando metodologia por cromatografia líquida descrita no item 4.6.1.1 do Capítulo 2.

A quantidade de fármaco presente em cada unidade foi avaliada seguindo especificação da Farmacopéia Brasileira IV (1988).

5.14 Resultados e discussão

Este capítulo abordou análises realizadas no sentido de verificar a qualidade e contribuir para um estudo de intercambialidade de comprimidos de atenolol.

O medicamento teste, candidato a genérico (lotes A, B, C, D e E) e o medicamento referência Atenol 100 mg (lote R), foram comparados. Requisitos farmacopeicos de identidade, teor, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração, dissolução, entre outros, foram avaliados.

A Tabela 21 representa os resultados obtidos na análise de peso médio das amostras do medicamento teste de atenolol nos lotes A, B, C, D, E; e do medicamento de referência lote R.

Tabela 21 – Valores individuais em “mg” obtidos para determinação de peso-médio (PM), desvio padrão (DP) e limites inferior e superior para os comprimidos analisados.

Comprimidos	A	B	C	D	E	R
1	360,5	363,6	363,5	362,8	363,5	413,6
2	364,7	358,9	369,1	363,4	365,2	417,2
3	358,8	367,8	365,3	365,8	363,3	411,3
4	359,6	362,1	363,8	365,5	366,4	418,1
5	358,3	363,6	364,1	367,2	361,5	409,2
6	364,1	363,6	363,9	366,5	363,8	411,3
7	360,3	365,4	369,7	369,9	367,2	414,4
8	333,0	364,1	367,2	364,1	368,0	418,6
9	357,7	362,7	368,4	359,9	363,8	415,1
10	362,1	367,1	364,2	363,7	360,9	415,7
11	359,8	362,2	365,7	362,3	362,4	413,6
12	362,3	359,6	363,9	362,7	363,8	415,1
13	360,7	364,1	362,8	365,3	365,2	413,6
14	362,2	363,1	363,9	367,2	362,5	418,5
15	357,5	359,9	364,5	364,6	361,5	409,3
16	359,1	362,8	364,1	365,5	364,5	415,6
17	358,4	362,2	365,8	367,3	366,0	413,5
18	363,1	363,3	366,6	368,8	365,7	418,1
19	360,2	360,4	368,4	365,3	364,1	413,9
20	369,3	367,2	366,5	364,1	363,3	414,2
PM ± DP	359,6 ± 6,9	363,2 ± 2,4	365,6 ± 2,1	365,1 ± 2,4	364,1 ± 1,9	414,5 ± 2,8
Limite inferior	333,0	358,9	362,8	362,7	361,5	409,3
Limite superior	369,3	367,8	369,7	368,8	368,0	418,6

Na análise de peso médio, as amostras submetidas ao ensaio cumpriram com as especificações propostas pela Farmacopéia Brasileira IV (1988), onde a variação individual

para comprimidos com peso médio acima de 250 mg é de $\pm 5,0\%$. Os resultados da variação de peso podem ser visualizados na Tabela 21.

Os resultados do teste de desintegração estão demonstrados na Tabela 22.

Tabela 22 - Resultados obtidos para o teste de desintegração de atenolol comprimidos

Lote	Tempo
A	1 minuto
B	1 minuto e 15 seg
C	2 minutos
D	1 minuto
E	2 minutos
R	2 minutos

O teste de desintegração é mais uma etapa preconizada para a análise da intercambialidade. A Tabela 22 demonstra que os medicamentos analisados estão de acordo com a especificação da Farmacopéia Brasileira IV (1988), que é de 30 minutos para comprimidos.

A Tabela 23 demonstra os resultados da determinação de umidade por Karl Fischer.

Tabela 23 - Resultados obtidos para a determinação de umidade por Karl Fischer

Lote	Umidade %
A	5,10
B	5,23
C	5,18
D	5,08
E	5,20
R	5,06

Para a análise de conteúdo de umidade dos comprimidos evidenciaram-se valores entre 5,06% e 5,23% (Tabela 23). Como não existe especificação para umidade de atenolol em comprimidos, relata-se a proximidade dos resultados do medicamento teste e referência.

Os resultados obtidos para as análises mecânicas de dureza e friabilidade encontram-se dispostos na Tabela 24.

Tabela 24 - Resultados obtidos para a determinação de dureza e friabilidade

Lote	Dureza (Kgf)	Friabilidade %
A	5,5	0,09
B	5,3	0,13
C	4,5	0,01
D	4,7	0,05
E	5,0	0,06
R	9,6	0,14

No teste de resistência mecânica (Tabela 24) verificou-se que os comprimidos cumprem com a especificação da Farmacopéia Brasileira IV (1988): dureza > 3 Kgf e friabilidade (resistência aos choques mecânicos) < 1,5%.

Os resultados obtidos para a determinação quantitativa de atenolol por cromatografia líquida de alta eficiência em comprimidos estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 – Valores experimentais obtidos para a análise de teor de atenolol comprimidos

Resultados de Teor em %						
Amostra	A	B	C	D	E	R
1	100,7	100,46	100,56	99,64	102,30	100,54
2	99,1	100,74	101,42	101,65	102,51	100,49
Média	99,90	100,60	100,99	100,64	102,40	100,51
DPR%	1,13	0,20	0,60	1,41	0,15	0,03

Na análise de doseamento dos medicamentos teste e referência foram verificados que os resultados estavam dentro da faixa de 90 – 110% em concordância com a especificação da monografia oficial (Tabela 25). Segundo a ANVISA, para o medicamento ser aprovado nos

ensaios de equivalência farmacêutica a diferença de teor entre o medicamento teste e o referência deve ser de no máximo 5% (BRASIL, 2004).

Os resultados obtidos para o teste de dissolução *in vitro* nas amostras de atenolol comprimidos, utilizando-se como meio de dissolução tampão acetato de sódio 0,1 N pH 4,6 estão dispostos na Tabela 26.

Tabela 26 – Valores de porcentagens dissolvidas (%) de atenolol obtidos por espectrofotometria de ultravioleta

Amostra	A	B	C	D	E	R
1	99,1	100,2	101,5	98,9	97,99	100,2
2	98,7	101,4	101,1	99,7	98,92	99,81
3	97,6	99,6	98,4	101,4	100,2	98,72
4	100,3	99,9	99,3	100,3	101,3	99,83
5	101,4	100,3	100,9	101,2	100,84	101,26
6	99,3	98,7	99,2	99,9	100,56	102,98
Média	99,4	100,01	100,06	100,23	99,97	100,46
DPR%	1,32	0,89	1,26	0,95	1,26	1,47

A Figura 13 representa os perfis de dissolução comparativos entre os diferentes lotes analisados.

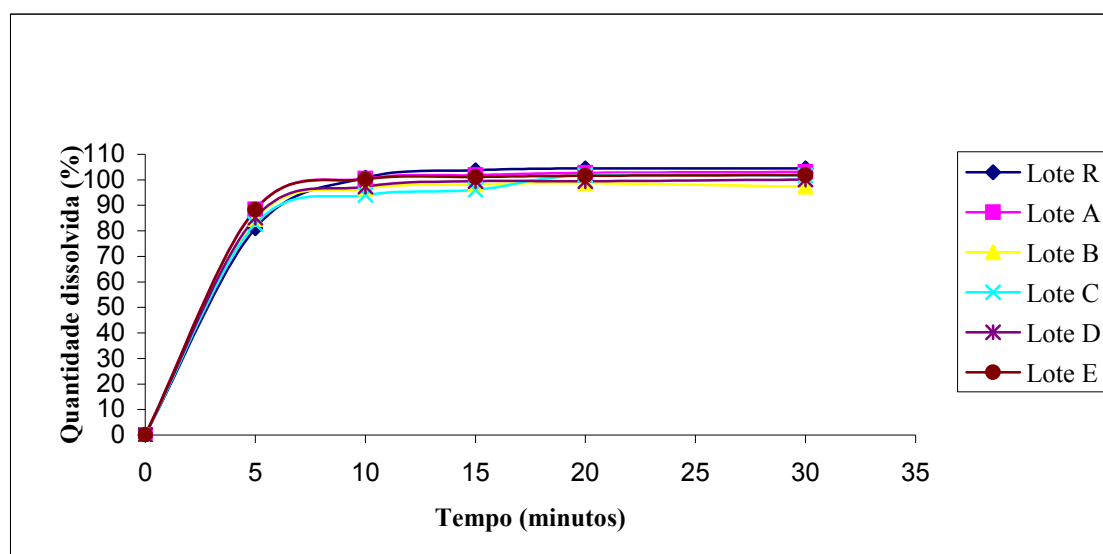


Figura 13 – Perfil de dissolução comparativo entre os lotes A, B, C, D, E e R de atenolol 100 mg comprimidos

Os valores de eficiência de dissolução, os respectivos desvios padrão e os coeficientes de variação obtidos encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27 - Valores da eficiência de dissolução (%)

Amostra	A	B	C	D	E	R
1	96,77	89,78	88,26	93,15	91,23	90,43
2	95,71	90,37	85,78	92,69	92,03	91,72
3	97,74	87,38	88,52	93,55	90,01	89,49
4	88,54	90,42	85,94	92,91	89,98	91,03
5	87,85	89,93	85,84	92,42	90,69	91,95
6	89,16	89,66	85,48	93,37	90,16	91,04
7	88,50	88,61	90,41	83,44	90,97	93,13
8	89,22	88,52	91,07	83,12	88,04	94,40
9	89,40	89,94	90,06	83,21	88,97	91,72
10	89,65	89,73	88,56	84,19	89,98	91,13
11	89,37	87,86	88,77	84,04	89,18	85,54
12	89,42	88,31	88,71	85,24	91,80	87,77
Média	90,95	89,21	87,54	88,44	90,25	90,78
DPR%	3,91	1,14	2,61	5,44	1,30	2,58

Tabela 28 – Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de atenolol comprimidos (100 mg).

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	5	89,96	17,20	2,18 (2,37)
Resíduo	66	520,07	7,88	
Total	71	606,05		

O teste de dissolução determina a quantidade de princípio ativo liberado no meio de dissolução, dentro de um tempo especificado segundo as condições experimentais. Conforme pode ser visualizado na Figura 13, o atenolol tem por característica uma dissolução rápida, liberando mais de 85% do princípio em 15 minutos e sendo assim todos os lotes cumpriram com a especificação definida pela USP 29 de, não menos que 80% do fármaco dissolvido em 30 minutos. Com base nos resultados do perfil de dissolução foi realizado o cálculo de eficiência de dissolução, o mesmo foi avaliado estatisticamente para comprovar a semelhança entre os perfis.

A ANOVA demonstrou que não houve diferença significativa entre os medicamentos para o cálculo de eficiência de dissolução, apresentando um F_{cal} de 2,18 (2,37) para um $p=0,05$, conforme pode ser visualizado na Tabela 28.

Segundo Brasil (2004), considerando a Figura 15 e os fatores $f1/f2$, os medicamentos seriam considerados intercambiáveis, passíveis de serem submetidos aos estudos *in vivo*.

Os valores experimentais (%) obtidos na determinação da uniformidade de conteúdo de atenolol comprimidos apresentam-se na Tabela 28.

Tabela 29 - Valores experimentais (%) obtidos na determinação da uniformidade de conteúdo de atenolol comprimidos.

Amostra	A	B	C	D	E	R
1	99,54	99,33	99,49	102,62	103,00	101,56
2	101,23	99,56	99,77	102,60	100,71	100,95
3	98,64	100,23	98,16	99,37	98,57	96,89
4	97,48	101,14	100,99	96,18	98,46	99,55
5	99,50	99,86	99,56	96,86	97,00	99,62
6	99,50	101,12	98,32	99,02	97,88	101,23
7	101,80	98,76	100,49	100,10	101,97	101,14
8	99,77	97,45	98,74	98,96	97,79	101,91
9	100,35	102,46	101,97	99,75	98,93	98,78
10	98,15	100,24	100,64	100,64	99,10	100,25
Média	99,60	100,01	99,81	99,41	99,34	100,18
CV%	1,32	1,39	1,22	1,87	1,95	1,53

A uniformidade de conteúdo é um parâmetro que avalia a distribuição homogênea do fármaco em cada comprimido. De acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1988), os valores individuais podem variar de 85 a 115%, com CV% máximo de 6%. Conforme pode ser visualizado na Tabela 29, todos os medicamentos cumpriram com as especificações.

Através dos dados apresentados, relativos a todos os parâmetros exigidos pela legislação que ampara o estudo de equivalência *in vitro* no país, pode-se concluir que a intercambialidade entre o medicamento teste e referência é adequada. Contudo, a comprovação desta equivalência requer um estudo *in vivo* (bioequivalência/biodisponibilidade). Este medicamento (teste) foi submetido ao estudo *in vivo* e foi aprovado.

6 CONCLUSÃO

- A análise da matéria prima de atenolol permitiu sua caracterização, fornecendo dados importantes para a escolha dos excipientes na fase de pré-formulação, garantindo um delineamento adequado da forma farmacêutica;
- Os dados obtidos da caracterização do fármaco permitem a qualificação dos fornecedores, garantindo a qualidade lote-a-lote dos medicamentos produzidos.
- A análise de DSC definiu a inexistência de polimorfos, bem como impurezas da matéria prima de atenolol;
- O método desenvolvido através de cromatografia líquida, nas condições experimentais, sem a utilização de pareador iônico, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de atenolol em comprimidos;
- O método desenvolvido através de espectrofotometria na região do ultravioleta, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de atenolol em comprimidos, sendo um método alternativo de quantificação com enfoque para ensaios de dissolução;
- A análise comparativa entre os métodos propostos e a metodologia oficial, para a quantificação de atenolol em comprimidos, demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa, caracterizando a equivalência dos mesmos;
- No estudo comparativo realizado entre as formulações teste e a de referência, verificou-se que todos os produtos cumpriram com as especificações indicadas nas farmacopéias;
- Os teores de atenolol nos produtos analisados ficaram dentro da faixa de 90 – 110%;

- Os medicamentos avaliados apresentaram % de dissolução superior a 95% em 30 minutos.
- Os medicamentos teste e referência podem ser considerados intercambiáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, M. E. Comparative LC-MS and HPLC analyses of selected antiepileptics and beta-blocking drugs. Kuwait. **II Farmaco**; v. 55, p. 136-145, 2000.

ABREU, L. R. P. et al. Atenolol quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography: Application to bioequivalence study. São Paulo. **AAPS PharmSci**; v.5 (2), 2003.

AL-GHANNAM, S. M. A simple spectrophotometric method for the determination of β -blockers in dosage forms. Arabia Saudita. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**; Article in press, 2005.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Stuttgart. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413-420, 1995.

AMIN, A. S.; RAGAB, G. H.; SALEH, H. Colorimetric determination of β -blockers in pharmaceutical formulations. Egypt. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 1347-1353, 2002.

ANDRISANO, V.; GOTTI, R.; LEONI, A.; CAVRINI, V. Photodegradation studies on atenolol by liquid chromatography. Italy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 851-857, 1999.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; JR. ALEN, L. V. **Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. Eight Edition. United States: LWW, 2004. p.568.

BANAKAR, U.; CHERESON, R. **Bioavailability, Bioequivalence, and Drug Selection.** United States: Michael C. Makoid, 1999. p. 111.

BRASIL, **Lei Nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999.** Visalegis, Legislação em Vigilância Sanitária, Estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências, 1999.

BRASIL, **Resoluções-RE nº 899, de 29 de maio de 2003.** Visalegis, Legislação em Vigilância Sanitária, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2003a.

BRASIL, **Resoluções-RDC nº 135, de 29 de maio de 2003.** Visalegis, Legislação em Vigilância Sanitária, Regulamento técnico para medicamentos genéricos, 2003b.

BRASIL, **Resoluções-RDC nº 133, de 29 de maio de 2003.** Visalegis, Legislação em Vigilância Sanitária, Regulamento técnico para medicamentos similares, 2003c.

BRASIL, **Resoluções-RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003.** Visalegis, Legislação em Vigilância Sanitária, Regulamento técnico de Boas Práticas de Fabricação de medicamentos, 2003d.

BRASIL, **Resoluções-RE nº 310, de 01 de setembro de 2004.** Visalegis, Legislação em Vigilância Sanitária, Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução, 2004.

BRASIL, **Resoluções-RE nº 01, de 29 de julho de 2005.** Visalegis, Legislação em Vigilância Sanitária, Guia para realização de estudos de estabilidade, 2005.

BRIGUENTI, A. C. C.; BONATO, P. S. Quantitative Analysis of β -blockers in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis. Brasil. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, p. 209-214, 2005.

BRITISH PHARMACOPOEIA (BP), Her Majesty's Stationary Office, v 1 e 2, London, 2007.

BUCKTON, G. Propriedade do estado sólido. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 9, p. 151-161.

BUDAVARI, S. The merck index. 13 ed. New York, 2001, p.864.

CARR, R. L. Evaluating flow properties of solids. New York. **Chemical Engineering**. v. 18, p. 163-168, 1965.

CRAIG, D. Q. M. Characterization of polymorphic systems using thermal analysis. In: HILFIKER, R. **Polymorphism in the pharmaceutical industry**. 1 ed. Germany: Wiley-VCH, 2006. cap. 3, p. 43-77.

DATASUS, In: Hiperdia, Brasil, 2006. Disponível em: <http://www.hiperdia.datasus.gov.br>. Acesso em: 17 set 2006.

DELAMOYE, M.; DUVERNEUIL, C.; PARAIRE, F.; MAZANCOURT, P. de; ALVAREZ, J. Simultaneous determination of thirteen β -blockers and one metabolite by gradient high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection. France. **Forensic Science International**. v. 141, p. 23-31, 2004.

EL-GINDY, A., EMARA, S., MOSTAFA, A. HPLC and chemometric-assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of atenolol, amiloride hydrochloride and chlorthalidone. Egypt. **II Farmaco**. p. 269-278, 2005.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA (EP), Conciul of Europe, 5^a ed., v 1 e 2, France, 2005.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), Validation of Chromatographic Methods, Reviewer Guidance, 1994.

GENÉRICO INFO, In: Genérico Info – O Portal dos Medicamentos Genéricos! Brasil, 2005. Disponível em: <http://www.genericoinfo.hpg.ig.com.br>. Acesso em: 14 set 2005.

GIACHETTI, C. et al. Simultaneous determination of atenolol and chlorthalidone in plasma by high-performance liquid chromatography. Application to pharmacokinetic studies in man. Ivrea. **Journal of Chromatography B**. v. 698, p.187-194, 1997.

GÖLCÜ, A. et al. Spectrophotometric determination of some beta-blockers in dosage forms based on complex formation with Cu(II) and Co(II). Turkey. **II Farmaco**; v. 59, p.487-492, 2004.

GOODMAN & GILMAN, **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2003. p. 1671.

HAUSNER, H. H. Friction conditions in a mass of metal powder. USA. **International Journal of Powder Metallurgy**. v. 3, p. 7-13, 1967.

HISTÓRIA, In: **PróGenéricos**. Brasil, 2005. Disponível em: <http://www.progenericos.org.br/historia.shtmL>. Acesso em: 27 jun. 2005.

HUBER, L. Validation of analytical methods. In: **Validation and Qualification in Analytical Laboratories**. 1 ed. USA: InterPharm/CRC, 1999. cap. 9, p. 107-140.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, “Guideline on Validation of Analytical Procedure: Methodology”. 2005.

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

KUBÁN, P.; ABAD-VILLAR, E. M.; HAUSER, P. C. Evaluation of contactless conductivity detection for the determination of UV absorbing and non-UV absorbing species in reversed-phase high-performance liquid chromatography. Switzerland. **Journal of Chromatography A**. v. 1107, p. 159-164, 2006.

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

LACHMAM, L., LIEBERMAN H. A., KANING J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Volume I. Fundação Calouste Guiblenkian, Lisboa. 2001. p 115.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, 2003.

MODAMIO, P., LASTRA, C.F., MONTEJO, O., & MARIFIO, E.L. Development and validation of liquid chromatography methods for the quantitation of propranolol, metoprolol, atenolol and bisoprolol: application in solution stability studies. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 130, p. 137-140, 1996.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, D. M.; WIDDOP, B.. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals Body Fluids and Postmortem Material**. Third Edition. London: PHarmaceutical Press, v.2, 2004.

MONEGHINI, M. et al. Studies in dissolution enhancement of atenolol. Milano. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, p. 177-183, 1998.

MORETTO, L. D. **Qualificação de Fornecedores de Matérias-Primas Farmacêuticas**. v 5. São Paulo: Febrafarma – Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica, 2005.

MOORE, J. N.; FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharm. Technol.**, New York, v. 20, n. 6, p. 64-74, 1996.

PDR – GENERICS. Third Edition. Medical Economics Company, 1997. p.271–272.

PENILDON. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.1374.

PORTA, V. Avaliação da bioequivalência de formulações do mercado nacional contendo fluconazol. São Paulo.[Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo], 1999, p. 129.

PYRAMIDES, G. et al. The combined use of DSC and TGA for the thermal analysis of atenolol tablets. New York. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 103-110, 1995.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. **Farmacologia**, 3 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1997, p.691.

RANTA, V. P., TOROPAINEN, E., TALVITIE, A., AURIOLA, S., & URTTI, A. Simultaneous determination of eight β -blockers by gradient high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and fluorescence detection in corneal permeability studies in vitro. Finland. **Journal of Chromatography B**. v. 772, p. 81-87, 2002.

SALEM, H. Spectrophotometric determination of β -adrenergic blocking agents in pharmaceutical formulations. Egypt. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**; v. 29, p.527-538, 2002.

SHAFATI, A.; CLARCK B.J. Development and validation of a capillary zone electrophoretic method for the determination of atenolol in presence of its related substances in bulk and tablet dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.14, p. 1547-1554, 1996.

SHARGEL, L. & YU, A.B.C. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics, 4 ed. Stamford: Appleton & Lange, 1999.p. 768.

SINGH, A. K.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; SANTORO, M. I. R. M. Development and validation of a chiral liquid chromatographic method for the determination of atenolol and metoprolol enantiomers in tablet preparations. Brasil. **Journal of AOAC International**. v. 84, n. 6, 2001.

SKOOG, HOLLER, NIEMAN. **Princípios de Análise Instrumental**, 5 ed. São Paulo: Bookman, 2002, cap. 31, p. 704-713.

STANIFORTH, J. Fluxo de pós. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 14, p. 208-221.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTO, F. S.; VILNOVA, C. M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: Bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, nº 9-10, 2004.

_____ ; OLIVEIRA, P. G., RODRÍGUEZ, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. São Paulo. **Revista Bras. Cienc. Farmacêuticas**, v. 35, n. 1, p. 1-16, 1999.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. The National Formulary, USP 29 NF 24, Asian Edition, Washington, 2006.

WADWORTH, A.N.; MUDDOCH, D.; BRODGEN, R.N.. **Atenolol – A Reappraisal of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Cardiovascular Disorders**, New Zeland, 1991.

WELLS, Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 9, p. 124-148.

WHO. Report of the WHO expert Committee on National Drug Policies, Contribution to updating the WHO guidelines for developing national drug policies [on line]. World Health Organization. Geneva, 1995. Available from [URL:http://whqlibdoc.who.int/hq/1995/WHO_DAP_95.9pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1995/WHO_DAP_95.9pdf).

WREN, S.A.C.; TCHELITCHEFF, P. UPLC/MS for the identification of β -blockers. UK. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p. 571-580, 2006.