

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

**DIACEREÍNA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO
DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO E DISSOLUÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sílvia Helena Miollo Borgmann

Santa Maria, RS, Brasil

2007

DIACEREÍNA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO E DISSOLUÇÃO

por

Sílvia Helena Miollo Borgmann

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

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

Santa Maria, RS, Brasil

2007

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

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

**DIACEREÍNA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
DE QUANTIFICAÇÃO E DISSOLUÇÃO**

elaborada por
Sílvia Helena Miollo Borgmann

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Simone Gonçalves Cardoso
(Presidente/Orientadora)

Helder Ferreira Teixeira (UFRGS)

Margareth Linde Athayde (UFSM)

Santa Maria, 15 de março de 2007.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho ao Rogerio pelo amor, incentivo, compreensão, colaboração e paciência, durante todo o período de sua elaboração.

Aos meus pais, Sílvio e Beatriz, meu irmão, Rodolfo, minha madrinha Mariluza, aos pais do Rogerio, Valdir e Terezinha, pelo apoio dedicado à minha formação.

À Prof^a Dr^a Simone Gonçalves Cardoso pela orientação, apoio e amizade, indispensáveis, durante a graduação, pela Iniciação Científica, e durante a realização desta dissertação.

Ao Prof. João Régis Miolo, pelo apoio e incentivo desde a graduação.

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

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

Aos funcionários do Departamento de Farmácia Industrial, Vera Pagliarin, Verinha, Renato, Carmem, Rosecler e Silvana, pelo apoio e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CTEFAR – Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaios Farmacêuticos, pelo incentivo no início de minha carreira profissional, durante o primeiro ano da elaboração desta dissertação.

À Elaide Minato, secretária do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela amizade e dedicação.

Ao Prof. Braga, e ao amigo Rogério Lourega, pelas análises espectroscópicas realizadas.

Aos amigos Marcelo (principalmente pela colaboração ao entregar este trabalho ao Prof. Helder), Alemoa (Marcela), Gabriela, Bib's (Bianca), Denise, Lelê (Danielle), Lisiane, Carine, Fibebe e Patrícia, pelo companheirismo, amizade, paciência e colaboração durante esses dois anos de convivência (vou sentir saudades...).

Aos colegas de turma, Thiago, Paulo, Sidoca (Leandro), João, Tânia e Giane pela amizade, colaboração e aprendizado.

Em especial à minha "IC" Lutiane Mozaquatro Parcianello, pelo apoio, colaboração e amizade.

Aos estagiários (e Ex-estagiários...) do laboratório de Controle Físico-Químico, Débora, Emanoelle, Chana e Jamila, pela amizade, colaboração e aprendizado.

A CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro com o fornecimento das bolsas de Mestrado e Iniciação Científica.

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

RESUMO

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

DIACEREÍNA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO E DISSOLUÇÃO

AUTORA: SÍLVIA HELENA MIOLLO BORGMANN

ORIENTADORA: SIMONE GONÇALVES CARDOSO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de março de 2007.

A diacereína (DAR) é um fármaco antiartrósico sintomático de ação lenta. No mercado brasileiro encontra-se disponível na forma de cápsulas e cápsulas manipuladas. Não existem monografias para análise de DAR em nenhuma farmacopéia. No presente trabalho, métodos para quantificação e avaliação da dissolução do fármaco em cápsulas foram desenvolvidos e validados. Os métodos usados para a quantificação do fármaco foram a espectrofotometria e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). No método espectrofotométrico DAR pode ser quantificada em 277 ou em 502 nm, utilizando NaOH 0,1N como diluente. As análises por CLAE foram realizadas em coluna C₁₈, utilizando fase móvel composta de trietilamina 0,1%: acetonitrila (65:35, v/v; com pH ajustado para 7,5 com ácido ortofosfórico) com detecção no UV em 250 nm. Os métodos mostraram boa linearidade ($r > 0,99$), precisão (DPR < 2%) e exatidão (>99%) e os resultados obtidos não apresentaram diferença estatística significativa ($P = 0,05$). A otimização das condições para o teste de dissolução *in vitro* para DAR em cápsulas foi avaliada. As condições que forneceram resultados satisfatórios para os produtos testados foram 900 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 com 0,75% de lauril sulfato de sódio, a $37,0 \pm 0,5$ °C, aparato cesta, 100 rpm e 30 minutos de teste. A liberação de DAR na condição estabelecida foi superior a 80% e os diferentes produtos analisados demonstraram boa eficiência de dissolução (>85%). O método espectrofotométrico que foi validado para avaliar a dissolução mostrou ser específico, não havendo interferência de excipientes ou do invólucro das cápsulas na quantificação de DAR, linear (0,27 – 6,66 µg/mL; $r > 0,99$), preciso (DPR < 5%) e exato (>97%). O fármaco mostrou estabilidade satisfatória no meio de dissolução selecionado.

Palavras-chaves: diacereína, validação, quantificação, dissolução.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DIACERHEIN: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS T OF QUANTITY AND DISSOLUTION

AUTHOR: SÍLVIA HELENA MIOLLO BORGMANN

ADVISER: SIMONE GONÇALVES CARDOSO

Presentation date: Santa Maria, March 15th 2007.

Diacerhein (DAR) is a slow acting symptomatic drug used to treatment of osteoarthritis. It is available in the Brazilian market as capsules and compounded capsules. There are no official methods for DAR analysis in any of the pharmacopeia. In the present work, methods for the quantification and dissolution evaluation of the drug in capsules and compounded capsules were developed and validated. Spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC) were the methods used for drug determination. In the spectrophotometric method the DAR can be quantified at 277 as well as 502 nm, using 0.1N NaOH as diluent. The HPLC analyses were performed on a C₁₈ column, using a mobile phase composed of triethylamine 0.1%:acetonitrile (65:35, v/v; adjusted to 7.5 with ortho-phosphoric acid) and UV detection at 250 nm. The methods showed good linearity ($r>0.99$), precision (RSD<2%) and accuracy (>99%) and the results obtained were not statistically different ($P=0.05$). The optimization of dissolution test conditions for in vitro quality control of DAR in capsules was evaluated. The use of 900 mL of sodium phosphate buffer at 37.0 ± 0.5 °C, basket as apparatus, at 100 rpm rotate speed and 30 minutes of test provided satisfactory results for tested products. The percent dissolution of DAR in the established condition was more than 80% and the different evaluated products presented good dissolution efficiency (>85%). The spectrophotometric method that was validated to evaluate the dissolution testing showed to be specific, with no interference of the placebo or shell capsules in the quantification of DAR, linear ($0.27 - 6.66 \mu\text{g mL}^{-1}$; $r>0.99$), precise (RSD<5%) and accurate (>97%). The drug showed satisfactory stability in the selected dissolution medium.

Key-words: diacerhein, validation, quantification, dissolution.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ASE	Amostra simulada de excipiente
°C	Grau centígrado
µg	Microgramas
µL	Microlitros
CL	Cromatografia líquida
CV%	Coefficiente de variação percentual
DAD	Diodo array detector
DMSO <i>d6</i>	Dimetilsulfóxido deuterado
e.p.m.	Erro padrão da média
ED	Eficiência de dissolução
FDA	Food and Drugs Administration
GL	Graus de liberdade
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonization
IV	Infravermelho
mL	Mililitro
OA	Osteoartrose
r	Coefficiente de correlação de Pearson
r.p.m.	Rotações por minuto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SQR	Substância química de referência
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Determinação de água em DAR SQR	33
Tabela 2 -	Resultados da validação dos métodos utilizados para determinação de DAR em cápsulas.....	86
Tabela 3 -	Análise comparativa entre os diferentes métodos de quantificação ..	87

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Estrutura Química da Diacereína..... 14
- Figura 2 -** Espectro de RMN ^1H da diacereína SQR (400 MHz, DMSO-d_6) 27
- Figura 3 -** Estrutura Química de DAR com representação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios..... 28
- Figura 4 -** Espectro de RMN ^{13}C da diacereína SQR (100 MHz, DMSO-d_6) 29
- Figura 5 -** Estrutura Química de DAR com representação dos deslocamentos químicos dos carbonos 29
- Figura 6 -** Espectro na região do infravermelho da diacereína SQR 30
- Figura 7 -** Espectro da solução de diacereína SQR, na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, obtido por DAD. Condições cromatográficas:coluna Luna Phenomenex® RP_{18} (250 mm x 4 mm, 5 μm); fase móvel: trietilamina 0,1% / acetonitrila (65:35, v/v) pH 7,5 ajustado com ácido fosfórico; vazão: 0,8 mL / min; Volume de injeção: 20 μL 31
- Figura 8-** Cromatograma obtido com a solução de diacereína SQR, na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$. Condições cromatográficas:coluna Luna Phenomenex® RP_{18} (250 mm x 4 mm, 5 μm); fase móvel: trietilamina 0,1% / acetonitrila (65:35, v/v) pH 7,5 ajustado com ácido fosfórico; vazão: 0,8 mL / min; Volume de injeção: 20 μL 32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos Gerais	16
2.1 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Condições Gerais	17
3.2 Indicações e características farmacológicas	17
3.3 Métodos de determinação	18
3.4 Validação de métodos analíticos	21
3.5 Estudos de Dissolução	23
4 CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA(SQR)	26
4.1 Introdução	26
4.2 Substância Química de Referência (SQR)	26
4.3 Identificação da SQR	26
4.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	27
4.3.1.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H (RMN ¹H)	27
4.3.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³C (RMN ¹³C)	28
4.3.2 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)	30
4.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	31
4.4 Determinação de água	32
4.5 Conclusões	33
5 ARTIGOS CIENTÍFICOS	34
5.1 Artigo 1	34
5.2 Artigo 2	47
5.3 Artigo 3	63
6 DISCUSSÃO	80

6.1 Discussão Geral	80
6.2 Método Espectrofotométrico.....	81
6.3 Método Cromatográfico	82
6.4 Análise comparativa entre os diferentes métodos de quantificação	85
6.5 Dissolução	88
7 CONCLUSÕES	92
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
9 ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

A artrite é a doença mais comum entre a população com idade superior a 65 anos. Muitos estudos avaliam sua prevalência, através dos próprios relatos dos pacientes, os quais não diferenciam as várias formas de artrite, sendo que a artrose é a forma mais comum de artrite (BROOKS & BACHMEIER, 1996).

A artrose (osteoartrose, osteoartrite) é considerada a forma mais prevalente de doença articular, sendo mais incidente em joelhos. Considerada como uma forma de reumatismo, histopatologicamente a doença é caracterizada pela perda progressiva da cartilagem articular, aposição de formações ósseas nas trabéculas subcondrais e formação de nova cartilagem e novo osso nas margens articulares. Esta doença possui origem poligênica de penetração incompleta, e os fatores ambientais são muito importantes na contribuição do curso da doença. Por ser o tecido cartilaginoso muito complexo, o estudo fisiopatogênico da artrose se torna difícil, resultando na carência de tratamentos medicamentosos (GOLDMAN, 2001; VON MÜHLEN, 2000).

A artrose pode ser dividida em primária e secundária. A artrose primária, ou forma idiopática, a qual pode ser de maneira localizada (halux ou patelofemural) ou generalizada envolvendo três ou mais articulações, é considerada como falência de todos os tecidos de uma articulação diartrodial (membrana sinovial, osso subcondral, ligamentos, terminações neuromusculares). Algumas evidências incluem a artrose nos reumatismos inflamatórios, como cintilografias que revelam uma hipercaptação articular de proteína C reativa e liberação de diversas proteases lisossomiais (catepsinas) e metaloproteinases neutras (estromelisina, colagenase, gelatinase). A perda de cartilagem está ligada diretamente a estas enzimas que, por sua vez, estão relacionadas a interleucina-1 a qual possui a ação primária no estímulo da síntese e secreção das mesmas. As causas da artrose secundária são diversas, entre as mais importantes estão: necrose avascular, artrite séptica ou tuberculosa, gota, artrite reumatóide, osteoporose, osteocondrite, artropatia hemofílica e neuropática, acromegalia e deslocamento congênito de quadris, bem como os principais fatores de risco: obesidade e fatores metabólicos e genéticos (GOLDMAN, 2001; BROOKS & BACHMEIER, 1996; VON MÜHLEN, 2000).

As terapias farmacológicas encontradas para artrose são escassas, como já mencionado. As modalidades terapêuticas encontradas envolvem analgésicos não opióides, como o paracetamol, opióides analgésicos como a capsaicina (uso tópico), antiinflamatórios não esteroidais (AINES), antimaláricos, infiltrações intra-articulares de corticosteróides ou de substâncias que implementam a viscosidade, como o ácido hialurônico. Recentemente têm sido indicados, como tratamento alternativo, fármacos como glicosamina e condroitina, administrados sozinhos ou em associação, os quais são derivados de cartilagem bovina ou de tubarão, cuja ação seria a regeneração da cartilagem (BROOKS & BACHMEIER, 1996; RICHETTE & BARDIN, 2004).

A diacereína (DAR) (Fig.1) é um fármaco que vem sendo recentemente indicado para terapia de artrose no Brasil. DAR é derivada da reina que, por sua vez, possui origem vegetal. A reina é uma antraquinona encontrada em plantas do gênero *Cássia*. DAR é produzida através da esterificação da reina, obtendo-se assim sua forma acetilada. Desta forma a molécula se torna mais lipofílica, tendo então melhor absorção que a reina. No momento da absorção, a reina passa a ser o metabólito ativo de DAR, pois a molécula sofre desacetilação (SPENCER & WILD, 1997). O mecanismo de ação de DAR está envolvido no processo de inibição da interleucina – 1 em articulações com artrose ativa, atuando deste modo em uma fase mais precoce da cascata inflamatória quando comparados aos AINES (FERNANDEZ *et al*, 1997).

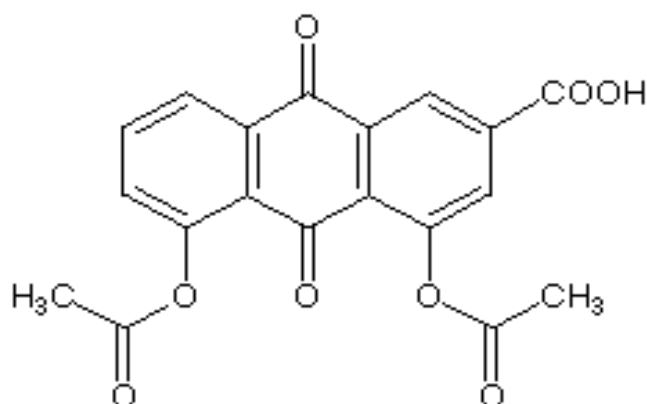


Fig 1: Estrutura química da diacereína.

Comercialmente, a diacereína é encontrada na forma farmacêutica de cápsulas, com nome comercial de Artrodar® (TRB PHARMA) e, alternativamente, cápsulas manipuladas em farmácias magistrais.

Encontra-se na literatura científica apenas metodologia para análise de DAR em matéria-prima, portanto não havendo outros estudos sobre DAR em formas farmacêuticas nem mesmo em monografias oficiais.

Com base no exposto, o presente trabalho contemplou um estudo de controle de qualidade de DAR, abrangendo o desenvolvimento e validação de métodos simples e exeqüíveis para a quantificação de DAR em cápsulas e cápsulas manipuladas. No Brasil, apenas uma indústria é produtora de DAR em cápsulas, no entanto existem, como forma farmacêutica não oficial, as cápsulas manipuladas contendo DAR, as quais são produzidas por uma infinidade de farmácias magistrais. Sendo assim, o presente trabalho contemplou, também, estudos de dissolução das cápsulas industrializadas (Produto A) e de cápsulas provenientes de duas farmácias magistrais da cidade de Santa Maria (Produtos B e C), considerando que os estudos *in vitro* são importantes para a avaliação de propriedades biofarmacotécnicas.

A apresentação dos resultados deste trabalho está disposta na forma de artigos científicos. A partir dos resultados obtidos com o desenvolvimento e validação de método para quantificação de DAR em cápsulas através de espectrofotometria elaborou-se artigo científico, intitulado “*Direct spectrophotometric determination of diacerhein in capsules*” (Artigo 1), o qual foi aceito para publicação no periódico *Die Pharmazie*. O segundo artigo foi elaborado com os resultados obtidos com o desenvolvimento e validação do método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Este artigo, intitulado “*Isocratic RP-HPLC method for diacerhein determination in capsules*” (Artigo 2), foi submetido ao periódico *Chromatographia*. Por fim, foi elaborado ainda artigo científico utilizando-se os resultados provenientes do desenvolvimento e validação de método para avaliação da dissolução de cápsulas contendo DAR, intitulado “*Development and validation of dissolution test for diacerhein in capsules*” (Artigo 3).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar metodologia para controle quantitativo e estudos de dissolução de DAR nas formas farmacêuticas de cápsulas, comerciais e manipuladas.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver e validar métodos para análise quantitativa de DAR em cápsulas através de espectrofotometria na região do ultravioleta e visível;
- ✓ Desenvolver e validar métodos para análise quantitativa de DAR em cápsulas através de cromatografia líquida;
- ✓ Desenvolver e validar métodos de dissolução para DAR nas formas farmacêuticas cápsulas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Considerações Gerais

A diacereína, descrita quimicamente como ácido-4,5-diacetoxi-9,10-dioxi-2-antracencarboxílico, é um novo fármaco antiartrósico com características diferentes dos demais fármacos utilizados no tratamento da artrose. A aprovação do uso de DAR na França ocorreu no ano de 1992 (NICOLAS *et al*, 1998), e sua entrada no mercado brasileiro está registrada na Resolução 675 de 2002 (BRASIL, 2002).

Sua fórmula empírica é $C_{19}H_{12}O_8$, com peso molecular de 368,29. Apresenta-se como pó cristalino e amarelado, praticamente insolúvel em água e pouco solúvel em ácido acético, álcool e acetona. Possui ponto de fusão entre 217 e 218°C (INDEX MERCK, 2004; VALDEQUÍMICA, 2004).

3.2. Indicações e características farmacológicas

De acordo com os manuais da Organização Mundial da Saúde (OMS) e Grupo para Respeito da Ética e Excelência em Ciência (GREES) a Diacereína está classificada como um fármaco antiartrósico sintomático de ação lenta (AASAL) (DOUGADOS, 1996; LEQUESNE, 1994), já que seus efeitos tornam-se aparentes após 2 a 4 semanas do início do tratamento. Além de demonstrar efeitos sintomáticos no tratamento da artrose, DAR também possui propriedades estimuladoras da cartilagem, resultando em um retardamento no processo da doença, conforme resultados apresentados em alguns estudos realizados *in vitro* (SCHÖNGEN, 1988; PUJOL, 1991; BOITTIN, 1993; CRUZ, 1996 e FELIZAS, 1999), em animais (BRANDT, 1997; GOSH, 1998 e SMITH, 1999) e em seres humanos (DOUGADOS, 2001).

A diacereína possui propriedades anti-osteoartrósicas e, moderadamente, atividades analgésica, antiinflamatória e antipirética (SPENCER & WILD, 1997). Seu

mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) (BERDAH *et al*, 1993), de proteases (RAIMONDI *et al*, 1982) e radicais livres de oxigênio (MIAN *et al*, 1987), todos estes envolvidos no processo de degradação cartilaginosa. Diferentemente dos AINES, a diacereína não inibe a síntese de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (POMARELLI *et al*, 1980; PETRILLO *et al*, 1991) demonstrando, assim, certa vantagem em relação à tolerância gástrica.

A molécula de diacereína, logo após sua administração oral, sofre metabolização sendo desacetilada à reina (ácido 4,5-dioxi-9,10-diidro-9,10-dioxi-2-antracencarboxílico) que é o seu metabólito ativo (COPPI & SPRINGOLO, 1988; COPPI & ZILLETTI, 1985).

Após a administração de uma dose de 50 mg, o pico plasmático ocorre em 2,5 horas e a meia-vida de eliminação é de aproximadamente 4,5 horas. Este fármaco possui alta afinidade pelas proteínas plasmáticas, principalmente com a albumina. A biodisponibilidade da diacereína é aumentada quando administrada junto a alimentos, seguida de um retardo na sua absorção. Sua principal via de eliminação é a via renal, sendo que o metabólito principal, a reina, sofre eliminação de 20% por esta via. Os metabólitos conjugados como sulfatos e glicuronatos, são excretados na proporção de 60% e 20% respectivamente (NICOLAS *et al*, 1998).

3.3. Métodos de determinação

Na literatura científica foram encontrados alguns artigos que relatam métodos de determinação de reina, o metabólito ativo de DAR. No início do desenvolvimento deste trabalho não foram encontrados métodos descritos na literatura para determinação de DAR em matéria-prima ou formas farmacêuticas. Somente em 2005 foi descrito método para determinação de DAR em matéria-prima (GIANNELINI *et al*, 2005). Devido ao fato da estrutura molecular de DAR ser muito semelhante à de seu metabólito, buscou-se na literatura métodos de análise para reina, pois os mesmos poderiam servir de base para o desenvolvimento dos estudos com DAR.

Coppi e Springolo (1988) desenvolveram método simples para análise de reína em fluidos biológicos após a administração oral de diacereína. As análises foram realizadas em coluna LiChrosorb RP-8 de 25 cm, com diâmetro de 10 µm, equipada com uma pré-coluna LiChrosorb RP-18, com diâmetro de 5 µm, mantida a 18°C. A fase móvel era constituída por tampão melvaine pH 2,2 e acetonitrila na proporção de 55:45 (v/v) com vazão de 1,0 mL/min e detecção em 258 nm.

Djozan e Assadi (1995) realizaram a separação de antraquinonas e seus glicosídeos, entre eles a reína, presentes em Ruibarbo, utilizando coluna Spherisorb-CN de 5 µm de diâmetro. A fase móvel empregada era constituída por clorofórmio e ácido acético (95:5, v/v), a uma vazão de 0,7 mL/min, com detecção em UV a 254 nm.

Kim e Lee (2003) desenvolveram três diferentes métodos cromatográficos para análise de reína em plasma:

- Método A: inicialmente o plasma foi “marcado” com padrão de reína. O sistema cromatográfico era composto por uma coluna Spheri RP-18 e fase móvel constituída por acetonitrila, metanol e tampão melvaine nas proporções de 35:15:50 (v/v), com vazão de 1,0 mL/min e detecção em UV a 258 nm. A glibenclamida foi utilizada como padrão interno;
- Método B: a identificação da reína em plasma foi conduzida em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ com os eluentes n-propanol, acetato de etila, éter e água nas proporções de 4:3:1:2 (v/v);
- Método C: foi realizada análise por CLAE acoplada a espectrômetro de massas. Foi utilizada uma coluna Phenomenex LUNA C₁₈ com fase móvel composta por metanol e ácido acético 10% nas proporções de 50:50 (v/v), com vazão de 1 mL/min.

Ito, Zhang e Wei (2003) descreveram a determinação de reína em extrato bruto alcoólico e suas frações através de CLAE. Foi utilizada uma coluna Sulpelcosil ODS a temperatura de 35°C. A fase móvel era composta por metanol e ácido fosfórico 0,5% com proporções de 60:40 (v/v) e eluída isocraticamente a uma vazão de 1 mL/min. A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD), nos comprimentos de onda de 254 e 410 nm.

Liu e Zhang (2004) descreveram a determinação de cinco hidroxiantraquinonas em Ruibarbo e em fluidos biológicos por CLAE. Coluna C₁₈ Zorbax, como fase estacionária, e metanol e ácido acético 0,5% (85:15, v/v) como fase móvel, foram utilizadas, e a detecção realizada em 254 nm utilizando DAD. O limite de detecção ficou entre 0,35 e 3,13 ng e a porcentagem de recuperação foi de 83-103% para as diferentes hidroxiantraquinonas. Estes autores descrevem que há também muitos artigos que relatam a determinação de uma ou mais hidroxiantraquinonas derivadas de plantas da medicina chinesa. Neste estudo, constataram que a fase móvel mais comumente encontrada era composta por metanol (ou acetonitrila) e água, com ajuste de pH através de ácido fosfórico, ácido acético ou ácido perclórico. As fases estacionárias eram colunas C₈ e C₁₈. A proporção da fase móvel variava conforme as amostras.

Jiang, Lv e Wang (2005) desenvolveram método para separação e determinação de antraquinonas em preparações medicinais de *Cássia obtusifolia* (Leguminosae) através de eletroforese capilar. O método foi desenvolvido para determinar 5 antraquinonas, entre elas a reína. Foi utilizado tampão borato pH 9,0 e 15 % de acetonitrila.

Koyama *et al* (2005) realizaram a determinação de antraquinonas, glicosídeos e senosídeos em *Rhei Rhizoma* através de eletroforese capilar. O método utilizou α -ciclodextrinas 0,05M em tampão borato 0,03M (pH 10,0) contendo 20 % de acetonitrila. Dentre as antraquinonas determinadas encontrava-se a reína e seu senosídeo.

Zhu *et al* (2005) realizaram estudo farmacocinético de reína em oito voluntários com administração de preparações orais e enemas de extratos de Ruibarbo. A concentração plasmática de reína foi avaliada por cromatografia líquida utilizando coluna Zorbax C₁₈ mantida a 30°C. A fase móvel era composta por metanol, água e ácido acético nas proporções de 80:19,8:0,2 (v/v, pH 5,25) e vazão de 0,5mL/min. O comprimento de onda para detecção foi de 258 nm.

Liu e Xue (2006) realizaram determinação de reína em preparações medicinais em doseamento ultra-sensível através de reação de quimio-luminescência usando a técnica de análise injeção de fluxo.

Qu *et al* (2007) descrevem a determinação de oito componentes ativos em "YIQING" cápsulas, uma preparação medicinal chinesa, através de método cromatográfico. Entre os ativos determinados está a reína. A separação foi realizada

em coluna Lichrospher C₁₈ mantida a 30°C. A fase móvel era composta por solução A (10 mM KH₂PO₄, 0,02% H₃PO₄ em água (v/v) pH 3,0) e solução B (metanol) com eluição gradiente e vazão de 0,8 mL/min. Devido às diferentes características dos componentes ativos, a detecção foi realizada em três diferentes comprimentos de onda: 254 nm para antraquinonas, 278 nm para flavonóides e 345 nm para alcalóides.

Como já mencionado Giannelini *et al* (2005) desenvolveram método cromatográfico indicativo da estabilidade para determinação de DAR em matéria-prima. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Phenomenex Luna C₁₈, mantida à temperatura de 40°C, fase móvel constituída por ácido fosfórico 0,1 M e metanol (40:60, v/v) e comprimento de onda de 254 nm.

3.4. Validação de métodos analíticos

A validação de ensaios de controle de qualidade constitui-se numa ferramenta a qual assegura e permite confiabilidade nas análises de insumos e produtos farmacêuticos, sendo desta forma imprescindível para a indústria farmacêutica, nos laboratórios de controle de qualidade, assim como para produção e registros de novos medicamentos. Os estudos de validação devem ser conduzidos de acordo com protocolos previamente definidos, fazendo parte das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPFM) conforme a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – RDC nº 210/03 (BRASIL, 2003a, GOMES, 2003).

Entre 1994 e 1996 a Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Registros de Produtos Farmacêuticos para uso Humano (ICH) realizou harmonização dos parâmetros de validação de métodos analíticos produzindo dois diferentes guias. O guia Q2A, de 1994, definia parâmetros de desempenho e adotando definições e terminologias necessárias para as diferentes categorias de procedimentos analíticos Já o guia Q2B, de 1996, ampliou o guia anterior incluindo dados experimentais e interpretações estatísticas. Em novembro de 2005 estes guias foram incorporados em um único guia, denominado Q2R1:

Validação de Procedimentos Analíticos: Texto e Metodologia (ICH, 1994; ICH, 1996; ICH, 2005).

A validação de procedimentos analíticos tem como objetivo demonstrar que estes são adequados para o seu propósito (USP 29; 2006; BRASIL; 2003b; ICH, 2005). A validação é que confere a confiabilidade nos resultados de uma análise, embora não determine que o método seja livre de erros, apenas confirmando que o mesmo seja adequado para aquilo a que é proposto (MEHTA, 1997).

As características de desempenho que devem ser testadas no processo de validação devem ser baseadas na intenção do uso do método (ICH, 2005; USP 29, 2006; BRASIL, 2003b), os quais são divididos em quatro categorias: I) testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas; II) testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matéria-prima; III) testes de performance (ex: dissolução) e IV) testes de identificação.

Quanto à definição e execução dos parâmetros analíticos de validação têm-se encontrado na literatura algumas discordâncias, porém, tanto o ICH (2005) como a Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) reconhecem que não há necessidade de serem avaliados todos os parâmetros. Sendo assim, fica sob a responsabilidade do analista definir quais os parâmetros que serão avaliados, visto que, o tipo de método e o seu propósito é que irão determinar o desenvolvimento do processo (Ermer, 2001; Swartz & Krull, 1998).

A especificidade é indicada para testes de identificação do princípio ativo, excluindo-se a necessidade dos outros parâmetros. Excetuando-se o Limite de Detecção, os demais parâmetros devem ser avaliados para os testes quantitativos de Impurezas. Para o Ensaio Limite de Impurezas, onde não é necessária a análise quantitativa, a avaliação do Limite de Detecção e da Especificidade é suficiente. Para os Testes de Determinação Quantitativa, é indicado que se avaliem todos os parâmetros, exceto os Limites de Quantificação e Detecção (ICH, 2005).

Conforme a Resolução nº 899 (Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para os estudos de validação além dos parâmetros de validação, citados anteriormente, há outro ponto que também é salientado pela resolução: os equipamentos e materiais utilizados devem apresentar-se devidamente calibrados e que os analistas sejam qualificados e treinados adequadamente (BRASIL, 2003b).

3.5 Estudos de Dissolução

A dissolução pode ser resumidamente definida como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica, tornando-se disponível para ser absorvido pelo organismo. Alguns autores definem como taxa de dissolução, onde a quantidade de um fármaco, a partir de um estado sólido, passa para solução, por unidade de tempo, sob interface líquido/sólido, com temperatura e composição do solvente padronizados (CHOWDARY & RAJYALAKSHMI, 1987; MARCOLONGO, 2003).

O teste de dissolução constitui-se em procedimento importante na área farmacêutica, sendo uma ferramenta útil na avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações. Esses testes são preditivos da performance dos fármacos *in vivo*, a qual é avaliada através de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência (DOKOUMETZIDIS & MACHERAS, 2006). Os testes de dissolução são recomendados por compêndios oficiais para garantir a qualidade lote-a-lote de formas farmacêuticas sólidas, mas também são empregados para avaliar etapas de produção e de desenvolvimento de novas formulações (FDA, 1997; DRESSMAN et al., 1998; MARQUES & BROWN, 2002; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; BP, 2003; USP 29, 2006).

Para se ter conhecimento de como está acontecendo o processo de dissolução dos fármacos analisados realiza-se a avaliação do perfil de dissolução. Neste procedimento determina-se quantitativamente o fármaco dissolvido em intervalos de tempos diferentes. O perfil de dissolução fornece, assim, informações sobre a velocidade de dissolução, a porcentagem máxima dissolvida e, ainda, em que ponto mudanças significativas podem estar ocorrendo (FERRAZ, 1998).

Segundo Marques & Brown (2002), são inúmeros os desafios no desenvolvimento e validação de métodos de dissolução, devido à variabilidade intrínseca do método e devido à variabilidade de fatores que podem afetar o processo de dissolução (QURESHI & MCGILVEKAY, 1999). Dentre os fatores que influenciam o processo citam-se:

- relacionados com o fármaco e sua formulação, como: solubilidade, tamanho da partícula, natureza química, forma farmacêutica, excipientes e tecnologia de produção;
- relacionados aos equipamentos como: aparato utilizado, geometria do sistema, velocidade do sistema, vibração do sistema, posição da haste, posição e método de amostragem e dispositivo para as formas farmacêuticas que flutuam;
 - relacionados ao meio de dissolução como: volume, presença de ar/gases, presença de bolhas de ar, pH, evaporação do meio, temperatura, viscosidade, força iônica/pressão osmótica e tensoativos;
 - relacionados ao ambiente como: condições de estocagem (temperatura, exposição à luz);
 - relacionados ao método analítico como: método de filtração e o próprio método analítico.

Alguns estudos têm demonstrado e discutido essa variabilidade (QURESHI & MCGILVEKAY, 1999).

Conhecer estes fatores e controlá-los vem a favorecer a reprodutibilidade dos resultados (MARCOLONGO, 2003).

Os maiores desafios encontrados no desenvolvimento do teste de dissolução são a seleção do aparato a ser utilizado (pás ou cestas) e das condições que permitam a seleção de um meio discriminativo (meio de dissolução e velocidade de rotação). Para realizar a escolha do meio de dissolução, características como pKa, solubilidade e estabilidade do fármaco em função do pH, condições *sink*, bem como faixa de concentração do fármaco (FORTUNATO, 2005; MARCOLONGO, 2003; MARQUES & BROWN, 2002; EMAMI, 2006).

Durante o desenvolvimento de métodos de dissolução devem ser também avaliados alguns parâmetros como: a avaliação da influência dos filtros, escolha de método de quantificação preciso e específico bem como utilização de equipamento calibrado. A partir da condição *sink* é que se determina o volume de meio a ser utilizado nos testes de dissolução. A condição *sink* pode ser definida como uma quantidade de solvente não inferior a 3 vezes o volume de meio necessário para obter a solução saturada do fármaco em uma faixa de 500 a 1000 mL. No entanto, esta definição pode variar de acordo com a fonte bibliográfica. Atualmente, se aceita que, para manter as condições *sink*, seja suficiente um volume de 5 a 10 vezes o necessário para a saturação (ABDOU, 1989; MARQUES & BROWN, 2002).

Para validar métodos analíticos que são utilizados para determinação de características de desempenho, como no caso de testes de dissolução, devem-se avaliar os seguintes parâmetros de validação: especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Considera-se a precisão, como o parâmetro de maior importância para a validação de estudos de dissolução para garantir a confiabilidade dos resultados (ANSARI, KAZEMIPOUR & TALEBNIA, 2004).

Dessa forma, um controle criterioso das condições experimentais se faz necessário para reduzir a variabilidade teste-a-teste, a fim de garantir a confiabilidade e reprodutibilidade do teste e garantir que apenas alterações na formulação ou no processo de produção sejam detectadas (FORTUNATO, 2005; MARQUES & BROWN, 2002).

Na literatura não foram encontrados relatos sobre métodos de dissolução de DAR em formas farmacêuticas, o que justifica um dos objetivos do presente trabalho.

4 CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

4.1 Introdução

Para realizar o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos é necessário que se faça uso de substâncias químicas de referência. Conforme o FDA existem duas categorias de padrões de referência: compendial ou não compendial. Os padrões de referência compendiais são obtidos de fontes como a Farmacopéia Americana – USP e a Farmacopéia Brasileira, sendo que, esses padrões não necessitam de caracterização posterior. Os padrões de referência não compendiais são substâncias químicas que possuem elevado teor de pureza, porém devem ser cuidadosamente caracterizados para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1998).

Pelo exposto, a SQR de DAR, pode ser classificada como não compendial, e sua caracterização foi realizada utilizando diferentes análises como: métodos espectroscópicos (RMN ^1H e RMN ^{13}C), espectrofotométricos (ultravioleta, visível e infravermelho), cromatográfico (cromatografia líquida) além de testes quantitativos, como análise de determinação de água (Karl-Fisher).

4.2 Substância Química de Referência

Neste trabalho foi utilizada como SQR matéria-prima de DAR, com teor declarado de 99,8%, identificada pelo lote 114.019, adquirida do laboratório DEG[®].

4.3 Identificação da SQR

4.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A RMN é uma importante técnica para caracterização da exata estrutura de matérias-primas e produtos acabados e fornece mais informações sobre a estrutura molecular do que qualquer outra técnica. (WATSON, 1999).

4.3.1.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H)

O espectro de RMN ^1H de DAR SQR foi obtido em espectrofotômetro Bruker modelo DPX 400, registrado a 400 MHz, utilizando DMSO-d_6 como solvente. O espectro correspondente está apresentado na Figura 2.

As atribuições dos hidrogênios de DAR não foram encontradas na literatura consultada. As mesmas foram descritas baseadas nos deslocamentos químicos encontrados na literatura pertinente e estão representadas por letras na Figura 3 (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

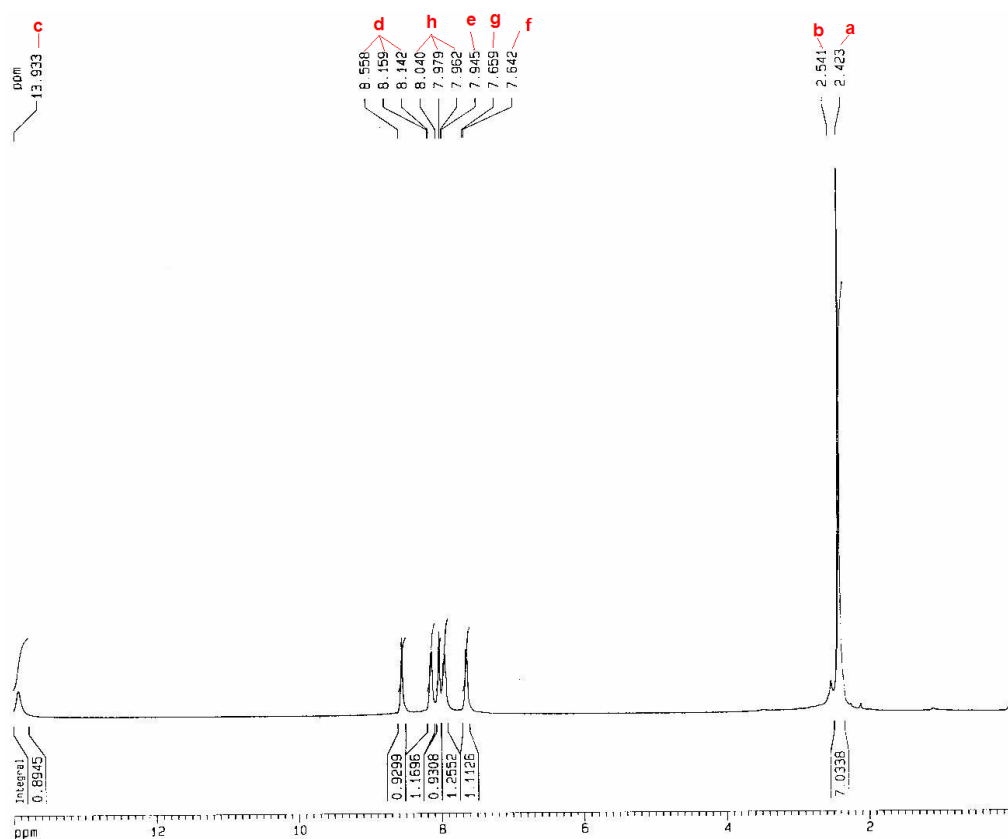


Figura 2 – Espectro de RMN ^1H de DAR SQR (400 MHz, DMSO-d_6).

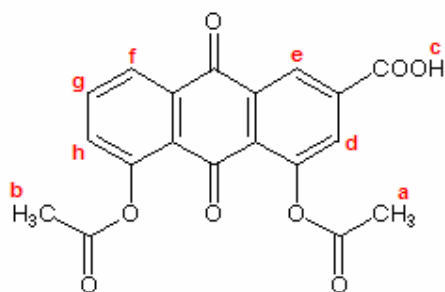


Figura 3 – Estrutura de DAR com atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios(400 MHz, DMSO d_6).

4.3.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C)

O espectro de RMN ^{13}C de DAR SQR foi obtido em espectrofotômetro Bruker modelo DPX 100, registrado a 100 MHz, utilizando DMSO d_6 como solvente. O espectro correspondente está apresentado na Figura 4.

As atribuições dos carbonos de DAR não foram encontradas na literatura consultada. As mesmas foram descritas baseadas nos deslocamentos químicos encontrados na literatura pertinente e estão representadas por letras na Figura 5 (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

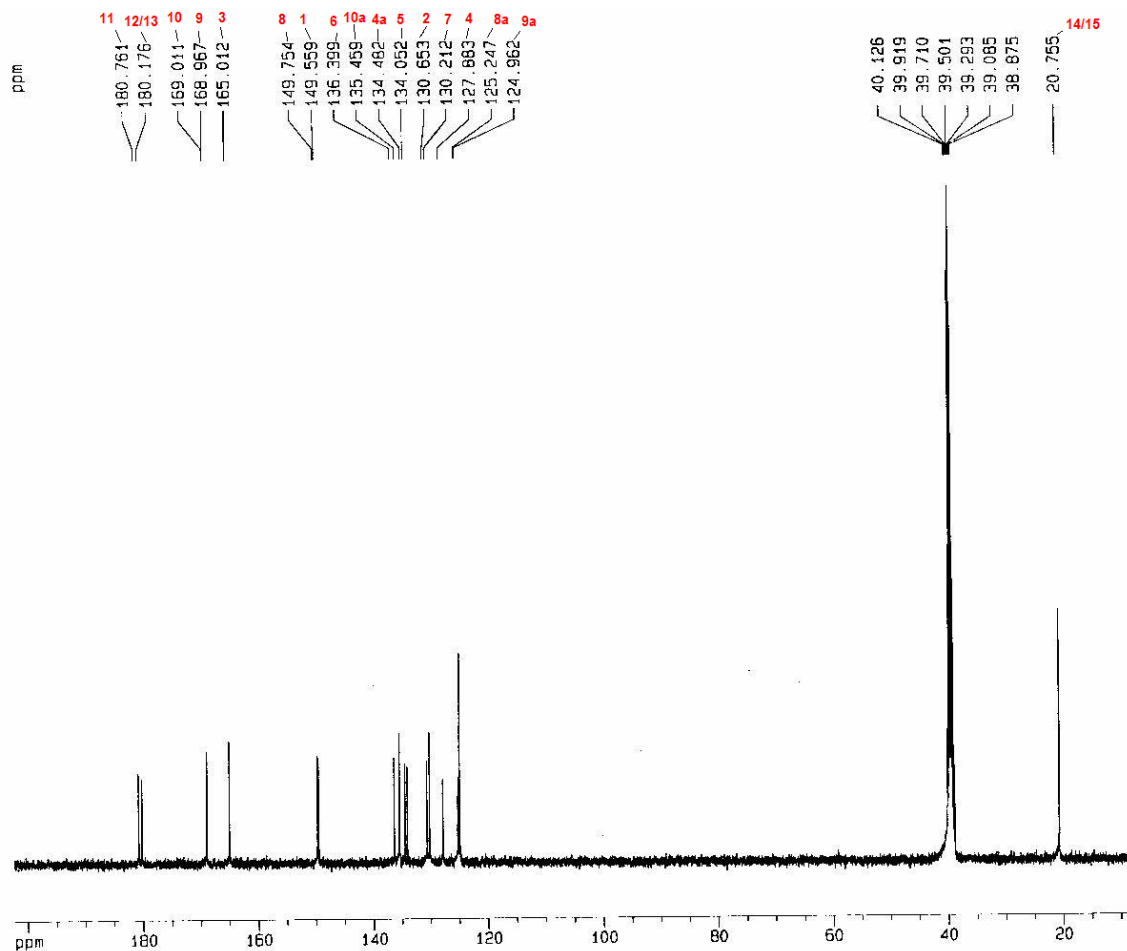


Figura 4 – Espectro de RMN ^{13}C de DAR SQR (100 MHz, DMSO-d_6).

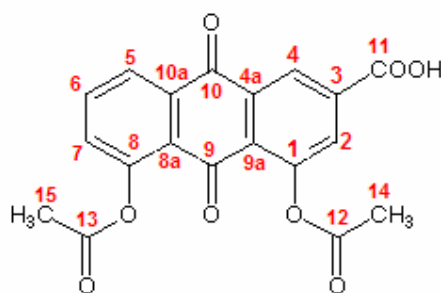


Figura 5 – Estrutura de DAR com atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos (400 MHz, DMSO-d_6).

4.3.2 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A identificação de estruturas químicas utilizando o espectro de infravermelho baseia-se nas bandas que certos grupos de átomos originam, mais ou menos na mesma frequência. É justamente a presença destas bandas características de grupos que permite ao analista a obtenção, através do exame do espectro e consulta a tabelas, de informações úteis sobre a estrutura da substância em análise (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

O espectro de absorção na região do infravermelho de DAR SQR foi obtido em espectrofotômetro RUKER IFS28, utilizando pastilhas de brometo de potássio. Na Figura 4, verificam-se as seguintes bandas características (cm^{-1}): 1770; 1693; 1593; 1292; 1253; 1211 e 1026. As atribuições das bandas características não foram encontradas na literatura consultada, sendo, então, descritas baseadas na literatura pertinente (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

As bandas encontradas nas regiões de 1770 e 1693 cm^{-1} referem-se às vibrações das carbonilas ligadas ao anel aromático, enquanto que as bandas de 1292 e 1253 cm^{-1} referem-se às ligações éster dos anéis aromáticos. Em 1593 cm^{-1} observa-se banda característica das vibrações C-C dos anéis aromáticos, enquanto que em 1026 cm^{-1} se encontram as vibrações dos anéis aromáticos conjugados. A banda em 1211 cm^{-1} pode ser atribuída também às ligações éster dos anéis aromáticos.

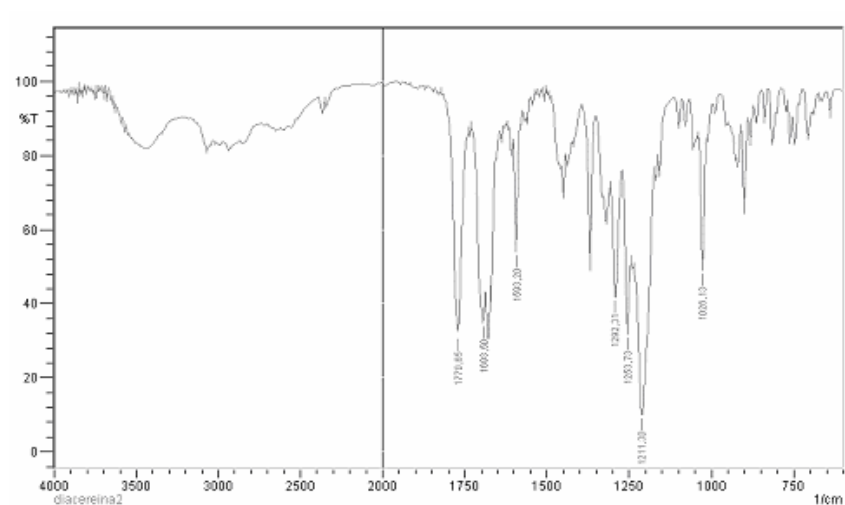


Figura 6 – Espectro de DAR SQR na região do infravermelho.

4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

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

As análises por cromatografia líquida utilizaram método validado, que está descrito no item 5.2, em cromatógrafo líquido, Shimadzu SLC-10 Avp. O espectro de absorção molecular, obtido por DAD e o cromatograma obtidos com a solução de DAR SQR, na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, estão apresentados nas Figura 7 e 8, respectivamente.

A análise do pico principal, aproximadamente em 4,5 minutos, revelou percentual de pureza de 99,99%.

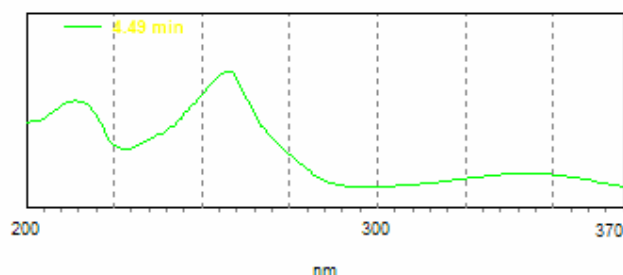


Figura 7 – Espectro da solução de DAR SQR, na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, obtido por DAD. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex[®] RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 μm); fase móvel: trietilamina 0,1% / acetonitrila (65:35, v/v) pH 7,5 ajustado com ácido fosfórico; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 20 μL .

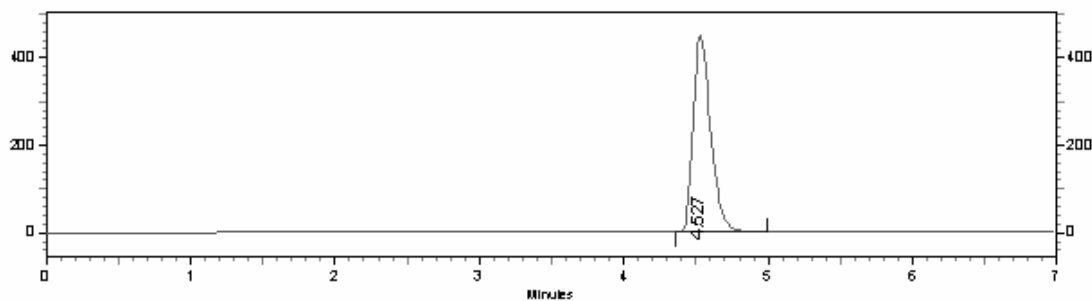


Figura 8 – Cromatograma obtido com a solução de DAR SQR, na concentração de 32 µg/mL. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,1% / acetonitrila (65:35, v/v) pH 7,5 ajustado com ácido fosfórico; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 20 µL.

4.4 Determinação de água

Para determinar a umidade contida em DAR SQR utilizou-se o método de Karl-Fischer, empregando titulador automático, segundo Farmacopéia Brasileira IV Ed. (1988). Pesaram-se aproximadamente 150 mg de matéria-prima. A percentagem de umidade contida nos produtos foi determinada utilizando-se o seguinte cálculo:

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

onde:

FC = fator de correção do reagente de Karl-Fischer

Os valores encontrados na análise da determinação da percentagem de água, em DAR SQR por Karl-Fischer estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Determinação de água em DAR SQR

Amostra	Umidade (%)
1	0,10
2	0,08
3	0,11
<i>Média</i>	<i>0,09</i>

Os resultados obtidos demonstraram que DAR SQR apresentou percentual inferior a 0,1% de umidade. No entanto, não existe especificação farmacopéica para o limite de umidade de DAR em matéria-prima.

4.5 Conclusões

Considerando-se os resultados obtidos nas análises qualitativas e quantitativas realizadas, as quais contribuíram para garantir a identidade do fármaco, pôde-se utilizar, então, a matéria-prima como substância química de referência.

5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 Artigo 1

Direct spectrophotometric determination of diacerhein in capsules

Borgmann SHM¹, Parcianello L¹, Arend M¹, Cardoso SG^{1*}

*¹Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS, Brazil*

*Corresponding author: Prof. Dr. Simone Gonçalves Cardoso, Departamento de Farmácia Industrial – Prédio 26, Sala 1105, Universidade Federal de Santa Maria, Campus, Santa Maria – RS – Brazil - CEP 97.105-900

FAX: 55 55 3220 8288

e-mail: simonegc@ccs.ufsm.br

ABSTRACT

A simple, rapid and precise ultraviolet spectrophotometric method using 0.1N sodium hydroxide has been developed and validated for the assay of diacerhein. The drug can be estimated at 277 nm (ultraviolet region, UV) as well as at 502 nm (visible region, VIS). The absorbances were linearly correlated with concentration in the 6.0 – 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range ($r = 0.9999$) and 10 – 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range ($r = 0.9998$), respectively for measured at 277 and at 502 nm. The relative standard deviation values for intra ($n = 6$) and inter-day ($n = 3$) precision were $< 2\%$. Recoveries ranged between 99.0 and 101.7 %. The method has been successfully applied for the drug assay in capsules. It was also found that the excipients in the commercial capsules did not interfere with the method. Statistical analysis showed no significant difference between the results obtained at two wavelength (277 nm or 502 nm).

Keywords: Diacerhein; UV spectrophotometry, quality control, validation.

1. INTRODUCTION

Diacerhein (DAR, Figure 1) is an oral agent that has been developed specifically for the treatment of osteoarthritis (Lequesne 1994). DAR has a novel mode of action that differentiates it from non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and other conventional forms of drug therapy (Spencer and Wild 1997). No official methods are available for DAR in bulk or in its pharmaceutical forms and there is only one reported method for its determination in bulk form by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detector (Giannelinni et al 2005). Chromatographic techniques are time consuming, costly and require expertise, while spectrophotometric methods are easy to use and robust methods for the quantitation of drugs in formulations where there is no interference from excipients (Watson, 1999). Thus, the aim of the present work was to develop and to validate a simple and reproducible spectrophotometric procedure for the quantitative determination of DAR in capsules. The proposed method can be applied routinely because it does not require high cost reagents and equipment when it is compared with HPLC published method (Giannelinni et al, 2005).

2. INVESTIGATIONS, RESULTS AND DISCUSSION

For media optimization various diluents and solvents, like 0.1N HCl, 0.1N NaOH, methanol, ethanol and acetonitrile, were evaluated. Due to better solubility of the drug in 0.1N NaOH, this diluent was chosen. The absorption spectrum of DAR in 0.1N NaOH shows a strong absorbance peak at 241 nm and other two peaks at 277 and 502 nm (Figure 2). The absorption peaks at 277 and 502 nm were selected for analytical studies. According to Giannelinni et al. (2005) in alkaline conditions (1N NaOH), at room temperature, DAR was found to degrade rapidly to its active metabolite rhein, in stoichiometric amount. Then, we can propose that rhein is probably the species measured. No interferences from the tested excipients were observed with the proposed methods (Figure 2). The optimal characteristics of the method, such as Beer's law limit, apparent molar absorptivity, correlation coefficient, slope, intercept, and confidence limits are presented in Table 1. The correlations coefficients were > 0.999 , indicating a linear relation between absorbance and

concentration of drug. The linearity data were validated by the analysis of variance (ANOVA), which demonstrated significant linear regression and no significant linearity deviation ($P < 0.05$). The experimental results obtained for the determination of DAR in capsules are shown in Table 2 and the % RSD values for the intra-day and inter-day were less than 2%, indicating a satisfactory precision (Table 2). Statistical analysis showed no significant difference between the results obtained at 277 nm and 502 nm ($P < 0.01$) for all evaluated products. Good recoveries results were obtained (Table 3), and no significant differences were observed between the amount of DAR added and the amount found, which indicate the accuracy of the method. It was showed that the variation of the ionic force of the diluent from 0.1N to 1N as well as changes of the wavelength from 277 nm to 282 or ± 5 nm from 502 nm did not have any effects on the analytical results (Table 4). However, the change of ionic force of NaOH from 0.1N to 0.01N or change of the wavelength from 277 nm to 272 nm, have significant effect on the results (Table 4).

3. EXPERIMENTAL

3.1. Chemicals

Diacerhein chemical reference substance (CRS) (assigned purity, 99.8%) was obtained from DEG (Brazil). Capsules (Product A) and compounded capsules (Products B and C) were purchased at the local market and were claimed to contain 50 mg DAR each. Sodium hydroxide analytical grade was obtained from Merck (Germany).

3.2. Equipment

A double-beam UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, Japan) model UV – 1601 PC, with a fixed slit width (2nm) and a 10 mm quartz cell was used to obtain spectrum and absorbance measurements.

3.3. Samples preparation

Twenty capsules were weighed to obtain the average weight. An amount of the powdered sample equivalent to 12.5 mg of DAR was transferred to a 100 mL volumetric flask, about 70 ml of 0.1 N NaOH was added and the flask was sonicated for 20 minutes, followed by addition of 0.1 N NaOH to volume (final concentration of $125 \mu\text{g mL}^{-1}$). This solution was filtered through a quantitative paper filter (Schleicher & Schuell) and further dilution was made with the same solvent in order to give final concentrations of $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $22 \mu\text{g mL}^{-1}$ for measured at 277 nm and 502 nm, respectively.

3.4. Method Validation

The method was validated by the determination of the following operational characteristics: specificity, linearity, precision, accuracy and robustness (USP 29 2006, ICH Q2R1, 2005).

3.4.1. Specificity

The influence of commonly used capsule excipients was investigated before the determination of the drug in dosage forms.

3.4.2 Linearity

For measured at 277 nm, aliquots of DAR CRS stock solution ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 0.1 N NaOH), ranging from 1.5 to 6.0 ml, were transferred to a 25 ml volumetric flasks and the volumes were made with 0.1 N NaOH to obtain solutions at concentrations of 6, 9, 12, 15, 18, 21 and $24 \mu\text{g mL}^{-1}$. In a similar way, for measured at 502 nm, aliquots of stock solution ranging from 2.5 to 8.5 ml were transferred to a 25 ml volumetric flasks and the volumes were made with 0.1 N NaOH to obtain

solutions at concentrations of 10, 14, 18, 22, 26, 30 and 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The curves were prepared in three different days. The linearity was evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least square regression method.

3.4.3 Precision

The precision of the assay was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) and was expressed as a R.S.D.% of a series of measurements. Repeatability was calculated by assaying six samples of the 100% standard concentration (15 or 22 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The analyses were repeated on three different days in order to evaluate the intermediate precision.

3.4.4 Accuracy

The accuracy was determined by % recovery of known amounts of DAR substance reference added to the samples at beginning of the process. All solutions were prepared in triplicate and assayed. The percentage recovery of added DAR substance reference was calculated using the equation proposed by A.O.A.C. (1990).

3.4.5 Robustness

The samples were assayed under different conditions, such as different ionic force of the diluent (0.01 N NaOH and 1 N NaOH) and under different wavelength (272 ± 5 nm and 502 ± 5 nm).

Acknowledgment: This work was supported by CAPES-Brazil and FAPERGS.

REFERENCES

Giannellini V, Salvatore F, Bartolucci G, Coran SA, Bambagiotti-Alberti M (2005) A validated HPLC-stability-indicating method for the determination of diacerhein in bulk drug substance. *J Pharm Biom Analysis* 39: 776-780.

International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005), ICH Steering Committee, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)

Lequesne M (1994) Symptomatic slow acting drugs in osteoarthritis: a novel therapeutic concept? *Rev. Rhum (Engl Ed)* 61: 69-73.

Official Methods of Analytical Chemists of A.O.A.C. (1990) 15th ed., XVII.

Spencer CM, Wild MI (1997) Diacerhein. *Drugs* 53 (1): 987-106.

The United States Pharmacopoeia (USP) 29 ed. Rokville, United States Convention, 2006.

Watson DG (1999) *Pharmaceutical Analysis – A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, Churchill Livingstone.

Additional file:

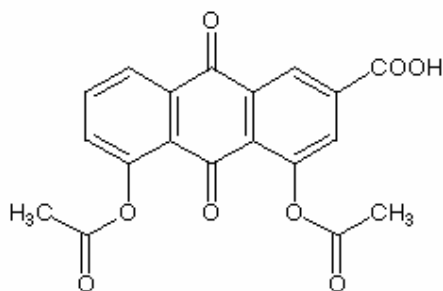
Figure 1 Diacerhein Cardoso at al.doc

Label:

Figure 1

Legend:

Chemical structure of diacerhein



Additional file:

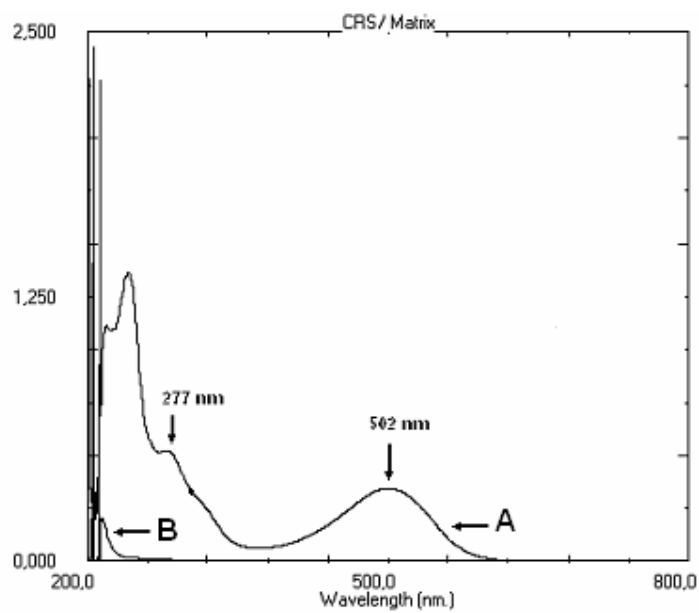
Figure 2 Diacerhein Cardoso at al.doc

Label:

Figure 2

Legend:

Absorption spectrum in 0.1N NaOH: (A) of Diacerhein chemical reference substance at 15 μ g/mL; (B) capsules excipients.



Additional file:

Table 1 Diacerhein Cardoso at al.doc

Label:

Table 1

Legend:

Results of the regression analysis of diacerhein by spectrophotometric method.

<i>Parameters</i>	<i>277 nm</i>	<i>502 nm</i>
Concentration range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6 - 24	10 – 34
Apparent molar absorptivity ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	12570.16	9483.63
Slope \pm standard error ^a	0.0009 ± 0.0003	0.0079 ± 0.0027
Intercept \pm standard error ^a	0.0341 ± 0.0002	0.0260 ± 0.0005
Correlation coefficient (r) ^a	0.9999	0.9999
Linear regression ^b	212626 (4.6)	28278 (4.6)
Linearity deviation ^b	1.325 (2.96)	0.407 (2.96)

a Data obtained from three calibration curves

b Figures in parentheses corresponding critical values for F at P = 0.05

Additional file:

Table 2 Diacerhein Cardoso at al.doc

Label:

Table 2

Legend:

Intra and inter-day assay variations of diacerhein by spectrophotometric method.

<i>277 nm</i>				
	<i>Intra-day^a</i>		<i>Inter-day^b</i>	
<i>Product</i>	<i>% ± s.e.m.</i>	<i>% RSD</i>	<i>% ± s.e.m.</i>	<i>% RSD</i>
<i>A</i>	99.4 ± 0.52	1.3	99.2 ± 0.25	1.1
<i>B</i>	97.8 ± 0.57	1.4	97.8 ± 0.35	1.2
<i>C</i>	99.4 ± 0.41	1.0	99.3 ± 0.35	1.0

<i>502 nm</i>				
	<i>Intra-day^a</i>		<i>Inter-day^b</i>	
<i>Product</i>	<i>% ± s.e.m.</i>	<i>% RSD</i>	<i>% ± s.e.m.</i>	<i>% RSD</i>
<i>A</i>	97.8 ± 0.18	0.5	97.9 ± 0.14	0.6
<i>B</i>	98.7 ± 0.63	0.1	99.5 ± 0.37	1.1
<i>C</i>	98.0 ± 0.64	0.1	99.7 ± 0.23	0.6

a average of six determinations

b average of three determinations

s.e.m. = standard error of the mean

Additional file:

Table 3 Diacerhein Cardoso at al.doc

Label:

Table 3

Legend:

Recovery test of diacerhein capsules by standard addition method.

λ (nm)	Amount of reference ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		%	
	Added	Recovered	Recovery	Average
277	4.00	3.97	99.0	99.4
	7.00	7.03	100.2	
	10.0	9.92	99.0	
502	6.00	6.12	101.7	100.4
	10.0	10.02	99.9	
	14.0	13.95	99.4	

Additional file:

Table 4 Diacerhein Cardoso at al.doc

Label:

Table 4

Legend:

Robustness test of spectrophotometric method.

Ionic force of NaOH			
	0.01N ^a	0.1N ^a	1N ^a
% ± s.e.m.	103.0 ± 0.2	98.6 ± 0.1	98.1 ± 0.4
% RSD	0.3	0.2	0.6
% ± s.e.m.	101.2 ± 0.2	98.9 ± 0.2	96.8 ± 0.3
% RSD	0.2	0.3	0.4
Change of wavelengths			
	272	277	282
% ± s.e.m.	103.6 ± 0.7	98.6 ± 0.1	98.9 ± 0.1
% RSD	1.0	0.2	0.1
	497 nm ^a	502 nm ^a	507 nm ^a
% ± s.e.m.	99.1 ± 0.4	98.9 ± 0.2	99.6 ± 0.3
% RSD	0.5	0.3	0.5

a mean of two determinations

s.e.m. = standard error of the mean

5.2 Artigo 2

Isocratic RP-HPLC Method for Diacerhein Determination in Capsules

S. H. M. Borgmann, L. M. Parcianello, M. Z. Arend, S. G. Cardoso✉

Universidade Federal de Santa Maria - Departamento de Farmácia Industrial
Santa Maria – CEP 97.119-900 – RS, Brazil, E-mail: simonegc@ccs.ufsm.br

Abstract

An accurate, simple, reproducible and sensitive HPLC method has been developed and validated for quantitative diacerhein determination in capsules. The isocratic analyses were performed on a C₁₈ column, using a mobile phase composed of triethylamine 0.1%:acetonitrile (65:35, v/v; adjusted to 7.5 with ortho-phosphoric acid) and UV detection at 250 nm. The method validation yielded good results and included specificity, linearity, precision, accuracy and robustness. The obtained results are in good agreement with those obtained by UV spectrophotometric reported method.

Keywords:

Column liquid chromatography

Isocratic reversed-phase LC

Antraquinone determination

Diacerhein assay

Introduction

The osteoarthritis (OA) has been defined as a degenerative condition involving articular cartilage and subcondhral bone. Subsequently, OA has come to be viewed more as a syndrome with many complex etiologies rather than a single disease entity [1]. Significant progress has been made in understanding the pathophysiological events that cause the structural changes of osteoarthritis, like the studied of potential roles of cytokines and metalloproteinase (MMP) in cartilage degradation [2-3]. Diacerhein (DAR, Figure 1) is a low molecular weight heterocyclic compound designated as 4,5-bis(acetyloxy)-9,10-dihydro-9,10 dioxo-2-anthracene carboxylic acid [4]. DAR and rhein, its active metabolite [5-6] are anthraquinone compounds that ameliorate the course of osteoarthritis [7-8]. The mechanism of action of DAR is different from that described for classic nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) or corticosteroids. DAR has no inhibitory effect on phospholipase A₂, cyclooxygenase, or 5-lipoxygenase in vitro; however DAR is able to stimulate prostaglandin E₂ synthesis in human chondrocyte cultures [9-10] and inhibits the effects of IL-1 on chondrocytes [11-12]. DAR is a slow acting symptomatic drug used to treatment of osteoarthritis, which has demonstrated efficacy on functional manifestations of osteoarthritis and on the structural component [13]. Few methods have been reported for drug determination by spectrophotometry [14] and HPLC methods [15]. This HPLC method was proposed by Giannellini et al (2005) for assay of DAR in bulk form; the resolution of drug, its potential impurities and degradation products were achieved on a RP 18 (endcapped) operated at 40°C column with 0.1M phosphoric acid and methanol (40:60, v/v) as mobile phase operated isocratically at 1.0 mL min⁻¹, at the detection wavelength of 254 nm. Since there is no official method available for DAR determination, there it is necessary to develop a sensitive, specific

and validated analytical method for the routine analysis of the drug in pharmaceutical dosage form. In the present study, a rapid, inexpensive, accurate, precise and selective isocratic high-performance liquid chromatographic method is reported for routine quality control analysis of DAR in capsules. With the proposed method it is not necessary to use endcapped column and the harmful *N,N*-dimethylacetamide to prepare the sample solution, and the analysis can be performed at room temperature. The method was validated according to ICH [16] and USP Pharmacopoeia [17] specifications, including stress testing of the drug.

Experimental

Chemical and Reagents

Diacerhein used as chemical reference substance (DAR CRS) was purchased from DEG (São Paulo). Capsules were purchased locally and were claimed to contain 50 mg DAR. HPLC-grade acetonitrile was obtained from Tedia (Fairfield, USA). Ultra-pure water was obtained from a Labconco Water Purification Unit (Missouri, USA). Other chemicals were analytical grade.

Instrumentation and Chromatographic Conditions

Chromatography was performed, at room temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) with a Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC system comprising an LC-10 AD_{VP} pump, an SPD-M 10 A_{VP} Phodiode Array Detector, a SCL-10 A_{VP} system controller, and an SIL-10 AD_{VP} auto injector and degasser module. The injection volume was 20 μL . Compounds were separated on a 250 mm x 4.6 mm i.d. x 5 μm particle size Phenomenex (Torrance, California, USA) Luna C₁₈ analytical column. The isocratic mobile phase was triethylamine 0.1% and acetonitrile (65:35; v/v) at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The pH

was adjusted to pH 7.5 with ortho-phosphoric acid. Detection was performed at 250 nm and data were acquired and processed by use of Shimadzu CLASS-VP 5.032 software. All the samples were filtered through 0.45 μm nylon membrane filter (Whatman, USA) before the injections.

Preparation of Stock Standard Solution

Stock standard solution ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared in a 50 mL volumetric flask by dissolving 10 mg of DAR CRS in mobile phase. The working standard solution containing $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ was obtained by dilution of the stock solution in mobile phase.

Preparation of Sample Solutions

Twenty capsules were weighed to get the average weight. The content of the capsules was completely removed from shells and homogenized. An accurately amounts of homogenized samples, equivalent to 10 mg of DAR, were transferred to a 50 mL volumetric flasks and 30 mL of mobile phase was added. The flasks were shaken mechanically for 15 minutes; the solutions were then diluted to volume with mobile phase (final concentration of $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) and filtered through quantitative filter paper (Schleicher & Schuell, Germany). Subsamples of these solutions were diluted with mobile phase to furnish final concentrations of $32 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Method Validation

Specificity

Forced degradations studies were conducted by subjecting DAR CRS to acid, oxidative and alkaline degradations. Solution containing $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ of DAR CRS was prepared in mobile phase. Sub samples of this solution were diluted with 0.1 M

HCl or 3% hydrogen peroxide to furnish final concentrations of $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Acid and oxidative studies were conducted respectively, under reflux at $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and at room temperature ($24 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$), for 4 h. After acid hydrolytic degradation, the solution was cooled to room temperature and neutralized. Alkaline treatment was performed at room temperature, for 4 h, using solution containing 1 mg mL^{-1} in 0.1M NaOH. All the degraded samples were diluted to $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ with mobile phase and analyzed against a freshly prepared control sample (with no degradation treatment). Single wavelength data at 250 nm was collected following the method. Additional photodiode array data was collected to evaluate the purity of the drug peak.

Linearity, Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ)

Appropriate aliquots of DAR standard stock solution ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) ranging from 0.6 to 6.0 mL were transferred to 20 mL volumetric and diluted to volume with mobile phase to obtain solutions at concentrations of 6, 15, 24, 33, 42, 51 and $60 \mu\text{g mL}^{-1}$. On three different days each was injected in triplicate and calibration plots were prepared. Linearity was evaluated by linear least-square regression analysis and by ANOVA statistical analysis. LOD and LOQ were calculated based on the ICH guideline [16].

Precision and Accuracy

Method precision was evaluated by repeatability (intra-day precision). Repeatability was evaluated by assay six samples, at the same concentration ($32 \mu\text{g mL}^{-1}$), on the same day. The intermediate precision (inter-day) was calculated from results obtained on three different days. Intra and inter-day precision were expressed as RSD (%).

Accuracy of the proposed method was evaluated through the percentage of recovery of known amounts of DAR CRS (9.0; 17.0 and 25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) added to solutions of commercial product at concentration of 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The percentage recovery was calculated from differences between the peak areas obtained for fortified and unfortified solutions.

Robustness

The robustness was evaluated by variations in the mobile phase, including pH (7.0 – 8.0) and percentage of acetonitrile (30 – 40%). Variations in the flow rate (1.0 mL min^{-1}) and wavelength (245 and 255 nm) were also determined.

Results and discussion

Method Development

The development of liquid chromatographic methods requires a careful combination among the polarity of the analyte, stationary phase and mobile phase to obtain good separations in reasonable times [16]. The stationary phases in reverse phase, when used in conjunction with polar solvents (usually aqueous) approach the ideal universal system for liquid chromatography [16]. DAR is soluble in *N,N*-dimethylacetamide, dimethylsulfoxide and alkaline solutions; it is not soluble in water and chloroform, and it is slight soluble in ethanol and methanol. Mobile phase and flow rate selection was based on peak parameters (symmetry, tailing), ease of preparation and run time. A sharp and symmetric peak was produced when DAR was assayed on a reversed-phase C_{18} column using a mobile phase composed of triethylamine 0.1%:acetonitrile (65:35, v/v; adjusted to 7.5 with ortho-phosphoric acid) (Figure 2a). System suitability (SST) test of the chromatographic system was

performed using six replicates injections of a standard solution and included: tailing factor (T), theoretical plates (N), RSD of the peak areas response and the retention time. The results of T and N were 1.46 and 6,956, respectively. The RSD (%) of the peak areas response was 0.1 % and the retention time was 4.6 min \pm 0.02 min (RSD 0.1%). The retention time observed allows a rapid determination of the drug, which is important for routine analysis. No interferences from the diluents, impurities and dosage form excipients were observed at the detection wavelength (250 nm). At the same concentration, the peak areas of DAR standard and samples solutions were identical (Figure 2b). The drug chromatographic peak was not attributable to more than one component (diode array peak purity test = 99999).

Method Validation

Specificity

Forced degradation studies were performed to provide an indication of specificity of the method. Additional photodiode array data were collected for purpose of the peak purity evaluation. After acid, oxidative and alkaline conditions, the DAR content decrease and additional peaks were observed (Figure 2 c, 2d and 2e, respectively). It was observed that recovery of DAR was approximately 50% after 4h of reflux at 80 °C in acid, or in alkali medium at room temperature or under oxidizing condition. As observed by Giannelinni et al [15], basic hydrolytic pathway is the main degradation reaction, and rhein is the main hydrolysis product. However, in their study, no degradation products were detected under oxidizing conditions. In the proposed method, the products obtained by acid, alkaline and oxidative conditions were resolved from the DAR peak, indicating the specificity of the method. The photodiode-array data were collected with the purpose of peak pure evaluation.

These analyses showed that no impurities or degradation products were coeluting with the DAR peak. These results suggest that the method had specificity, and could be indicative of stability. However, in the present study, the products have not yet been identified.

Linearity

Linearity of the peak area responses *versus* concentration was studied from 6.0 – 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A linear response was observed over the examined concentration range, with correlation coefficient of 0.9998. The slope and intercept of the calibration plot (\pm standard deviation, $n = 3$) were $118,093 \pm 1894$ and $73,987 \pm 4,758$, respectively. The validity of the assay was verified by analysis of variance. This revealed the regression analysis was linear ($F_{\text{calculated}} = 13,789.4 > F_{\text{critical}} = 4.6$; $P=5\%$) and there was no deviation from linearity ($F_{\text{calculated}} = 0.4 < F_{\text{critical}} = 2.96$; $P = 5\%$). The LOD and LOQ were obtained from the slope and the standard deviation of the intercept from three calibration curves by a linear regression line as defined by ICH. The LOD and LOQ were found to be 0.15 and 0.44 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These values were also used in an experimental assay confirming the calculation.

Precision and Accuracy

Precision data on the intra- ($n=6$) and inter-day ($n=3$) variations are summarized in Table 1. Both inter- and intra-day RSD (%) were less than 2%, indicating a good precision. The amounts of DAR found on the three different days were equivalent ($F_{\text{calculated}} = 0.617 < F_{\text{critical}} = 3.88$; $P=5\%$). The mean recovery of DAR from pharmaceutical dosage form after spiking with 9.0; 17.0 and 25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of additional standard was 99.6% with RSD (%) of 0.5 (Table 1), confirming the accuracy of the

method. No significant difference between the proposed and previously method [14] was found (Table 1).

Robustness

In order to evaluate the robustness of the propose method, deliberate modifications in mobile phase, flow rate and wavelength were made. The mean values obtained for every factor studied is indicated in Table 2, showing that selected factors had no significant effect on assay data or on chromatographic performance.

Conclusion

A rapid and reliable isocratic RP-HPLC method with UV detection has been developed and validated for the determination of DAR in capsules. Simple sample preparation, analyses carried out at room temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) using a no endcapped column and a rapid run time are some advantages of the proposed method. The method demonstrated to be specific, linear, precise, accurate, and robust. Since there is no official method for this drug in any of the pharmacopoeia yet, the proposed method can be used to determine DAR in capsules as well as to evaluate the chemical stability of DAR.

Acknowledgment

This work was supported by CAPES-Brazil and FAPERGS.

References

1. Flores RH, Hochberg MC (2003) In: Definition and classification of osteoarthritis. Osteoarthritis. Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS (eds). Oxford.
2. Pelletier JP, DiBattista JA, Roughley P, McCollum R, Martel-Pelletier J (1993) Osteoarthritis 19; 3: 545-567
3. Pelletier JP, McCollum R, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (1995) J Rheumatol 43: 109-114
4. The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biological (2001) Merck & Co Inc (eds). Whitehouse Station, New Jersey
5. Tamura T, Ohmori K (2001) Jpn J Pharmacol 85: 101–104
6. Spencer C M, Wild M I (1997) Drugs 53;1: 98-108
7. Tamura T, Shirai T, Kosaka N, Ohmori K, Takafumi N (2002) Eur J Pharmacol 448; 1: 81-87
8. Mendes A F, Caramona M M, Carvalho A P, Lopes M C (2002) Pharmacol Toxicol 91; 1: 22-28
9. Pomarelli P, Berti M, Gathi M T, Mosconi P (1980) Farmaco 35: 836-842

10. Franchi-Micheli S, Lavachi L, Friedman C A, Zilletti L (1983) J Pharm Pharmacol 35: 262-264
11. Pujol J P, Felisaz N, Boumediene K, Ghayor C, Herrouin JF, Bogdanowicz P, Galera P (2000) Biorheology 37: 177-184 1: 82
12. Pelletier JP, Mineau F, Fernandes JC, Duval N, Martel-Pelletier J (1998) J Rheumatol 25: 2417-2424
13. Lequesne M (1994) Rev Rhum 61; 2: 69-73
14. Borgmann SHM; Parcianello, L; Arend, M; Cardoso, SG. Pharmazie, *in press*.
15. Giannellini V, Salvatore F, Bartolucci G, Coran S A, Bambagiotti-Alberti M (2005) J Pharm Biomed Anal 39: 776-780
16. ICH (2005) Harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)
17. USP (2006) The United States Pharmacopoeia, United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD

Table 1 – Results from determination of the intra-day and inter-day precision of the proposed and reported UV method and the accuracy

	<i>Mean ± sem^a</i>	<i>RSD (%)</i>
Intra-day precision		
Day 1	98.3 ± 0.4	0.9
Day 2	97.5 ± 0.8	1.3
Day 3	97.7 ± 0.5	1.2
Inter-day precision		
Mean ± sem	97.9 ± 0.3	1.1
UV method	99.2 ± 0.4	1.0
Comparison between UV and HPLC methods	$F_{\text{calculated}} = 3.0$ ($F_{\text{critical}} = 4.96$; $P=5\%$)	
Accuracy		
Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
9.0	8.9	99.2
17.0	16.9	99.5
25.0	25.1	100.2

^asem is the standard error of the mean

Table 2 – Results from study of method robustness

Conditions		%. (Mean \pm sem) ^a	RSD (%)
Recommended Conditions^b		97.9 \pm 0.48	0.71
Mobile phase	60:40	98.6 \pm 0.12	0.18
	70:30	97.9 \pm 0.13	0.18
pH	7.0	97.8 \pm 0.05	0.07
	8.0	97.8 \pm 0.11	0.15
λ (nm)	245	98.4 \pm 0.15	0.21
	255	97.5 \pm 0.63	0.92
Flow rate (mL min ⁻¹)	1.0	97.6 \pm 0.66	0.96
250 nm x 4.0 mm i.d. x 5 μ m particle size hypersil ODS column		98.9 \pm 0.45	0.64

^a sem is the standard error of the mean

*The recommended chromatographic conditions were: 250 mm x 4.6 mm i.d. x 5 μ m particle size Phenomenex Luna C₁₈ analytical column with triethylamine 0.1%:acetonitrile (65:35, v/v; adjusted to 7.5 with ortho-phosphoric acid) as mobile phase at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹, and UV detection at 250 nm

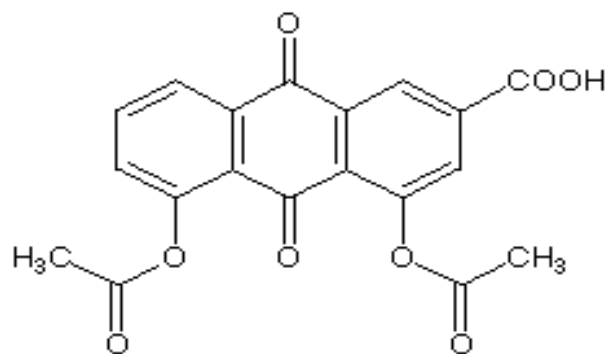


Figure 1 – Chemical structure of Diacerhein

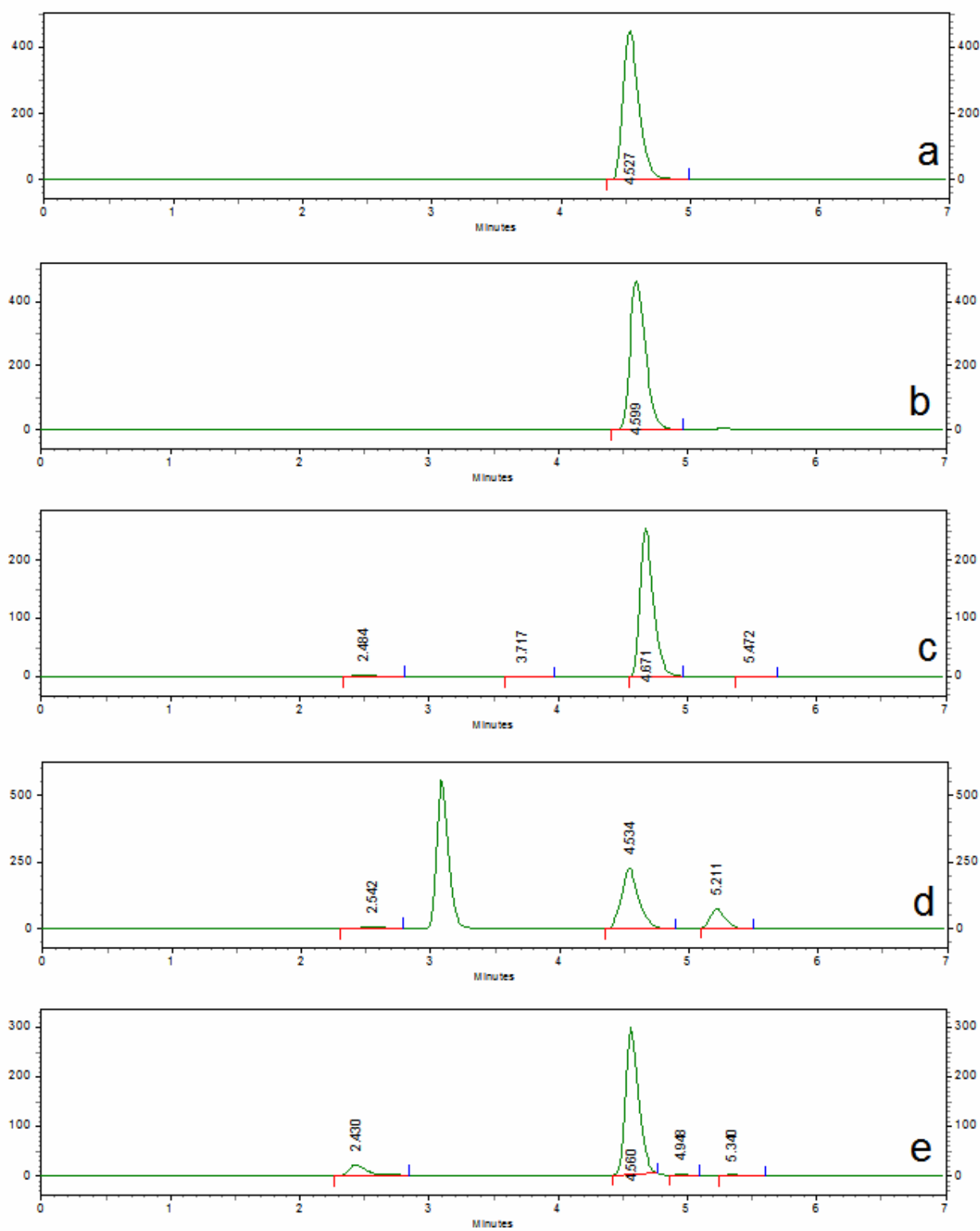


Figure 2 – Chromatograms obtained from diacerhein (32 $\mu\text{g mL}^{-1}$). **a** reference substance; **b** capsules; **c** after acid degradation; **d** after oxidative degradation; **e** after alkaline degradation

5.3 Artigo 3

Development and validation of a dissolution test for diacerhein in capsules

Borgmann SHM¹, Parcianello L¹, Arend M¹, Bajerski L¹, Cardoso SG^{1*}

*1Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS, Brazil*

*Corresponding author: Prof. Dr. Simone Gonçalves Cardoso, Departamento de Farmácia Industrial – Prédio 26, Sala 1105, Universidade Federal de Santa Maria, Campus, Santa Maria – RS – Brazil - CEP 97.105-900

FAX: 55 55 3220 8288

e-mail: simonegc@ccs.ufsm.br

Abstract: Purpose: The development and validation of dissolution procedure for diacerhein (DAR) in capsules is presented. **Method:** Different conditions, such as medium composition, surfactant concentration and rotation speed were applied, using the apparatus basket. The dissolution test was validated using a spectrophotometric method. Three different batches of diacerhein capsules available in the Brazilian market, containing 50 mg each, were evaluated. The best dissolution conditions tested were applied to evaluate the dissolution profiles. Six dosage units were assayed and dissolution efficiency concept was used to obtain results with statistical significance. **Results:** DAR dissolution was more than 80% of DAR in phosphate buffer with 0.75 % of sodium lauryl sulfate (SLS). There was no significant difference between 75 and 100 rpm rotation speed and dissolution efficiency (DE) in these rotations were 84.7 and 87.1 %, respectively. All batches evaluated presented equivalent DE results. No interference from the placebo or shell capsules was observed in the spectrophotometric method. The calibration curves were linear ($r > 0.999$) in the studied range of concentration ($0.27 - 6.66 \mu\text{g mL}^{-1}$). The RSD values for intra and inter-day precision studies were less than 5% and the accuracy were greater than 98%. **Conclusion:** The best conditions were achieved using 900 mL of medium containing sodium phosphate buffer pH 7.0 with 0.75 (w/v) of SLS, at a rotation speed of 100 rpm. The validation of spectrophotometric method yielded good results, including specificity, linearity, precision and accuracy.

INTRODUCTION

Diacerhein (DAR, Figure 1) an oral agent described as 4,5-Bis(acetyloxy)-9,10-dioxo-2-anthracenecarboxylic acid, is a low molecular weight heterocyclic compound (1). After absorption, DAR is metabolized to rhein, its active metabolite (2-3). DAR and rhein are anthraquinone compounds designated to treatment of osteoarthritis (OA) (4-5). DAR has been demonstrating efficacy on functional manifestations of OA and on the structural component, and has been classified as symptomatic slow-acting drug (6-7). The mechanism of action of DAR is different from those described for classic nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) or corticosteroids. DAR has no inhibitory effect on phospholipase A2, cyclooxygenase, or 5-lipoxygenase in vitro; however DAR is able to stimulate prostaglandin E2 synthesis in human chondrocyte cultures [8-9] and inhibits the effects of IL-1 on chondrocytes [10-11]. Drug absorption from a dosage form after oral administration depends on the release of the drug substance from the drug product, the dissolution and/or solubilization of the drug under physiological conditions, and the permeability across the gastrointestinal tract. Because of the critical nature of the first two of these steps, in vitro dissolution may be relevant to the prediction of in vivo performance (12-13). The dissolution test is a very important tool in drug development and quality control. At the present time there are no official monographs for DAR raw material and capsules and no dissolution test has been described in literature for this drug. Few methods have been reported for DAR determination in capsules and bulk, respectively by spectrophotometry (14) and HPLC methods (15). Parameters to set up the dissolution test should be researched and defined for drugs that do not possess official monographs (13). This study describes the development and validation of dissolution test for quality control of DAR in capsules. The best dissolution conditions were used to evaluate the dissolutions profile of three different DAR capsules, including manufactured and compounded capsules.

MATERIALS AND METHODS

Material and reagents

Diacerhein chemical reference substance (CRS) (assigned purity, 99.8%) was obtained from DEG (Brazil). Capsules and compounded capsules were purchased at the local market and were claimed to contain 50 mg DAR each. One batch of

manufactured capsules (A), and two batches of compounded capsules (B and C) were purchased from the market. All reagents and solvents used were analytical grade. Ultra-pure water was obtained from a Labconco Water Purification Unit (Missouri, USA). Sodium acetate and sodium phosphate buffer solutions were prepared according to USP (16).

Instrumentation and spectrophotometric conditions

All dissolution tests were performed in Nova Ética dissolution test system, model 299 multi-bath (n=6), in accordance with the United States Pharmacopoeia (16) general method. The drug release percent (DR%) was assayed by ultraviolet spectrophotometry, using a double-beam UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan) model UV – 1601 PC, with a fixed slit width (2 nm) and a 10 mm quartz cell, and dissolution medium as diluent. Absorbances measures were obtained at 258 nm, using dissolution medium as blank.

Dissolution test and dissolution profiles conditions

DAR solubility were determined in 0.1M HCl, sodium acetate buffer pH 5.5 and sodium phosphate buffer pH 7.0 using an amount of the drug equivalent a three times of the dose in the pharmaceutical formulation. The dissolution test was performed using basket (USP Apparatus 1) and 900 mL of dissolution medium pre-heated to 37 ± 0.5 °C. The different evaluated conditions are presented in Table 1. Sampling aliquots of 5.0 mL were withdraw at 0, 5, 10, 15, 30 and 60 minutes, and replaced with an equal volume of the fresh medium to maintain a constant total volume. After the end of each test time, samples aliquots were filtered through a quantitative paper filter, diluted to $5.55 \mu\text{g mL}^{-1}$ in dissolution medium and quantified at 258 nm. The assay of the three tested products was performed using the previously validated spectrophotometric method (14). The content results were used to calculate the percentage release on each time of dissolution profile. The dissolution profiles were obtained plotting the drug release percent versus time and were compared through the calculation of dissolution efficiency (DE). DE was calculated from the area under the curve at time t_i (measured using the trapezoidal rule) and expressed as a percentage of the area of the rectangle described by 100% dissolution in the same time.

Validation

The development dissolution test was validated for specificity, linearity, precision and accuracy, according to ICH guideline (17) and USP (16). Filter interference and DAR stability in dissolution medium were also evaluated (18).

Specificity

The specificity was evaluated by preparing samples of placebo, which consisted of all the excipients and shell capsule without the drug. The excipients were lactose and magnesium stearate. Their concentrations were determined based in Handbook of Pharmaceutical Excipients (19) and calculated for a medium weight of content. The samples of placebo were transferred to separate vessels (n=3) with 900 mL of the dissolution medium and stirred for 30 minutes at 100 rpm, using basket apparatus. Aliquots were analyzed by ultraviolet spectrophotometry at 258 nm.

Linearity

A DAR CRS stock solution containing $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ was prepared in dissolution medium. Aliquots of this solution were diluted with dissolution medium to obtain calibrations solutions at concentrations of 5, 70, 80, 90, 100, 110 and 120% of the theoretical work concentration ($5.55 \mu\text{g mL}^{-1}$). The calibrations curves were prepared on three different days. The absorbances were determined at 258 nm. Linearity was evaluated by linear least-square regression analysis and by ANOVA statistical analysis.

Precision

The capsules (n=6) of each product (A, B and C) were subjected to dissolution test conditions (900 mL of dissolution medium pre-heated at $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5$, basket apparatus rotate at 100 rpm, 30 minutes) in the same day (intra-day precision) and in two different days (inter-days precision), and analyzed. The relative standard deviation (RSD) was determined and the results were evaluated by ANOVA.

Accuracy

This parameter was determined by the recovery test of known amounts of DAR CRS (20, 100 and 120 % of theoretical work concentration) to placebo, which were

subjected to dissolution test conditions (900 mL of dissolution medium pre-heated at $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5$, basket apparatus rotate at 100 rpm, 30 minutes, n=3) and analyzed.

Stability of drug in dissolution medium and filter interference

The solutions stability in 900 ml of dissolution medium was analyzed at 37.0 ± 0.5 °C by 2 hours. The filtration procedure of DAR CRS and samples (capsules dissolved in dissolution medium, n=3) was evaluated using: a) quantitative filter (Schleicher & Schuell, Germany); b) 0.45 μm cellulose acetate membrane filter (Phenomenex), and c) quantitative filter filtration + cellulose acetate membrane filter simultaneously. The absorbances of filtered and unfiltered (centrifuged) solutions (at concentration $5.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ in dissolution medium) were evaluated at 258 nm.

RESULTS

The solubility evaluation showed that DAR was insoluble in acid mediums (0.1N HCl and acetate buffer pH 5.5) showing low solubility in sodium phosphate buffer pH 7.0 also. Then, different concentrations of SLS were added to sodium phosphate buffer pH 7.0 medium, to improve the solubility and the profiles achieved with product A, at 100 rpm rotation speed, are show in Figure 2. It was observed that more than 80% of drug was dissolved at 15 minutes in phosphate buffer pH 7.0 with 0.75% SLS. In the others conditions the % drug dissolved was < 65%. The influence of rotation speed was evaluated and the results are show in Figure 3. The analisis of variance shows no significant difference between results obtained at 75 or 100 rpm ($p < 0.05$). However, it was observed that drug release percent (Figure 3) and the dissolution efficiency (Table 1) were higher at 100 rpm. These results demonstrated that best conditions for the dissolution test of DAR in capsules were 900 mL of sodium phosphate buffer pH 7.0 with 0.75% SLS as dissolution medium and 100 rpm rotation speed. The comparison of dissolution profiles for the different products (Figure 4) in the selected conditions was performed using the dissolution efficiency, and the results are presented in Table 2. The analysis of variance of the DE values shows that the profiles were similar for ($F_{\text{calculated}} = 3.35 < F_{\text{critical}} = 3.68$, $p < 0.05$). The % drug delivery was higher than 90% in 30 minutes for all products. The method specificity was evaluated through the analysis of placebo by UV. The absorptions spectrums

are shown in Figure 5. No interference from the placebo (Figure 5C) or shell capsules (Figure 5B) were observed at maximum absorption peak of DAR (Figure 5A). To assess the linearity, three standard curves of DAR were constructed, plotting concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) versus absorption. Linear regression was performed and the obtained equation was $y = 0.1017x$ (standard error: ± 0.0010) + 0.0022 (standard error: ± 0.0008), with correlation coefficient greater than 0.999. The calibration data were validated by means of ANOVA that demonstrated significant linear regression ($F_{\text{calculated}} = 10,622.46 > F_{\text{critical}} = 4.6$; $P = 5\%$) and no significant deviation from linearity ($F_{\text{calculated}} = 0.304 < F_{\text{critical}} = 2.96$; $P = 5\%$). The intra-day ($n=6$) and inter-day ($n=2$) RSD (%) are given in Table 2. The mean recovery was found to be 97.4% (Table 3). The results of stability showed that DAR was stable (variation less than 2%) in sodium phosphate buffer with 0.75% SLS for at least 2 hours at 37.0 ± 0.5 °C and no evidence of drug degradation observed under these conditions. No absorption of the drug onto filters was observed too. The absorbances of the filtered portions are to approach the original concentration of standard and centrifuged sample solutions (Table 3).

DISCUSSION

Dissolution testing is an official test used by pharmacopoeias for evaluation drug release of solid and semisolid dosage forms, and is routinely used in Quality Control (QC) and Research & Development (R&D). The purpose of *in vitro* dissolution studies in QC is batch to batch consistency and detection of manufacturing deviation while in R&D the focus is to provide some predictive estimate of the drug release in respect to the *in vivo* performance of a drug product. For QC, an over-discriminatory test might be suitable to detect even small production deviations. However, for prediction of the *in vivo* performance of drug product a dissolution test should be sensitive and reliable predictor of bioavailability (20). The accomplishment of dissolution profiles is recommended as support in the development and optimization of drug formulation as well as in the establishment of *in vitro/in vivo* correlation. When dissolution test is not defined in the monograph of the dosage form, or if the monograph is not available, comparison of drug dissolution profiles is recommended in three different dissolution media, in the pH range of 1-7.5. Selection of dissolution medium may be based on the solubility data and dosage range of the drug product (18, 21). Hydrochloric acid,

acetate buffer, phosphate buffer and purified water are typical medium used to dissolution test (18). DAR was insoluble in acid mediums and showed poor solubility in phosphate buffer. For poor soluble drugs, a percentage of surfactant can be used to enhance drug solubility (18). Then, increase concentrations of SLS, ranging from 0 to 0.75%, were added to sodium phosphate buffer pH 7.0 (medium which DAR show some solubility). The DE acquired in phosphate buffer pH 7.0 with 0.75 SLS at 100 rpm was greater than other conditions tested yielded better dissolution condition. Stirring speed of 100 rpm was more efficient than stirring speed of 75 rpm in the cited conditions. According to USP (16), basket is normally used to dissolution test of capsules and this apparatus was used. Based in these results, the selected conditions for the dissolution test of DAR in capsules were 900 ml of sodium phosphate buffer with 0.75% SLS as dissolution medium and 100 rpm rotation speed. The products A, B and C showed similar dissolution profiles in the selected conditions. Typical acceptance criteria for the amount of drug dissolved are in the range of 70 – 80 % dissolved (16). In the present study, the % dissolved for all products was > 90% in 30 minutes, and the suggested acceptance criterion could be 85% in 30 minutes. UV/VIS spectrophotometry and high performance liquid chromatography are the most analytical methods used for quantifying drug release in dissolution tests (18, 23). The UV/VIS spectrophotometry had been the traditional analytical method for dissolution testing. Spectrophotometric method may be used if drug has a UV chromophore and no UV interferences due excipients and/or capsules shells used in the formulation are observed (24). In this study the spectrophotometric method was chosen because the analyses are simpler, the results can be obtained faster and fewer solvents are used (18). The absorption spectrum of DAR in dissolution medium shows an absorbance peak at 258 nm (Figure 5). At this wavelength, no interference was observed, showing the specificity of the method. The recommended range for the calibrations curves is from $\pm 20\%$ below the lowest expected concentration to $\pm 20\%$ above the highest expected concentration of dissolution test (16,18). Good linearity was observed over the concentration range evaluated (0.27 to 6.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) with correlation coefficient greater than 0.99 (18). The precision was expressed as RSD and all the data are within the acceptance criteria of < 5% (25). The measured recovery is typically 95 – 105% of the weighed amounts. The obtained accuracy results showed that the dissolution method was accurate. Typical acceptable range for stability may be between 98 and 102% when compared

to the initial analysis. The results of stability of the sample analyzed over a specified period showed that DAR was stable in dissolution medium (18). Filtration of the dissolution samples is usually to prevent undissolved drug particles from entering the analytical sample and further dissolving. The filtration removes insoluble excipients that may otherwise cause high background or turbidity (18). For the filter to be acceptable for use, the results of filtered portions are to approach (within 98-102%) the original concentration of the unfiltered standard solution and the centrifuged sample solution. However, due to low cost of quantitative filter when compared to 0.45 μm cellulose acetate membrane filter, the quantitative filter was chosen as filtration process.

CONCLUSION

The dissolution test developed and validated for DAR capsules was considered satisfactory. The conditions that allowed the dissolution determination were 900 mL of sodium phosphate buffer pH 7.0 with 0.75% SLS at 37.0 ± 0.5 °C, basket apparatus, 100 rpm stirring speed and filtration with quantitative filter. In these conditions, the DAR stability was guaranteed. The % drug delivery was higher than 90% in 30 minutes for all evaluated products. The analysis of variance of the DE values showed that the dissolution profiles among the products A, B and C were similar ($p < 0.05$). The spectrophotometric method was validated and showed to be specific, linear, precise and accurate.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by CAPES-Brazil and FAPERGS.

REFERENCES

1. The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Merck & CO., INC. Whitehouse Station, NJ, 2001.
2. Tamura T. and Ohmori K., Rhein, an Active Metabolite of Diacerein, Suppresses the Interleukin-1 α Induced Proteoglycan Degradation in Cultured Rabbit Articular Chondrocytes. *Jpn J Pharmacol*, 85: 101–104, 2001.
3. Spencer C. M. and Wilde M. C., Diacerein. *Drugs*, 53: 98-106, 1997.
4. Tamura T., Shirai T., Kosaka K., Ohmori K. and Takafumi T., Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. *Eur J Pharmacol*, 448: 81-87, 2002.
5. Mendes A. F., Caramona M. M., Carvalho A. P. and Lopes M. C., Diacerhein and Rhein prevent interleukin-1 β -induced nuclear factor activation inhibiting the degradation of inhibitor κ B- α . *Pharmacol Toxicol*, 91: 22-28, 2002.
6. M. Lequesne., Symptomatic slow acting drugs in osteoarthritis: a novel therapeutic concept? *Rev Rhum*, 61: 69-73, 1994.
7. Mahajan, A., Singh K., Tandon, V.R., Kumar S., Kumar H., Diacerein: a new symptomatic slow acting drug for osteoarthritis. *J K Science*, 8: 173-175 2006.
8. Pomarelli, P. et al. A non steroidal anti-inflammatory drug that stimulates prostaglandin release. *Farmaco*, 35: 836 – 842, 1980.
9. Franchi-Micheli, S. et al., The influence of rhein on the biosynthesis of prostaglandin-like substances *in-vitro*. *J Pharm Pharmacol*, 35: 262 – 264, 1983

10. Pujol J.P., Felisaz, N., Boumediene, K., Ghayon, C., Herrouin, J. F., Bogdanowics, P., Galera, P., Effects of diacereína on biosynthesis activities of chondrocytes in culture. *Biorh*, 37: 177 – 184, 2000.
11. Pelletier, J. P. et al., Diacerhein and Rhein reduce the interleukin 1 β stimulates inducible nitric oxid synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol*, 25: 2417 – 2424, 1998.
12. Emami, J., In vitro – In vivo Correlation: from theory to Applications. *J Pharm Pharm Sci*, 9: 169 – 189, 2006.
13. Food and Drug Administration: Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, US department of health and human services/Food and drug administration/Center for drug evaluation and research, Rockville MD, 1997
14. Borgmann S. H. M., Parcianello L., Arend M. and Cardoso S. G., Direct spectrophotometric determination of diacerhein in capsules. *Pharmazie*, *IN PRESS*.
15. Giannellini V., Salvatore F., Bartolucci G., Coran S. A. and Alberti M. B., A valited HPLC-stability-indicating method for the determination of diacerhein in bulk drug substance. *J Pharm Biomed Anal*, 39: 776-780, 2005.
16. The United States Pharmacopoeia 29th.ed. Rokville, United States Pharmacopoeial Convention, 2006.
17. ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on Validation of Analytical Procedure Q2 (R1): Text and Methodology, 2005.
18. Pharmacopeial Forum. Pharmacopeial Previews, 30, 2004.

19. Wade, A., Weller, P. J., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd ed., 1994.
20. Azarmi S., Roa W., Löbenberg R., Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *Int J Pharm*, 328: 12-21, 2007.
21. Brown C. K., Chokshi H. P., Nickerson B., Reed R. A., Rohrs B. R., Shah P. A., Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharm Technol*, 28: 56-65, 2004.
22. Noory C., Tran N., Ouderkirk L. and Shah V., Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. *Dissolution Technol* 7: 16-19, 2000
23. Wang, Q.; MA, D.; Higgins, J. P. Analytical Method for drug product dissolution testing. *Dissolution Technol*, 13: 6 – 13, 2006
24. Fortunato, D., Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. *Dissolution Technol*. 12: 12 – 14, 2005
25. Brasil, Resolução-RE-nº 899, de 29 de maio de 2003. Anvisa. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, 2003

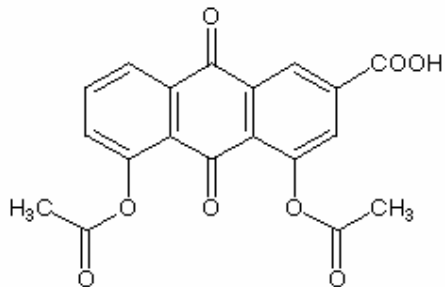


Figure 1:Chemical structure of diacerhein

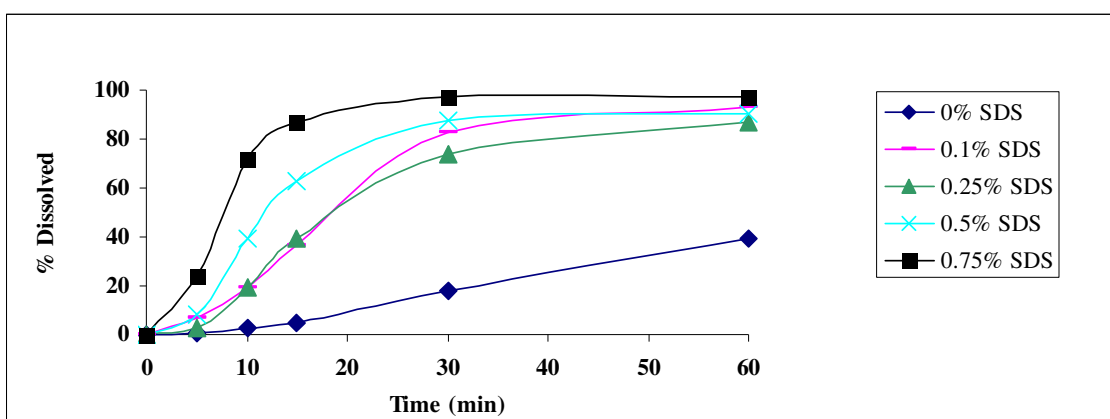


Figure 2: dissolution profiles of diacerhein capsules in sodium phosphate buffer pH 7.0 with different concentration of sodium lauryl sulfate (SLS) using basket at 100 rpm.

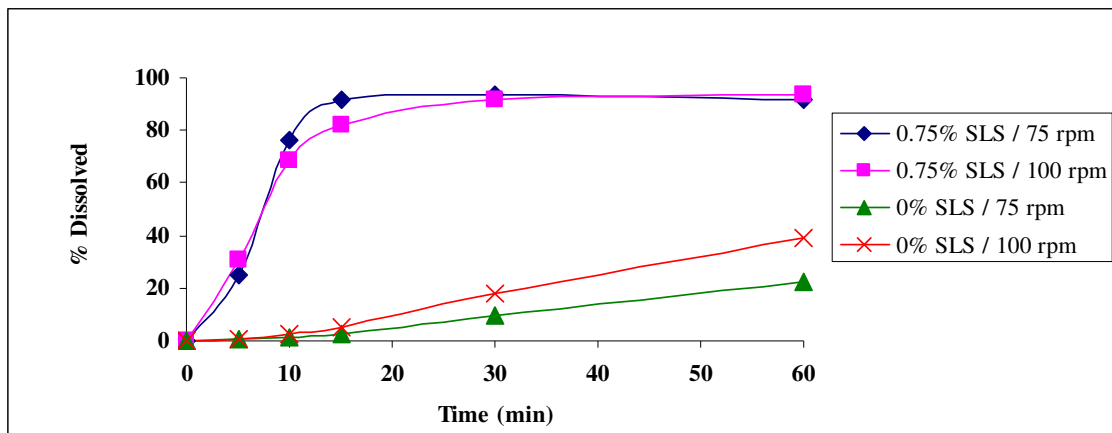


Figure 3: Dissolution profile of diacerhein capsules in sodium phosphate buffer pH7.0 with 0 and 0.75% of sodium lauryl sulfate (SLS) using basket at 75 and 100 rpm.

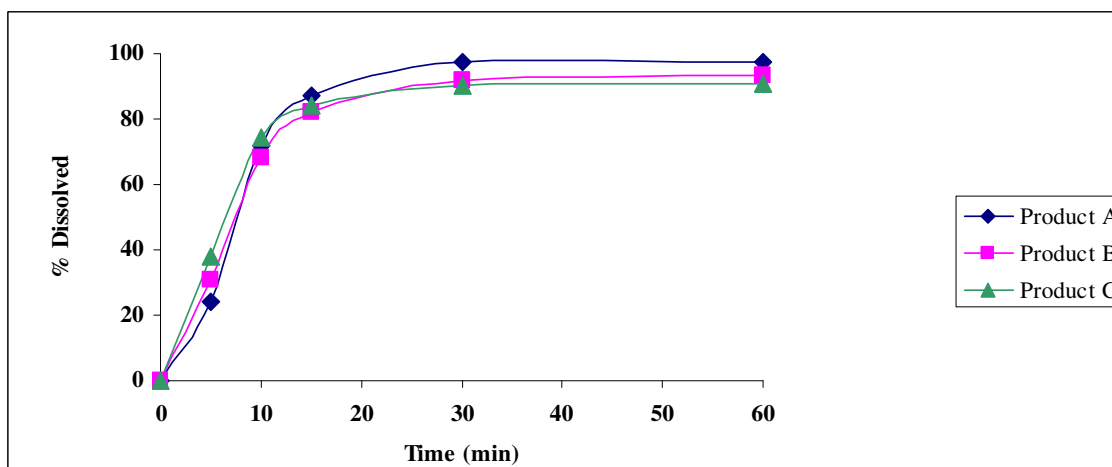


Figure 4: Dissolution profile of products A, B and C in sodium phosphate buffer pH7.0 with 0.75% of sodium lauryl sulfate using basket at 100 rpm.

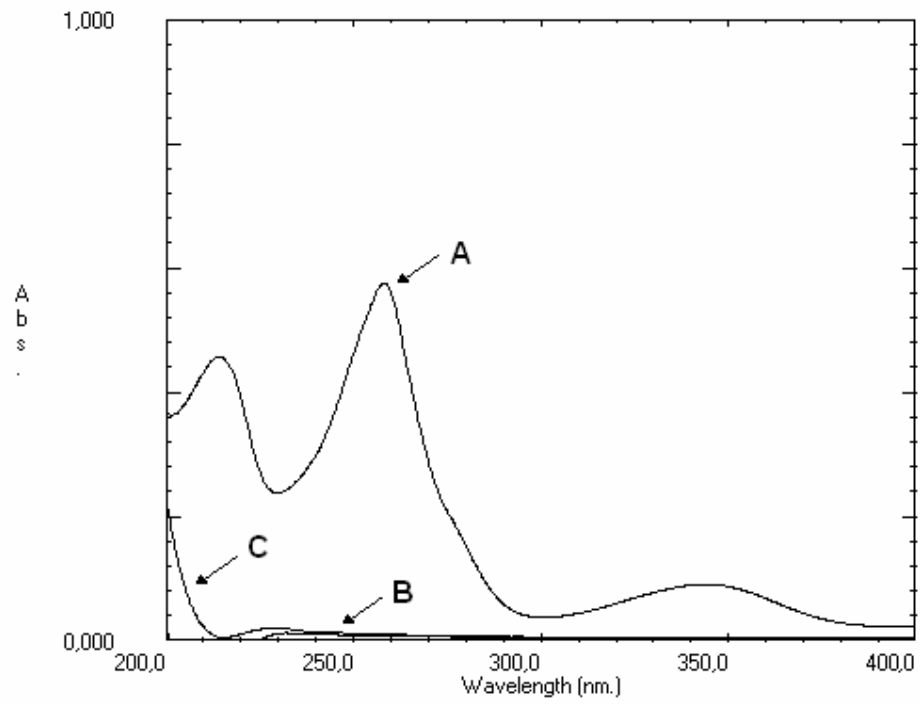


Figure 5: Absorption spectrum of Diacerhein: (A) CRS DAR, (B) shell capsules and (C) Placebo

Table 1: Tested conditions and dissolution efficiency (DE%)

Conditions	Description	DE%
I	Phosphate buffer pH 7.0 / 75 rpm	43.74
II	Phosphate buffer pH 7.0 / 100 rpm	44.99
III	Phosphate buffer pH 7.0 / 100 rpm / 0.1% SLS	67.10
IV	Phosphate buffer pH 7.0 / 100 rpm / 0.25% SLS	66.52
V	Phosphate buffer pH 7.0 / 100 rpm / 0.5% SLS	77.51
VI	Phosphate buffer pH 7.0 / 100 rpm / 0.75% SLS	87.13
VII	Phosphate buffer pH 7.0 / 75 rpm / 0.75% SLS	84.70

Table 2: Precision of the method and dissolution efficiency (DE%).

Product	1st*	2nd*	Inter-day	ANOVA (p=0.5)	DE%
	Mean \pm RSD	Mean \pm RSD	Mean \pm RSD		
A	94.14 \pm 4.13	97.53 \pm 2.29	95.27 \pm 3.92	1.81	86.12
B	92.97 \pm 3.89	90.33 \pm 1.93	91.65 \pm 3.31	2.59	85.33
C	91.46 \pm 3.98	90.26 \pm 2.12	91.11 \pm 3.21	1.02	88.13

*n=6

Table 3: Accuracy results for diacerhein (% recovery)

Amount of reference ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			%	
<i>Added</i>	<i>Recovered</i>	Recovery	Mean	RSD
1.11	1.09	98.28		
5.55	5.31	95.76	97.4	1.44
6.66	6.53	98.11		

Table 4: Filter interference

Type of filtration	Absorbance	
	CRS*	Capsules
Without filtration	0.530	0.527
Quantitative filter	0.536	0.535
Cellulose acetate membrane (0.45 μm)	0.532	0.540
Quantitative filter + Cellulose acetate membrane (0.45 μm)	0.535	0.527

*CRS = Chemical Reference Substance

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão Geral

O desenvolvimento e validação de métodos analíticos quantitativos para determinação de DAR em cápsulas constituíram-se nos principais objetivos do presente trabalho, tendo em vista a escassez de métodos descritos na literatura para quantificação deste fármaco e por não haver monografias oficiais para sua quantificação.

Houve a preocupação de se desenvolver e validar métodos simples, como a espectrofotometria, e também métodos mais sofisticados, como a cromatografia líquida de alta eficiência, permitindo que a determinação quantitativa do fármaco possa ser realizada independente do porte ou condições do laboratório.

Como mencionado anteriormente, existem vários parâmetros a serem avaliados para a escolha de um método analítico de quantificação. Assim como devem ser considerados os parâmetros como linearidade, especificidade, precisão e exatidão, também se devem avaliar a simplicidade de execução, tempo necessário para realizar as análises, a geração de resíduos produzidos pelas análises e os custos de materiais e equipamentos necessários para seu desenvolvimento.

Dentre os métodos propostos, a espectrofotometria é o método de maior simplicidade em termos de execução e custo, já que os solventes e equipamentos necessários possuem um custo relativamente baixo, quando comparado à CLAE. Porém, métodos espectrofotométricos possuem a desvantagem de não serem específicos, no caso de substâncias com estruturas químicas semelhantes.

Os métodos cromatográficos possuem a desvantagem de serem um pouco onerosos, já que requerem equipamentos e reagentes de maior custo, além de necessitarem de um tempo maior para a realização das análises e analistas devidamente treinados. No entanto, tais métodos permitem que seja realizada a avaliação de possíveis interferentes, como produtos de degradação.

6.2 Método Espectrofotométrico

A quantificação de fármacos tem sido realizada através de método espectrofotométrico por ser um método fácil, rápido e de custo relativamente baixo (CLURCZAK, 1998).

Pelo fato de não terem sido encontrados na literatura métodos espectrofotométricos para determinação de DAR, desenvolveu-se, então, método espectrofotométrico para determinação de DAR em cápsulas.

Inicialmente avaliou-se a solubilidade de DAR SQR em diferentes solventes, porém constatou-se que DAR SQR possui boa solubilidade apenas em solventes de pH básico, como NaOH 0,1 N.

A especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência dos excipientes das cápsulas na determinação quantitativa de DAR, utilizando NaOH 0,1 N como diluente. De acordo com os espectros obtidos para SQR e para amostra simulada de excipientes (ASE), constatou-se que o método foi específico, demonstrando não haver interferência dos excipientes nos máximos de absorção de 277 e 502 nm.

A intensidade de uma banda de absorção na espectrofotometria é usualmente expressa como absorvidade molar a uma absorção máxima ϵ ou $\log \epsilon$ máximo. A absorvidade molar aparente calculada para DAR em NaOH 0,1 N foi de 12570,16 e 9483,63 para 277 e 502 nm respectivamente.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as soluções de DAR SQR apresentaram correlação linear entre as absorbâncias e concentrações, nos intervalos utilizados. Foram plotados gráficos da concentração versus absorbância, os quais demonstraram haver linearidade adequada nas faixas de 6 a 24 $\mu\text{g/mL}$, para 277 nm, e 10 a 34 $\mu\text{g/mL}$ para 502 nm. Para o comprimento de 277 nm obteve-se a seguinte equação da reta: $y = 0,0341x + 0,0009$ com coeficiente de correlação de 0,9999. Já para o comprimento de onda de 502 nm a equação da reta foi $y = 0,0260 + 0,0079x$ com coeficiente de correlação de 0,9999. A análise de variância (ANOVA) realizada com as três curvas de linearidade obtidas em diferentes dias demonstra que a regressão linear é significativa e que não há desvio da linearidade ($P = 0,05$).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados baseados nas curvas de calibração produzidas nos diferentes dias. Os valores encontrados para os limites de detecção foram de 0,03 e 0,35 µg/mL, para a detecção nos comprimentos de onda de 277 e 502 nm, respectivamente. Os limites de quantificação encontrados foram de 0,09 e 1,06, para 277 e 502 nm, respectivamente.

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias). Os valores experimentais obtidos para a determinação de DAR em cápsulas, no mesmo dia e sob as mesmas condições, demonstraram que o método foi preciso, já que os coeficientes de variação ficaram todos abaixo de 2 %. Os resultados da precisão inter-dias foram analisados através de ANOVA, a qual demonstrou não haver diferença significativa entre os valores obtidos nos diferentes dias.

A exatidão do método proposto foi determinada através do teste de recuperação de DAR SQR em NaOH 0,1 N. As percentagens de recuperação médias obtidas foram de 99,4% e 100,4% para 277 e 502 nm, respectivamente. Os resultados encontrados estão dentro da faixa de percentagem de recuperação recomendada para exatidão de métodos analíticos (95 – 105%).

A robustez do método foi avaliada quanto aos seguintes parâmetros: força iônica do diluente e comprimento de onda. Na mudança da força iônica de 0,1 N para 0,01 e 1 N, o método demonstrou não haver diferença significativa com NaOH 1 N, entretanto quando mudou-se a força iônica para 0,01 N o presente método não apresentou-se robusto. Já na troca de comprimentos de onda de 277 ± 5 nm e 502 ± 5 nm o método demonstrou não ser robusto apenas para o comprimento de onda de 272 nm.

O método espectrofotométrico proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para o controle de qualidade de DAR em cápsulas.

6.3 Método Cromatográfico

Por ser uma técnica bastante versátil, a cromatografia líquida tem sido muito utilizada em laboratórios de análise para determinação qualitativa e quantitativa de

fármacos em matérias-primas, produtos acabados e amostras biológicas. A separação e quantificação de diferentes componentes em uma formulação podem ser realizadas através da adequada escolha de alguns parâmetros, como coluna analítica, composição e proporção das fases móveis, e método de detecção. Pelo fato de haver a necessidade, em cromatografia líquida, do uso de equipamentos e reagentes de maior custo, acaba ocorrendo uma certa limitação para o uso desta técnica por alguns laboratórios de controle de qualidade de medicamentos (SWARTZ & KRULL, 1998; SKOOG, HOOLLER & NIMAN, 2002).

Na literatura científica não foram encontrados métodos para análise de DAR em cápsulas, no entanto foram encontrados alguns métodos para análise de reína, que possui estrutura química muito semelhante. Dentre os métodos encontrados para reína destacam-se as seguintes análises: fluidos biológicos (COPPI & SPRINGOLO, 1998; KIM & LEE, 2003; LIU & ZHANG, 2004; ZHU *et al*, 2005), em extrato de ruibarbo (ITO, ZHANG & WEI, 2003; LIU & ZHANG, 2004; DJOZAN & ASSADI, 1995) e em preparações medicinais (QU *et al*, 2007). No decorrer deste estudo Giannelinni (2005) desenvolveu estudo cromatográfico de DAR em matéria-prima, porém o referido método apresentou-se pouco sensível e não havia a aplicação para formas farmacêuticas.

As condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método cromatográfico foram influenciadas pelas propriedades físico-químicas de DAR, tais como polaridade e solubilidade. DAR não é solúvel em água e solventes ácidos, é pouco solúvel em etanol e metanol e muito pouco solúvel em ácido acético.

Durante o desenvolvimento do método foram realizados testes utilizando diferentes fases-móveis, como por exemplo: metanol:água, acetonitrila:água, solução de ácido acético 0,1%:metanol, solução de ácido fosfórico 0,1%:acetonitrila e solução de trietilamina 0,1%:acetonitrila. O método proposto empregou coluna cromatográfica C₁₈ em virtude desta ser a mais utilizada em laboratórios de controle de qualidade, e devido às características estruturais de DAR. A fase móvel constituída por solução de trietilamina 0,1%:acetonitrila (65:35, v/v) com ajuste de pH para 7,5, mostrou-se a mais adequada, proporcionando tempo de retenção reprodutível de aproximadamente 4,5 minutos, boa eficiência (pratos teóricos > 6000), com picos de boa resolução, seletividade e simetria (< 2%).

Para avaliar a especificidade do método, DAR SQR foi submetida à degradação forçada em meio ácido, alcalino e oxidativo.

Tanto na degradação oxidativa, quanto nas hidrólises ácida e alcalina pode-se perceber que houve formação de picos adicionais, porém os mesmos encontram-se bem resolvidos do pico principal de DAR, que continuou com alto grau de pureza, todos acima de 99,8%.

Através da avaliação dos picos de DAR por detector de diodos, pode-se verificar que a SQR continuou com alto grau de pureza em todas as determinações, podendo-se, assim, sugerir que o método possui especificidade, podendo ser indicativo da estabilidade.

Na avaliação dos resultados obtidos através das curvas de linearidade, realizada através de ANOVA, pode-se observar que há regressão linear significativa e que não houve desvio da linearidade para as curvas produzidas em diferentes dias ($P < 0,05$). A faixa de concentração linear foi de 6 a 60 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta para o método proposto foi: $y = 122218x + 23063$, com coeficiente de correlação de 0,9996.

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). Os valores experimentais médios obtidos para determinação de DAR, no mesmo dia e nas mesmas condições foram de 97,7% com coeficiente de variação de 1,2%. Já os valores de precisão intermediária foram de 97,9 % com CV% de 1,1%. Foi realizada ANOVA para os valores de precisão dos três diferentes dias, a qual demonstrou não haver diferença significativa para os ensaios realizados. Os valores de coeficiente de variação inferiores a 2 % é que conferem a precisão do método.

O método demonstrou ser exato perante os valores obtidos com o teste de recuperação realizado. O valor médio de recuperação obtido foi de 99,6% com CV% de 0,5%. Este valor encontra-se entre a faixa de 98 – 102%, recomendada pelos guias de validação.

O método proposto foi avaliado, ainda, quanto a sua sensibilidade. Foram realizados os cálculos de Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ). Os valores obtidos foram: LOQ de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ e LOD de 0,2 $\mu\text{g/mL}$. Os baixos valores de LOQ e LOD indicam a boa sensibilidade do método.

A robustez do método foi testada através da realização de pequenas modificações nas condições cromatográficas propostas. Os valores médios obtidos para as determinações de DAR em cápsulas realizando as modificações nas condições cromatográficas foram analisados por ANOVA, a qual demonstrou não

haver diferença significativa entre as análises realizadas. Notou-se, apenas, que com a mudança da vazão da fase móvel para 1,0 mL/min e a mudança de coluna analítica, o tempo de retenção teve uma pequena diminuição, entretanto esta mudança não alterou a determinação de DAR.

O método proposto mostrou-se adequado para determinação de DAR em cápsulas apresentando boa sensibilidade, simplicidade e especificidade. A validação realizada também demonstrou que o método foi linear, preciso e exato, podendo dessa forma, ser empregado para o controle de qualidade de DAR.

6.4 Análise comparativa entre os diferentes métodos de quantificação

Quanto aos parâmetros de validação pode-se verificar que, tanto os métodos propostos, quanto os diferentes produtos testados (A, B e C), apresentaram resultados satisfatórios.

Em relação à linearidade, todos os métodos apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,999, conforme preconizado pela literatura (USP 29, 2006 e ICH, 2005), indicando haver uma relação linear entre a concentração e as variáveis estudadas.

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

Tabela 2 – Resultados da validação dos métodos utilizados para determinação de DAR em cápsulas.

Amostra	Linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão* (CV%)	Exatidão** (%)	Teor (%)
Espectrofotometria – 277 nm				
Produto A		1,1	99,4	99,2
Produto B	6,0 - 24,0	1,0	-	97,8
Produto C		1,0	-	99,3
Espectrofotometria – 502 nm				
Produto A		0,6	100,4	97,9
Produto B	10,0 - 34,0	1,1	-	99,5
Produto C		0,6	-	99,7
CLAE				
Produto A		1,1	99,6	97,9
Produto B	6,0 - 60,0	0,1	-	97,1
Produto C		0,6	-	97,5

* (n=6)

** Recuperação de padrão

Sabe-se que a exatidão de um método analítico é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são baseados no uso de materiais de referência certificado; na comparação do método proposto com o método de referência; no uso de ensaios de adição de padrão (recuperação) e em estudos colaborativos. A exatidão do produto A foi avaliada através da porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas de substância adicionadas às amostras. Os percentuais médios de recuperação obtidos para todos os métodos com o produto A encontram-se entre 99,4 e 100,4% (Tabela 2), indicando que os mesmos possuem exatidão adequada. Para os produtos B e C, a exatidão foi realizada através da comparação dos resultados obtidos entre os métodos propostos. Essa comparação, realizada através de ANOVA, demonstrou

não haver diferença significativa entre os mesmos (Tabela 3), indicando exatidão equivalente ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Análise comparativa entre os diferentes métodos de quantificação para DAR em cápsulas

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Produto A				
Entre métodos	2	0,533	0,267	0,44 (3,68)
Resíduo	15	9,079	0,605	
Total	17	9,612		
Produto B				
Entre métodos	2	2,451	1,226	0,86 (4,26)
Resíduo	9	12,889	1,432	
Total	11	15,340		
Produto C				
Entre métodos	2	6,697	3,348	3,11 (4,26)
Resíduo	9	9,699	1,078	
Total	11	16,396		

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

Em virtude dos resultados obtidos através desta comparação, pode-se dizer que os mesmos são adequados para a análise de rotina em controle de qualidade de DAR em cápsulas, pois são métodos rápidos, de fácil execução e cumprem com os requisitos de validação.

Os referidos métodos podem ser utilizados para determinação quantitativa, teste de uniformidade de conteúdo e técnicas de identificação de DAR na forma farmacêutica proposta.

6.5 Dissolução

O teste de dissolução é exigido para as formas farmacêuticas sólidas orais, nos quais é necessário que ocorra a absorção dos princípios ativos, para que, desse modo, os mesmos exerçam seus efeitos terapêuticos (MARQUES & BROWN, 2002).

Em controle de qualidade prefere-se um teste de dissolução discriminativo, pois o mesmo indicará possíveis mudanças na qualidade do produto antes de a performance *in vivo* ser afetada, permitindo distinguir importantes diferenças de componentes, composição ou método de produção dos diferentes produtos analisados. (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004; QURESH, 2006).

Podem-se encontrar diferenças na razão de dissolução de produtos que usem o princípio ativo com diferentes tamanhos de partícula, diferentes proporções de excipientes, processos de granulação e até mesmo diferentes forças de compressão (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

Os resultados dos testes de dissolução podem ser utilizados, nas áreas de produção e controle de qualidade, contribuindo para:

- auxiliar no desenvolvimento e avaliação de novas formulações;
- possibilitar possíveis correlações *in vivo* – *in vitro*;
- assegurar a uniformidade durante o processo de produção de um lote;
- detectar desvios de fabricação;
- assegurar a reprodutibilidade lote a lote;
- avaliar a qualidade da formulação em função do tempo e condições de armazenamento durante o período de validade do produto;
- avaliar mudanças após o registro do produto;
- fazer parte da documentação para registro de novos produtos junto às autoridades regulatórias (EMAMI, 2006).

A diacereína é comercializada no Brasil na forma de cápsulas e, alternativamente, na forma de cápsulas manipuladas em farmácias magistrais. Como já mencionado, até o presente momento não foram encontrados monografias ou trabalhos que apresentem dados de dissolução para diacereína em cápsulas.

Com base no exposto foi desenvolvido e validado método para avaliar essa importante característica das formas farmacêuticas sólidas de uso oral, que é a

análise da percentagem de liberação do fármaco contribuindo, assim, para indicar a qualidade das formulações existentes.

O desenvolvimento do método levou em consideração a solubilidade da diacereína, a qual apresentou baixa solubilidade em soluções aquosas ácidas.

Diversas condições foram testadas para definir aquela com melhor poder discriminativo na liberação de diacereína das formas farmacêuticas em estudo. Diferentes rotações e concentrações de lauril sulfato de sódio no meio de dissolução foram igualmente testados. Foi utilizado somente o aparato cesta, por ser esse mais indicado para avaliação de cápsulas e também pelo fato de as cápsulas ficarem flutuando na superfície do meio (USP 29, 2006).

Nos testes preliminares realizados a condição de 900 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0, 0,75% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução, com velocidade de rotação de 100 rpm, foi a que melhor demonstrou o objetivo que se buscava, ou seja, verificar a liberação de diacereína através do tempo, com precisão.

Após a definição das condições de dissolução avaliou-se a influência do filtro, a estabilidade das soluções no meio de dissolução e realizou-se validação do método de determinação da percentagem dissolvida.

Foram avaliados dois tipos diferentes de filtros: filtro quantitativo e membrana de acetato de celulose de 0,45 μm , a fim de verificar uma possível interferência na liberação de material para as soluções ou alterações significativas na concentração do fármaco. A possibilidade de centrifugar as soluções também foi avaliada. Considerando que não houve alteração significativa na concentração do fármaco quando se utilizou o filtro quantitativo, ou a membrana, ou ambos, e devido ao maior custo de aquisição das membranas, optou-se por trabalhar com o filtro quantitativo durante o desenvolvimento e validação da dissolução.

Os valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade de soluções da SQR a amostras simuladas das cápsulas ficaram dentro da faixa de 98 – 102%, para o período de 2 horas, indicando que o fármaco foi estável no meio de dissolução dentro do período de análise.

Avaliou-se, também, a possível interferência dos excipientes, através de amostra simulada de excipientes (ASE) e do invólucro gelatinoso das cápsulas (cápsulas vazias) nas análises realizadas. Os resultados demonstram que não

houve interferência no máximo de absorção de DAR SQR conforme ilustrado na Figura 5.

O método de quantificação não deve sofrer influência dos excipientes presentes na formulação. A CLAE e os métodos espectrofotométricos têm sido utilizados em estudos de dissolução. Devido à sua simplicidade, rapidez e baixo custo foi escolhido o método por espectrofotometria no ultravioleta, tendo em vista que o fármaco possui cromóforos e por não ter sido observada interferência de excipientes (FORTUNATO, 2005; WANG, MA & HIGGINS, 2006).

O objetivo da validação é demonstrar que o método é adequado para o fim pretendido (ICH, 1996, BRASIL, 2003b). Os equipamentos devem ser calibrados e os analistas devem ser qualificados para esse fim. A validação de métodos analíticos utilizados para determinação de características de desempenho, como é o caso dos testes de dissolução, deve incluir, no mínimo, a avaliação da especificidade, linearidade, precisão e exatidão (USP 29, 2005; MARQUES e BROWN, 2003; ICH, 1996, BRASIL, 2003b).

Na avaliação dos resultados obtidos através das curvas de calibração, realizada através de ANOVA, pôde-se observar que a regressão linear foi significativa e que não houve desvio da linearidade para as curvas preparadas em diferentes dias ($P < 0,05$). A faixa de concentração linear foi de 0,27 a 6,66 $\mu\text{g/mL}$, o que corresponde a uma faixa de 5 – 120% da concentração teórica do fármaco na dissolução, que era 5,55 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta para o método proposto foi: $y = 0,1017x + 0,0022$, com coeficiente de correlação de 0,9999.(USP 29, 2006; BRASIL, 2003b).

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias), através da avaliação da dissolução de 6 unidades de cápsulas em cada dia. Os valores obtidos para as cápsulas e as cápsulas manipuladas estão apresentados na Tabela 2. Os coeficientes de variação obtidos foram todos inferiores a 5%, indicando boa precisão do método (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004). A análise de variância indicou não haver diferença significativa entre as análises realizadas nos diferentes dias nos diferentes produtos avaliados.

A exatidão do método de dissolução foi determinada através do teste de recuperação de DAR SQR adicionada às amostras simuladas de excipientes (ASE) das cápsulas, diluídas no meio de dissolução. A percentagem de recuperação média

obtida foi de 97,38%. Este resultado confere a exatidão do método, já que valores na faixa de 95 – 105% são considerados aceitáveis (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

As especificações de dissoluções devem se baseadas nas correlações *in vivo* – *in vitro* (IV IV). Quando são inexistentes, os limites de tolerância podem ser derivados dos dados dos estudos de dissolução *in vitro* (biolote) ou pela demonstração de bioequivalência entre lotes com limites superior ou inferior da faixa de dissolução (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004). Não foram encontradas correlações IV IV descritas para diacereína.

Muitas monografias oficiais estabelecem que não menos que 75% do fármaco deve estar dissolvido em 45 minutos (MARCOLONGO, 2003).

Segundo a Farmacopéia Britânica (2003) este é o critério adotado para quase todas as monografias. Entretanto, o FDA recomenda que para fármacos de liberação imediata a especificação de um único ponto, com 85% de princípio ativo dissolvido em 60 minutos ou menos, é considerada suficiente para os testes de controle de qualidade lote a lote e, nesses casos, os critérios de aceitação dos fármacos incluindo o tempo de teste, podem ser estabelecidos com base na avaliação do perfil de dissolução. Os critérios de aceitação para a porcentagem liberada do fármaco, expressa como porcentagem da quantidade declarada, (a ou T, respectivamente) para as Farmacopéias Americana e Brasileira estão, normalmente, na faixa de 75 a 80% (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; USP 29, 2006).

Baseando-se nos fatos expostos, sugere-se como especificação pra DAR em cápsulas, 85% de fármaco dissolvido em 30 minutos, utilizando o aparato cesta a 100 rpm e tampão fosfato pH 7,0 com 0,75% de LSS.

7 CONCLUSÕES

- ✓ As análises espectroscópicas (RMN¹H, ¹³C e IV) e espectrofotométricas (UV e Vis), permitiram a caracterização da substância química utilizada como referência no presente estudo;
 - ✓ A cromatografia líquida pode ser utilizada como método de identificação de DAR em cápsulas e cápsulas manipuladas;
 - ✓ O método desenvolvido através da espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e visível, em 277 e 502 nm respectivamente, utilizando NaOH 0,1 N como diluente, mostrou-se sensível, linear, preciso, exato e específico para a determinação quantitativa de DAR em cápsulas e cápsulas manipuladas;
 - ✓ O método desenvolvido através de cromatografia líquida, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para a determinação quantitativa de DAR em cápsulas e cápsulas manipuladas;
 - ✓ A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa de DAR demonstrou não haver diferença significativa entre eles, sendo caracterizada a equivalência entre os mesmos ($P < 0,5$);
 - ✓ O uso de 900 mL de tampão fosfato pH 7,0 com 0,75 % de LSS a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, aparato cesta, com velocidade de 100 rpm, demonstraram resultados satisfatórios para a análise da dissolução de cápsulas contendo DAR;
 - ✓ Sugere-se que a especificação: 85% de dissolução em 30 minutos seja suficiente para avaliar a % dissolvida de DAR em cápsulas e cápsulas manipuladas;
 - ✓ O método espectrofotométrico mostrou-se adequado para avaliar a % dissolvida de DAR não apresentando interferentes;
-

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. **Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company, 1989.

ANSARI, M.; KAZEMIPOUR, M; TALEBNIA, J. The Development and Validation of Dissolution Method for Clomipramine Solid Dosage Form. **Dissolution Technologies**, v. 11 (3) p. 16 - 24, 2004.

AOAC - ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 15 ed. Arlington. v.1, p.27, 1990

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R.. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 12 – 21, 2007

BERDAH, L. et al. Effects du metabolite actif de la diacerheine sur la production d'IL1 β par les monocytes humains en culture. **Revue du Rhumatisme**, v. 15 nov, 60 (10), p. 678, 1993.

BOITIN, M. R., LOYAU, G., PUJOL J-P. Effect of Diacerhein (ART50) on matrix synthesis and collagenase secretion by cultured rabbit joint chondrocytes. **Revue du Rhumatisme** v. 60 (6 bis), p. 68s - 76s, 1993.

BRANDT, K. D. et al. Effects of diacerhein in an accelerated canine model of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage** v. 5, p. 438 – 449, 1997.

BRASIL. **Resolução 675**. Concede Registro de Medicamento Similar, Medicamento Homeopático Novo, Nova Associação no País, Altera Registro por Modificação de Excipiente, Renova Registro de Medicamento Similar, Retifica Publicação de Registro, Cancela Registro da Apresentação do Medicamento a Pedido, Cancela Registro da Apresentação do Medicamento, de produtos farmacêuticos, 2002.

BRASIL. **Resolução RDC 210**. Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, 2003a.

BRASIL. **Resolução 899**. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, 2003b.

- BRITISH PHARMACOPOEIA (BP). **Her Majesty's Stationary Office**, London, 2003.
- BORGMANN, S. H. M.; PARCIANELLO, L.; AREND, M.; CARDOSO, S. G. Direct spectrophotometric determination of diacerhein in capsules, **Pharmazie**, *in press*
- BROOKS, P. M.; BACHMEIER, C. J. M. Osteoarthritis: epidemiological aspects, assessment and treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v 36 n.6, p. 379 – 381, 1996.
- BROWN, C. K, et al. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical technology**, v. 28(12): p. 56 – 65, 2004
- CHOWDARY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharmaceutical**, v. 30, p. 51 – 54, 1987.
- CLURCZAK, E. W. Validação de métodos em espectroscopia para análises farmacêuticas. **Pharmaceutical Technology**, v. junho, p. 22 – 28, 1998.
- COPPI, G.; SPRINGOLO, V. Simple Method for the determination for rhein in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 428, p. 173 – 177, 1988.
- COPPI, G., ZILLETI, L. **Symposium on Diacerhein**. Toscana Medicina, Pisa, p 105, 1985.
- CRUZ, T. F. et al. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de l'expression de la collagénase par la Diacérhéine. **La Revue du Praticien (Paris)** v. 46 (60), p. S15 - S19, 1996.
- DJOZAN, D. J.; ASSADI, Y. Determination of anthraquinones in Rhubarb roots, dock flowers and senna leaves by normal-phase high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 42, n.6, p. 861 – 865, 1995.
- DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: From Noyes and Withney to the Biopharmaceutic Classification System. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, p. 1 – 11, 2006.
- DOUGADOS, M.; GROUP FOR THE RESPECT OF ETHICS AND EXCELLENCE IN SCIENCES (GREES) Osteoarthritis section. Recommendations for the registration of

drugs used in the treatment of osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.55, p.552 – 557, 1996.

DOUGADOS, M. et al. ECHODIAH Investigators Study Group. Evaluation of the structure-modifying effects of Diacerein in hip osteoarthritis. ECHODIAH, a three-year, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44 (11), p. 2539 – 2547, 2001.

DRESSMAN, J. B. et al. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 11 – 22, 1998.

EMAMI, J. In vitro – In vivo Correlation: from theory to Applications, **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9 (2), p. 169 – 189, 2006.

ERMER, J. Validation in Pharmaceutical Analysis. Part I: An Integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

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

FDA - Food and Drug Administration: Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, US department of health and human services/Food and drug administration/Center for drug evaluation and research, Rockville MD, 1997

FELISAZ, N. et al. Stimulating effect of Diacerein on TGF-b1 and b2 expression in articular chondrocytes cultured with and without IL-1. **Osteoarthritis and Cartilage** v. 7, p. 255-267, 1999.

FERNANDEZ, R. N. et al. Perspectivas Terapêuticas para a Osteoartrose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 37 n.2, p. 97 – 102, 1997.

FERRAZ, H. G., CONSIGLIERI, V. O., STORPIRTIS, S. Avaliação da cinética de dissolução de ampicilina em comprimidos comercializados no Brasil. **Revista Farmácia e Bioquímica**, v. 34 n. 2, p. 93 – 99, jul./dez. Universidade São Paulo, 1998.

FLORES, R. H., HOCHBERG, M. C. (2003) In: **Definition and classification of osteoarthritis**. Osteoarthritis. Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS (eds). Oxford.

FORTUNATO, D. Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. **Dissolution Technologies**. 12 (3), p. 12 – 14, 2005.

FRANCHI-MICHELI, S. et al., The influence of rhein on the biosynthesis of prostaglandin-like substances *in-vitro*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 35, p. 262 – 264, 1983.

GHOSH, P. et al. Evaluation of the effects of Diacerein in an ovine model of osteoarthritis. **La Revue du Practicien**, v. 48, p.S24 - S30, 1998.

GIL, E. S. et al. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**, Campo Grande: Editora UNIDERP, p. 438, 2005.

GIANNELLINI, V. et al. A validated HPLC-stability-indicating method for the determination of diacerein in bulk drug substance. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 776 – 780, 2005.

GOLDMAN, B. et al. Cecil – **Tratado de Medicina Interna**, v. 2, p. 1728 – 1731, Guanabara Koogan, 2001.

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

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Text on Validation of Analytical Procedures**, 1994.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Guideline on Validation of Analytical Procedure: Methodology**, 1996.

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

INDEX, THE MERCK. **The Merck Index**, Thirteenth Edition, New Jersey, USA, 2001.

ITO, Y., ZHANG, T.; WEI, Y. Preparative separation of rhein from Chinese traditional herb by repeated high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1017, p. 125 – 130, 2003.

JIANG, T., LV, Z., WANG, Y. Separation and determination of anthraquinones in *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. **Journal of separation science**, v. 28, n.16, p. 2225 – 2229, 2005.

KIM, C; LEE, J. Pharmacokinetic analysis of rhein in *Rheum undulatum* L. **Journal of Ethno Pharmacology**, v. 84, p. 5-9, 2003.

KOYAMA, J. et al. Simultaneous determination of anthraquinones, their 8- β -D-glucosides, and sennosides of Rhei Rhizoma by capillary electrophoresis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 5, p. 573 – 575, 2005.

LEQUESNE, M. Symptomatic slow acting drugs in osteoarthritis: a novel therapeutic concept? **Revue du Rhumatisme (Engl Ed)**, v. 61, p. 69 – 73, 1994.

LIU, M.; ZHANG, H. Separation procedures for the pharmacologically active components of Rhubarb. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 175 – 181, 2004.

LIU, E., XUE, B. Ultra sensitive assay of rhein in medicine based on its enhanced luminol-K₃Fe(CN)₆ chemiluminescence reaction using flow injection technique. **Microchimica Acta**, v. 153, p. 51 – 56, 2006.

MAHAJAN, A. et al. Diacerein: A new symptomatic slow acting drug for osteoarthritis. **JK Science**, v. 8 (3), p. 173 – 175, 2006.

MANADA, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375 – 399, 2002.

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, São Paulo, 2003.

MARQUES, R. C.; BROWN W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analítica**, v. agosto, n.1, p. 48 – 51, 2002.

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

MENDES, A. F. et al. Diacerhein and Rhein prevent interleukin-1 β -induced nuclear factor activation inhibiting the degradation of inhibitor κ B- α . **Pharmacology and Toxicology**, v. 91 (1), p. 22 – 28, 2002.

MIAN, M. et al. Rhein: an anthraquinone that modulates superoxide anion production from human neutrophils. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39 (Oct), p. 845 – 47, 1987.

NICOLAS, P. et al. Clinical Pharmacokinetics of Diacerein. **Clinical and Pharmacokinetics**, v. 35, (5), p. 347 – 359, 1998.

NOORY, C. et al. Steps for development of dissolution test for sparing water-soluble drug products. **Dissolution Technologies** v. 7(1), p. 6 – 19, 2000.

PELLETIER, J. P. et al. Cytokines and inflammation in cartilage degradation, **Osteoarthritis**, v. 19 (3), p. 545 – 567, 1993.

PELLETIER, J. P. et al. Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an Il-1 mediated process. **Journal of Rheumatology**, v. 43, p. 109 – 114, 1995.

PELLETIER, J. P. et al. Diacerhein and Rhein reduce the interleukin 1 β stimulates inducible nitric oxid synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes, **Journal of Rheumatology**, v. 25, p. 2417 – 2424, 1998.

PETRILLO, M. et al. Endoscopic evaluation of diacetylrhein-induced gastric mucosal lesions. **Current Therapeutics Research**, v 49.(jan), p.10 – 15, 1991.

PHARMACOPOEIAL FORUM. **Pharmacopoeial Previews**, 30: (1), 2004.

POMARELLI, P. et al. A non steroidal anti-inflammatory drug that stimulates prostaglandin release. **Il Farmaco**, v. 35 (oct), p. 836 – 842, 1980.

PUJOL, J. P. Collagenolytic enzymes and interleukin-1: their role in inflammation and cartilage degradation. The antagonist effects of diacerhein on IL-1 actions on

cartilage matrix components. **Labortorie de Biochimie du Tissu Conjonctif, CHU Côte de Nacre**, Caen, France 1991.

QU, H. *et al.* Simultaneous determination of eight active components in chinese medicine 'YIQING' capsule using high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 66 – 72, 2007.

QURESHI, S. A. developing discriminatory drug dissolution tests and profiles: Some thoughts for consideration on the concept and its interpretation, **Dissolution Technologies**, v. 13 (4), p. 18 – 23, 2006.

QURESHI, S. A; MCGILVEKAY, I.J. Typical variability in drug dissolution testing: study with USP and FDA calibrator tablets and marketed drug (glibenclamide) product. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.7, p. 249 – 258, 1998.

RAIMONDI, L. *et al.* Rhein and derivatives. In vitro studies on their capacity to inhibit certain proteases. **Pharmacological Research Communications**, v. 14, (2,) p. 103 – 112, 1982.

RICHETTE, P.; BARDIN, T. Structure-modifying agents for osteoarthritis: an update. **Joint Bone Spine**, v. 71, p. 18 – 23, 2004.

SCHÖNGEN, R. N. *et al.* Effect of diacetylrhein on the phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes and its influence o the biosynthesis of hyaluronate in synovial cells. **Arzneim-Forsch/Drug Res**, v. 38,(1), p. 744 – 748, 1988.

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

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução Ignez Caracelli *et al.* 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SMITH, G. N., *et al.* Diacerhein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism** v. 42 (3), p. 545 – 554, 1999.

SPENCER, C. M.; WILDE, M. I. Diacerein. **Drugs**, v. 53 (jan - 1), p. 98 – 108, 1997.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, (3), p. 12 – 20, 1998.

TAMURA, T.; OHMORI, K. Rhein, an Active Metabolite of Diacerhein, Suppresses the Interleukin-1 α Induced Proteoglycan Degradation in Cultured Rabbit Articular Chondrocytes, **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, p. 101 – 104, 2001.

TAMURA, T. et al. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption, **European Journal of Pharmacology**, v. 448 (1), p. 81 – 87, 2002

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

VALDEQUÍMICA PRODUTOS QUÍMICOS, Certificado de Análises, 2004.

VON MÜHLEN, C. A. Osteoartrose. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57, n. 3, 2000.

WADE, A.; WELLER, P. J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 2nd ed., 1994.

WANG, Q.; MA, D.; HIGGINS, J. P. Analytical Method for drug product dissolution testing, **Dissolution Technologies**, v. 13 (3), p. 6 – 13, 2006.

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

ZHU, W. et al. Pharmacokinetic of Rhein in Healthy male volunteers following oral and retention enema administration of Rhubarb Extract: A single dose study. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 33, n. 6, p. 839 – 850, 2005

9 ANEXOS



UFSM
Universidade Federal de Santa Maria

Bem vindo **Simone Gonçalves Cardoso** (simonegc@mail.ufsm.br), você não tem nova(s) mensagem(ns).

Data: 19/12/2006 05:15:49
De: Die Pharmazie <pharmazie@govi.de>
Para: simonegc@ccs.ufsm.br
Cc:
Assunto: Manuscript PHARMAZIE P 6263



Responder



Responder para todos



Repassar



Adicionar ao Livro de Endereços



Apagar Mensagem



Retornar ao webmail

Mensagem:

Dear Colleague,

editors of PHARMAZIE would like to inform you that your manuscript

P 6263

Silvia Helena Miollo Borgmann, Lutiane Parcianello, Marcela Arend, Simone Gonçalves Cardoso*

Direct spectrophotometric determination of diacerhein in capsules

has been accepted for publication.

Thank you for publishing in PHARMAZIE.

Yours sincerely

Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Pflögel
Editor-in-chief Die PHARMAZIE



Responder



Responder para todos



Repassar



Adicionar ao Livro de Endereços



Apagar Mensagem



Retornar ao webmail



UFSM
Universidade Federal de Santa Maria

Bem vindo **Simone Gonçalves Cardoso** (simonegc@smail.ufsm.br), você não tem nova(s) mensagem(ns).

Data: 19/12/2006 05:15:49
De: Die Pharmazie <pharmazie@govi.de>
Para: simonegc@ccs.ufsm.br
Cc:
Assunto: Manuscript PHARMAZIE P 6263



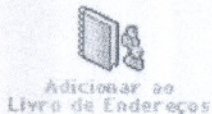
Responder



Responder para todos



Repassar



Adicionar ao Livro de Endereços



Apagar Mensagem



Retornar ao webmail

Mensagem:

Dear Colleague,

editors of PHARMAZIE would like to inform you that your manuscript

P 6263

Silvia Helena Miollo Borgmann, Lutiane Parcianello, Marcela Arend, Simone Gonçalves Cardoso*

Direct spectrophotometric determination of diacerhein in capsules

has been accepted for publication.

Thank you for publishing in PHARMAZIE.

Yours sincerely

Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Pfliegel
 Editor-in-chief Die PHARMAZIE



Responder



Responder para todos



Repassar



Adicionar ao Livro de Endereços



Apagar Mensagem



Retornar ao webmail

Universidade Federal de Santa Maria
 Centro de Processamento de Dados
 Página desenvolvida pela Equipe Design/WWW - 2001