

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA SARTURI HESS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE-DAD PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAPTOPRIL, HIDROCLOROTIAZIDA E
SEUS COMPOSTOS RELACIONADOS E AVALIAÇÃO DA EQUIVALÊNCIA
FARMACÊUTICA DE MEDICAMENTOS ANTI-HIPERTENSIVOS**

**CURITIBA
2011**

BIANCA SARTURI HESS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE-DAD PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAPTOPRIL, HIDROCLOROTIAZIDA E
SEUS COMPOSTOS RELACIONADOS E AVALIAÇÃO DA EQUIVALÊNCIA
FARMACÊUTICA DE MEDICAMENTOS ANTI-HIPERTENSIVOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Co-orientador: Dr. Marco André Cardoso

CURITIBA
2011

Hess, Bianca Sarturi

Desenvolvimento e validação de método por CLAE-DAD para determinação simultânea de captopril, hidroclorotiazida e seus compostos relacionados e avaliação da equivalência farmacêutica de medicamentos anti-hipertensivos / Bianca Sarturi Hess – Curitiba: UFPR, 2011.

169 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Roberto Pontarolo

Orientadora: Marco André Cardoso

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

Referência bibliográfica: f. 140-151

1. Captopril. 2. Hidroclorotiazida. 3. Desenvolvimento analítico.
4. CLAE-DAD. I. Pontarolo, Roberto. II. Cardoso, Marco André.
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

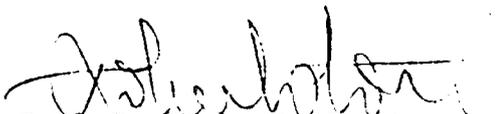
CDD 615.32

TERMO DE APROVAÇÃO

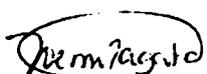
BIANCA SARTURI HESS

Título: Desenvolvimento e validação de método por CLAE-DAD para determinação simultânea de captopril, hidroclorotiazida e seus compostos relacionados e avaliação da equivalência farmacêutica de medicamentos anti-hipertensivos

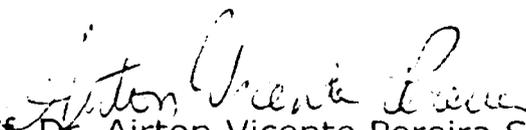
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador



Profª. Drª. Noemi Nagata
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Airton Vicente Pereira Saúde
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Curitiba, 29 de março de 2011.

A minha família,
Origem da minha vida, identidade e valores, meu porto seguro, fonte de alegria e
incentivadora dos meus sonhos e lutas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná pelas oportunidades de desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo empenho em fornecer condições estruturais e oportunidades de crescimento intelectual.

Ao CNPq, que possibilitou financeiramente a realização desse mestrado.

Ao professor Roberto Pontarolo, que abriu novos horizontes na minha vida quando me convidou para estagiar no Centro de Estudos em Biofarmácia ainda durante a graduação. Pela sua dedicação em buscar recursos que possibilitassem a realização desse trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e pela sua participação no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

A todos os amigos e professores do CEB e do laboratório de controle de qualidade, em especial a Mário Sérgio Piantavini, Consuelo Reis Pereira, Inajara Rotta, Caroline Paola Uber, Letícia Bonâncio Cerqueira, Luana Lenzi, Sirley Sayomi Hayashi, Flávia Lada Degaut Pontes e Cleverson Antônio Ferreira Martins, pela amizade e convivência diária, pela participação direta no trabalho, apoio ou simplesmente por me fazerem rir durante esses dois anos.

Ao meu amigo e parceiro de trabalho João Cleverson Gasparetto, a quem muito admiro pessoalmente e profissionalmente e que nunca poupou tempo nem esforços pra me ajudar, pelos conhecimentos, carinho, discussões de resultados, dedicação, paciência e por todo dia de manhã falar “Pessoal, motivação!” com um ânimo contagiante.

Ao meu grande amigo e co-orientador Marco André Cardoso, pela prestatividade, conhecimentos, parceria, por sempre me instigar a ver e pensar as coisas por outro lado, por me fazer rir, elevar minha auto-estima quando preciso e me apoiar nos momentos mais difíceis.

Ao amigo Carlos Francisco Pedroso, pelas boas idéias nos momentos críticos, incentivo, ensinamentos e prestatividade.

A todos os estagiários do CEB, em especial a Luana Campos Baby, Guilherme da Rosa e Michele Ferreira de Almeida pela amizade, trabalho em equipe, questionamentos e oportunidade de aprender enquanto ensinava.

Aos amigos, especialmente àqueles do Colégio Estadual, CCA e UFPR pelo apoio, carinho, compreensão e momentos de descontração.

Ao amigo Luciano Donizete da Silva pelas palavras de motivação, por ouvir meus problemas e me apoiar nas horas decisivas.

Às amigas Georgia, Marcela e Adélia pelas conversas, risadas, por sempre estarem por perto e me apoiarem.

Aos meus pais, Vera e Gilberto, pelo amor, apoio, compreensão e palavras de ânimo, por não medirem esforços pra me ajudar, por tudo que me ensinaram e ensinam.

Aos meus irmãos, Bruno e Vinicius, por me emprestarem cadeira e laptop, respectivamente, para eu escrever a dissertação, pelo companheirismo e amizade sempre.

Ao Marcos Silvestre Rosvailer, pelo amor, compreensão, por estar sempre presente, me incentivar profissionalmente e pessoalmente, manter meus pés no chão e me fazer muito feliz.

A Deus, por iluminar meus passos e colocar esses anjos na minha vida.

RESUMO

Neste trabalho os fármacos anti-hipertensivos captopril e hidroclorotiazida foram alvo de estudo por duas abordagens: (a) analítica, com o objetivo de desenvolver e validar método por CLAE-DAD para sua determinação e de seus compostos relacionados simultaneamente em comprimidos e (b) do ponto de vista do controle de qualidade com o objetivo de avaliar a equivalência farmacêutica e perfil de dissolução dos medicamentos disponíveis comercialmente que os contenham separadamente ou associados. Foi desenvolvido e validado um método rápido e econômico utilizando CLAE-DAD para quantificação de captopril (CAP), hidroclorotiazida (HCTZ) e seus principais compostos relacionados: dissulfeto de captopril (CAD), clorotiazida (CTZ) e benzotiadiazina (BTDZ). O método foi desenvolvido e validado através de um sistema cromatográfico composto por uma coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-Phenyl 5 μ m, 4,6 x150 mm mantida a 40°C, utilizando como fase móvel (A) ácido fosfórico 0,067% (pH 2,5) e (B) acetonitrila em modo gradiente como segue: $t_{0-3,0}$ min: B=15%; $t_{3,1-6,5}$ min: B=35%; $t_{6,6-8,0}$ min: B=15%. O fluxo de eluição da fase móvel foi de 1,2 mL/min e o volume de injeção de 20 μ L sendo os analitos monitorados a 220 nm. O método se mostrou linear na faixa de concentração de 0,5 a 400 μ g/mL para CAP, 0,313 a 14,4 μ g/mL para CAD, 0,05 a 100,0 μ g/mL para HCTZ, 0,078 a 1,2 μ g/mL para CTZ e 0,02 a 2,4 μ g/mL para BTDZ. O ensaio de exatidão resultou em recuperações no intervalo de 98,82 – 101,31% e no ensaio de precisão intra e inter-dia DPR <5% foi obtido. A robustez do método foi verificada frente a modificações na composição da fase móvel, fluxo, temperatura e pH, sendo este crítico para a determinação de CAD. A avaliação da equivalência farmacêutica não constatou a equivalência de duas amostras de comprimidos de CAP 25 mg dentre as seis marcas de genéricos e cinco de similares avaliadas. Para comprimidos de HCTZ 25 mg essa situação foi constatada para um medicamento similar entre os dois similares e dois genéricos testados. Todas as formas farmacêuticas associadas apresentaram equivalência farmacêutica com o medicamento de referência, Lopril-D[®]. Os perfis de dissolução de comprimidos de CAP, HCTZ e sua associação foram comparados através da análise da variância (ANOVA), eficiência de dissolução (ED%), fator de semelhança f_2 e cinética de dissolução (zero ordem, primeira ordem e Higuchi). Os resultados dos perfis caracterizaram três genéricos de CAP, entre os sete testados, como não semelhantes ao referência e entre os seis similares o mesmo aconteceu para apenas uma das marcas. Entre os dois genéricos e quatro similares de HCTZ apenas um genérico exibiu perfil satisfatório. Na forma farmacêutica associada, dos dois genéricos testados apenas um teve perfil semelhante ao Lopril-D[®]. Como conclusão tem-se que o novo método pode ser utilizado para a determinação simultânea dos cinco compostos citados na forma farmacêutica comprimido, sendo proposto como uma alternativa para o controle de qualidade destes produtos na indústria farmacêutica e laboratórios analíticos. Também concluímos que há uma necessidade real de maior fiscalização em relação a qualidade dos medicamentos durante seu período de comercialização.

Palavras-chaves: Captopril, hidroclorotiazida, desenvolvimento analítico, validação analítica, CLAE-DAD, equivalência farmacêutica, perfil de dissolução.

ABSTRACT

In this study, the antihypertensive drugs captopril and hydrochlorothiazide were the subject of study by two approaches: (a) analytical, aiming to develop and validate HPLC-DAD method for their determination and of their related compounds simultaneously in tablets and (b) from the standpoint of quality control in order to evaluate the pharmaceutical equivalence and dissolution profile of commercially available drugs containing them separately or combined. A quick and economical method using HPLC-DAD was developed and validated for quantification of captopril (CAP), hydrochlorothiazide (HCTZ) and its main related compounds: captopril disulfide (CAD), chlorothiazide (CTZ) and benzothiadiazine (BTDZ). The method was developed and validated through a chromatographic system composed of a Agilent Zorbax Eclipse XDB-Phenyl column 5 μ m 4.6 x150 mm maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of 0.067% phosphoric acid (pH 2.5) (A) and acetonitrile (B) in gradient elution mode eluted at a flow rate of 1.2 mL/min as follows: $t_{0-3.0}$ min: B = 15%, $t_{3.1-6.5}$ min: B = 35%, $t_{6.6-8.0}$ min: B = 15%. The detection wavelength was set at 220 nm and the injection volume of the sample was 20 μ L. The method was linear in the concentration range of 0.5 to 400 μ g/mL for CAP, 0.313 to 14.4 μ g/mL for CAD, 0.05 to 100 μ g/mL for HCTZ, 0.078 to 1.2 μ g/mL for CTZ and 0.02 to 2.4 μ g/mL for BTDZ. The accuracy test resulted in recoveries range of 98.82 to 101.31% and for intra and inter-day precision RSD <5% was obtained. The robustness study evaluated changes in the mobile phase composition, flow, temperature and pH, the last one is a critical factor for the CAD determination. Regarding the assessment of equivalence pharmaceutical trials did not demonstrate equivalence of two samples of captopril 25 mg tablets among the six brands of Generics and five of Similar evaluated. For hydrochlorothiazide 25 mg tablets two Similar and two Generics were tested and one Similar medicine was not equivalent to the reference. All brands of the association were pharmaceutical equivalents of their reference medicine, Lopril-D. The dissolution profiles of Generics, Similar and reference of captopril, hydrochlorothiazide and their association were compared by analysis of variance (ANOVA), dissolution efficiency (DE%), similarity factor f_2 and dissolution kinetics (zero order, first order and Higuchi). The results of the profiles featured three Generics and one Similar of captopril as no similar to the reference. Among Generics and Similar medicines of hydrochlorothiazide only one Generic medicine exhibited satisfactory dissolution profile. For the medicines of the association just one of the two Generics tested was similar to Lopril-D. In conclusion we have that the new method might be used to determine the five compounds simultaneously in tablets, and presents itself as an alternative for quality control of these products in the pharmaceutical industry and that there is a real need for increased monitoring of the quality of drugs during their marketing period.

Key words: Captopril, hydrochlorothiazide, analytical development, validation, HPLC, pharmaceutical equivalence, dissolution profile.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO CAPTOPRIL OU 1-[(2S)-3-MERCAPTO-2-METILPROPIONIL]-L-PROLINA.	28
FIGURA 2 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO DISSULFETO DE CAPTOPRIL	29
FIGURA 3 – HIDROCLOROTIAZIDA E SEUS COMPOSTOS RELACIONADOS.....	31
FIGURA 4 – DEMONSTRAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	65
FIGURA 5 – EXEMPLO DE PICO CROMATOGRÁFICO ASSIMÉTRICO.....	66
FIGURA 6 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV DE CAPTOPRIL, HIDROCLOROTIAZIDA, DISSULFETO DE CAPTOPRIL, CLOROTIAZIDA E BENZOTIADIAZINA A 10 µG/ML EM ÁCIDO FOSFÓRICO 0,067% : ACN (85:15, V/V).	81
FIGURA 7 – COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS COM UMA COLUNA C18 (A), C8 (B) E FENIL (C) DE UMA SOLUÇÃO DE TRABALHO CONTENDO MISTURA DOS PADRÕES UTILIZANDO MODO GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO 0,067% : ACN.	83
FIGURA 8 – CROMATOGRAMA OBTIDO COM COLUNA FENIL DE UMA SOLUÇÃO DE TRABALHO CONTENDO MISTURA DOS PADRÕES UTILIZANDO MODO ISOCRÁTICO DE ELUIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO 0,067% : ACN (85:15, V/V).	86
FIGURA 9 - CROMATOGRAMA OBTIDO COM COLUNA FENIL DE UMA SOLUÇÃO DE TRABALHO CONTENDO MISTURA DOS PADRÕES UTILIZANDO MODO GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO 0,067% : ACN.....	87
FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DE CAP (100 µG/ML), HCTZ (50 µG/ML), CAD (9,0 µG/ML), CTZ (0,75 µG/ML) E BTZ (1,5 µG/ML) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.	89
FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DE CAP (100 µG/ML), HCTZ (50 µG/ML), CAD (9,0 µG/ML), CTZ (0,75 µG/ML) E BTZ (1,5 µG/ML) EM DIFERENTES VAZÕES DE FLUXO.	90
FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DE UMA SOLUÇÃO TRABALHO DA MISTURA DOS PADRÕES UTILIZADA PARA AVALIAR A ADEQUABILIDADE DO MÉTODO..	92
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DE CLAE-DAD DAS MATRIZES ISENTA E CONTENDO OS ANALITOS DE INTERESSE.	94
FIGURA 14 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CAPTOPRIL E OS RESULTADOS DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR.	97
FIGURA 15 - EM DESTAQUE, OS LIMITES DE PREDIÇÃO E CONFIANÇA TRAÇADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO CAPTOPRIL.	98
FIGURA 16 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA HIDROCLOROTIAZIDA E OS RESULTADOS DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR.	98
FIGURA 17 - EM DESTAQUE, OS LIMITES DE PREDIÇÃO E CONFIANÇA TRAÇADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA HIDROCLOROTIAZIDA.....	99

FIGURA 18 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DISSULFETO DE CAPTOPRIL E OS RESULTADOS DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR.....	99
FIGURA 19 - EM DESTAQUE, OS LIMITES DE PREDIÇÃO E CONFIANÇA TRAÇADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DISSULFETO DE CAPTOPRIL.	100
FIGURA 20 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOROTIAZIDA E OS RESULTADOS DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR.	100
FIGURA 21 - EM DESTAQUE, OS LIMITES DE PREDIÇÃO E CONFIANÇA TRAÇADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOROTIAZIDA.	101
FIGURA 22 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BENZOTIADIAZINA E OS RESULTADOS DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR.	101
FIGURA 23 - EM DESTAQUE, OS LIMITES DE PREDIÇÃO E CONFIANÇA TRAÇADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BENZOTIADIAZINA.	102
FIGURA 24 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS E REFERÊNCIA DE CAPTOPRIL 25 MG.....	125
FIGURA 25 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE SIMILARES E REFERÊNCIA DE CAPTOPRIL 25 MG.....	126
FIGURA 26 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS, SIMILARES E REFERÊNCIA DE COMPRIMIDOS DE HIDROCLOROTIAZIDA 25 MG.	131
FIGURA 27 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE CAPTOPRIL EM COMPRIMIDOS DA ASSOCIAÇÃO.....	135
FIGURA 28 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE HIDROCLOROTIAZIDA EM COMPRIMIDOS DA ASSOCIAÇÃO.....	135

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL DE ACORDO COM A MEDIDA CASUAL NO CONSULTÓRIO (> 18 ANOS).....	19
TABELA 2 - DECISÃO TERAPÊUTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SEGUNDO O RISCO CARDIOVASCULAR.	20
TABELA 3: ASSOCIAÇÕES FIXAS DE ANTI-HIPERTENSIVOS DISPONÍVEIS NO BRASIL.	25
TABELA 4 – INTERVALO SUGERIDO PARA O ESTUDO DE LINEARIDADE SEGUNDO O MÉTODO ANALITICO	45
TABELA 5 – PARÂMETROS ANALISADOS PARA VERIFICAR A ADEQUABILIDADE DO MÉTODO	92
TABELA 6 – LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS.	95
TABELA 7 – ÁREAS DOS PICOS DOS COMPOSTOS UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.	96
TABELA 8 – ÁREAS DOS PICOS OBTIDAS PARA OS ANALITOS PARA DETERMINAÇÃO DA REPETIBILIDADE.	105
TABELA 9 - ÁREAS DOS PICOS OBTIDAS PARA OS ANALITOS PARA DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.	106
TABELA 10 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO.....	107
TABELA 11 – FATORES DE CAUDA DOS ANALITOS DETERMINADOS SOB VARIAÇÃO DE FLUXO, TEMPERATURA, FASE MOVEL E PH.....	109
TABELA 12 – RESOLUÇÕES DOS ANALITOS DETERMINADAS SOB VARIAÇÃO DE FLUXO, TEMPERATURA, FASE MOVEL E PH.....	110
TABELA 13 – RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO DE CAPTOPRIL E DISSULFETO DE CAPTOPRIL DETERMINADOS SOB VARIAÇÃO DE FLUXO, TEMPERATURA, FASE MOVEL E PH.....	111
TABELA 14 – RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO PARA HIDROCLOROTIAZIDA E CLOROTIAZIDA DETERMINADOS SOB VARIAÇÃO DE FLUXO, TEMPERATURA, FASE MOVEL E PH.....	112
TABELA 15 – RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO PARA BENZOTIADIAZINA DETERMINADOS SOB VARIAÇÃO DE FLUXO, TEMPERATURA, FASE MOVEL E PH.	113
TABELA 16 – TEORES DOS COMPOSTOS DE INTERESSE EM AMOSTRAS COMERCIAIS (50 MG CAP / 25 MG HCTZ) DETERMINADOS ATRAVÉS DO MÉTODO DESENVOLVIDO E VALIDADO POR CLAE-DAD.	115
TABELA 17 – RESULTADOS DE DUREZA, FRIABILIDADE, DESINTEGRAÇÃO, DISSOLUÇÃO, IMPUREZAS E DOSEAMENTO DAS ESPECIALIDADES AVALIADAS.	118

TABELA 18 – RESULTADOS DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA DE COMPRIMIDOS DE CAPTOPRIL 25 MG.....	121
TABELA 19 - RESULTADOS DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA DE COMPRIMIDOS DE HIDROCLOROTIAZIDA 25 MG.....	122
TABELA 20 – RESULTADOS DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA DE COMPRIMIDOS DE CAPTOPRIL (50 MG) E HIDROCLOROTIAZIDA (25 MG) EM ASSOCIAÇÃO.....	123
TABELA 21 – PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS E REFERÊNCIA DE CAPTOPRIL 25 MG EM FUNÇÃO DO TEMPO.	125
TABELA 22 – PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE SIMILARES E REFERÊNCIA DE CAPTOPRIL 25 MG EM FUNÇÃO DO TEMPO.	126
TABELA 23 – ANÁLISE COMPARATIVA DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS, SIMILARES E REFERÊNCIA DE COMPRIMIDOS DE CAPTOPRIL 25 MG.	127
TABELA 24 – PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS, SIMILARESE REFERÊNCIA DE HIDROCLOROTIAZIDA 25 MG EM FUNÇÃO DO TEMPO.	131
TABELA 25 - ANÁLISE COMPARATIVA DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE HIDROCLOROTIAZIDA 25 MG.....	132
TABELA 26 - PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS E REFERÊNCIA DA FORMA FARMACÊUTICA ASSOCIADA.	134
TABELA 27 – ANÁLISE COMPARATIVA DOS PERFIS DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM COMPRIMIDOS DA ASSOCIAÇÃO.....	136

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ESTRATIFICAÇÃO DO RISCO INDIVIDUAL DO PACIENTE HIPERTENSO: RISCO CARDIOVASCULAR ADICIONAL DE ACORDO COM OS NÍVEIS DA PRESSÃO ARTERIAL E A PRESENÇA DE FATORES DE RISCO, LESÕES DE ÓRGÃOS-ALVO E DOENÇA CARDIOVASCULAR.....	20
QUADRO 2: CLASSIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS POR SEU LOCAL OU MECANISMO DE AÇÃO.	22
QUADRO 3 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA QUANTIFICAR CAP E CAD POR CLAE-UV.....	38
QUADRO 4 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA QUANTIFICAR HCTZ E SEUS COMPOSTOS RELACIONADOS POR CLAE-UV.	39
QUADRO 5 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA QUANTIFICAR CAP E HCTZ POR CLAE-UV.....	40
QUADRO 6 – CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS SEGUNDO SUA FINALIDADE	42
QUADRO 7 – ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SEGUNDO SUA FINALIDADE	42
QUADRO 8 – GRADIENTE FINAL DE ELUIÇÃO DA FM.	88
QUADRO 9 – RESULTADO DE UNIFORMIDADE DE CONTEÚDO DE GC1.	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila
ANOVA - Análise de variância
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT₁ - Angiotensina 1
AVC - Acidente Vascular Cerebral
BTDZ - Benzotiadiazina ou 4-amino-6-cloro-1,3-benzenodissulfonamida
CAP - Captopril
CAD - Dissulfeto de captopril
CG - Cromatografia gasosa
CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD - Cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos
CLAE-EM - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
CTZ - Clorotiazida
CV - Coeficiente de variação
DAD - Detector de arranjo de diodos
DCB - Denominação Comum Brasileira
DCI - Denominação Comum Internacional
DP - Desvio Padrão
DPa - Desvio Padrão do intercepto com o eixo y
DPR - Desvio Padrão Relativo
EC - Eletroforese Capilar
ECA - Enzima Conversora de Angiotensina
EM - Espectrômetro de massas
FDA - Food and Drug Administration
FIA - Análise por injeção de fluxo
FM - Fase Móvel
HAS - Hipertensão arterial sistêmica
HCTZ - Hidroclorotiazida
IC - Inclinação da curva
ICH - International Conference on Harmonisation
IECA - Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
K' - Fator de capacidade ou fator de retenção
LD - Limite de Detecção
LQ - Limite de Quantificação

N - Número de pratos teóricos

ODS - Octadecilsilano

PTFE - Politetrafluoretileno

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

rpm - Rotações por minuto

Rs - Resolução

SUS - Sistema Único de Saúde

T - Fator caudal

Tr - Tempo de retenção

USP - United States Pharmacopeia

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	17
3.1.1	DIAGNÓSTICO E ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA.....	18
3.1.2	TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL	20
3.1.2.1	<i>Tratamento não-medicamentoso</i>	21
3.1.2.2	<i>Tratamento medicamentoso</i>	21
3.2	ADESÃO AO TRATAMENTO E ASSOCIAÇÃO TERAPÊUTICA.....	23
3.3	CAPTOPRIL	26
3.4	HIDROCLOROTIAZIDA.....	29
3.5	ASSOCIAÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA	31
3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO	32
3.6.1	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	35
3.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	41
3.7.1	SELETIVIDADE	43
3.7.2	LINEARIDADE	44
3.7.3	INTERVALO.....	45
3.7.4	PRECISÃO	46
3.7.4.1	<i>Repetibilidade (precisão intra-corrída)</i>	46
3.7.4.2	<i>Precisão intermediária (precisão inter-corrída)</i>	47
3.7.4.3	<i>Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial)</i>	47
3.7.5	EXATIDÃO.....	48
3.7.6	LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	49
3.7.7	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	50
3.7.8	ROBUSTEZ	51
3.8	MEDICAMENTOS GENÉRICOS E SIMILARES	51

3.9	EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA.....	54
3.10	ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	60
4.2	ANÁLISES ATRAVÉS DO CLAE-DAD	61
4.2.1	PREPARO DOS PADRÕES	61
4.2.2	ANÁLISE DOS PADRÕES POR ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA (UV)	62
4.2.3	PREPARO DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS.....	62
4.2.4	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	63
4.2.5	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CLAE-DAD	64
4.2.6	CÁLCULO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	64
4.2.7	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS	66
4.2.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-DAD.....	67
4.2.8.1	<i>Seletividade</i>	67
4.2.8.2	<i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	67
4.2.8.3	<i>Linearidade</i>	68
4.2.8.4	<i>Precisão</i>	68
4.2.8.5	<i>Exatidão</i>	69
4.2.8.6	<i>Robustez</i>	70
4.3	ENSAIOS DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA	70
4.3.1	IDENTIFICAÇÃO	71
4.3.2	DETERMINAÇÃO DE PESO	71
4.3.3	DUREZA	71
4.3.4	FRIABILIDADE	72
4.3.5	TESTE DE DESINTEGRAÇÃO.....	72
4.3.6	UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS.....	72
4.3.7	TESTE DE DISSOLUÇÃO	74
4.3.8	ENSAIO DE PUREZA.....	74
4.3.8.1	<i>Limite de dissulfeto de captopril</i>	74
4.3.8.2	<i>Limite de Benzotiadiazina composto relacionado A</i>	75
4.3.9	DOSEAMENTO.....	75

4.3.10	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	76
4.3.11	PERFIL DE DISSOLUÇÃO	77
4.3.12	COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO	78
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CLAE-DAD	80
5.1.1	ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA	80
5.1.2	ESCOLHA DA COLUNA	81
5.1.3	COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	84
5.1.4	TEMPERATURA.....	88
5.1.5	FLUXO	90
5.1.6	ADEQUABILIDADE DO MÉTODO.....	91
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-DAD	93
5.2.1	SELETIVIDADE	93
5.2.2	LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	94
5.2.3	LINEARIDADE E INTERVALO	95
5.2.3.1	<i>Linearidade.....</i>	<i>95</i>
5.2.3.2	<i>Intervalo de trabalho.....</i>	<i>103</i>
5.2.4	PRECISÃO	104
5.2.4.1	<i>Repetibilidade.....</i>	<i>104</i>
5.2.4.2	<i>Precisão Intermediária.....</i>	<i>105</i>
5.2.5	EXATIDÃO	107
5.2.6	ROBUSTEZ	108
5.3	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS COMERCIAIS.....	115
5.4	EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA.....	116
5.4.1	IDENTIFICAÇÃO	116
5.4.2	DETERMINAÇÃO DE PESO	116
5.4.3	DUREZA, FRIABILIDADE, DESINTEGRAÇÃO, DISSOLUÇÃO, IMPUREZAS E DOSEAMENTO	117
5.4.4	UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS.....	119
5.5	PERFIL DE DISSOLUÇÃO.....	124
5.5.1	PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE CAPTOPRIL 25 mg.....	124

5.5.1.1	<i>Comparação dos perfis de dissolução de comprimidos de captopril 25 mg.....</i>	127
5.5.2	PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE HIDROCLOROTIAZIDA 25 mg.....	130
5.5.2.1	<i>Comparação dos perfis de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida 25 mg</i>	132
5.5.3	PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE CAPTOPRIL (50 mg) E HIDROCLOROTIAZIDA (25 mg).....	134
5.5.3.1	<i>Comparação dos perfis de dissolução de comprimidos de captopril (50 mg) e hidroclorotiazida (25 mg)</i>	136
6	CONCLUSÃO	138
7	REFERÊNCIAS	140
	ANEXO.....	152

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é responsável por cerca de 6% das mortes em todo o mundo (WOLF-MAIER *et al.*, 2004). Além disso, está entre os principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, as quais foram responsáveis por 29,4% dos óbitos no Brasil em 2007. Estudos brasileiros mostraram que 52,3% dos indivíduos adultos sabiam ter hipertensão, 34,9% estavam em tratamento e 13,7% tinham a pressão arterial controlada (< 140/90 mmHg). A utilização de medicamentos anti-hipertensivos reduz a morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares, mas seu emprego como monoterapia é ineficaz em cerca de 2/3 dos casos de hipertensão, o que gera uma tendência de adoção cada vez mais precoce da terapia combinada. A Sociedade Brasileira de Hipertensão recomenda a utilização da associação de anti-hipertensivos como tratamento inicial nos estágios mais avançados da doença (CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010).

A utilização de associações de dois ou mais fármacos em uma mesma forma farmacêutica determina maior comodidade para o paciente, assim como maior adesão e, conseqüentemente, efetividade terapêutica. Porém, por ser uma prática relativamente nova, existem poucos métodos analíticos descritos nas farmacopéias para esse tipo de apresentação. Entre as monografias existentes para associações de anti-hipertensivos encontram-se métodos em que os fármacos são quantificados separadamente e por sistemas cromatográficos distintos, o que é pouco viável diante do volume de análises a ser realizado em uma indústria farmacêutica e da tendência mundial de otimização dos processos analíticos.

Para a análise simultânea de captopril (CAP) e hidroclorotiazida (HCTZ) em comprimidos foram encontrados métodos por CLAE (JAIN;JAIN, 1991; IVANOVIC *et al.*, 2004) cromatografia líquida com detecção por quimioluminescência (OUYANG *et al.*, 1998b-b; OUYANG *et al.*, 1999), espectrofotometria derivada (SALEM *et al.*, 1991; PANDERI;PARISSI-POULOU, 1992) e calibração multivariada (USTUNDAG;DINC, 2003). No entanto estes métodos envolvem procedimentos complicados e não monitoram

os compostos relacionados. A *United States Pharmacopeia* (USP) reconhece a importância de monitorar estes compostos juntamente com os seus ativos, e para tal, apresenta uma monografia para essa associação. Porém, descreve dois sistemas cromatográficos: um para determinação dos ativos e do composto relacionado 4-amino-6-cloro-1,3-benzenodisulfonamida (BTDZ) e outro para determinação do limite de dissulfeto de captopril (CAD). Além disso, não determina clorotiazida, produto de fotodegradação e subproduto de síntese da HCTZ (USP, 2011). A farmacopéia brasileira não possui monografia para a associação. A escolha do tema se baseou, portanto, na importância de captopril e hidroclorotiazida no tratamento da hipertensão arterial, e na necessidade de um método mais prático e rápido para sua quantificação e de suas impurezas em formas farmacêuticas.

Há uma crescente preferência pela utilização de medicamentos genéricos pela população e uma dificuldade de fiscalização da qualidade dos medicamentos como um todo durante o período de comercialização. Assegurar a mesma qualidade e efeito dos genéricos e similares disponíveis, utilizados como anti-hipertensivos, frente ao correspondente medicamento referência, assume uma importância altamente significativa na garantia da sua eficácia terapêutica e segurança no consumo pela população. Entre os testes empregados para isso destacam-se os de equivalência farmacêutica, necessários para a aprovação e renovação do registro de quaisquer medicamentos como genéricos ou similares. Diante disto, outra proposta de trabalho a ser desenvolvida abrangeu a avaliação da qualidade dos comprimidos de captopril, hidroclorotiazida e sua associação comercializados em Curitiba, através dos testes determinantes da equivalência farmacêutica e comparação do perfil de dissolução dos medicamentos registrados como genéricos, similares e referência.

Esse trabalho tem por objetivo propor um método por CLAE que permita o doseamento simultâneo de captopril, hidroclorotiazida e seus compostos relacionados na forma farmacêutica em associação; permitindo análises em menor tempo e com menor consumo de reagentes para laboratórios de controle de qualidade, equivalência farmacêutica e para a indústria

farmacêutica. Também pretende avaliar a qualidade dos medicamentos genéricos, similares e referência contendo esses fármacos comercializados na cidade de Curitiba.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que quantifique simultaneamente captopril (CAP), hidroclorotiazida (HCTZ) e seus compostos relacionados (benzotiadiazina - BTZ, clorotiazida - CTZ e dissulfeto de captopril - CAD) em comprimidos contendo a associação dos fármacos e avaliar a equivalência farmacêutica de formulações anti-hipertensivas de CAP, HCTZ e sua associação na forma farmacêutica comprimido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método por CLAE rápido e econômico para doseamento simultâneo de CAP, CAD, HCTZ, BTZ e CTZ que otimize as análises de controle de qualidade de comprimidos da associação, determinando os parâmetros cromatográficos que gerem os melhores resultados considerando também o tempo de corrida, gasto de fase móvel, tipo de eluição (isocrático ou gradiente), eficiência da coluna e facilidade de execução do método.
- Realizar os ensaios para validação do método atendendo as normas vigentes pela ANVISA e entidades internacionais.
- Realizar os testes de equivalência farmacêutica previstos pelos compêndios oficiais para diferentes formulações indicadas terapeuticamente como anti-hipertensivas e registradas como medicamentos genéricos ou similares.
- Averiguar a qualidade dos medicamentos anti-hipertensivos contendo captopril e hidroclorotiazida disponíveis comercialmente em

Curitiba comparando os resultados de genéricos e similares com os do medicamento de referência.

- Comunicar, quando cabível, os resultados obtidos para equivalência farmacêutica diretamente aos órgãos regulamentadores responsáveis.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônica caracterizada por pressão arterial (PA) maior ou igual a 140/90 mmHg e provoca alterações patológicas nos vasos sanguíneos e hipertrofia do ventrículo esquerdo. Suas principais complicações são acidente vascular encefálico (AVE), infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e aneurisma dissecante da aorta (OATES;BROWN, 2003; CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010). A hipertensão explica 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% das por doença coronariana sendo que a mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial, a partir de 115/75 mmHg (CHOBANIAN *et al.*, 2003; CARDIOLOGIA;NEFROLOGIA;ARTERIAL, 2007).

A hipertensão arterial é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, as quais, segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão, foram responsáveis por 29,4 % dos óbitos ocorridos no Brasil em 2007 e determinaram 1.180.184 internações em 2005, com um custo global de mais de 1 bilhão de reais. Os principais fatores de risco relacionados ao aumento da pressão arterial são: idade (a PA aumenta linearmente com a idade), sexo (prevalência maior em homens até os 50 anos e em mulheres após a sexta década de vida), sedentarismo, consumo de álcool, tabagismo, consumo elevado de sal, obesidade, predisposição genética e fatores ambientais. A etnia e fatores sócio econômicos também exercem influência, uma vez que há até 130% mais risco de hipertensão em mulheres afrodescendentes em relação a mulheres brancas, e um menor nível socioeconômico está relacionado a uma maior prevalência da HAS (CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010). A taxa de morbidade e mortalidade devido a PA elevada é proporcional ao grau de desenvolvimento do país. A PA elevada se encontra entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, juntamente com as

doenças cardiovasculares, colesterol elevado, e fatores de risco nutricional como obesidade e sobrepeso (EZZATI *et al.*, 2005). Alguns estudos realizados em cidades brasileiras indicam prevalência de HAS ($\geq 140/90$ mmHg) entre 22,3% e 43,9% (CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010). Mais de 25% da população mundial adulta é hipertensa e a tendência é aumentar para 29% até 2025, podendo alcançar 1,56 bilhão de pessoas (KEARNEY *et al.*, 2005).

A mortalidade por acidente vascular cerebral (AVC) nas principais cidades do Brasil, até o final da década de 80, foi maior que em países como Estados Unidos, Canadá e países da Europa Ocidental, assemelhando-se a da Europa Oriental e Japão. Em 2002, o AVC foi a principal causa de óbitos no Brasil determinando 87.344 mortes e tendo como segundo lugar a doença arterial coronariana que alcançou 81.505 mortes (LOTUFO, 2005). O fato de a HAS ser o principal fator que leva a essas mortalidades e apresentar alta prevalência são indicativos suficientes da importância de se estabelecer medidas de saúde pública mundiais de controle, prevenção, detecção e tratamento da HAS (KEARNEY *et al.*, 2005).

Apesar das evidências de que o tratamento anti-hipertensivo é eficaz em reduzir a morbidade e mortalidade cardiovasculares a baixa adesão ao tratamento determina percentuais de controle da PA muito baixos (GUS *et al.*, 2004; CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010). O menor controle da PA está relacionado também à idade avançada, obesidade e baixo nível educacional (FIRMO;BARRETO;LIMA-COSTA, 2003; CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010).

3.1.1 DIAGNÓSTICO E ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA

Para o diagnóstico e estratégia terapêutica deve-se considerar a avaliação dos valores de PA, presença de fatores de risco, lesões em órgãos-alvo e doenças associadas (CHOBANIAN *et al.*, 2003; CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010). A classificação da PA

pelo valor obtido em medida casual em consultório, para maiores de 18 anos, é feita através dos valores da Tabela 1. Esses valores são adotados pelo Brasil na VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, pelas Sociedades Européias de Hipertensão e Cardiologia (*European Society of Hypertension* e *European Society of Cardiology* respectivamente) e pela Sociedade Britânica de Hipertensão (*British Hypertension Society*) (HYPERTENSION; CARDIOLOGY,2003;SOCIETY,2004;CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO; NEFROLOGIA, 2010).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL DE ACORDO COM A MEDIDA CASUAL NO CONSULTÓRIO (> 18 ANOS)

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

Quando as pressões sistólica e diastólica de um paciente situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial.

FUNTE:(CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010).

Após diagnosticada a hipertensão é feita a estratificação de risco (Quadro 1), que leva em consideração além dos valores de PA, o risco cardiovascular, lesões em órgãos-alvo e doenças cardiovasculares. As metas de PA a serem atingidas se baseia nos valores de PA e na estratificação de risco. Em função da estratificação de risco também se estabelece a estratégia terapêutica, como pode ser visto na Tabela 2.

Fatores de risco	Pressão arterial				
	Normal	Limítrofe	Hipertensão estágio 1	Hipertensão estágio 2	Hipertensão estágio 3
Sem fator de risco	Sem risco adicional				
1 a 2 fatores de risco	Risco baixo		Risco médio		
3 ou mais fatores de risco ou lesão de órgãos-alvo ou diabetes melito		Risco alto			
Doença cardiovascular		Risco muito alto			

QUADRO 1 - ESTRATIFICAÇÃO DO RISCO INDIVIDUAL DO PACIENTE HIPERTENSO: RISCO CARDIOVASCULAR ADICIONAL DE ACORDO COM OS NÍVEIS DA PRESSÃO ARTERIAL E A PRESENÇA DE FATORES DE RISCO, LESÕES DE ÓRGÃOS-ALVO E DOENÇA CARDIOVASCULAR.

FONTE: (CARDIOLOGIA;NEFROLOGIA;ARTERIAL, 2007).

TABELA 2 - DECISÃO TERAPÊUTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SEGUNDO O RISCO CARDIOVASCULAR.

Categoria de risco	Estratégia
Sem risco adicional	Tratamento não-medicamentoso isolado
Risco adicional baixo	Tratamento não-medicamentoso isolado por até 6 meses. Se não atingir a meta, associar tratamento medicamentoso
Risco adicional médio, alto e muito alto	Tratamento não-medicamentoso + medicamentoso

FONTE: (CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010).

3.1.2 TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL

A terapia anti-hipertensiva, medicamentosa ou não, tem o objetivo de reduzir a mortalidade e morbidade cardiovasculares pela manutenção da PA abaixo de 140 mmHg e 90 mmHg para pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), respectivamente. Uma situação comumente

observada é a maior dificuldade em se reduzir os valores de PAS quando comparado a PAD (CHOBANIAN *et al.*, 2003; 2003; SOCIETY, 2004; CARDIOLOGIA;NEFROLOGIA;ARTERIAL, 2007; CARDIOLOGIA; HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010).

3.1.2.1 Tratamento não-medicamentoso

O tratamento não medicamentoso objetiva a modificação dos fatores ambientais que contribuem para a hipertensão. Ele consiste na adoção de hábitos saudáveis como: controle do peso através de dietas e da prática regular de exercícios físicos, redução do consumo de sal, redução da ingestão de álcool e abandono do tabagismo. Por tratar-se da adoção de um estilo de vida mais saudável é recomendado para todos os níveis de risco cardiovascular (CHOBANIAN *et al.*, 2003; 2003; SOCIETY, 2004; CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010).

3.1.2.2 Tratamento medicamentoso

O tratamento medicamentoso ou farmacológico consiste na utilização de medicamentos anti-hipertensivos na forma de monoterapia ou combinados. Existem diferentes classes terapêuticas de anti-hipertensivos, definidas conforme seu local ou mecanismo de ação da seguinte maneira: diuréticos, inibidores adrenérgicos, vasodilatadores diretos, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor da angiotensina II e inibidores diretos da renina (CHOBANIAN *et al.*, 2003; OATES;BROWN, 2003; SOCIETY, 2004;CARDIOLOGIA; HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010). A classificação e alguns exemplos podem ser vistos no Quadro 2.

Diuréticos:

Tiazidas e agentes relacionados (hidroclorotiazida, clortalidona, etc)

Diuréticos de alça (furosemida, bumetanida, torsemida, ácido etacrínico)

Diuréticos poupadores de k⁺ (amilorida, espironolactona, triamtereno)

Simpatolíticos:

Antagonista β-adrenérgico (metoprolol, atenolol, etc)

Antagonista α-adrenérgico (prazosina, terazosina, doxazosina, fenoxibenzamina, fentolamina)

Antagonista adrenérgico misto (labetalol, carvedilol)

Agentes de ação central (metildopa, clonidina, guanabenz, guanfacina)

Agentes bloqueadores dos neurônios adrenérgicos (guanadrel, reserpina)

Bloqueadores dos canais de Ca²⁺ (verapamil, diltiazem, nimodipina, felodipina, nicardipina, isradipina, anlodipina)

Inibidores da enzima conversora de angiotensina (captopril, enalapril, lisinopril, quinapril, ramipril, benazepril, fosinopril, moexipril, perindopril, trandolapril)

Antagonista do receptor de angiotensina II (losartano, candesartano, irbesartano, valsartano, telmisartano, eprosartano)

Vasodilatadores:

Arteriais (hidralazina, minoxidil, diazóxido, fenoldopam)

Arteriais e venosos (nitroprussiato)

Inibidor direto da renina:

Alisquireno

QUADRO 2: CLASSIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS POR SEU LOCAL OU MECANISMO DE AÇÃO.

Os fármacos anti-hipertensivos atuam sobre o débito cardíaco e a resistência vascular periférica ou ambos. Os efeitos hemodinâmicos complementares fornecem uma base lógica para a associação desses fármacos na terapêutica. Assim, a terapia combinada utilizando fármacos de diferentes classes pode contribuir para o controle da PA e reduzir os efeitos adversos relacionados à dose (OATES;BROWN, 2003). A combinação de anti-hipertensivos é principalmente indicada para pacientes em estágio 2 e 3, sendo a monoterapia aplicável aos pacientes em estágio 1 que não responderam ao tratamento não-medicamentoso. Com exceção dos vasodilatadores diretos, todas as classes de anti-hipertensivos podem ser empregadas na monoterapia (CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010).

3.2 ADESÃO AO TRATAMENTO E ASSOCIAÇÃO TERAPÊUTICA

A adesão ao tratamento é definida pela OMS como “a extensão em que cada comportamento pessoal – administração dos medicamentos, acompanhamento de uma dieta e/ou execução de mudanças no estilo de vida – correspondem com as recomendações acordadas com um provedor de atenção à saúde.” (WHITWORTH, 2003).

A baixa adesão ao tratamento não farmacológico e/ou farmacológico é o fator mais importante para o comprometimento do controle da pressão arterial (BATALLA-MARTÍNEZ *et al.*, 1984). A OMS estima que 75% dos pacientes hipertensos não alcancem valores ótimos de PA, sendo o controle dos níveis pressóricos fundamental para a diminuição da mortalidade e morbidade (WHITWORTH, 2003; BATALLA MARTINEZ, 2009). As conseqüências são resultados clínicos negativos e sobrecarga do sistema de saúde, gerando gastos enormes pelo maior consumo de serviços (KROUSEL-WOOD *et al.*, 2004).

Entre os fatores que influenciam a adesão estão as características do paciente, do tratamento e da doença. Com relação ao paciente há discrepâncias quanto a influência de raça, cultura, idade, fatores sociais e econômicos; porém o grau de conhecimento da doença tem sido correlacionado a uma melhor adesão e controle de PA. A complexidade do tratamento influencia a adesão, sendo considerados os seguintes fatores: frequência de doses, duração, número de medicamentos e comprimidos, horário de administração, custo, dose, efeitos adversos, efetividade e instruções para uso do medicamento (jejum, tomar meio comprimido). A hipertensão, por ser crônica e geralmente assintomática, possui uma menor aceitação do tratamento. Deve-se também considerar a relação médico-paciente e o acesso ao sistema de saúde (BATALLA-MARTÍNEZ *et al.*, 1984; SARQUIS *et al.*, 1998).

Sarquis *et al.* (1998) verificaram, através de revisão de 107 artigos científicos publicados entre 1991 e 1995, que a não adesão estava relacionada em 68% dos casos ao paciente, 63% ao tratamento farmacológico, 62% a

aspectos gerais, 39% ao tratamento não farmacológico, 34% a fatores institucionais e 8% relativos à doença (SARQUIS *et al.*, 1998).

Para cumprir o objetivo de controlar a PA muitas vezes é necessário o uso de 2 ou mais anti-hipertensivos além da adoção das medidas não farmacológicas. Essa maior complexidade do tratamento juntamente com sua longa duração prejudica a adesão terapêutica. Com o objetivo de minimizar os problemas relacionados ao tratamento medicamentoso, facilitar a administração e aumentar a qualidade de vida dos pacientes foram desenvolvidas formas farmacêuticas contendo a associação de fármacos. Nestas, dois ou mais fármacos podem ser combinados em diferentes doses e administrados de uma só vez. O paciente que utiliza formas associadas precisa se lembrar de um menor número de medicamentos e tomar menos comprimidos por horário. Além disso, como na associação podem ser usadas doses menores dos dois fármacos é comum os pacientes apresentarem menos efeitos adversos (OATES;BROWN, 2003). Algumas associações fixas para a terapia combinada, encontradas no Brasil, podem ser vistas na Tabela 3.

TABELA 3: ASSOCIAÇÕES FIXAS DE ANTI-HIPERTENSIVOS DISPONÍVEIS NO BRASIL.

Associações	Posologia (mg)
Diurético + diurético	
Clortalidona + amilorida	25 + 5 ou 50 + 5
Espironolactona + hidroclorotiazida	50 + 50
Furosemida + amilorida	40 + 10
Furosemida + espironolactona	20 + 100
Furosemida + triantereno	40 + 50
Hidroclorotiazida + amilorida	25 + 2,5 ou 50 + 5
Hidroclorotiazida + triantereno	50 + 50
Inibidor adrenérgico + diurético	
Ação central + diurético	
Alfametildopa + hidroclorotiazida	250 + 25 ou 250 + 15
Reserpina + clortalidona	0,25 + 50
Reserpina + diidralazina + hidroclorotiazida	0,1 + 10 + 10
Betabloqueador + diuréticos	
Atenolol + clortalidona	25 + 12,5 ou 50 + 12,5 ou 100 + 25
Bisoprolol + hidroclorotiazida	2,5 + 6,25 ou 5 + 6,25 ou 10 + 6,25
Metoprolol + hidroclorotiazida	50 + 25 ou 100 + 25 ou 100 + 12,5
Metoprolol ZOK*** + hidroclortiazida	100 + 12,5
Pindolol + clopamida	10 + 5
Propranolol + hidroclorotiazida	40 + 25 ou 80 + 25
Bloqueadores do receptor AT1 + diurético	
Candesartana + hidroclorotiazida	8 + 12,5 ou 16 + 12,5
Ibersartana + hidroclorotiazida	150 + 12,5 ou 300 + 12,5
Losartana + hidroclorotiazida	50 + 12,5 ou 100 + 25
Olmesartana + hidroclorotiazida	20 + 12,5 ou 40 + 12,5 ou 40 + 25
Telmisartana + hidroclortiazida	40 + 12,5 ou 80 + 12,5
Valsartana + hidroclorotiazida	80 + 12,5 ou 160 + 12,5 ou 160 + 25
Inibidores da ECA + diuréticos	
Benazepril + hidroclorotiazida	5 + 6,25 ou 10 + 12,5

Captopril + hidroclorotiazida	50 + 25
Cilazapril + hidroclorotiazida	5+12,5
Enalapril + hidroclorotiazida	10+25 ou 20+12,5
Fosinopril + hidroclorotiazida	10+12,5
Lisinopril + hidroclorotiazida	10+12,5 ou 20+12,5
Ramipril + hidroclorotiazida	5+12,5
Bloqueadores dos canais de cálcio + betabloqueador	
Nifedipino + atenolol	10+25 ou 20+50
Anlodipino + atenolol	5+25 ou 5+50
Bloqueadores dos canais de cálcio + inibidores da ECA	
Anlodipino + enalapril	2,5+10 ou 5+10 ou 5+20
Anlodipino + ramipril	2,5+5 ou 5+5
Manidipino + delapril	10+30
Bloqueadores dos canais de cálcio + bloqueadores do receptor AT1	
Anlodipino + losartana	2,5+50 ou 5+100
Inibidor direto da renina + diurético	
Alisquireno + hidroclorotiazida	150 + 12,5ou150 + 25 ou300 + 12,5 ou 300 + 25

FONTE: (CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010).

A associação estudada neste trabalho foi entre os fármacos anti-hipertensivos captopril (inibidor da ECA) e hidroclorotiazida (diurético tiazídico), que pertencem a diferentes classes de anti-hipertensivos e são comumente utilizados no tratamento da hipertensão.

3.3 CAPTOPRIL

Captopril ou 1-[(2S)-3-mercaptopropionil]-L-prolina é um anti-hipertensivo da classe dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) utilizado no tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva, promove redução da PA por sua atuação no sistema renina - angiotensina - aldosterona (OATES;BROWN, 2003; RAHMAN;SINGH;HODA, 2005; HUANG *et al.*, 2006; VANCEA *et al.*, 2009).

A enzima ECA faz parte do sistema renina-angiotensina, um dos sistemas responsáveis pela regulação da pressão arterial, convertendo angiotensina I em angiotensina II. Esta altera a resistência periférica vascular, a função renal e a estrutura cardiovascular. Entre os mecanismos de ação estão o seu efeito vasoconstritor, de liberação de aldosterona, de aumento da reabsorção de sódio e da neurotransmissão noradrenérgica. O sistema renina-angiotensina é ativado em episódios de hipotensão para promover o aumento da PA até os níveis normais e alterações nele podem causar hipertensão. Por ser um importante meio de regulação da PA, o sistema renina-angiotensina é também um importante alvo de fármacos. A inibição da ECA impede a formação da angiotensina II e leva a uma diminuição da PA, o que na hipertensão é o principal objetivo (OATES;BROWN, 2003).

Os IECA são a primeira escolha para o tratamento da hipertensão de diabéticos e pacientes com doença renal crônica. Além disso, sua importância como anti-hipertensivos se fundamenta na sua eficácia e perfil de efeitos adversos, que levam a uma boa adesão terapêutica. Deve ser observado durante o tratamento a relevância do seu potencial para causar hipercalemia de acordo com o paciente e outros fármacos associados (OATES;BROWN, 2003). Como principais efeitos adversos é possível citar a tosse seca e alteração do paladar, mais raramente reações de hipersensibilidade com erupção cutânea e edema angioneurótico. Em pacientes com insuficiência renal crônica os IECA podem agravar a hiperpotassemia; quando em associação com diuréticos seu efeito hipotensor é aumentado, podendo levar a hipotensão postural (CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010).

Captopril tem rápida absorção e biodisponibilidade de 75%. Sua meia vida é de aproximadamente 2 horas e a eliminação ocorre principalmente na urina, 40-50% na forma inalterada e o restante como dissulfeto de captopril e dissulfeto de captopril-cisteína. A administração junto com a comida pode reduzir sua biodisponibilidade em até 25-30%, por isso a indicação médica é de que seja tomado em jejum uma hora antes da refeição (OATES;BROWN, 2003).

O captopril se apresenta como um pó cristalino branco ou quase branco, solúvel em água e em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos, facilmente solúvel em metanol e cloreto de metileno. Sua faixa de fusão é de 105 °C a 108 °C e possui valores de pKa de 3,7 (carboxila) e 9,8 (tiol). Apresenta massa molecular de 217,29 g/mol e sua fórmula molecular é C₉H₁₅NO₃S. Sua fórmula estrutural está representada na Figura 1 (BRASIL, 2005).

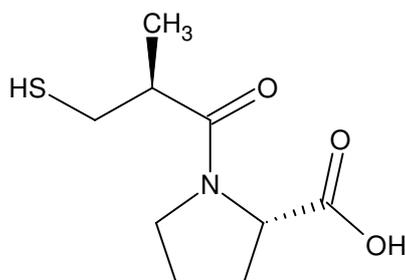


FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO CAPTOPRIL OU 1-[(2S)-3-MERCAPTO-2-METILPROPIONIL]-L-PROLINA.

O captopril possui como principal impureza seu dímero dissulfeto de captopril. Sua elevada susceptibilidade à degradação oxidativa promove a formação do seu produto de degradação; temperatura e umidade elevadas favorecem esse processo, o qual ocorre por meio de um complexo mecanismo envolvendo a função tiol. Quando veiculado em forma farmacêutica sólida, sua estabilidade é relativamente maior, porém há necessidade de utilização de barreiras efetivas contra oxigênio e umidade, na embalagem primária, para permitir um prazo de validade adequado em condições ambientais de elevado calor e umidade, como é o caso do Brasil (MARCATTO, 2005). O limite definido para dissulfeto de captopril em comprimidos de captopril é de no máximo 3% em relação a quantidade do ativo (BRASIL, 2005; USP, 2011). O dissulfeto de captopril possui massa molecular de 432,58 g/mol, fórmula molecular C₁₈H₂₈N₂O₆S₂ e sua fórmula estrutural pode ser vista na Figura 2.

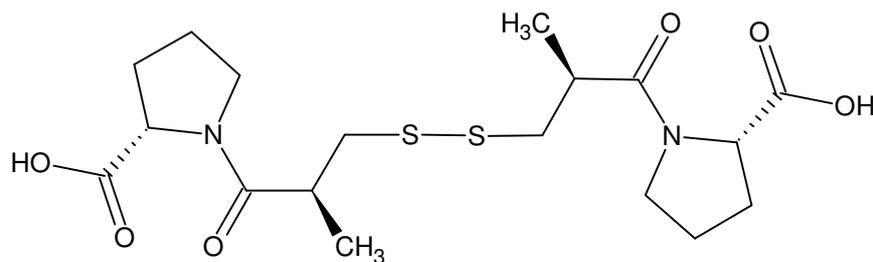


FIGURA 2 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO DISSULFETO DE CAPTOPRIL

3.4 HIDROCLOROTIAZIDA

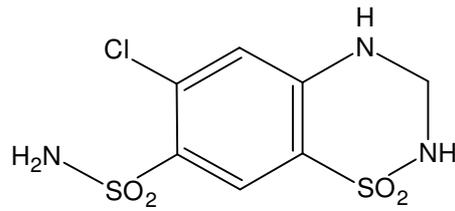
A hidroclorotiazida ou 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido) é um diurético tiazídico e, como tal, atua inibindo o transporte de Na^+ e Cl^- no túbulo distal do sistema renal. O mecanismo exato pelo qual os diuréticos tiazídicos promovem a redução da pressão arterial não está totalmente esclarecido. Esses fármacos diminuem o volume extracelular por inibição do transporte de sódio e cloreto no túbulo contorcido distal, levando a uma queda no débito cardíaco, mas o efeito hipotensor se mantém na terapia a longo prazo indicando que diuréticos tiazídicos provavelmente possuem um efeito vasodilatador direto. A HCTZ pode abrir canais de potássio ativados por cálcio, promovendo a hiperpolarização das células da musculatura lisa vascular, reduzida entrada de cálcio através dos canais de cálcio voltagem-dependentes e finalmente reduzida vasoconstrição (OATES;BROWN, 2003).

Os diuréticos tiazídicos podem ser usados em monoterapia, mas a depleção de potássio via urinária pode ser um problema. Os inibidores da ECA e antagonistas de receptores da angiotensina podem atenuar essa perda de potássio, indicando que deve-se considerar a necessidade do uso de uma segunda droga para o controle adequado da pressão arterial. Os efeitos diurético e hipotensor desses fármacos é bastante reforçado quando são combinados, o que justifica certo cuidado no início da terapia e utilização de doses baixas de cada agente no começo do tratamento. A administração de inibidores da ECA e antagonistas de receptores da angiotensina junto com

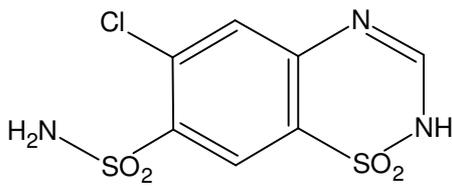
poupadores de potássio ou suplementos de potássio pode causar hipercalemia em alguns pacientes (OATES;BROWN, 2003).

A HCTZ possui 2 principais impurezas. Em sua primeira via de degradação gera benzotiadiazina (4-amino-6-chloro-1,3-benzenodisulfonamida) e formaldeído por hidrólise (HERTZOG *et al.*, 2002). Clorotiazida (CTZ) e benzotiadiazina (BTDZ) são as principais impurezas de processo, no entanto Fang *et al.* (2001) identificaram uma terceira impureza, o dímero HCTZ-CH₂-HCTZ (FANG *et al.*, 2001; LUSINA *et al.*, 2005). Estudos de fotodegradação da HCTZ reportaram a ocorrência principalmente de fotodesalogenação e fotólise (TAMAT;MOORE, 1983; REVELLE *et al.*, 1997; BRIGANTE *et al.*, 2005). Nesse caso BTDZ e CTZ estão entre os principais produtos de fotoprocessamento (TAMAT;MOORE, 1983; ULVI;TAMMILEHTO, 1989; BRIGANTE *et al.*, 2005). Os limites determinados para BTDZ e CTZ são de 1,0 e 0,5%, respectivamente, em relação a quantidade de HCTZ (USP, 2011).

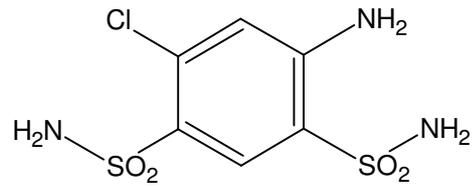
O fármaco HCTZ se apresenta como um pó cristalino branco ou quase branco, inodoro, muito pouco solúvel em água, pouco solúvel em etanol, solúvel em acetona e em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos. Sua faixa de fusão é de 266 a 270 °C com decomposição e possui valores de pKa de 7,9 e 9,2 (aminas) (BRASIL, 2005). Apresenta massa molecular de 297,7 g/mol e fórmula molecular C₇H₈N₃O₄S₂; sua fórmula estrutural está representada na Figura 3 junto com suas principais impurezas, CTZ e BTDZ.



Hidroclorotiazida (HCTZ)
(ativo)



Clorotiazida (CTZ)
(impureza do processo)



4-amino-6-cloro-1,3-benzenodissulfonamida
(Benzotiadiazina) (produto de degradação)

FIGURA 3 – HIDROCLOROTIAZIDA E SEUS COMPOSTOS RELACIONADOS

3.5 ASSOCIAÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA

A associação de fármacos ou terapia combinada se faz necessária sempre que a monoterapia não for eficaz na redução e controle da PA, isso ocorre em cerca de dois terços dos casos e por isso há uma tendência de utilização da terapêutica combinada como primeira medida medicamentosa (CARDIOLOGIA;HIPERTENSÃO;NEFROLOGIA, 2010). A associação consiste na utilização de fármacos anti-hipertensivos de diferentes classes terapêuticas, com exceção dos diuréticos. Estes podem ser associados tanto com as demais classes quanto entre si, associando-se, por exemplo, diuréticos tiazídicos e de alça com diuréticos poupadores de potássio (CARDIOLOGIA; HIPERTENSÃO; NEFROLOGIA, 2010).

Segundo estudo desenvolvido com médicos brasileiros especialistas em cardiologia, clínica médica e geriatria os fármacos mais recomendados no tratamento da hipertensão são diuréticos (53%) e IECA (24%). Quando não há

controle da pressão arterial com a monoterapia, 55 % dos médicos associam um segundo fármaco de diferente mecanismo de ação e 33% aumentam a dose. As associações mais citadas foram: a) IECA + diurético (46%), b) betabloqueador + diurético (34%), c) droga de ação central + diurético (17%). Entre as associações, 30% foram fixas e 13% não fixas (JR;PIERIN; GUIMARAES, 2001).

Captopril e hidroclorotiazida representam a associação de um IECA e um diurético tiazídico e, como citado acima, fazem parte do grupo que compõe praticamente metade de todas as associações prescritas. Estão disponíveis no mercado nas doses fixas de 50 e 25 mg, respectivamente.

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO

Existem vários métodos utilizados no doseamento de fármacos em formas farmacêuticas, desde titulometria e espectrofotometria na região ultravioleta até as mais avançadas tecnologias em cromatografia. Entretanto, quando se trata de formas farmacêuticas combinadas, surge o problema de quantificar os diferentes fármacos e seus compostos relacionados dentro de parâmetros aceitáveis de qualidade.

Entre os principais métodos encontrados na literatura para doseamento de fármacos e suas associações, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de UV-VIS, detector de fluorescência ou acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM). Também são utilizadas a titulação potenciométrica, a eletroforese capilar (EC), o UV-VIS e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A técnica de CLAE foi escolhida para o presente estudo pelas suas características e disponibilidade dentro das indústrias e laboratórios analíticos.

As farmacopéias européia, japonesa e portuguesa apresentam monografia apenas para as matérias-primas de captopril (CAP) e hidroclorotiazida (HCTZ). As monografias para comprimidos destes fármacos

são encontradas nas farmacopéias brasileira, britânica e americana (USP), sendo que apenas a última relata a forma associada dos fármacos.

Na monografia de comprimidos de CAP e HCTZ da USP, a análise de limite de dissulfeto de captopril (CAD) é realizada separadamente da de CAP, HCTZ e benzotiadiazina (BTDZ), utilizando preparo de amostra e fase móvel diferentes. Além disso, não é quantificada uma das principais impurezas da HCTZ, a clorotiazida (CTZ). Essa diferenciação dos sistemas cromatográficos torna o processo mais trabalhoso e lento. Esse método emprega uma coluna de dimensões 4,6 mm x 30 cm, o que apesar do fluxo relativamente alto (1,5 - 2,0 mL/min), caracteriza um método mais lento e dispendioso, passível de otimização.

Foram descritos métodos para determinação de captopril em comprimidos, em associação ou não, utilizando espectrofotômetro de UV (EL-SHABRAWY;EL-ENANY;SALEM, 2004; GHASEMI;NIAZI, 2007; NIAZI; GHASEMI, 2007; GAO;WU;LI, 2008), CLAE (EL WALILY *et al.*, 1999; MIRZA;TAN, 2001), CG (LIU *et al.*, 1998), EC (HILLAERT;VAN DEN BOSSCHE, 1999b; PEREZ-RUIZ;MARTINEZ-LOZANO;GALERA, 2006), quimiluminescência (DU;LI;LU, 2002), espectrometria de absorção atômica (EL WALILY *et al.*, 1999; EL REIS;ABOU ATTIA;KENAWY, 2000), titulometria (EL-BRASHY, 1995), voltametria (IOANNIDES;ECONOMOU; VOULGAROPOULOS, 2003; PARHAM;ZARGAR, 2005), potenciometria (NIKOLIC;VELASEVIC, 1990), espectroscopia Raman (MAZUREK;SZOSTAK, 2006), calibração multivariada (FRAGA *et al.*, 1998) e por análise por injeção de fluxo (FIA) (ALBERO *et al.*, 1993; TZANAVARAS *et al.*, 2002). CAP e seu composto relacionado CAD podem ser determinados em comprimidos por EC (HILLAERT;VAN DEN BOSSCHE, 1999a) e CLAE (BRASIL, 2005; BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2005; USP, 2011).

Em matrizes biológicas, essa mesma determinação foi feita por CLAE (GAO;TIAN;WANG, 1992; WAKABAYASHI *et al.*, 1994; LI;TAN;ZHOU, 1996; SYPNIEWSKI;BALD, 1996; ARROYO *et al.*, 1997; AYKIN *et al.*, 2001; KUSMIEREK;BALD, 2007), CLAE-EM (SALEM *et al.*, 2005; GU;CUI, 2006; REZENDE *et al.*, 2007; VANCEA *et al.*, 2009) e CG-EM (FUNKE *et al.*, 1980;

MATSUKI *et al.*, 1982; IVASHKIV;MCKINSTRY;COHEN, 1984; ITO *et al.*, 1987; LEIS *et al.*, 1990). Captopril e seus metabólitos dissulfeto foram analisados em matriz biológica por CG (BATHALA *et al.*, 1984), CG-MS (COHEN *et al.*, 1982; MATSUKI *et al.*, 1982), CLAE (HAYASHI;MIYAMOTO;SEKINE, 1985) e CLAE com detecção de fluorescência (ZHONG *et al.*, 1998; TACHE *et al.*, 2002).

Os métodos para determinação de HCTZ em comprimidos, em associação com outros fármacos ou não, envolvem: CLAE (BUTTERFIELD;LOVERING;SEARS, 1978; CARLUCCI *et al.*, 2000; BELAL *et al.*, 2001; HERTZOG *et al.*, 2002), espectrofotometria (EL WALILY *et al.*, 1995; ERK, 2003a), calibração multivariada (FERRARO;CASTELLANO;KAUFMAN, 2002; MAGGIO;CASTELLANO;KAUFMAN, 2008), EC (HILLAERT;DE GRAUWE;VAN DEN BOSSCHE, 2001) e quimiluminescência (OUYANG *et al.*, 1998a). Outros métodos foram propostos para avaliar, também, os compostos de degradação da HCTZ por diferentes técnicas analíticas (ESPANOLA, 1954; THOMAS *et al.*, 1994; HERTZOG *et al.*, 2002; BRASIL, 2005; BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2005; USP, 2011). Em amostras biológicas essa análise foi proposta através de espectrofotometria (BEBAWY *et al.*, 2005), CLAE (VAN DER MEER;BROWN, 1987; ERK, 2003b; ELSHANAWANE; MOSTAFA;ELGAWISH, 2009) e CLAE-EM (KOLOCOURI *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2007; PAREKH *et al.*, 2008; SALVADORI *et al.*, 2009; TUTUNJI *et al.*, 2009).

Apesar da grande quantidade de métodos propostos para quantificar os fármacos, sua determinação simultânea na forma farmacêutica comprimido é pouco relatada. Entre esses métodos destacam-se os que utilizam CLAE (KIRSCHBAUM;PERLMAN, 1984; IVANOVIC *et al.*, 2004; USP, 2008; 2011), CLAE com detecção de fluorescência (OUYANG *et al.*, 1998b-a; OUYANG *et al.*, 1999), espectrofotometria (SALEM *et al.*, 1991; PANDERI;PARISSI-POULOU, 1992) e calibração multivariada (USTUNDAG;DINC, 2003). Dentre esses destaca-se o trabalho de Kirschman, único em que são determinados além dos fármacos as impurezas. Porém este não permite a análise de CTZ, e as análises de CAP, HCTZ e BTZ são realizadas por sistema cromatográfico diferente do utilizado para determinar CAD. Até agora não foi encontrado um

método que permita quantificar simultaneamente captopril, hidroclorotiazida e seus compostos relacionados na forma farmacêutica comprimido.

3.6.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) surgiu na década de 60 pela união da cromatografia líquida às teorias e instrumentação da cromatografia gasosa. A inovação em relação a cromatografia líquida foi a utilização de partículas de fase estacionária menores, o que promove maior eficiência de separação, mas necessita a utilização de bombas para eluir a fase móvel (CASS;DEGANI, 2001).

A sensibilidade e seletividade da CLAE a tornaram uma das técnicas mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos nos últimos anos, com destaque para a análise ambiental, médica e principalmente em indústrias farmacêuticas. Estima-se que mais de 90% dos laboratórios de análises espalhados pelo mundo utilizam pelo menos uma modalidade de CLAE em fase reversa (TONHI *et al.*, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência ou CLAE é um método analítico de separação, identificação e quantificação. Ele permite analisar misturas de compostos promovendo sua separação de acordo com as características físico-químicas de cada composto e com a interação desses com a fase estacionária e a fase móvel. As interações podem ocorrer por pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. De acordo com a natureza da interação o modo de separação é classificado em cromatografia em fase reversa, fase normal, de troca iônica e por exclusão (CASS;DEGANI, 2001).

A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada e emprega fase estacionária de baixa polaridade e fase móvel de maior polaridade, a fase normal utiliza polaridades invertidas (TONHI *et al.*, 2002). O modo de separação é escolhido em função das características dos analitos, como por exemplo: peso molecular, polaridade e caráter iônico. Também depende da

fase estacionária e fase móvel para cada classe de soluto (CASS;DEGANI, 2001).

Um cromatógrafo a líquido é composto por reservatório, bombas de pressão e fluxo constante, injetor de amostra, coluna cromatográfica, forno da coluna, detector e um sistema de registro e tratamento de dados. Atualmente esses componentes são computadorizados, permitindo que parâmetros como temperatura, fluxo e composição de fase móvel (eluição gradiente) sejam alterados individualmente no equipamento, o que é fundamental para o desenvolvimento de métodos analíticos (SNYDER;KIRKLAND;GLAJCH, 1997; CASS;DEGANI, 2001).

A separação na CLAE ocorre nas colunas cromatográficas, estas podem ser separadas inicialmente em colunas analíticas e preparativas conforme a quantidade de material a ser cromatografado (CIOLA, 1998). Há uma diversidade de materiais que são empregados como fase estacionária, sendo a composição desta fundamental para a separação dos compostos e sua escolha feita antes do desenvolvimento do método (SNYDER;KIRKLAND;GLAJCH, 1997; CASS;DEGANI, 2001).

A temperatura do forno é um parâmetro que afeta diretamente o perfil cromatográfico dos compostos. Um aumento da temperatura promove redução do tempo de retenção principalmente de amostras ionizáveis, embora amostras neutras também possam ter mudanças significativas na retenção. Além disso, é um parâmetro muito útil para melhorar a resolução entre picos, sem alteração da coluna ou da fase móvel (SNYDER;KIRKLAND;GLAJCH, 1997).

O fluxo da fase móvel afeta diretamente o tempo de retenção dos compostos e a pressão do sistema (SNYDER;KIRKLAND;GLAJCH, 1997). A eluição da fase móvel em gradiente pode melhorar a resolução e seletividade do método, favorecendo a separação e diminuindo o tempo de corrida para amostras contendo analitos com uma ampla faixa de retenção (K). Em consequência da maior complexidade e número de variáveis envolvidas, a eluição gradiente apresenta maior dificuldade na reprodutibilidade dos dados (CASS;DEGANI, 2001).

Os sistemas de detecção mais empregados na CLAE são o arranjo de fotodiodos (DAD) ou detector de UV-Visível, fluorescência, índice de refração, infravermelho, polarímetro e dicroísmo circular, eletroquímicos, espalhamento de luz (light-scattering), ressonância magnética nuclear e espectrômetro de massas. Alguns fatores fundamentam a escolha do sistema a ser utilizado, entre eles tem-se a sensibilidade, seletividade, rapidez de resposta, linearidade e limite de detecção (CASS;DEGANI, 2001). Optou-se pela utilização do CLAE com detector de DAD devido a sua ampla utilização industrial e em laboratórios analíticos, e aos compostos de interesse apresentarem absorção na região do ultravioleta.

Nos Quadros 3, 4 e 5 estão especificadas as condições cromatográficas encontradas na literatura para determinação de CAP, HCTZ e seus compostos relacionados por CLAE-UV.

Compostos	Referência	Coluna	Fase Móvel	Fluxo (mL/min)	Comprimento de onda (nm)	Temp (°C)
CAP e CAD – Captopril comprimidos.	(BRASIL, 2005; BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2005; USP, 2011)	C18 (L1) 250 x4,6 mm, 5 µm	Mistura filtrada e degaseificada de Ác. fosfórico 0,11%: metanol (45:55, v/v).	1,0	220	25
CAD – Captopril matéria-prima.	(BRASIL, 2005; BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2005; USP, 2011)	C18 (L1) 300 x3,9 mm, 5 µm	Mistura filtrada e degaseificada de Ác. fosfórico 0,05%: tetrahydrofurano 9% em metanol (67:33, v/v). Isocrático	1,0	220	25
CAD – Captopril matéria-prima.	(ESPANOLA, 1954; PHARMACOPOEIA, 1994; BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2005)	C18 (L1) 125 x4,0 mm, 5 µm	Mistura filtrada e degaseificada de Ác. fosfórico 0,05%: metanol (50:50, v/v). Isocrático	1,0	220	25
CAD – Captopril matéria-prima.	(PHARMACOPOEIA, 2006)	C18 (L1) 300 x 3,9 mm, 10 µm	Mistura filtrada e degaseificada de Água: metanol: Ác. Fosfórico(1000:1000:1, v/v). Isocrático	Ajustar para CAD eluir em 10min	220	25
CAP em comprimidos	(MIRZA;TAN, 2001)	Vydac de baixa capacidade de troca 250 x 4,6 mm, 10 µm	0,1 M Tampão de biftalato de potássio:Metanol:água (25:150:825, v/v), pH 6.0	1,0	280	45

QUADRO 3 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA QUANTIFICAR CAP E CAD POR CLAE-UV.

Compostos	Referência	Coluna	Fase Móvel	Fluxo (mL/min)	Comprimento de onda (nm)	Temp. (°C)
CTZ – Hidroclorotiazida matéria-prima e comprimido	(BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2005)	C18 (L1) 100 x4,6 mm, 3µm	FM A: Tampão fosfato pH 3,2: metanol: tetrahydrofurano (940:60:10, v/v). Gradiente	0,8	224	25
HCTZ e BTZ - Hidroclorotiazida comprimido	(USP, 2011)	C18 (L1) 250 x4,6 mm, 5µm	Mistura filtrada e degaseificada de NaH ₂ PO ₄ 0,1M: ACN (9:1, v/v), pH 3,0±0,1. Isocrático	2	254	25
HCTZ – Hidroclorotiazida matéria-prima e comprimido	(BRASIL, 2005)	C18 (L1) 250 x4,6 mm, 3 a 10 µm	Mistura filtrada e degaseificada de NaH ₂ PO ₄ 0,1M: ACN (9:1, v/v), pH 3,0±0,1. Isocrático	2	254	25
HCTZ – Hidroclorotiazida matéria-prima	(PHARMACOPOEIA, 2006)	C18 (L1) 250 x4,6 mm, 5µm	Mistura filtrada e degaseificada de NaH ₂ PO ₄ 0,1M: ACN (9:1, v/v), pH 3,0±0,1. Isocrático	Ajustar para HCTZ eluir em 10min	254	25
Losartan, HCTZ e seus produtos de degradação	(HERTZOG <i>et al.</i> , 2002)	Symmetry C8 150 x3,9 mm, 5µm	FM A: Tampão fosfato 0,02M pH 7,0 (KH ₂ PO ₄ e Na ₂ HPO ₄):ACN (93:7, v/v) FM B: ACN. Gradiente	1	280	35
HCTZ e ramipril em comprimidos	(BELAL <i>et al.</i> , 2001)	Supelcosil™ LC-8 150 x 4,6 mm, 5 µm	ACN: perclorato de sódio 0,1M (46:54, v/v), pH 2,5±0,2.	1,5	210	25

QUADRO 4 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA QUANTIFICAR HCTZ E SEUS COMPOSTOS RELACIONADOS POR CLAE-UV.

Compostos	Referência	Coluna	Fase Móvel	Fluxo (mL/min)	Comprimento de onda (nm)	Temp. (°C)
CAP e HCTZ em comprimidos	(IVANOVIC <i>et al.</i> , 2004)	Beckman Ultrasphere ODS 150 x 4,6 mm, 5µm	Metanol:Água (45:55, v/v), pH 3,8	1,0	210	40
CAP, CAD, HCTZ e BTZ	(KIRSCHBAUM;PERLMAN, 1984)	Phenyl(L11) – 300 x4,6 mm	Ác. Fosfórico 0,5%: Metanol (75:25, v/v). Gradiente	Gradien- te	210	30
CAP, HCTZ e BTZ – Captopril e hidroclorotiazida comprimidos.	(USP, 2011)	L11 (Phenyl), 300 x 4,6 mm	Mistura filtrada e degaseificada de Ác. fosfórico: metanol: água (0,5:250:750, v/v). Isocrático	1,5	210	25
CAD – Captopril e hidroclorotiazida comprimidos	(USP, 2011)	L11 (Phenyl), 300 x 4,6 mm	Mistura filtrada e degaseificada de Ác.fosfórico: metanol: água (0,5:550:450, v/v). Isocrático	1,5	210	25

QUADRO 5 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA QUANTIFICAR CAP E HCTZ POR CLAE-UV

3.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação consiste no fornecimento de evidências de que os critérios necessários para a aplicação pretendida foram atendidos. Seu objetivo é garantir que o método proposto conduz a resultados confiáveis e com a qualidade desejada. Deve ser realizada com equipamentos e instrumentos adequadamente calibrados e validados, por operador competente na área de estudo (INMETRO, 2003).

Segundo a ANVISA o método deve apresentar os requisitos de especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão (BRASIL, 2003). Porém, os parâmetros a serem avaliados podem variar conforme o objetivo do método. Antes da validação é necessário realizar algumas etapas prévias, que incluem a qualificação dos equipamentos a serem utilizados, a análise da estabilidade das soluções reagentes e o teste de adequabilidade do sistema. A importância de cada teste está relacionada com seu potencial de influenciar as análises (SHABIR, 2003).

A qualificação dos equipamentos engloba sua correta instalação, operacionalidade conforme especificações de exatidão, precisão e linearidade pré-definidas e performance sob as condições de análise. A estabilidade das soluções, sob as condições de armazenamento estabelecidas, deve ser verificada por, pelo menos, 24h e se dá através da comparação dos resultados obtidos destas com os de soluções preparadas recentemente. A variação tolerada para os resultados depende do tipo de análise (doseamento ou análise de impurezas) (SHABIR, 2003).

O teste de adequabilidade do sistema se baseia nos fatores: equipamento, componentes eletrônicos, operações analíticas e amostras, analisando-os como um todo (SHABIR, 2003). Os parâmetros de conformidade a serem avaliados e os critérios de aceitação devem ser definidos para cada experimento e se manter apropriados durante sua realização. Segundo o FDA, os critérios a serem monitorados são: fator caudal (≤ 2), retenção relativa (normalmente > 2), resolução (> 2 entre o pico de interesse e o do interferente mais próximo), desvio padrão relativo ($< 1\%$, para $n > 5$) e número de pratos

teóricos (> 2000) (FDA, 2000). Normalmente são requeridos pelo menos dois destes critérios para garantir a conformidade do sistema (RIBANI *et al.*, 2004).

A etapa seguinte é a validação do método. Os métodos são classificados segundo sua finalidade em quatro classes conforme o Quadro 6:

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
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 matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

QUADRO 6 – CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS SEGUNDO SUA FINALIDADE
 FONTE: (BRASIL, 2003).

Os parâmetros a serem avaliados na validação de um método são determinados conforme essa classificação e podem ser vistos no Quadro 7:

PARÂMETRO	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim		*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Sim	Não
	Intermediária	**	**	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

NOTAS: * Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

QUADRO 7 – ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SEGUNDO SUA FINALIDADE
 FONTE: (BRASIL, 2003).

3.7.1 SELETIVIDADE

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005).

O ICH e a ANVISA definem da mesma forma seletividade e especificidade, porém a IUPAC sugere a utilização somente do termo seletividade. Um método de separação que produz resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado de específico e um que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo. Considerando-se que há poucos métodos que respondam a apenas um analito o termo seletividade é mais apropriado (VESSMAN, 1996; RIBANI *et al.*, 2004).

Além disso, o detector UV-VIS, o mais comumente utilizado em CLAE, é seletivo, por isso a denominação mais adequada para esse teste parece ser seletividade (LANÇAS, 2004). A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico e deve ser reavaliada continuamente. Caso a seletividade não seja assegurada, os parâmetros exatidão, precisão e linearidade ficam comprometidos (RIBANI *et al.*, 2004).

Para os testes de identificação é preciso comparar amostras contendo o fármaco com outras que contenham compostos estruturalmente semelhantes a ele. A capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes é demonstrada pela obtenção de resultados positivos para o composto de interesse e negativos para compostos com estrutura semelhante (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para análises quantitativas e análise de impurezas, devem ser comparados os resultados obtidos de amostras adicionadas de quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não adicionadas, o que demonstra que os resultados do doseamento não são afetados por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras

contendo impurezas ou produtos de degradação com os de um procedimento bem caracterizado como, por exemplo, metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado. Essas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse como: luz, calor, umidade, oxidação, hidrólise ácida e básica (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Métodos cromatográficos podem garantir a pureza dos seus picos através de testes em que, com o auxílio de detector de arranjo de fotodiodos, (DAD) ou espectrometria de massas, demonstra-se que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005). A seletividade é obtida na prática otimizando-se as condições cromatográficas como: polaridade e pH da fase móvel, fluxo de eluição, temperatura da coluna, recheio e fabricantes de coluna (LANÇAS, 2004). Para descrever a especificidade do método alguns parâmetros devem ser calculados nos cromatogramas: resolução, retenção relativa, fator de capacidade, fator de simetria do pico e número de pratos teóricos (INMETRO, 2003).

3.7.2 LINEARIDADE

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; ICH, 2005).

Para determinar a linearidade é recomendada a análise de no mínimo 5 diferentes concentrações, sendo cada uma destas em triplicata. Os dados obtidos devem ser organizados na forma de gráfico da concentração pela resposta do detector e tratados estatisticamente. A partir da reta determina-se o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y ($x=0$), coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (DPR), que deve ser menor que 2,0% (SHABIR, 2003; ICH, 2005).

O coeficiente de correlação fornece uma estimativa da qualidade da curva, quanto mais próximo de 1,0 menor é a dispersão dos dados e a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). O

critério mínimo aceito pela ANVISA é de um coeficiente de correlação maior que 0,99 e pelo INMETRO maior que 0,90. Valores superiores a 0,999 são considerados evidência de ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.3 INTERVALO

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, que possa ser determinada com precisão, exatidão e linearidade adequada (BRASIL, 2003; ICH, 2005)). Derivado do estudo de linearidade o intervalo depende da aplicação pretendida do método (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A tabela 4 traz os valores de intervalo sugeridos para cada tipo de ensaio:

TABELA 4 – INTERVALO SUGERIDO PARA O ESTUDO DE LINEARIDADE SEGUNDO O MÉTODO ANALITICO

MÉTODO	INTERVALO RECOMENDADO (%)
Quantificação do analito em matéria-prima ou produto final	80-120%.
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado.
Determinação de impurezas com potencial para causar efeito tóxico ou efeito farmacológico inesperado	Limites adequados às quantidades de impurezas a serem controlados.
Uniformidade de conteúdo	70-130% da concentração teórica do teste.
Ensaio de dissolução	± 20% do intervalo especificado.

FONTE: (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O intervalo pode ser determinado dividindo-se o sinal do detector (unidades de área ou altura, no CLAE) pela respectiva concentração obtendo as respostas relativas. Gerando um gráfico dessas respostas pela concentração em escala logarítmica deve-se obter uma reta horizontal, que se estende por toda a faixa linear. Duas linhas horizontais paralelas ao gráfico de

$\pm 5\%$ da linha da faixa linear determinam o intervalo dentro do qual flutuações são aceitáveis e o método é considerado linear (RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.4 PRECISÃO

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra sob condições pré-estabelecidas (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Pode ser expressa em variância, desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medidas (ICH, 2005).

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrída) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).

3.7.4.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída)

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo sob as mesmas condições operacionais (analista, método, instrumentação). Pode ser verificada em um mínimo de 9 determinações contemplando 3 níveis de concentrações (alta, média e baixa) dentro do intervalo linear do método e analisados em triplicata, ou em um mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003; ICH, 2005).

A ANVISA utiliza o termo repetibilidade, porém o mesmo conceito é adotado pelo INMETRO como repetitividade (BRASIL, 2003a; INMETRO, 2003).

O limite de repetibilidade permite avaliar se a diferença entre as repetições é significativa e, para um intervalo de confiança de 95%, pode ser calculado a partir da seguinte fórmula (INMETRO, 2003):

$$R = 2,8 \times s \text{ (desvio padrão)} \quad (1)$$

A repetibilidade não deve ser confundida com a precisão do instrumento, a qual é determinada através de no mínimo 10 injeções da mesma amostra (SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Segundo o FDA o DPR para essas análises deve ser $\leq 1\%$ (FDA, 1994; SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.4.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrída)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório obtidos em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes, com analistas diferentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório, e por esse motivo tem maior representatividade na variabilidade dos resultados do método em comparação a repetibilidade. Os ensaios segundo o ICH e ANVISA são os mesmos propostos para a repetibilidade. A precisão intermediária pode ser expressa pela estimativa do desvio padrão relativo, também conhecida como coeficiente de variação (RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.4.3 Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial)

A reprodutibilidade é a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. É utilizada quando se deseja padronizar um método analítico ou incluí-lo em farmacopéias, sendo resultado da colaboração entre laboratórios (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Os ensaios segundo o ICH e ANVISA são os mesmos propostos para a repetibilidade e precisão intermediária, porém devem ser realizados em condições operacionais diferentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A IUPAC não recomenda tirar conclusões com menos de cinco laboratórios, recomendando oito (RIBANI *et al.*, 2004). O valor aceitável deve ser definido de acordo com o método, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade

do método, porém, não se admite valores de DPR superiores a 5% (BRASIL, 2003).

3.7.5 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é a proximidade entre os resultados obtidos pelo método em estudo com um valor aceito como verdadeiro, existem vários métodos para sua avaliação (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Quando se determina fármacos pode-se avaliar a exatidão utilizando o método proposto para analisar uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou pela comparação dos resultados obtidos com os de uma metodologia bem caracterizada com exatidão já estabelecida (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para uma forma farmacêutica, analisa-se uma amostra em que quantidade conhecida do fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado). Na indisponibilidade destes, pode ser realizada a análise pelo método de adição de padrão, em que se adicionam quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para impurezas, utiliza-se o método de adição de padrão, em que quantidades conhecidas da impureza e/ou produto de degradação são adicionadas ao fármaco ou medicamento e na indisponibilidade destes compara-se os resultados com os de um método bem caracterizado (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O ICH e a ANVISA estabelecem um mínimo de nove determinações, envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração realizados em triplicata. As concentrações devem estar dentro do intervalo do método. Antes de determinar a exatidão é preciso definir a seletividade, a linearidade e o intervalo do método (FDA, 2000; BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2008; 2011).

A exatidão expressa o percentual de fármaco recuperado no ensaio, em relação à quantidade de analito adicionada na amostra ou a diferença entre a

média e o valor aceito como verdadeiro junto com os intervalos de confiança (ICH, 2005). O FDA recomenda uma recuperação em torno de $100 \pm 2\%$ do valor real para doseamento, nas três concentrações testadas dentro do intervalo linear do método. Para análise de impurezas se aceita a recuperação absoluta de 0,1% ou relativa de 10% em relação a concentração teórica, o que for maior, para impurezas na faixa de 0,1-2,5% (p/p) (AOAC, 1993; SHABIR, 2003). ANVISA e ICH não definem valores de recuperação.

3.7.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O LD é a menor concentração do analito na amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais definidas. Pode ser obtido por diferentes métodos. Uma delas é a análise de soluções do analito em concentrações conhecidas e decrescentes até o menor nível detectado, onde se consegue diferenciar o sinal analítico do ruído. Duas outras formas utilizadas são a relação de 3 vezes o ruído da linha de base e o cálculo do LD de acordo com o desvio padrão da resposta e inclinação da curva de calibração contendo concentrações próximas ao suposto limite de detecção (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005). Esse último método se baseia na seguinte fórmula:

$$LD = \frac{DPa}{IC} \times 3 \quad (2)$$

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo três curvas de calibração construídas contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio também pode ser obtido a partir da curva de calibração obtida pela análise de um número apropriado de amostras do branco. O IC é a inclinação da curva (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Segundo o INMETRO, limite de detecção do método é a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (INMETRO, 2003).

3.7.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O LQ é a menor concentração do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão adequadas sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; ICH, 2005). É especialmente utilizado na quantificação de impurezas e produtos de degradação em fármacos e formas farmacêuticas, é expresso em concentração do analito (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Assim como o LD o LQ pode ser determinado por três métodos: (1) através da análise de soluções com concentrações conhecidas e decrescentes até atingir o nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis, (2) pela relação de 10 vezes o ruído da linha de base e (3) calculado de acordo com o desvio padrão da resposta e inclinação da curva de calibração contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação (BRASIL, 2003). A fórmula utilizada para o cálculo é:

$$LQ = \frac{DPa}{IC} \times 10 \quad (3)$$

O método mais utilizado para técnicas analíticas no geral é o da relação sinal-ruído. Porém em técnicas de separação como a cromatografia e a eletroforese muitas vezes o ruído não é trivial (RIBANI *et al.*, 2004). O LD e LQ podem ser afetados por condições cromatográficas, picos mais afilados apresentam maior relação sinal-ruído e conseqüentemente LQ e LD menores (SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Uma alternativa quando as condições cromatográficas atrapalham a determinação do LQ é utilizar o método de cálculo a partir da curva de calibração (RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.8 ROBUSTEZ

A robustez mede a capacidade do método em resistir a pequenas, mas deliberadas, variações nos parâmetros analíticos e indica sua confiança durante o uso (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005). O método é considerado robusto quando não é afetado por essas pequenas modificações (RIBANI *et al.*, 2004).

A ANVISA e o ICH recomendam variações em alguns fatores para a cromatografia líquida: variação do pH, da composição e do fluxo da fase móvel; diferentes lotes ou fabricantes de colunas e variações na temperatura. No entanto, não determinam a quantidade de variação a ser imposta ao método. Green e Ribani sugerem variação do solvente orgânico na fase móvel de $\pm 2\%$, pH modificado em $\pm 0,1$ unidade e temperatura do forno da coluna $\pm 5^{\circ}\text{C}$ em relação ao especificado (GREEN, 1996; RIBANI *et al.*, 2004).

O INMETRO recomenda o teste de Youden, que permite avaliar a robustez e ordenar e tipificar a influência de cada uma das variações nos resultados finais. Consiste em oito ensaios com uma combinação fatorial dos efeitos, cujos resultados permitem verificar qual o efeito ou combinação de efeitos que apresentam variações (RIBANI *et al.*, 2004).

O método, após validado, está apto para ser utilizado nas análises a que se destina, no nosso caso, quantificar CAP, HCTZ e suas impurezas em comprimidos. Uma pesquisa dos medicamentos disponíveis comercialmente contendo esses fármacos evidenciou a quantidade de opções, em especial de genéricos.

3.8 MEDICAMENTOS GENÉRICOS E SIMILARES

Fazendo frente ao monopólio das grandes indústrias transnacionais, surgiu em diversos países, no final da década de 60, a idéia de produzir medicamentos nacionais utilizando denominação genérica. Esta lei foi primeiro implementada nos Estados Unidos em 1984, e possibilitou o surgimento da

indústria farmacêutica que comercializava não mais pelo nome da marca, mas pelo nome genérico (GEREZ, 1993; FERNANDES, 2001).

No Brasil, a Lei nº 9787 de 10 de fevereiro de 1999, estabeleceu o medicamento genérico e regulamentou a sua aquisição no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Segundo essa lei, medicamento genérico é “medicamento similar a um produto de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela Denominação Comum Brasileira (DCB) ou, na sua ausência, pela Denominação Comum Internacional (DCI)” (BRASIL, 1999a).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde e ANVISA os medicamentos genéricos devem satisfazer os mesmos padrões de qualidade, eficácia e segurança que o produto original, ou inovador, além de serem clinicamente intercambiáveis com estes (BRASIL, 1999a). Tais medicamentos têm como principais vantagens:

- Oferecer à população medicamentos de melhor qualidade, mais seguros e eficazes, comprovados através da realização de testes de equivalência farmacêutica e bioequivalência;
- Disponibilizar medicamentos de menor preço, visto que os fabricantes de genéricos não precisam investir em pesquisa para o seu desenvolvimento nem em propaganda;
- Reduzir os preços dos medicamentos de referência, com a entrada de medicamentos concorrentes (genéricos);
- Favorecer o acesso da população aos medicamentos;
- Fortalecer a indústria nacional proporcionando o desenvolvimento tecnológico das mesmas e, conseqüentemente, do país;

Para a obtenção de registro como medicamento genérico o medicamento deve comprovar sua equivalência farmacêutica e bioequivalência com o medicamento de referência (BRASIL, 1999b).

Já o medicamento similar, segundo a Lei nº 9787 de 10 de fevereiro de 1999, é “aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, e que é equivalente ao medicamento registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca”. Para seu registro junto a ANVISA devem ser apresentados os resultados dos testes de equivalência farmacêutica, descrevendo a metodologia utilizada, realizados por laboratórios habilitados (REBLAS) para os medicamentos de venda sob prescrição médica e não isentos deste estudo. Além disso, a partir da RDC nº 17 de 02 de março de 2007 os similares devem apresentar também os resultados dos testes de biodisponibilidade relativa, comprovando sua bioequivalência com o medicamento referência (BRASIL, 2007b). A bioequivalência é a ausência de diferença significativa entre a velocidade e quantidade de princípio ativo que atinge o sítio de ação após a administração de um equivalente farmacêutico (genérico ou similar) na mesma dose molar do medicamento referência e sob condições similares.

A exigência dos estudos de bioequivalência dos similares fez com que as principais diferenças entre estes e os genéricos sejam: a denominação e o preço. A denominação pela DCB ou DCI fez com que surgissem as propagandas institucionais, divulgando então o fabricante de genéricos e não mais o medicamento, enquanto os fabricantes de similares continuam com a propaganda de cada medicamento individualmente. Através dos incentivos federais à produção, comercialização e uso de medicamentos genéricos estes conseguem ser mais acessíveis à população do ponto de vista econômico que o medicamento de referência. Um estudo realizado por Vieira e Zucchi com 135 apresentações de genéricos e seus medicamentos de referência, revelou que

os genéricos são introduzidos no mercado com preços em média 40% menores do que os medicamentos de referência (VIEIRA;ZUCCHI, 2006).

A intercambialidade caracteriza a possibilidade de escolha entre dois medicamentos para os mesmos fins terapêuticos ou profiláticos com garantia da mesma eficácia e segurança terapêutica, e é estabelecida entre o medicamento referência e seus genéricos.

3.9 EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

O registro dos medicamentos genéricos exige comprovação das boas práticas de fabricação, do controle de qualidade, dos estudos de equivalência farmacêutica e de bioequivalência, assegurando que estes são equivalentes terapêuticos do medicamento referência (STORPIRTIS *et al.*, 2004). Medicamentos são considerados equivalentes farmacêuticos quando possuem mesma forma farmacêutica, mesma via de administração e mesma quantidade da mesma substância ativa, podendo ou não conter excipientes idênticos, desde que bem estabelecidos para a função destinada. Devem cumprir com os mesmos requisitos da monografia individual da Farmacopéia Brasileira, ou com os de outros compêndios oficiais reconhecidos pela ANVISA, satisfazendo testes como o de identificação, impurezas, doseamento e dissolução. A equivalência farmacêutica é exigida pela legislação brasileira e os testes são realizados *in vitro*, não envolvendo, portanto, seres humanos (BRASIL, 1999b; 2010).

A equivalência farmacêutica pode ser considerada um indicativo da bioequivalência relativa/ biodisponibilidade entre os medicamentos em estudo sem, no entanto, garanti-la. É uma etapa inicial indispensável no registro de um medicamento como genérico e, conseqüentemente, na intercambialidade entre este e seu medicamento de referência (STORPIRTIS *et al.*, 2004). A descrição do teste de equivalência farmacêutica e o modo como deve ser desenvolvido o estudo do perfil de dissolução dos medicamentos estão presentes na Resolução RE n° 310 de 1º de setembro de 2004 (BRASIL, 2004).

Variações na formulação, ou mesmo na técnica de fabricação, podem gerar diferenças substanciais na absorção e conseqüentemente na resposta terapêutica dos fármacos (POLLI;CRISON;AMIDON, 1996; ROUGE;BURI;DOELKER, 1996). Verifica-se que a ineficácia clínica observada com o uso de alguns medicamentos, além de episódios de intoxicação, está estritamente relacionada à biodisponibilidade de produtos farmacêuticos (STORPIRTIS;CONSIGLIERI, 1995). Isso destaca a necessidade de atenção especial com as formas farmacêuticas sólidas, em que a dissolução do fármaco pode ser afetada significativamente pelas características inerentes ao próprio fármaco, bem como pela presença de diferentes excipientes além das técnicas de fabricação empregadas (ARANCÍBIA, 1991; STORPIRTIS;CONSIGLIERI, 1995).

A maior preocupação em termos de equivalência farmacêutica, biodisponibilidade, bioequivalência e intercambialidade recai sobre medicamentos apresentados sob formas farmacêuticas para as quais existem muitos fatores que podem alterar a liberação, a dissolução e a absorção do fármaco no organismo como é o caso dos comprimidos. Logo, nota-se que análises *in vitro* rigorosas, quanto à qualidade dos medicamentos genéricos e similares produzidos no Brasil, são o primeiro passo para assegurar a eficácia terapêutica dos mesmos quando comparados aos medicamentos de referência. Ressaltando entre os testes *in vitro* a importância da determinação do perfil de dissolução.

3.10 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO

A liberação da substância ativa da forma farmacêutica sólida e sua dissolução são etapas críticas para a biodisponibilidade de um fármaco, uma vez que ele deve estar solúvel para ser absorvido e chegar ao sítio de ação. Essas etapas podem ser avaliadas através do perfil de dissolução.

A dissolução de um fármaco pode sofrer alterações em função de diversas características inerentes ao próprio fármaco, aos excipientes

presentes na formulação ou ainda ao processo de fabricação. Dentre as características inerentes ao próprio fármaco estão o tamanho das partículas, o polimorfismo, o estereoisomerismo, a higroscopicidade e a solubilidade (STORPIRTIS *et al.*, 2004).

Genéricos e similares podem conter na sua formulação excipientes diferentes dos utilizados no medicamento referência; ou ainda os mesmos excipientes em proporções diferentes. A influência desse fator na liberação e dissolução do fármaco pode ser observada através dos estudos de dissolução, o que explica sua utilização nos processos de desenvolvimento de medicamentos auxiliando na melhora da formulação, na escolha de excipientes e na melhora do próprio processo. Também são muito utilizados no controle de qualidade, permitindo avaliar alguns parâmetros do medicamento produzido de forma fácil e barata (COSTA, P.; LOBO, J. M.S., 2001).

A comparação de perfis de dissolução permite conhecer o comportamento do medicamento antes dos ensaios de bioequivalência, isentar dosagens menores desses ensaios e é útil para alterações pós-registro (BRASIL, 2010). Como consequência, reduz a quantidade de estudos de bioequivalência que precisariam ser feitos.

O estudo de dissolução descrito na farmacopéia compreende a exposição da forma farmacêutica sólida às condições pré-estabelecidas de meio de dissolução, velocidade de agitação, temperatura e aparato. A análise é feita quantificando a porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo. As farmacopéias brasileira e americana apresentam discrepâncias quanto às condições do ensaio de dissolução para comprimidos de captopril e hidroclorotiazida. Para comprimidos de CAP, a brasileira indica a utilização de ácido clorídrico 10 vezes mais concentrado que o previsto pela americana mantendo os critérios de aceitação. Para comprimidos de HCTZ a farmacopéia brasileira utiliza rotação de 150 rpm e como critério de aceitação dissolução de pelo menos 60% de HCTZ em 30 minutos enquanto a americana utiliza 100 rpm de rotação e a mesma porcentagem de dissolução deve ser atingida em 60 minutos.

O perfil de dissolução é o ensaio de dissolução no qual se faz a retirada de várias alíquotas em diferentes tempos para estabelecer a curva de %dissolvida x tempo. A determinação das porcentagens de fármaco dissolvidas é feita através de método de quantificação de compêndios oficiais ou previamente desenvolvido e validado. A partir da curva resultante determina-se a cinética do processo de dissolução, e outros parâmetros, tais como, o tempo de latência da forma farmacêutica (tempo para o início do processo de desagregação), eficiência e velocidade de dissolução (STORPIRTIS *et al*, 2004). O tipo de fármaco, a sua forma polimórfica, cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade e quantidade incorporada na forma farmacêutica podem influenciar a cinética de liberação (EL-ARINI;LEUENBERGER, 1995; COSTA, P.;LOBO, J.M.S., 2001)

Há uma grande dificuldade na comparação dos resultados do perfil de dissolução, pois apesar de haver vários métodos propostos para esse fim ainda não está determinado qual o melhor para cada caso. A interpretação quantitativa dos valores obtidos nos ensaios de dissolução é facilitada pela utilização de uma equação genérica, que traduz matematicamente a curva de dissolução em função de alguns parâmetros relacionados com a forma farmacêutica. Em alguns casos, essa equação resulta da simples análise teórica do processo, como é o caso da cinética de ordem zero. Porém, na maioria dos casos, não existe um fundamento teórico, sendo adotada uma equação empírica mais adequada (EL-ARINI;LEUENBERGER, 1995; COSTA, P.;LOBO, J.M.S., 2001).

Os métodos para comparação dos perfis de dissolução podem ser classificados em três categorias: modelos baseados na análise da variância (ANOVA), modelos independentes e modelos dependentes. Os independentes são divididos em testes de razão (razão de porcentagem dissolvida, área sob a curva ou tempo de dissolução médio) e testes combinados (fatores de diferença f_1 e semelhança f_2 e índices de Rescigno). Os dependentes englobam os modelos matemáticos, entre os quais se destacam: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, Hixson-Crowell, Higushi, Weibull,

Baker-Lonsdale, Korsmeyer-Peppas (COSTA, P.; LOBO, J.M.S., 2001; COSTA, P.; LOBO, J. M.S., 2001; SERRA; STORPIRTIS, 2007).

Dentre todos os métodos propostos na literatura para realização da comparação dos perfis de dissolução, os fatores de diferença f1 e semelhança f2 apresentam fácil aplicação e interpretação, sendo f2 adotado pela ANVISA e FDA como método para comparação dos perfis de dissolução de genéricos e similares com o do referência (FDA-CDER, 1997; BRASIL, 2010). Estes fatores são duas equações que permitem avaliar a diferença ou semelhança entre a porcentagem de fármaco dissolvido por unidade de tempo entre um produto teste e outro de referência. Porém, para fármacos muito solúveis f2 perde seu poder discriminativo e é necessário comprovar a rápida dissolução através do gráfico da curva de dissolução (BRASIL, 2010). O fator f2 é calculado através da equação a seguir:

$$F2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (4)$$

Onde n é o número de tempos de coleta, Rt é a porcentagem de dissolução do medicamento referência em um tempo t e Tt é a porcentagem de dissolução do medicamento teste no tempo t. Quanto mais próximo de 100 o valor de f2, maior a semelhança entre os objetos de estudo. Para os perfis de dissolução de dois medicamentos serem considerados semelhantes f2 deve possuir valor entre 50 e 100.

A eficiência de dissolução (ED%) é definida como a área sob a curva de dissolução até um determinado tempo expressa como porcentagem da área que corresponderia a 100% de dissolução nesse mesmo tempo (COSTA, P.; LOBO, J. M.S., 2001). É um método amplamente utilizado, que avalia não apenas a quantidade de fármaco liberado ao fim de um determinado tempo, mas a cinética de liberação ao longo de todo o período em questão. Devido a esta característica poder ser teoricamente relacionado com os dados in vivo, uma vez que a extensão da absorção de um fármaco in vivo é proporcional à concentração do fármaco dissolvida e ao tempo que este permanece em

contato com as regiões de absorção do trato gastrointestinal (KHAN, 1975; MANADAS;PINA;VEIGA, 2002).

Os modelos dependentes são baseados em modelos matemáticos que, após seleção de uma função adequada, permitem avaliar os perfis em relação aos parâmetros derivados do modelo aplicado. Através dos modelos cinéticos podem ser tiradas conclusões a respeito da velocidade do processo, da quantidade máxima dissolvida e dos pontos nos quais podem ocorrer mudanças significativas na dissolução (SERRA;STORPIRTIS, 2007).

O modelo cinético de ordem zero representa a dissolução de fármacos contidos em formas farmacêuticas que não desagregam e com liberação lenta, desde que a sua área não se altere nem sejam atingidas condições de equilíbrio. Formulações que seguem este perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, sendo o modelo de ordem zero o ideal para as formas farmacêuticas de liberação prolongada (COSTA, P.;LOBO, J.M.S., 2001; MANADAS;PINA;VEIGA, 2002).

Para formas farmacêuticas de liberação imediata a cinética característica é a chamada de primeira ordem. O fármaco é liberado de forma proporcional à quantidade remanescente no seu interior, de tal modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui, é o caso de fármacos hidrossolúveis contidos em matrizes porosas (COSTA, P.;LOBO, J.M.S., 2001; MANADAS;PINA;VEIGA, 2002).

Higuchi desenvolveu vários modelos para estudar a liberação de fármacos solúveis e poucos solúveis a partir de matrizes semi-sólidas e sólidas. O modelo conhecido como Higuchi ou pseudo zero ordem descreve a liberação como um processo de difusão fundamentado na lei de Fick, onde a porcentagem de fármaco liberada é dependente da raiz quadrada do tempo. Esse modelo caracteriza formas farmacêuticas de liberação modificada, nas quais a dissolução ocorre com velocidade controlada (COSTA, P.;LOBO, J.M.S., 2001; MANADAS;PINA;VEIGA, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os padrões de captopril (CAP) e hidroclorotiazida (HCTZ) utilizados foram adquiridos do INCQS - Farmacopéia Brasileira e possuem pureza de 99,6 e 100,1% respectivamente. Foram utilizados padrões USP de dissulfeto de captopril (CAD) (99%) e clorotiazida (CTZ) (99,2%), enquanto benzotiadiazina (BTDZ) com pureza de 98% foi adquirida da Sigma-Aldrich. Todos os padrões se encontravam dentro do prazo de validade.

As formas farmacêuticas foram comprimidos de CAP 25mg, HCTZ 25 mg e a associação CAP e HCTZ 50 / 25 mg adquiridos em farmácias comerciais de Curitiba. Foram comprados medicamentos genéricos de CAP de sete diferentes marcas intitulados GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6 e GC7 e seis similares intitulados SC1, SC2, SC3, SC4, SC5 e SC6, além do medicamento referência Capoten (REFC). Foram encontrados quatro similares (SH1, SH2, SH3 e SH4) e dois genéricos (GH1 e GH2) de HCTZ, além do medicamento referência Clorana (REFH). O medicamento referência para a associação de CAP e HCTZ, Lopril D(REFCH), foi utilizado no desenvolvimento do método, e além dele foram analisados dois genéricos da associação denominados GCH1 e GCH2. Como fabricantes desses medicamentos encontram-se: Biosintética, Bristol-Myers Squibb, Cazi, Cifarma, Cimed, EMS, Eurofarma, Geolab, Germed, Hexal, Medley, Multilab, Sandoz, Sanofi-Aventis, Teuto, União Química, Vitapan.

Os excipientes de grau farmacêutico utilizados foram: lactose, amido, celulose microcristalina, estearato de magnésio e ácido esteárico.

As vidrarias volumétricas utilizadas estavam calibradas. As filtrações da fase móvel foram realizadas em membrana de PTFE 0,45 µm com 47 mm de diâmetro, enquanto as das amostras em filtro de seringa PVDF 0,45 µm com 11 mm de diâmetro (Millex®), ambos adquiridos da Millipore. As pipetagens foram realizadas com micropipetas analíticas Gilson calibradas. Os reagentes

utilizados na composição da fase móvel e soluções diluentes foram: água ultrapura obtida através de ultrapurificador de água Milli-Q A10 Gradiente-Millipore Corporation (Bedford, EUA), ácido fosfórico 85,8% PA, ácido fórmico 88% grau CLAE, fosfato de sódio monobásico PA, acetonitrila (ACN) e metanol grau CLAE da J. T. Baker (Phillipsburg, USA) e ácido clorídrico 37% (F.Maia). Soluções tampão de pH 4,01 e 7,01 (Merck) foram utilizados para calibração do pHmetro.

As colunas analíticas utilizadas foram: Waters Spherisorb® ODS 5 µm, 4,6 x 250 mm, Waters XBridge™ C18 5 µm, 4,6 x150 mm Lote 0115370461, Waters XBridge™ C8 5 µm, 4,6 x150 mm Lote 0104370461 e Agilent Zorbax Eclipse XDB-Phenyl 5 µm, 4,6 x150 mm do Lote B09097.

Os equipamentos utilizados foram: banho de ultra-som Branson 2510, balança analítica Mettler Toledo XP 205, pHmetro digital HI8519N Hanna, espectrofotômetro UV-VIS Agilent 8452, agitador de balões Large Capacity Mixer da Glas-Col®, friabilômetro e durômetro Nova Ética, cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1100 Series equipado com detector DAD e software ChemStation® versão A.10.02 e dissolutor modelo SR8 Plus acoplado ao Auto Plus Maximizer, ambos da Hanson Research.

4.2 ANÁLISES ATRAVÉS DO CLAE-DAD

4.2.1 PREPARO DOS PADRÕES

As soluções estoque dos padrões de CAP, HCTZ, CAD, CTZ e BTZ foram preparadas em metanol nas concentrações de 50 mg/mL (CAP), 10 mg/mL (HCTZ) e 1 mg/mL (CAD, CTZ e BTZ). As soluções de CAD e CTZ foram armazenadas a 4°C em frascos âmbar e recondicionadas a temperatura ambiente antes do uso, o tempo total de armazenamento foi de 30 dias. Já as soluções estoque de CAP, HCTZ e BTZ foram preparadas imediatamente antes do uso. A solução padrão de trabalho foi preparada pela mistura das soluções estoque seguida de diluição com ácido fosfórico 0,067% : ACN

(85:15, v/v) para se obter uma concentração final de 1000 µg/mL para CAP, 500 µg/mL para HCTZ, 30 µg/mL para CAD, 2,5 µg/mL para CTZ e 5 µg/mL para BTZD. A partir desta outras soluções de trabalho foram preparadas através de novas diluições, conforme a exigência de cada experimento. Todas as soluções de trabalho foram preparadas na mesma solução diluente descrita e filtradas em filtro de seringa de PVDF (0,45 µm de poro, Millipore Millex) antes das injeções no HPLC.

4.2.2 ANÁLISE DOS PADRÕES POR ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA (UV)

Os espectros de absorção no UV de cada composto de interesse foram obtidos através de ensaios de varredura em um espectrofotômetro UV-VIS Agilent 8453 e os dados foram processados através do software UVVIS Win System A 10.01. Para tanto, soluções estoque dos padrões de CAP, HCTZ, CAD, CTZ e BTZD foram diluídas separadamente em ácido fosfórico 0,067% : ACN (85:15, v/v) de modo a se obter a concentração de 10 µg/mL de cada composto. Estas soluções foram submetidas à varredura na região de 200 a 400 nm utilizando como branco a solução diluente citada. As bandas de absorção de cada composto foram avaliadas e em seguida os espectros de varredura foram sobrepostos. O comprimento de onda escolhido foi aquele em que todos os compostos podem ser monitorados com intensidade e seletividade adequados.

4.2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS

Vinte comprimidos de CAP, HCTZ ou sua associação foram triturados e misturados até se obter um pó homogêneo. Quantidade equivalente a um comprimido (50 mg de CAP ou 25 mg de HCTZ) foi pesada e dissolvida em 15 mL de solução diluente (ácido fosfórico: ACN; 85:15, v/v) em um balão

volumétrico de 25 mL. As amostras foram sonicadas por 15 min e adicionadas de 2,5 mL de ACN para favorecer a dissolução da HCTZ. Novamente as amostras foram sonicadas por 15 min e em seguida realizou-se sua agitação mecânica por 10 min a 40 rpm. O volume foi ajustado com solução diluente (ácido fosfórico: ACN; 85:15, v/v) e as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4000 rpm. Um volume de 500 µL do sobrenadante foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a solução diluente. Antes das injeções, as amostras foram filtradas em filtro de seringa de PVDF (0,45 µm, Millipore Millex).

4.2.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

A primeira etapa consistiu na obtenção do espectro de varredura na região do UV-Vis dos fármacos e seus compostos relacionados, para escolha do melhor comprimento de onda para a sua quantificação quando presentes em associação.

Para o desenvolvimento do método escolheu-se a coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-Phenyl 4,6 x150 mm com partícula de 5 µm de diâmetro, outras colunas foram avaliadas posteriormente na otimização do método. A solução de trabalho utilizada como referência no desenvolvimento foi preparada a partir de uma solução estoque de forma a conter todos os compostos em concentração conhecida. A escolha da coluna se baseou no tempo de retenção, eficiência da coluna (número de pratos teóricos), resolução, fator de cauda e tempo de corrida.

A seleção da fase móvel se baseou na capacidade de eluição dos fármacos com boa resolução em um período de tempo aceitável para uma corrida analítica. Foram avaliadas diferentes combinações de soluções aquosas com solventes orgânicos levando em consideração o perfil cromatográfico obtido. As soluções aquosas: ácido fosfórico 0,067%, tampão fosfato 10 mM e ácido fórmico 0,05% foram combinadas em diferentes proporções com os solventes orgânicos ACN e metanol nos modos de eluição

isocrático e gradiente. Diferentes fluxos e temperaturas foram testados com a finalidade de melhorar o tempo de corrida e perfil cromatográfico. O fluxo variou de 1,0 a 1,5 mL/min e a temperatura do forno de 25 °C a 50 °C.

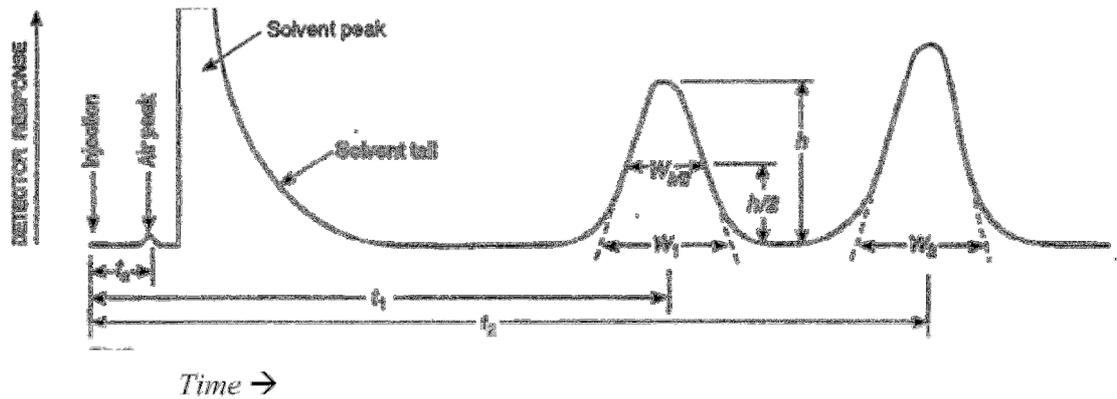
4.2.5 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CLAE-DAD

A quantificação por CLAE-DAD dos fármacos e seus compostos relacionados foi realizada nas seguintes condições cromatográficas:

- Fase móvel: mistura de (A) ácido fosfórico 0,067% (pH 2,5) e (B) ACN.
- Modo de eluição gradiente: $t_{0-3,0}$ min: B=15%; $t_{3,1-6,5}$ min: B=35%; $t_{6,6-8,0}$ min: B=15%.
- Coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-Phenyl 5 μ m, 4,6 x150 mm.
- Temperatura de forno: 40 °C.
- Fluxo: 1,2 mL/min.
- Volume de injeção: 20 μ L.

4.2.6 CÁLCULO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Foram analisados os seguintes parâmetros cromatográficos: tempo de retenção (T_r), fator de retenção (K'), resolução (R_s), número de pratos teóricos (N) e fator de cauda (T) para cada composto de interesse. Esses parâmetros foram calculados segundo a Farmacopéia Americana 31ª edição (USP, 2008). As Figuras 4 e 5 demonstram as características cromatográficas utilizadas para calcular os parâmetros e as equações 5 a 8 a forma pela qual são calculados os parâmetros cromatográficos. A eficiência da separação foi monitorada pelos parâmetros N , R_s e T .



- T_1 : tempo de retenção do pico 1;
- T_2 : tempo de retenção do pico 2;
- W_1 : largura da base do pico 1;
- $W_{h/2}$: largura da base do pico em meia altura;
- W_2 : largura da base do pico 2;
- h : altura do pico;
- $h/2$: meia altura do pico;

FIGURA 4 – DEMONSTRAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS
 FONTE: (USP, 2008)

- Fator de retenção ou capacidade:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (5)$$

t_R = tempo de retenção do composto
 t_0 = tempo morto da coluna

- Resolução entre os picos (R_s):

$$R_s = \frac{2 \times |t_1 - t_2|}{W_1 + W_2} \quad (6)$$

t_1 = tempo de retenção do composto 1
 t_2 = tempo de retenção do composto 2
 W_1 = largura da base do pico do composto 1
 W_2 = largura da base do pico do composto 2

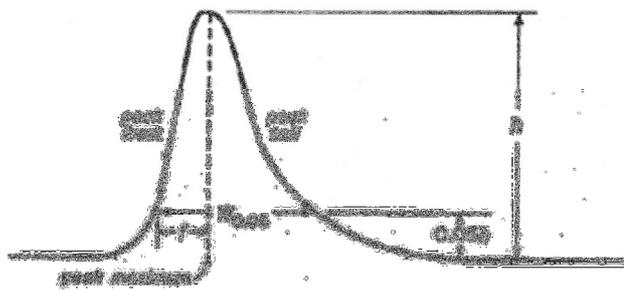
- Número de pratos teóricos da coluna (N):

$$N = 16 \times (t_1 / W_1)^2 \quad (7)$$

t_1 = tempo de retenção do composto 1

W_1 = largura da base do pico do composto

Fonte: (USP, 2008)



$W_{0,05}$: largura da base do pico em 5% da altura do pico;

h : altura do pico;

$0,05h$: 5% da altura do pico;

f : largura da base da parte frontal do pico.

FIGURA 5 – EXEMPLO DE PICO CROMATOGRÁFICO ASSIMÉTRICO

- Fator de cauda do pico:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (8)$$

4.2.7 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS

A identificação dos compostos relacionados foi realizada comparando-se os tempos de retenção e os espectros de ultravioleta das amostras e dos padrões sob as mesmas condições de análise por CLAE.

4.2.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-DAD

Os parâmetros especificados para a validação são: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão, limite de quantificação e de detecção, e robustez. A validação deste método se baseou na norma do ICH e legislação brasileira de validação de métodos analíticos vigente conforme a ANVISA (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

4.2.8.1 Seletividade

Para verificação da seletividade foi utilizado o método da comparação da matriz, que consistiu na comparação do cromatograma obtido para uma matriz contendo CAP (100 µg/mL), HCTZ (50 µg/mL), CAD (9,0 µg/mL), CTZ (0,75 µg/mL) e BTDZ (1,5 µg/mL), com o cromatograma obtido para uma matriz placebo isenta dos analitos de interesse. Para o preparo das matrizes foram utilizados os excipientes indicados na bula do medicamento da associação de CAP e HCTZ, Lopril-D. As matrizes foram preparadas misturando-se lactose, estearato de magnésio, amido, celulose microcristalina e ácido esteárico de forma a contê-los nas proporções de 75, 1, 12, 10 e 2%, respectivamente (ROWE;SHESKEY;OWEN, 2006). A seletividade foi determinada pela ausência de picos na mistura placebo nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse.

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

O LD e o LQ do método foram determinados para todos os compostos através da relação sinal/ruído. Para tanto, uma solução contendo 10 µg/mL de cada composto foi diluída em série com a mistura ácido fosfórico 0,067% : ACN (85:15, v/v) até a obtenção do menor pico detectável. As diluições foram feitas em triplicata até a concentração de 0,005 µg/mL. Foi considerado como LD a

menor concentração que resultou em um pico de três vezes o ruído da linha de base e como LQ a menor concentração que resultou em um pico de dez vezes o ruído da linha de base.

4.2.8.3 Linearidade

A Legislação Brasileira e o ICH recomendam que a linearidade seja determinada com, no mínimo, cinco concentrações diferentes e cada ponto em triplicata (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Neste método, utilizamos sete pontos em triplicata sendo a menor concentração correspondente ao LQ.

Os valores encontrados foram plotados em um gráfico da área dos picos cromatográficos (eixo y) pela concentração da amostra (eixo x) para verificar a linearidade do método na faixa de concentração testada. A determinação da linearidade foi feita através da análise da regressão linear, através da qual se estabeleceu o coeficiente de correlação, interseção no eixo y e coeficiente angular.

O intervalo de trabalho foi definido de acordo com a legislação vigente. Compreendeu, para os compostos relacionados, do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Para os fármacos o intervalo compreendeu a faixa de 80-120% da concentração de trabalho (BRASIL, 2003).

4.2.8.4 Precisão

A precisão foi avaliada através do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação entre os resultados de uma série de medidas, de uma mesma amostra. Foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária (BRASIL, 2003).

O ensaio de repetibilidade foi realizado em três níveis de concentração para CAP (80, 100 e 120 $\mu\text{g/mL}$) e HCTZ (40, 50 e 60 $\mu\text{g/mL}$), e em quatro

níveis para os compostos relacionados: CAD (0,313, 7,2, 9,0 e 10,8 µg/mL), CTZ (0,078, 0,6, 0,75 e 0,9 µg/mL) e BTDZ (0,02, 1,2, 1,5 e 1,8 µg/mL). Os compostos relacionados foram avaliados na concentração de 3 x o limite no nível de 100%, em ± 20% desta e na concentração correspondente ao seu limite de quantificação. As amostras foram preparadas em um curto período de tempo (no mesmo dia), pelo mesmo analista e analisadas sob as mesmas condições. A dispersão entre os resultados das duas corridas analíticas foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV%) (BRASIL, 2003; USP, 2011).

A precisão intermediária foi realizada pela execução do mesmo procedimento por um segundo analista após um intervalo de dois dias. Os resultados dos dois analistas foram comparados pela mesma ferramenta utilizada para a repetibilidade (BRASIL, 2003; USP, 2011).

4.2.8.5 Exatidão

A exatidão foi verificada através do método de recuperação, em que quantidades conhecidas dos compostos de interesse foram adicionadas a uma mistura de excipientes (placebo do Lopril-D). A mistura placebo foi composta por 75% de lactose, 1% de estearato de magnésio, 12% de amido, 10% de celulose microcristalina e 2% de ácido esteárico. Esses excipientes foram pesados de forma a totalizar o peso de excipiente em um comprimido de Lopril-D, adicionados de quantidades conhecidas dos padrões dos analitos e preparados conforme o item 4.2.3 do preparo de amostras de medicamentos.

A diferença entre a resposta referente a quantidade recuperada e a quantidade teórica (adicionada) é chamada de recuperação ou exatidão do método. Sua determinação foi feita nas mesmas concentrações descritas no item 4.2.8.4 da precisão. A porcentagem de recuperação foi calculada através da equação abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (9)$$

4.2.8.6 Robustez

Para a realização deste ensaio mudanças no fluxo ($\pm 0,05$ mL/min), temperatura ($\pm 2^\circ\text{C}$), pH da solução de ácido fosfórico ($\pm 0,1$) e composição da fase móvel (% de fase orgânica e aquosa) ($\pm 0,5\%$) foram realizadas, e os resultados obtidos no método modificado foram comparados com aqueles obtidos no método original. O método é considerado robusto quando os limites de precisão, exatidão e seletividade permanecem dentro dos critérios de aceitação após as modificações. Em nossos ensaios, a resolução entre os picos cromatográficos foi utilizada para avaliar a seletividade, enquanto que o ensaio de recuperação, na avaliação da precisão e da exatidão do método frente às modificações. Além disso, o fator de cauda foi avaliado para verificar o desempenho do método frente a cada mudança realizada.

Os ensaios foram realizados pela injeção de uma sextuplicata de uma solução de trabalho contendo uma mistura de $100\ \mu\text{g/mL}$ de CAP, $50\ \mu\text{g/mL}$ de HCTZ, $3\ \mu\text{g/mL}$ de CAD, $0,25\ \mu\text{g/mL}$ de CTZ e $0,5\ \mu\text{g/mL}$ de BTZD. As ferramentas estatísticas: DPR%, intervalo de confiança, teste *t* de Student e ANOVA (one way) foram empregadas para avaliar a influência das modificações nos dados obtidos.

4.3 ENSAIOS DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

A equivalência farmacêutica entre os medicamentos genéricos e similares e o medicamento referência para comprimidos de CAP e comprimidos de HCTZ foi verificada através dos ensaios farmacopéicos de identificação, determinação de peso, dureza, friabilidade, teste de desintegração, uniformidade de doses unitárias, teste de dissolução, ensaio de pureza (captopril) e doseamento.

Uma vez que a Farmacopéia Brasileira não apresenta monografia para esta associação, e o estabelecimento da equivalência farmacêutica deve cumprir os ensaios de compêndio oficial, a farmacopéia americana 31^a edição

foi adotada. Nesta, os ensaios previstos são apenas os de identificação, dissolução, uniformidade de doses unitárias, limite de CAD e BTZD e doseamento.

4.3.1 IDENTIFICAÇÃO

A identificação é positiva quando o tempo de retenção e o espectro de UV do pico principal do cromatograma da solução amostra, obtidos no método de doseamento de cada fármaco, equivale aquele do pico principal da solução do seu padrão. Os resultados para este teste foram obtidos da mesma corrida analítica efetuada para o doseamento dos fármacos.

4.3.2 DETERMINAÇÃO DE PESO

Para a determinação do peso médio dos comprimidos de CAP, HCTZ e da sua associação, 20 comprimidos foram pesados individualmente e a média da massa foi calculada. De acordo com a farmacopéia brasileira, no máximo duas unidades podem estar fora do limite especificado e nenhuma pode estar fora do dobro deste. Para comprimidos com valor nominal declarado de até 80 mg o limite especificado é de $\pm 10\%$ em relação ao peso médio.

4.3.3 DUREZA

A dureza expressa a resistência do comprimido à ruptura por pressão radial e foi determinada através do durômetro de bancada autônomo MOD. 298 ATTS da Nova Ética. O teste foi realizado com 10 comprimidos de cada medicamento analisado. A dureza média mínima aceitável é de 45 N ou 4,5 kgf.

4.3.4 FRIABILIDADE

O ensaio de friabilidade avalia a resistência dos comprimidos à abrasão. É expressa em porcentagem de pó perdido após a realização do ensaio em friabilômetro (MOD 300-1 da Nova Ética). Foram pesados 20 comprimidos os quais foram submetidos a rotações de 25 rpm por 4 minutos, totalizando 100 rotações. Após removido o pó, foram pesados novamente e a massa perdida foi calculada pela diferença entre a massa inicial e a final; a perda máxima aceitável é de 1,5% do peso.

4.3.5 TESTE DE DESINTEGRAÇÃO

O teste de desintegração determina se o comprimido se desintegra dentro do limite de tempo especificado. Para a realização deste ensaio, comprimidos (n=6) foram desintegrados utilizando-se um equipamento de desintegração da Ética Equipamentos Científicos S.A. MOD. 301. O ensaio consiste na alternância entre submersão e emersão dos comprimidos em água a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para tanto, as formas farmacêuticas foram colocadas dentro de um aparato específico e o aparelho acionado por 30 min. A desintegração total de todos os comprimidos deve ocorrer nesse período.

4.3.6 UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS

A uniformidade de doses unitárias foi avaliada através do método da uniformidade de conteúdo. Para isso 10 comprimidos de CAP foram adicionados separadamente a balão volumétrico (25 mL) contendo 5 mL de água e desintegrados. Em seguida, foram adicionados de 12,5 mL da mistura etanol: água (1:1, v/v), sonicados por 15 min, agitados mecanicamente por 15 min e o volume completado com a mesma mistura. Após homogeneizadas e filtradas, as soluções foram diluídas até concentração de 0,02% (m/v) e então

analisadas através de UV (BRASIL, 2005). O teor foi determinado por comparação com um padrão preparado na mesma concentração. Inicialmente as amostras foram avaliadas em aparelho de UV (212 nm) e CLAE (220 nm), porém devido a conformidade entre os resultados obtidos nos dois aparelhos e a maior praticidade do CLAE frente ao grande número de amostras a serem analisadas, posteriormente apenas o método por CLAE para doseamento descrito na farmacopéia brasileira foi utilizado.

Para a análise de comprimidos de HCTZ, 10 unidades foram adicionadas separadamente a balão volumétrico (100 mL) contendo 10 mL de fase móvel (fosfato de sódio monobásico 0,1 mol/L : Acetonitrila (9:1), pH 3,0). Na sequência foram sonicadas por 5 min, adicionadas de 10 mL de ACN e sonicadas novamente por 5 min. Metade do volume foi completado com fase móvel e as soluções foram agitadas mecanicamente por 10 min. O volume foi então completado com fase móvel e as soluções foram homogeneizadas, filtradas e analisadas por CLAE. O teor foi determinado por comparação com um padrão preparado na mesma concentração.

Os comprimidos da associação de CAP e HCTZ foram preparados individualmente, porém seguindo o preparo de amostra descrito no item 4.2.3, e submetidos a análise por CLAE utilizando o método desenvolvido e validado descrito neste trabalho.

O critério de aceitação é que de 10 unidades testadas, no máximo uma fique fora da faixa de 85 a 115% e nenhuma ultrapasse a faixa de 75 a 125%, sendo que o desvio padrão relativo (DPR) deve ser menor que 6%. Porém, quando uma unidade ultrapassa o teor de 85-115% mas respeita a faixa de 75-125% mais vinte unidades devem ser testadas. O critério de aceitação para as 30 unidades é que no máximo uma fique fora da faixa de 85% a 115%, nenhuma fique fora da faixa de 75% a 125% e o DPR seja $\leq 7,8\%$.

4.3.7 TESTE DE DISSOLUÇÃO

O teste foi realizado em sextuplicata em um dissolutor modelo SR8 Plus da Hanson Research nas seguintes condições:

- Captopril: cubas com 900 mL de HCl 0,1 mol/L como meio de dissolução, com o aparato cesta a 50 rpm por 20 min. A quantidade de captopril dissolvida foi analisada por CLAE a 220 nm sendo que os valores de dissolução devem ser superiores a 80% da quantidade declarada.
- Hidroclorotiazida: cubas com 900 mL de HCl 0,1 mol/L como meio de dissolução, com o aparato cesta a 150 rpm por 30 min. A quantidade de hidroclorotiazida dissolvida foi analisada por CLAE a 272 nm devendo a dissolução ser superior a 60% da quantidade declarada.
- Captopril e Hidroclorotiazida: cubas com 900 mL de HCl 0,1 mol/L como meio de dissolução, com o aparato cesta a 50 rpm por 30 min. A porcentagem de dissolução de captopril e hidroclorotiazida foi determinada por CLAE a 220 nm com valores de dissolução esperados maiores que 80% em 20 min para CAP e 60% em 30 min para HCTZ.

4.3.8 ENSAIO DE PUREZA

4.3.8.1 Limite de dissulfeto de captopril

A amostra foi preparada conforme descrito pela Farmacopéia Brasileira IV no doseamento de comprimidos de captopril e analisada por CLAE. O limite de dissulfeto de captopril na amostra é de no máximo 3% da quantidade de captopril. No caso dos comprimidos da associação, a determinação foi realizada a partir da mesma amostra e corrida analítica desenvolvidas para o ensaio de doseamento, uma vez que o método utilizado foi o desenvolvido no

presente trabalho e permite a determinação dos ativos e seus compostos relacionados simultaneamente.

4.3.8.2 Limite de Benzotiadiazina composto relacionado A

Esse ensaio foi realizado apenas para os comprimidos da associação de fármacos pois está previsto na farmacopéia americana - USP, monografia seguida para a avaliação da equivalência farmacêutica nesse tipo de apresentação. Sua determinação, assim como a do dissulfeto de captopril pode ser feita simultaneamente ao doseamento. O limite de BTZ na amostra é de no máximo 1% em relação a quantidade de HCTZ.

4.3.9 DOSEAMENTO

Foram pulverizadas vinte unidades da amostra e preparadas conforme previsto nas monografias de comprimidos de HCTZ e CAP da Farmacopéia Brasileira IV ed. Os teores limite determinados pelos compêndios oficiais para o captopril são 90-110% (Farmacopéia Brasileira e USP) e para a hidroclorotiazida são 93-107% (Farmacopéia Brasileira) e 90-110% (USP) (BRASIL, 2005; USP, 2008; 2011). Segundo a resolução RE nº 310 de 1º de setembro de 2004 a diferença entre o teor de fármaco dos medicamentos testados e o do medicamento referência não pode ser superior a 5% (BRASIL, 2004). Os comprimidos da associação de CAP e HCTZ foram preparados segundo o item 4.2.3 de preparo de amostra de medicamentos e submetidos a análise por CLAE utilizando o método desenvolvido e validado exposto neste trabalho.

Para o doseamento do CAP, massa equivalente a 25 mg de CAP foi dissolvida em 15 mL de FM em balão volumétrico de 25 mL. Sonicada por 15 min e agitada mecanicamente por 15 min. O volume foi completado com FM e a amostra foi homogeneizada e filtrada antes de ser analisada por CLAE. Já

para os comprimidos de HCTZ, uma tomada de amostra equivalente a 25 mg de HCTZ foi pesada e dissolvida em 10 mL de FM em balão volumétrico de 100 mL. Sonicada por 5 min, adicionada de 10 mL de ACN e sonicada por mais 5 min. O volume foi completado até a metade com FM e em seguida a solução foi agitada mecanicamente por 10 min. O volume foi completado com FM e a solução homogeneizada, filtrada e analisada por CLAE.

4.3.10 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As condições cromatográficas empregadas nos ensaios referentes a equivalência farmacêutica de comprimidos de CAP e HCTZ são descritas nas monografias farmacopéicas destes medicamentos. Para a associação e na avaliação dos perfis de dissolução foi utilizado o método desenvolvido e validado no nosso laboratório.

Para análise de captopril, a fase móvel consistiu em uma mistura de metanol : ácido fosfórico 0,11% (55:45) a um fluxo de 1 mL/min, coluna de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm) foi utilizada, temperatura de 25°C e cromatógrafo equipado com detector de ultravioleta a 220 nm.

Para a hidroclorotiazida empregou-se fase móvel fosfato de sódio monobásico 0,1 mol/L: acetonitrila (9:1) pH = 3,0 a um fluxo de 1,5 mL/min, coluna de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm), temperatura de 25°C e cromatógrafo equipado com detector de ultravioleta a 254 nm.

A coluna utilizada foi Waters Spherisorb® ODS 5 µm, 4,6 x 250 mm.

4.3.11 PERFIL DE DISSOLUÇÃO

O perfil de dissolução foi determinado em triplicata para os medicamentos sob as mesmas condições previstas no ensaio de dissolução da monografia de comprimidos de CAP, HCTZ e da associação, conforme a 31ª edição da USP. As condições do ensaio foram programadas no dissolutor SR8 Plus da Hanson Research e no Auto Plus Maximizer.

Condições para determinação do perfil de dissolução de comprimidos de CAP:

- cubas contendo 900 mL do meio de dissolução ácido clorídrico 0,01 mol/L à 37°C
- aparato I (cesta)
- velocidade de rotação de 50 rpm
- alíquotas em 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 min

Segundo a USP, a quantidade de CAP dissolvida deve ser superior a 80% da quantidade declarada em 20 min.

Condições para determinação do perfil de dissolução de comprimidos de HCTZ:

- cubas contendo 900 mL do meio de dissolução ácido clorídrico 0,1 mol/L à 37°C
- aparato I (cesta)
- velocidade de rotação de 100 rpm
- alíquotas em 3, 5, 10, 20, 30, 50, 60 e 70 min

Segundo a USP, a quantidade de HCTZ dissolvida deve ser superior a 60% da quantidade declarada em 60 min.

Condições para determinação do perfil de dissolução de comprimidos de CAP e HCTZ:

- cubas contendo 900 mL do meio de dissolução ácido clorídrico 0,1 mol/L à 37°C
- aparato I (cesta)
- velocidade de agitação de 50 rpm
- alíquotas em 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min

Segundo a USP, CAP deve apresentar no mínimo 80% de dissolução em relação a quantidade declarada em 20 min e HCTZ mais de 60% em 30 min.

Alíquotas de 5 mL foram retiradas sem reposição de meio e filtradas por filtro de seringa de PVDF de 0,45 µm diretamente para vial para a análise por CLAE-DAD.

4.3.12 COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

A comparação dos perfis de dissolução foi feita por análise de variância (ANOVA), modelos independentes (Eficiência de Dissolução e fator de semelhança f_2) e por modelos dependentes (Cinética de Liberação).

Para a análise baseada na ANOVA, foram utilizadas as porcentagens de dissolução de cada medicamento em triplicata em todos os tempos de coleta, ou seja, os dados foram utilizados integralmente. Estas porcentagens foram calculadas a partir das áreas dos picos observados no cromatograma e da equação de reta da curva de calibração.

A eficiência de dissolução (ED%) é definida como a relação entre a área sob a curva (ASC) de dissolução e a área total do gráfico, foi calculada a partir da ASC obtida plotando-se a porcentagem de fármaco dissolvida em função do tempo. A comparação entre os valores de ED% foi realizada por análise de variância (ANOVA – fator único) para determinar se eram semelhantes ou não.

Foram empregados três modelos para determinar a cinética de liberação dos fármacos nos medicamentos avaliados: cinética de zero ordem, cinética de

primeira ordem e Higuchi. O modelo que melhor caracteriza a liberação é determinado a partir da análise de regressão linear realizada no intervalo em que ocorre liberação de fármaco a partir da formulação, sem formação de platô.

Para o modelo de ordem zero, construiu-se um gráfico que relacionou quantidade de fármaco não dissolvida ($Q_{\text{alfa}} - Q$) com o tempo (min). Onde Q_{alfa} corresponde a quantidade de fármaco total e Q a quantidade dissolvida. O modelo de primeira-ordem foi avaliado através do gráfico que relacionou logaritmo neperiano da porcentagem de fármaco não dissolvida ($\ln\%ND$) e o tempo (minutos). Para avaliar o modelo de Higuchi, foi traçado um gráfico de porcentagem de dissolução em função da raiz quadrada do tempo. O modelo mais adequado foi determinado para cada formulação e fármaco através do coeficiente de correlação de Pearson (R^2) observado, quanto mais próximo de 1, o valor mais perto a curva está da linearidade perfeita.

O fator de semelhança f_2 foi calculado segundo a equação apresentada no ítem 3.10, os perfis de dissolução de dois medicamentos foram considerados semelhantes quando um valor de f_2 entre 50 e 100 foi obtido.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CLAE-DAD

Os parâmetros cromatográficos iniciais definidos como ponto de partida para o desenvolvimento analítico foram baseados nos dados da revisão de literatura, nos pontos em comum entre os métodos existentes de quantificação por CLAE dos fármacos em formas farmacêuticas.

5.1.1 ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA

A primeira etapa para o desenvolvimento do método através de CLAE-DAD foi verificar o comprimento de onda ideal para detecção dos compostos. Com essa finalidade, soluções de trabalho de captopril (10 µg/mL), dissulfeto de captopril (10 µg/mL), hidroclorotiazida (10 µg/mL), clorotiazida (10 µg/mL) e benzotiadiazina (10 µg/mL) em ácido fosfórico 0,067% : ACN (85:15, v/v) foram submetidas à varredura em luz ultravioleta de 200 a 400nm. Os espectros foram analisados individualmente e em seguida sobrepostos para facilitar a observação do comprimento de onda onde todos os compostos apresentam absorção adequada, como mostrado na Figura 6.

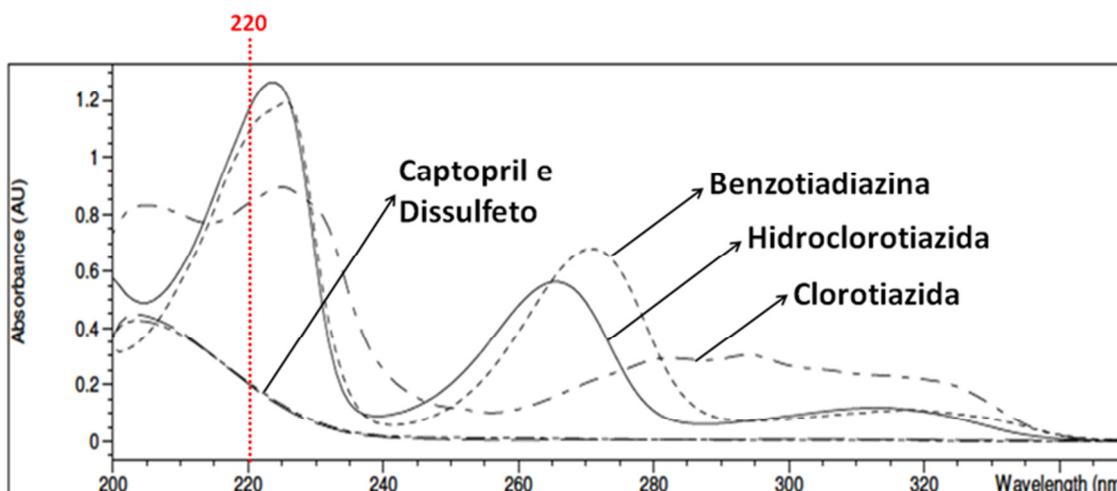


FIGURA 6 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV DE CAPTOPRIL, HIDROCLOROTIAZIDA, DISSULFETO DE CAPTOPRIL, CLOROTIAZIDA E BENZOTIADIAZINA A 10 µg/mL EM ÁCIDO FOSFÓRICO 0,067% : ACN (85:15, V/V).

Captopril e dissulfeto de captopril não possuem bons grupos cromóforos (Fig. 1 e 2) e por isso, como já era esperado, apresentaram baixa absorvidade molar quando comparados a hidroclorotiazida e seus compostos relacionados, os quais apresentam anel ressonante em sua estrutura (Fig. 3).

Na sobreposição dos espectros foi possível observar que captopril (CAP) e seu dímero, dissulfeto de captopril (CAD), são as substâncias que possuem as menores absorvidades (uma vez que todas se encontram a 10 µg/mL) e são os limitantes da escolha do comprimento de onda a ser utilizado, pois apresentam absorção apenas entre 200 e 240 nm. CAP não representa um problema real à sensibilidade do método uma vez que sua concentração no comprimido é duas vezes maior que a de HCTZ. Porém, CAD deve ser encontrado com um teor máximo relativo a 3% da concentração de CAP o que corresponde a apenas 1,50 mg para as amostras testadas. Levando em consideração esses fatores e a interferência a que estão sujeitas as análises empregando absorção próxima a região espectral de 200 nm, o comprimento de onda de 220 nm foi escolhido para a determinação dos compostos de interesse. Estes resultados estão em conformidade com o observado em literatura, uma vez que 210 e 220 nm são os comprimentos de onda mais utilizados na determinação de CAP por CLAE-UV (Quadros 3 e 5).

5.1.2 ESCOLHA DA COLUNA

Inicialmente, foi realizado um levantamento bibliográfico para verificar os outros métodos existentes por CLAE que envolvessem a quantificação, separação ou identificação dos fármacos CAP e HCTZ, assim como suas impurezas. A partir dos dados obtidos, concluiu-se que a coluna analítica mais utilizada para os fármacos isoladamente é a composta por grupos octadecilsilano: C18, na fase estacionária. A maioria dos métodos encontrados

para a análise da associação em forma farmacêutica utiliza a espectroscopia no UV e entre os poucos que empregam CLAE, o tipo de coluna mais utilizado foi o L11 ou fenil, inclusive no método oficial da farmacopéia americana (KIRSCHBAUM;PERLMAN, 1984; USP, 2008; 2011).

A coluna inicialmente escolhida para o desenvolvimento do método por CLAE-DAD foi uma Zorbax[®] Eclipse XDB-Phenyl (5 µm, 4,6 x150 mm). As colunas fenil têm se mostrado uma alternativa interessante em análises cromatográficas de fase reversa por apresentarem seletividade distinta das colunas C8 e C18, podem ser usadas para separações envolvendo tanto compostos ácidos quanto básicos e neutros, sendo uma boa alternativa para análises de aminas aromáticas como é o caso da HCTZ e suas impurezas. Apresenta polaridade e perfil de retenção semelhantes aos apresentados por uma coluna composta por octasilano (C8), porém com diferenças na seletividade. Além da alta eficiência de separação, essa coluna é composta em seu substrato de sílica ultrapura desativada com duplo *endcapped*, o que inativa o maior número possível de grupos silanóis livres, evitando, portanto, problemas como o aumento do fator de cauda (*tailing*) dos picos cromatográficos. Devido ao tratamento a que é submetida, essa coluna suporta uma faixa de pH de 2 a 9 e temperaturas de até 60°C.

Snyder e colaboradores (1997) consideram colunas com tamanho de 150 mm de comprimento e 5 µm de diâmetro de partícula uma boa escolha para o início do desenvolvimento de um novo método, pois apresentam boa relação entre eficiência cromatográfica e tempo de análise (SNYDER;KIRKLAND;GLAJCH, 1997).

Foram avaliadas também duas outras colunas com características cromatográficas diferentes: Waters XBridge[™] C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm) e Waters XBridge[™] C8 (5 µm, 4,6 x150 mm). Os cromatogramas obtidos a partir da eluição em modo gradiente de ácido fosfórico 0,067% : ACN utilizando coluna C18, C8 e fenil pode ser observados na Figura 7.

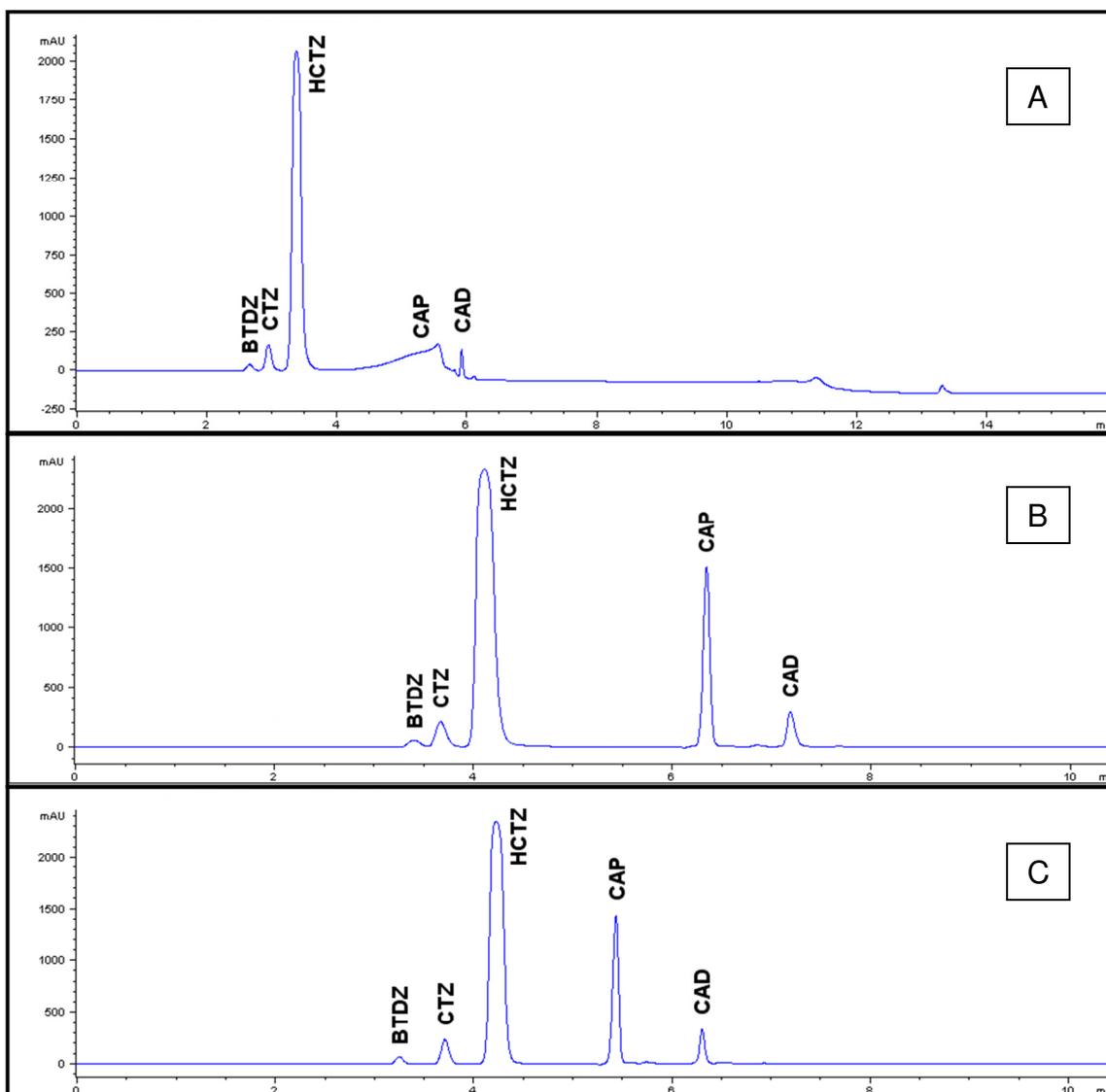


FIGURA 7 – COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS COM UMA COLUNA C18 (A), C8 (B) E FENIL (C) DE UMA SOLUÇÃO DE TRABALHO CONTENDO MISTURA DOS PADRÕES UTILIZANDO MODO GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO 0,067% : ACN.

A coluna C18 exigiu a utilização de maior proporção de solvente orgânico e tempo total de corrida, não sendo capaz de separar adequadamente todos os compostos de interesse. A coluna C8 apresentou resultados mais parecidos com os obtidos com a coluna fenil. Este resultado já era esperado uma vez que, como já mencionado, as colunas C8 e fenil possuem polaridades semelhantes. Entre HCTZ e seus compostos relacionados, BTMZ apresentou

maior retenção na C8, e CTZ e HCTZ menor; devido a diferença na forma e intensidade com que foram afetados sua resolução foi prejudicada, atingindo valores abaixo do limite aceitável (1,5). Já CAP e CAD apresentaram maior tempo de retenção e co-eluíram com outras impurezas, o que determinou aumento do tempo de corrida e comprometeu a seletividade do método, conforme observado na Figura 7.

Para a coluna C8, a resolução entre os três primeiros compostos foi melhorada com a diminuição do componente orgânico na FM. Porém, isso não favoreceu a parte final do cromatograma estendendo demasiadamente o tempo de corrida. Diante dos resultados, a coluna Zorbax[®] Eclipse XDB-Phenyl (5 µm, 4,6 x 150 mm) foi escolhida.

5.1.3 COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

Após a definição da coluna e comprimento de onda, iniciaram-se os testes para escolha da fase móvel, a fim de obter um cromatograma com parâmetros cromatográficos adequados para os compostos alvo. Para isso foi utilizada uma mistura dos compostos de interesse em concentrações conhecidas e respeitando a proporção em que se espera que estejam nos comprimidos.

A primeira fase móvel utilizada foi ácido fosfórico 0,067%: Metanol (75:25, v/v) em modo isocrático de eluição a 1,5 mL/min, semelhante ao método proposto pela farmacopéia americana para os comprimidos da associação. A corrida teve um tempo total de 18 minutos e no cromatograma foi observada a eluição de BTZD, HCTZ e CTZ nos primeiros 5 minutos e em torno de 12 minutos o aparecimento de um sinal muito alargado, o qual inicialmente acreditou-se corresponder a uma mistura de CAP e CAD.

Com base neste primeiro resultado, fixamos a utilização de ácido fosfórico 0,067% que apresenta pH próximo de 2,5 como fase aquosa e testamos como modificador orgânico metanol e ACN. Quando necessário, o pH foi ajustado utilizando-se ácido fosfórico 85,8% PA. O fluxo inicial utilizado foi

de 1 mL/min, pois nessa condição existe uma comprovada eficiência para colunas com essas dimensões sem o uso excessivo de solventes. A temperatura escolhida foi de 25°C devido ao fácil controle desta frente a oscilações na temperatura ambiente e a sua ampla utilização nos métodos pesquisados.

Testou-se primeiramente a utilização de metanol nas proporções de 25, 35 e 50% em modo isocrático de eluição. Observou-se que em concentrações de até 35% deste componente ocorria boa separação entre BTZ, HCTZ e CTZ. No entanto, quando a proporção de metanol foi aumentada para 50% não houve separação entre HCTZ e CTZ. O modo isocrático não permitiu, também, a separação de CAP e CAD, sendo necessário o desenvolvimento de um método com modo gradiente de eluição.

Apenas com uma brusca elevação da porcentagem de metanol, seguida de eluição isocrática, ocorreu a separação dos componentes presentes sob o sinal alargado observado no cromatograma anterior, sendo eles CAP, CAD e mais 3 picos não identificados. A análise subsequente do padrão de HCTZ nos permitiu concluir que os três sinais não identificados correspondiam a impurezas menos relevantes e não identificadas da própria HCTZ. Apesar de permitir a separação, o gradiente utilizando metanol não promoveu um perfil cromatográfico adequado para CAP, cujo pico apresentou significativo alargamento frontal (*fronting*), e determinou grande oscilação da linha de base quando metanol estava em maior concentração, o que prejudicou a integração dos picos eluídos nessa condição. Essas limitações com o uso de metanol nos levaram a substituí-lo por acetonitrila (ACN), um solvente com maior força elutropica e que possui absorção no UV até no máximo 190 nm.

No modo isocrático, foi empregado ACN 10, 12 e 15% e apesar de observarmos inversão na ordem de eluição de HCTZ e CTZ, não houve grande vantagem com relação a resolução do pico de captopril e CAD quando comparado ao metanol. A co-eluição de compostos foi observada novamente no cromatograma na forma de um sinal alargado semelhante ao observado anteriormente (Figura 8).

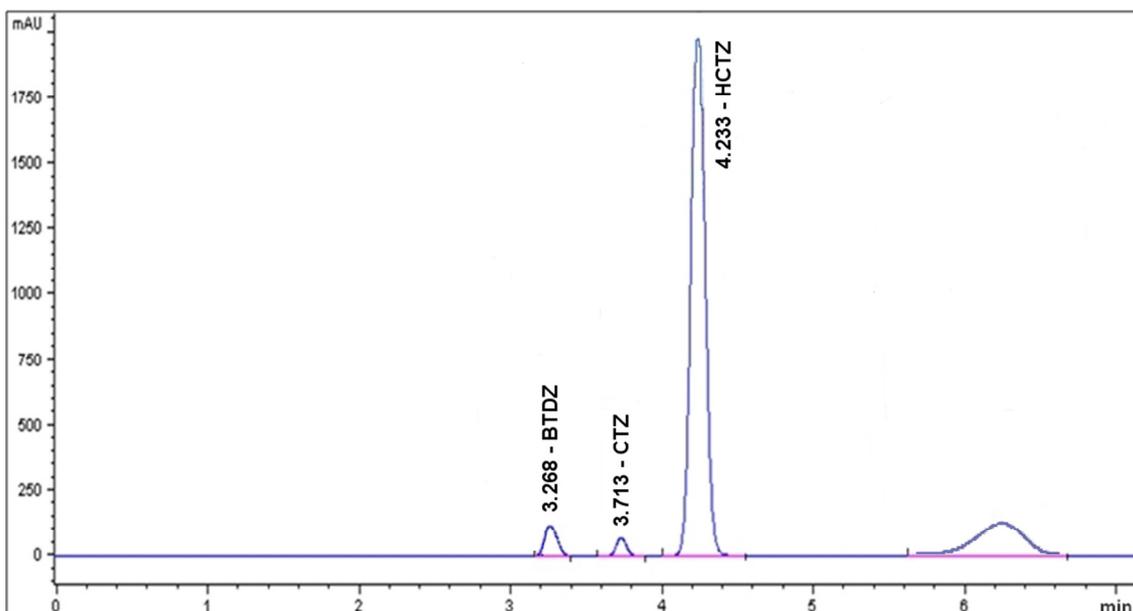


FIGURA 8 – CROMATOGRAMA OBTIDO COM COLUNA FENIL DE UMA SOLUÇÃO DE TRABALHO CONTENDO MISTURA DOS PADRÕES UTILIZANDO MODO ISOCRÁTICO DE ELUIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO 0,067% : ACN (85:15, V/V).

A porcentagem de 15% de ACN promoveu boa resolução entre BTDZ, CTZ e HCTZ e, assim como o observado para o metanol, o aumento na concentração de modificador orgânico promoveu separação adequada entre CAP, CAD e as impurezas não identificadas de HCTZ com a vantagem da menor oscilação da linha de base. Foram avaliadas as concentrações de 20, 25, 30 e 35% de ACN, sendo que com 35% obteve-se a melhor resolução entre CAP, CAD e as impurezas não identificadas da HCTZ (Figura 9).

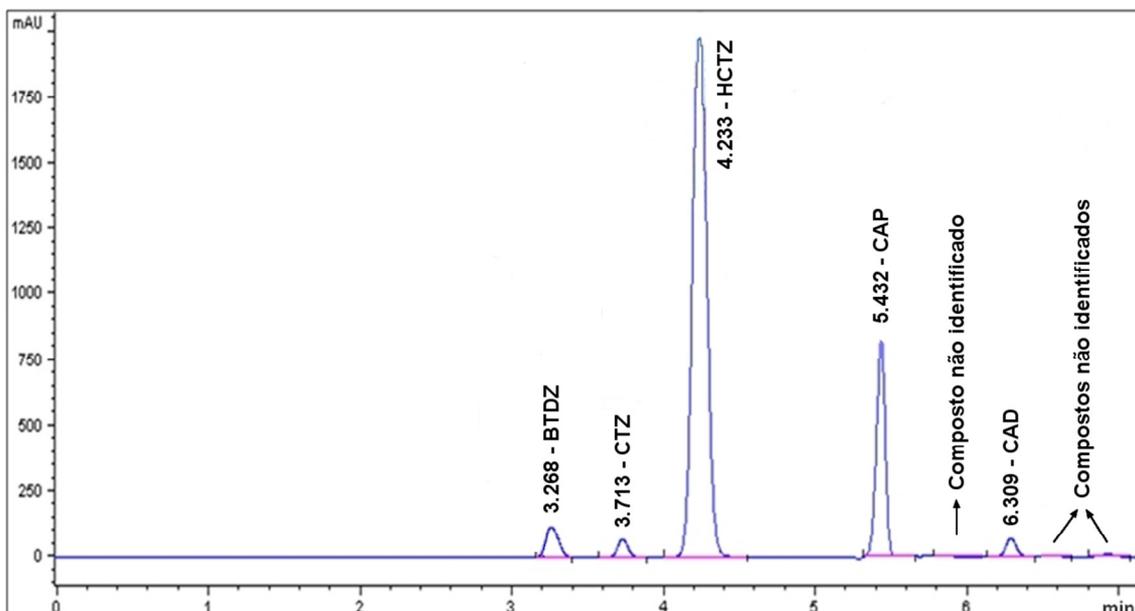


FIGURA 9 - CROMATOGRAMA OBTIDO COM COLUNA FENIL DE UMA SOLUÇÃO DE TRABALHO CONTENDO MISTURA DOS PADRÕES UTILIZANDO MODO GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO 0,067% : ACN.

Contudo, esta abordagem também foi ineficaz na melhoria da simetria do pico de CAP, o que só foi conseguido com mudanças na temperatura. Ainda foi testada a utilização de ácido fórmico 0,5%, porém a intensidade de sua absorção em 220 nm impossibilitou seu uso.

Na busca de uma melhor simetria do pico do captopril, a concentração desta substância foi reduzida pela metade, uma vez que uma das principais causas de fronting é o excesso de amostra. Porém a redução não apresentou efeito significativo, o que nos levou a avaliar a influência da temperatura no sistema cromatográfico. Através desse experimento foi possível concluir que o aumento da temperatura é um fator determinante para melhora da simetria do pico de captopril, e dessa forma a temperatura de 40 °C foi adotada. Após mais alguns ajustes no gradiente da fase móvel, excelente resolução e perfil dos picos cromatográficos foram alcançados. O gradiente final é descrito no quadro a seguir:

Tempo (min)	Ácid. Fosfórico 0,067% (%)	Acetonitrila (%)	Eluição
0 – 3,0	85	15	Isocrática
3,1 -6,5	65	35	Isocrática
6,6 – 8,0	85	15	Recondicionamento

QUADRO 8 – GRADIENTE FINAL DE ELUIÇÃO DA FM.

5.1.4 TEMPERATURA

Kocijan e colegas reportaram que o formato de pico para peptídeos contendo prolina, como ocorre no captopril, é altamente dependente de temperatura, pH e fluxo. O pico pode se alargar e até se dividir dependendo da velocidade de interconversão entre as apresentações *cis* e *trans* da molécula referentes a rotação em torno da ligação peptídica. Essa interconversão se torna mais lenta e prejudica o formato de pico em baixas temperaturas e em pH alcalino, nos quais o caráter de dupla ligação da ligação peptídica aumenta restringindo a rotação da mesma (KOCIJAN *et al.*, 2001). O pH da fase móvel utilizada (2,5) assim como a elevação da temperatura da coluna utilizada na separação cromatográfica, acelera a cinética de interconversão, favorecendo a formação de um único pico estreito e bem definido para o CAP. Foram testadas temperaturas de 25 a 50 °C com incremento de 5 °C entre cada análise (Figura 10). Observou-se significativo afinamento e correção do *fronting* do pico correspondente ao CAP já a 40 °C sendo o gradiente de eluição otimizado para esta temperatura.

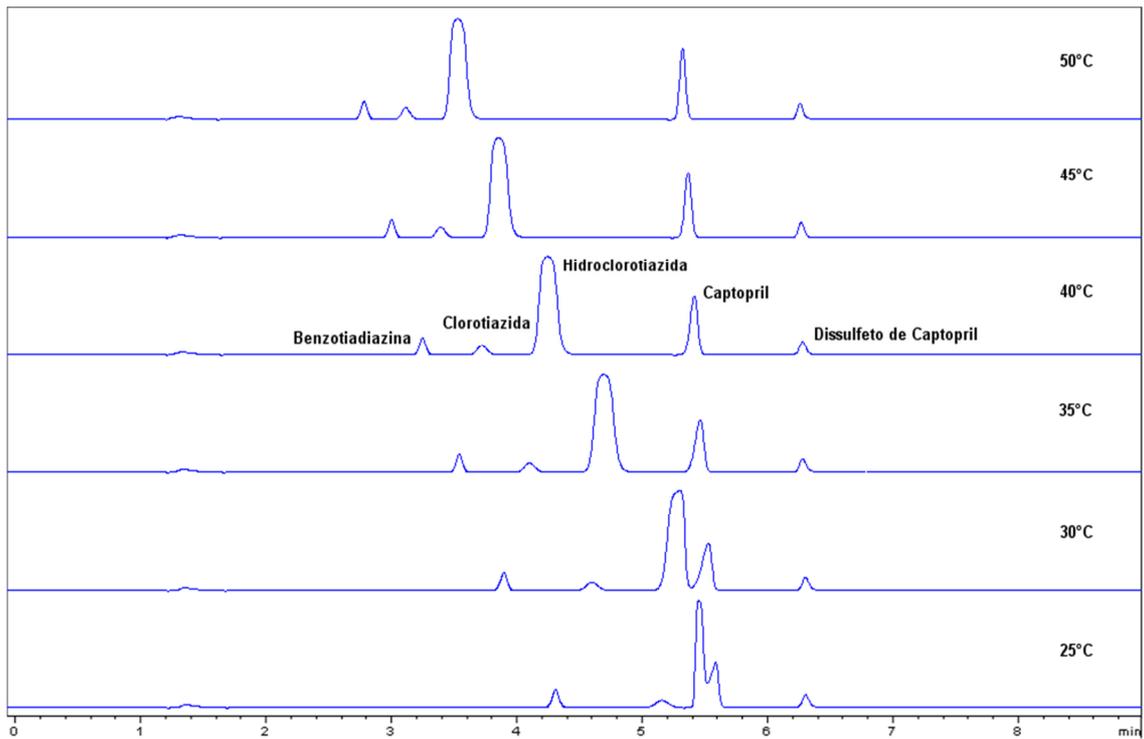


FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DE CAP (100 $\mu\text{g/mL}$), HCTZ (50 $\mu\text{g/mL}$), CAD (9,0 $\mu\text{g/mL}$), CTZ (0,75 $\mu\text{g/mL}$) E BTZ (1,5 $\mu\text{g/mL}$) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

Conforme pode ser observado na Figura 10, a influência da temperatura no perfil cromatográfico da mistura, e principalmente na simetria do captopril é clara; porém o aumento da temperatura acima de 40°C diminuiu a resolução entre CAD e as impurezas da HCTZ que eluem no final da corrida. Enquanto isso, temperaturas menores que 35°C favoreceram a assimetria do pico de CAP, sendo que abaixo de 30°C houve prejuízo da resolução entre CAP e HCTZ. A temperatura promove alteração na retenção apenas de HCTZ e seus compostos relacionados, praticamente não afetando CAP e CAD. À medida que a temperatura diminui a retenção de HCTZ aumenta, até que a 30°C a resolução entre HCTZ e CAP fica abaixo de 1,5 e a 25°C os picos se fundem. A 40°C o pico de CAP se encontra simétrico e afilado e a resolução entre todos os compostos adequada, sendo portanto a temperatura escolhida para o método.

5.1.5 FLUXO

Na tentativa de reduzir ainda mais o tempo de corrida, diferentes vazões de fluxo foram testadas. O critério de escolha do melhor fluxo para compor o método em desenvolvimento foi a correlação entre tempo de corrida, resolução dos picos cromatográficos e consumo de FM. Os fluxos testados na otimização variaram de 1,0 a 1,5 mL/min. Os resultados encontram-se dispostos na Figura 11.

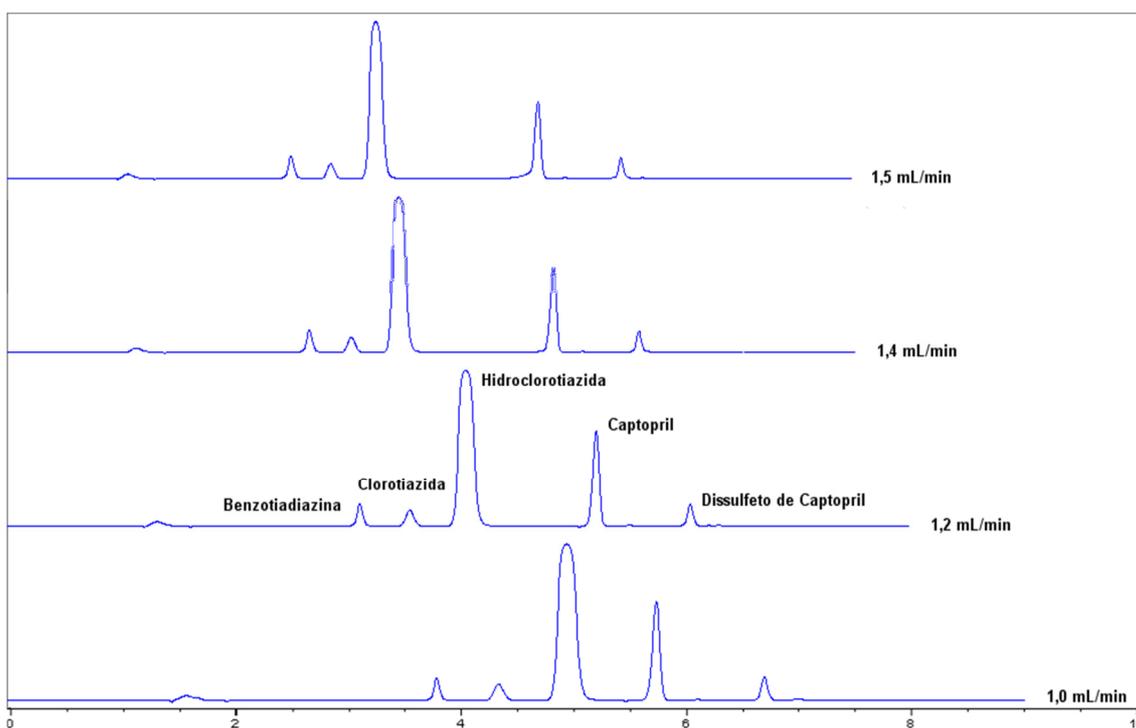


FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DE CAP (100 $\mu\text{g/mL}$), HCTZ (50 $\mu\text{g/mL}$), CAD (9,0 $\mu\text{g/mL}$), CTZ (0,75 $\mu\text{g/mL}$) E BTZ (1,5 $\mu\text{g/mL}$) EM DIFERENTES VAZÕES DE FLUXO.

O fluxo assim como a temperatura afeta com maior intensidade a retenção de HCTZ e suas impurezas, não alterando significativamente CAP e CAD. À medida que o fluxo diminui os compostos são eluídos mais lentamente da coluna, porém CAP sofre menor influência desse parâmetro e dessa forma sua resolução frente à HCTZ diminui. Ao contrário, o aumento do fluxo de 1,0 para 1,2 mL/min aumentou a resolução entre CAD e as impurezas da HCTZ eluídas ao final da corrida e entre HCTZ e CAP, apesar desta não representar

uma vantagem efetiva. Além disso, permitiu a redução da corrida em 1 min, sendo a análise completada em 8 min. O fluxo de 1,4 mL/min apresentou cromatograma muito semelhante ao de 1,5 mL/min, onde foi observado aparecimento de fronting no pico de captopril. O fluxo de 1,5 mL/min determinou um consumo de FM 50% maior que em 1 mL/min sem que houvesse um ganho efetivo em tempo de análise (1,5 min menor) e ainda promoveu a formação de fronting no pico de CAP. Os fluxos de 1,0 e 1,2 mL/min apresentaram boa eficiência cromatográfica e optou-se pela utilização de 1,2 mL/min devido a considerável redução no tempo de análise e características cromatográficas apresentadas.

Desta forma, os parâmetros finais definidos para o método foram:

- Coluna: Zorbax[®] Eclipse XDB-Phenyl (5 µm, 4,6 x150 mm);
- Fase móvel: ácido fosfórico 0,067% e acetonitrila, eluída conforme gradiente descrito no Quadro 8;
- Comprimento de onda de detecção: 220 nm;
- Fluxo da fase móvel: 1,2 mL/min;
- Temperatura de forno: 40 °C;
- Volume de injeção: 20 µL.

5.1.6 ADEQUABILIDADE DO MÉTODO

O método foi avaliado pela determinação dos parâmetros cromatográficos tempo de retenção (T_r), fator de retenção (K'), resolução (R_s), número de pratos teóricos (N) e o fator caudal (T) segundo a Farmacopéia Americana 34^a edição (USP, 2008). Esses dados foram obtidos automaticamente através do software ChemStation versão A 10.02 a partir de injeções consecutivas de solução 100 µg/mL (CAP), 50 µg/mL (HCTZ), 9,0µg/mL (CAD), 0,75 µg/mL (CTZ) e 1,5 µg/mL (BTDZ) (Figura 12) e estão expostos na Tabela 5 .

TABELA 5 – PARÂMETROS ANALISADOS PARA VERIFICAR A ADEQUABILIDADE DO MÉTODO

Compostos	Parâmetros (Média de 6)				
	T_r (min)	K'	R_s	T	N
Captopril	5,415	3,23	8,38	0,88	92684
Dissulfeto de Captopril	6,277	3,90	2,20	1,06	37565
Hidroclorotiazida	4,225	2,30	3,39	1,07	9671
Clorotiazida	3,705	1,89	3,53	1,07	12136
Benzotiadiazina	3,256	1,54	1,54	1,08	12806

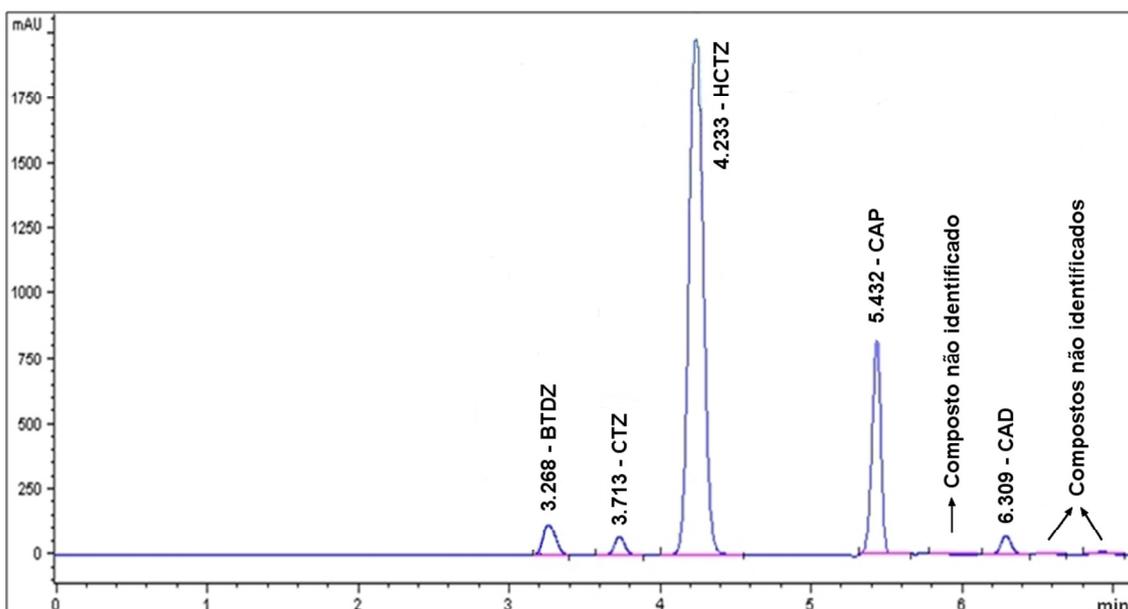


FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DE UMA SOLUÇÃO TRABALHO DA MISTURA DOS PADRÕES UTILIZADA PARA AVALIAR A ADEQUABILIDADE DO MÉTODO

As farmacopéias em geral não trazem valores de referência para esses parâmetros por isso a maioria dos trabalhos utilizam o *Reviewer Guidance – Validation of Chromatographic Methods* (FDA, 1994) como referência. Segundo este guia os valores desejáveis para um sistema cromatográfico são: $N > 2000$, $K' > 2$, $T \leq 2$, $R_s > 2$ com desvio padrão relativo (DPR) $\leq 1\%$. Porém, estudos mais recentes revelaram que um fator de cauda próximo de 1,0 é o desejável para uma análise por cromatografia líquida e que uma resolução de pelo menos 1,5 garante separação completa entre dois picos. Além disso, indicaram que um $K' > 1$ é suficiente para manter a exatidão de um método (SKOOG *et al.*, 1999).

Os resultados mostrados na Tabela 5 evidenciam a eficiência de separação do método, onde se verifica que mesmo compostos em baixa concentração podem ser analisados. Os valores de K' superiores a 1 para todos os compostos, demonstram a afinidade dos analitos pela fase estacionária, ou seja, garantem que todos os analitos foram cromatografados não sendo eluídos no volume morto da coluna. Os compostos ficaram bem resolvidos ($R_s > 1,5$), não havendo possibilidade de interferência no momento da quantificação, o que também pode ser observado na Fig. 10. A simetria dos picos foi verificada pelo fator de cauda próximo a 1 para todos os analitos. O novo método proposto foi, portanto, considerado confiável e reprodutível na determinação de captopril, hidroclorotiazida, dissulfeto de captopril, clorotiazida e benzotiadiazina.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-DAD

5.2.1 SELETIVIDADE

A seletividade foi determinada pelo método de comparação da matriz, onde foram comparados os cromatogramas obtidos a partir de duas matrizes: uma isenta dos metabólitos de interesse e outra fortificada com 100 µg/mL de CAP, 50 µg/mL de HCTZ, 9 µg/mL de CAD, 0,75 µg/mL de CTZ e 1,5 µg/mL de BTZ. A matriz consistiu em uma mistura dos excipientes: lactose (75%), amido (12%), estearato de Mg (1%), ácido esteárico (2%) e celulose microcristalina (10%). A sobreposição dos cromatogramas está retratada na Figura 13. O método demonstrou boa seletividade, não sendo verificada a interferência dos excipientes comumente utilizados nestas especialidades farmacêuticas na análise. Observamos também que os excipientes que se dissolveram na solução diluente da amostra (ácido fosfórico 0,067%: ACN, 85:15) não possuem absorção na região do UV.

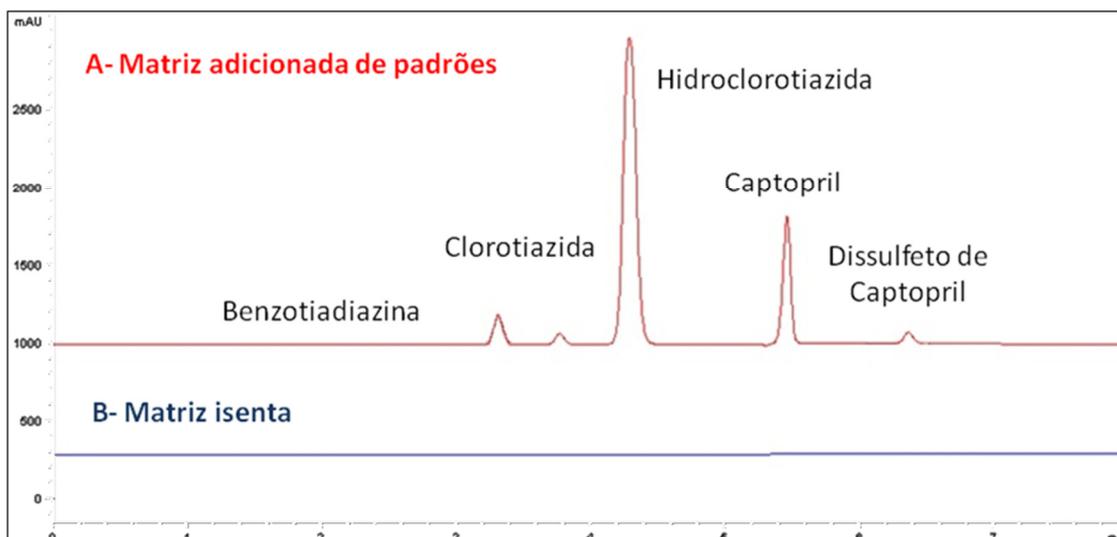


FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DE CLAE-DAD DAS MATRIZES ISENTA E CONTENDO OS ANALITOS DE INTERESSE.

5.2.2 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados a partir da relação sinal/ruído. Para isso, uma solução contendo 10,0 µg/mL de cada composto foi diluída de forma seriada até a concentração que resultou no menor pico detectável. A menor concentração injetada no cromatógrafo líquido foi 0,005 µg/mL. O limite de detecção foi estabelecido pela concentração que determinou sinal de pelo menos três vezes a altura do ruído da linha de base, enquanto o limite de quantificação corresponde a concentração em que essa relação é de pelo menos dez vezes. Os valores de LD e LQ encontrados para os cinco compostos estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 – LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS.

Composto	Parâmetro	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Sinal / Ruído $\pm s$
CAP	LD	0,157	4,1 \pm 0,85
	LQ	0,5	11,7 \pm 0,85
HCTZ	LD	0,01	3,45 \pm 1,13
	LQ	0,05	10,2 \pm 0,42
CAD	LD	0,157	4,0 \pm 0,64
	LQ	0,313	11,65 \pm 0,92
CTZ	LD	0,01	3,3 \pm 0,71
	LQ	0,078	14,6 \pm 0,99
BTDZ	LD	0,01	4,15 \pm 1,27
	LQ	0,02	12,8 \pm 1,70

*Sinal / Ruído da fase móvel = 0,050 mUA.

5.2.3 LINEARIDADE E INTERVALO

5.2.3.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela análise direta de curvas de calibração. As curvas foram construídas através de uma série de diluições de uma triplicata de solução de trabalho contendo uma mistura de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de captopril, 500 $\mu\text{g/mL}$ de hidroclorotiazida, 30 $\mu\text{g/mL}$ de dissulfeto de captopril, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de clorotiazida e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de benzotiadiazina. O ponto de menor concentração das curvas corresponde ao LQ e foi preparado pela mistura de soluções diluídas de cada composto separadamente. Após as injeções a linearidade foi observada na faixa de 0,5 a 400 $\mu\text{g/mL}$ para CAP, 0,05 a 100 $\mu\text{g/mL}$ para HCTZ, 0,313 a 14,4 $\mu\text{g/mL}$ para CAD, 0,078 a 1,2 $\mu\text{g/mL}$ para CTZ e 0,02 a 2,4 $\mu\text{g/mL}$ para BTDZ. A Tabela 7 traz a média das áreas dos picos de cada composto, em cada nível de concentração, do ensaio de linearidade.

TABELA 7 – ÁREAS DOS PICOS DOS COMPOSTOS UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.

Compostos	Concentração µg/mL						
	0,5	2,5	10	50	100	200	400
	Média das áreas (mUA)						
CAP	7,61	30,15	112,08	552,54	1102,78	2212,55	4419,00
DP	0,26	1,01	2,22	7,81	4,07	3,50	7,43
CV%	3,40	3,34	1,98	1,41	0,37	0,16	0,17
	0,05	0,5	2,0	10	50	75	100
	Média das áreas (mUA)						
HCTZ	6,97	69,70	200,44	1048,76	5164,33	7713,63	10237,52
DP	0,18	1,80	0,27	14,00	45,33	25,41	22,20
CV%	2,58	2,58	0,14	1,33	0,88	0,33	0,22
	0,313	3,0	4,5	7,2	9,0	10,8	14,4
	Média das áreas (mUA)						
CAD	9,51	45,45	65,57	100,96	124,85	150,12	196,87
DP	0,36	0,88	0,87	1,91	1,56	0,85	1,86
CV%	3,84	1,93	1,33	1,89	1,25	0,57	0,94
	0,078	0,25	0,375	0,6	0,75	0,9	1,2
	Média das áreas (mUA)						
CTZ	7,33	31,95	49,25	79,02	99,35	118,66	160,39
DP	0,26	0,95	0,80	0,34	0,37	0,06	0,64
CV%	3,48	2,98	1,63	0,43	0,38	0,05	0,40
	0,02	0,5	0,75	1,2	1,5	1,8	2,4
	Média das áreas (mUA)						
BTDZ	9,44	106,28	155,00	245,26	306,38	366,38	487,18
DP	0,15	0,62	0,80	0,69	0,80	1,01	0,88
CV%	1,61	0,58	0,51	0,28	0,26	0,28	0,18

O coeficiente de variação permite avaliar a dispersão dos dados em cada nível da curva. O maior valor obtido para nossos experimentos foi de 3,84% indicando uma baixa dispersão dos dados. Os resultados de área de cada analito foram submetidos à análise de regressão linear (Figuras 14 a 23) da qual obtivemos a equação da reta e os coeficientes de correlação (R) para cada composto. Para verificar o controle da relação entre as variáveis área e concentração foram aplicados os limites de confiança e de predição. Para

calcular as incertezas ao longo da curva de calibração, a análise de variância de resíduos foi aplicada em cada curva obtida. Esse teste também foi utilizado para verificar a aceitabilidade do modelo linear utilizado, assim como para validar a regressão. O teste de variância de resíduos e os limites de confiança e de predição foram realizados no nível de confiança de 95% (CHUI;ZUCCHINI;LICHTIG, 2001).

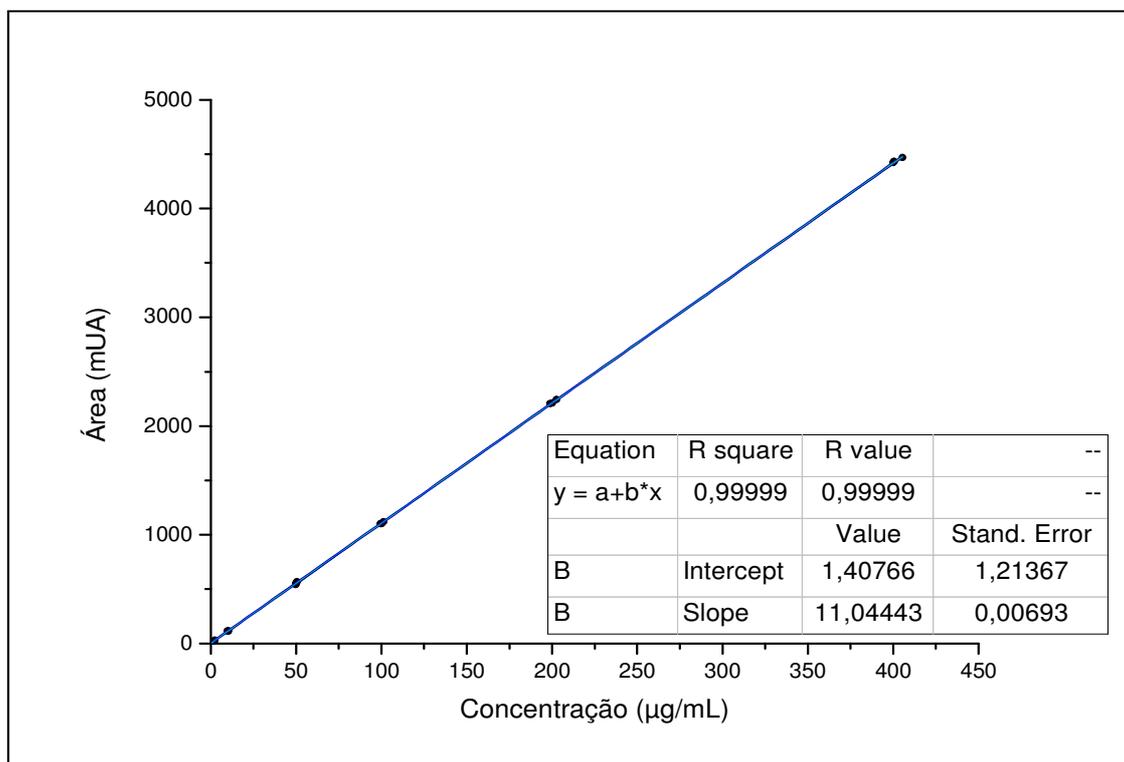


FIGURA 14 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CAPTOPRIL E OS RESULTADOS DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR.

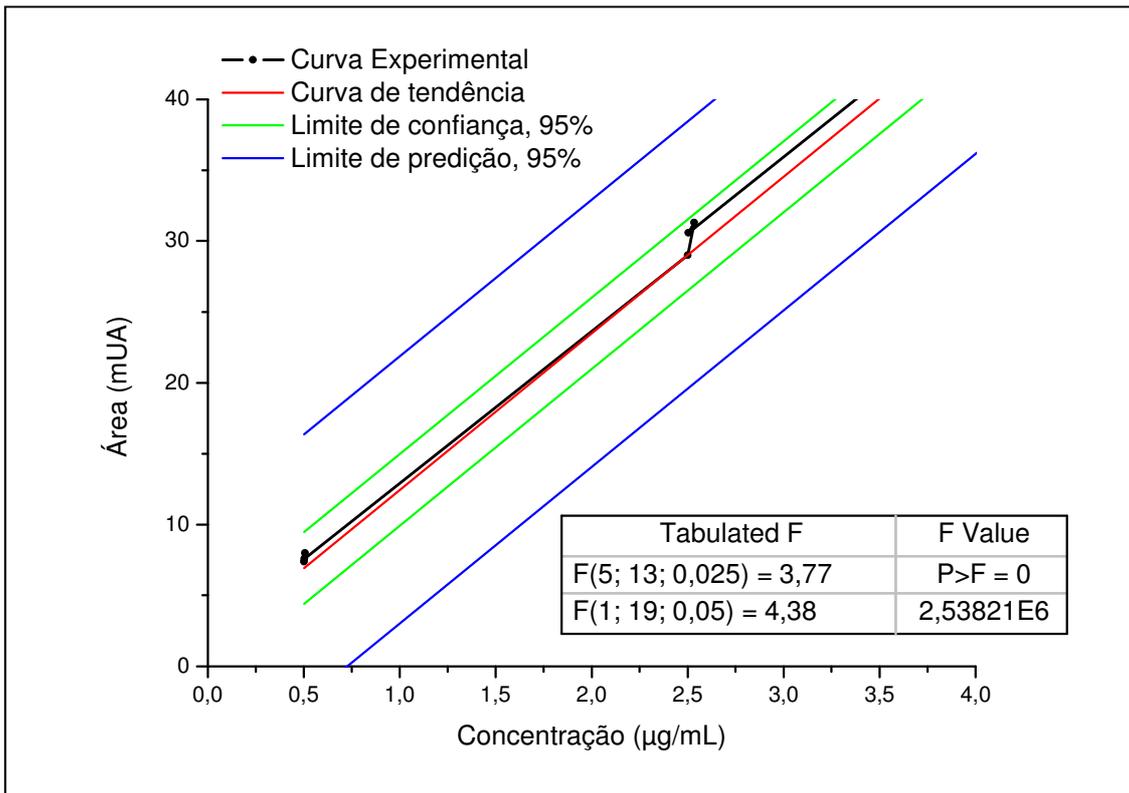


FIGURA 15 - EM DESTAQUE, OS LIMITES DE PREDIÇÃO E CONFIANÇA TRAÇADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO CAPTOPRIL.

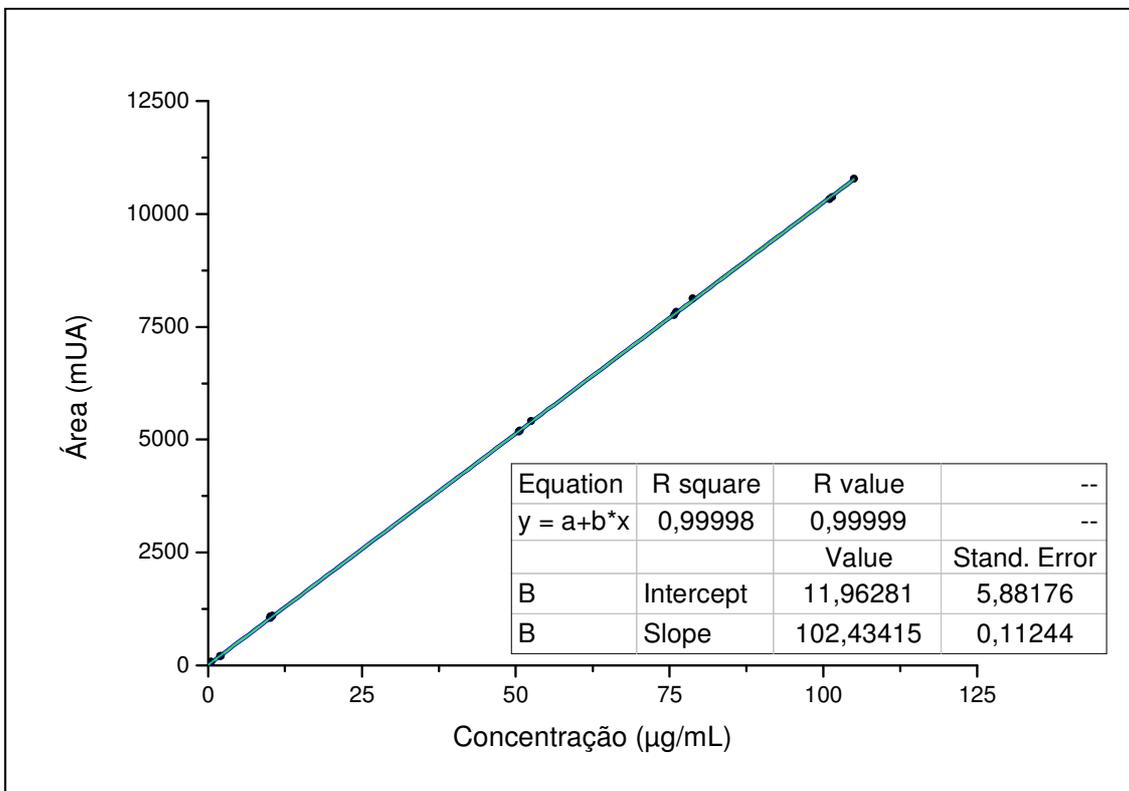


FIGURA 16 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA HIDROCLOROTIAZIDA E OS RESULTADOS DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR.

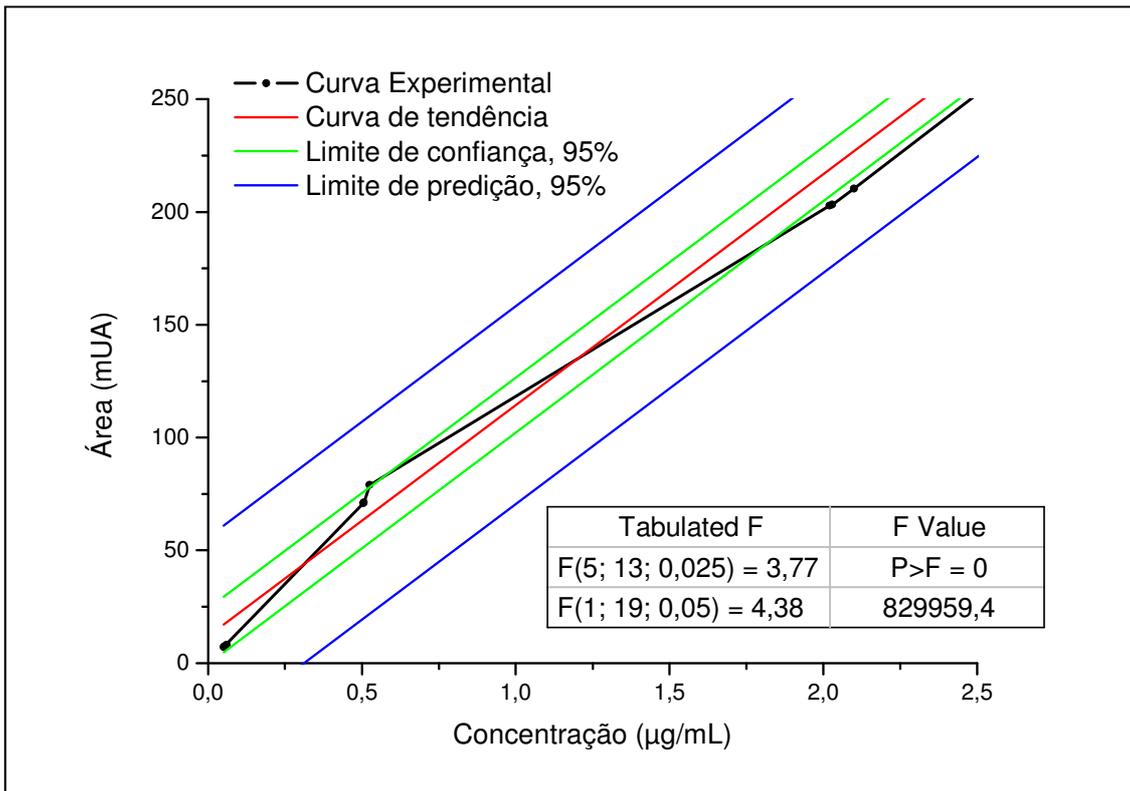


FIGURA 17 - EM DESTAQUE, OS LIMITES DE PREDIÇÃO E CONFIANÇA TRAÇADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA HIDROCLOROTIAZIDA.

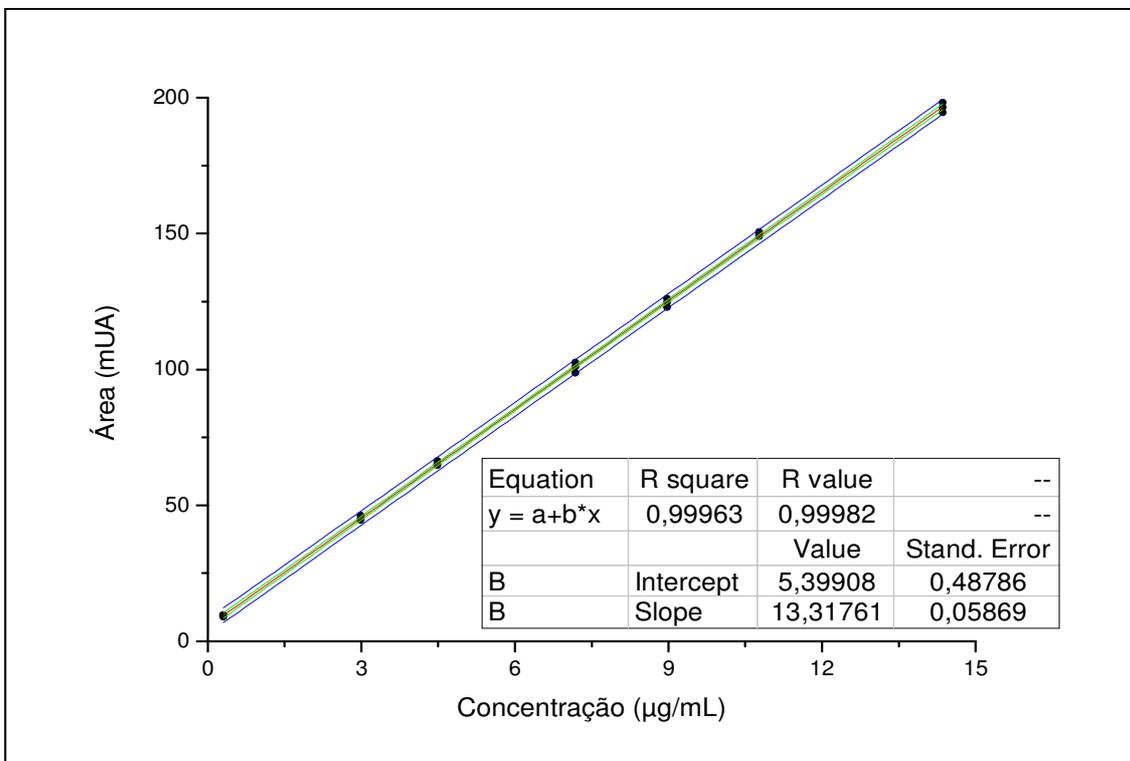


FIGURA 18 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DISSULFETO DE CAPTOPRIL E OS RESULTADOS DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR.

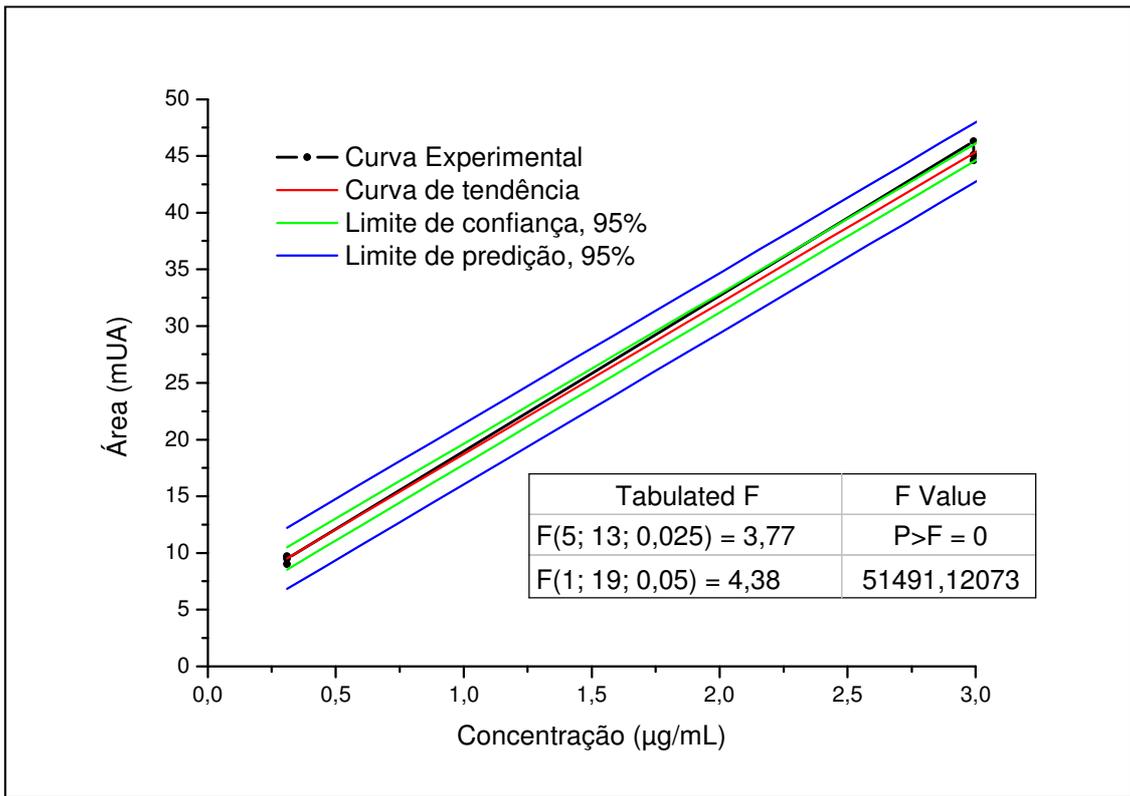


FIGURA 19 - EM DESTAQUE, OS LIMITES DE PREDIÇÃO E CONFIANÇA TRAÇADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DISSULFETO DE CAPTOPRIL.

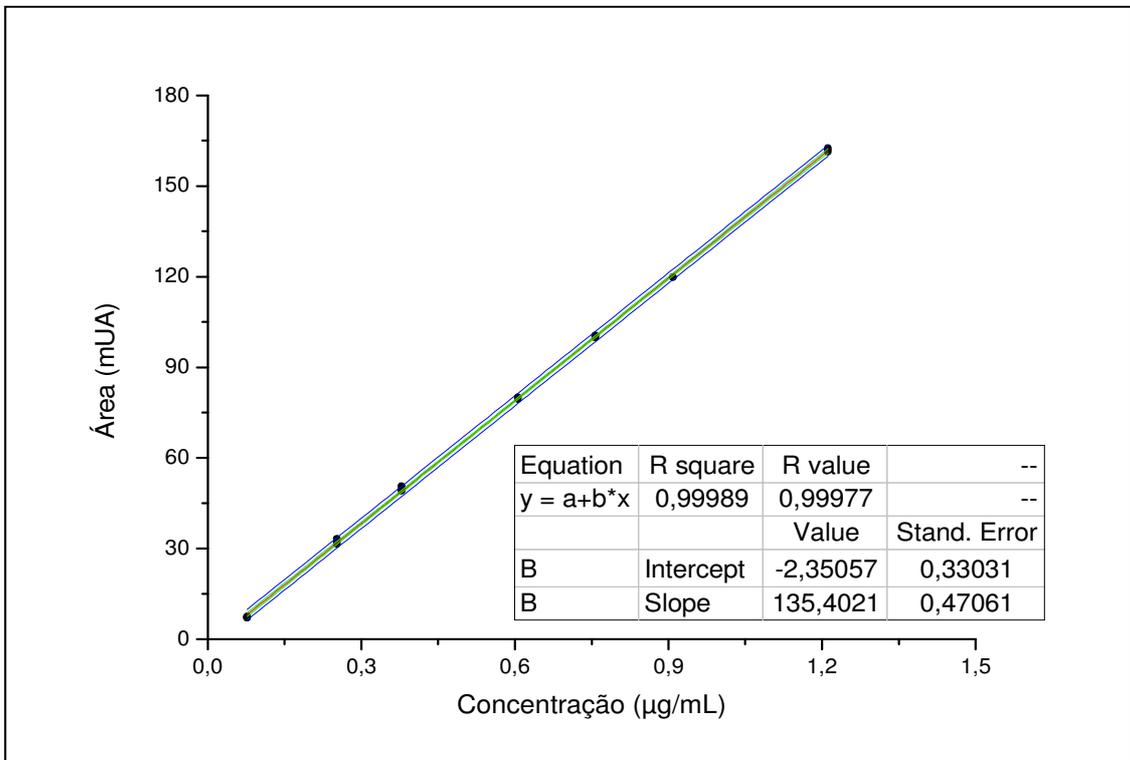


FIGURA 20 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOROTIAZIDA E OS RESULTADOS DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR.

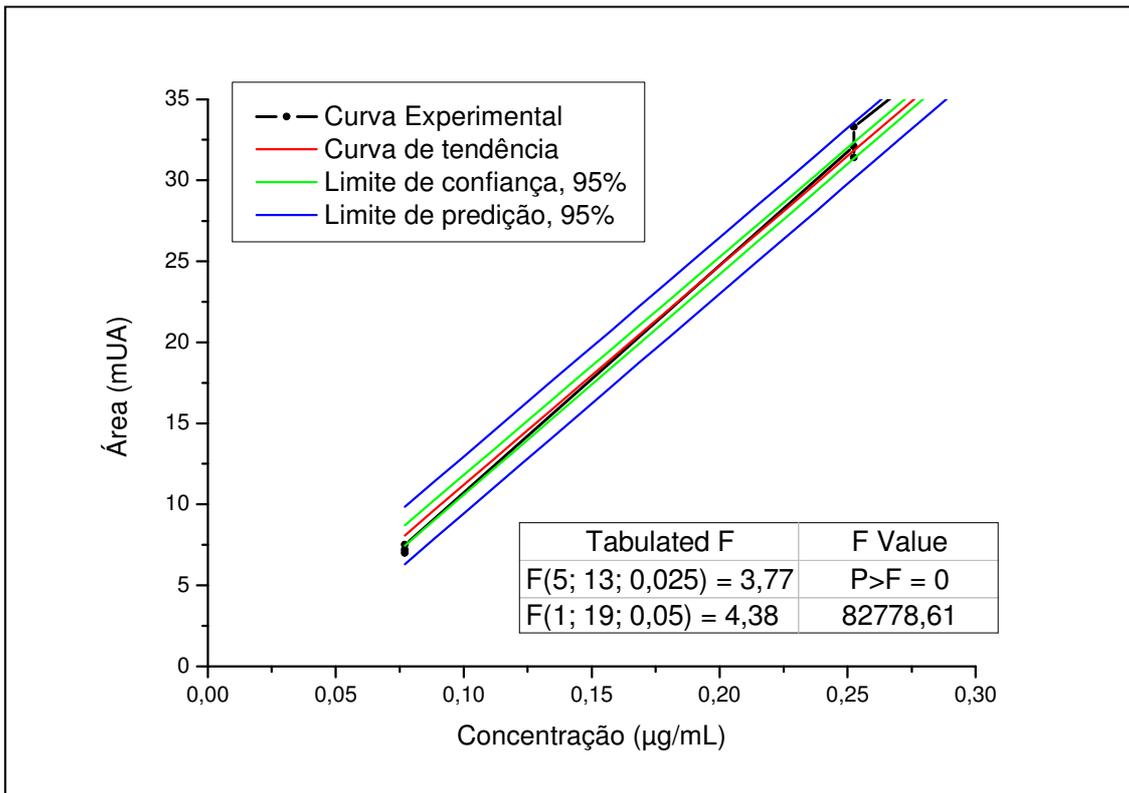


FIGURA 21 - EM DESTAQUE, OS LIMITES DE PREDIÇÃO E CONFIANÇA TRAÇADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOROTIAZIDA.

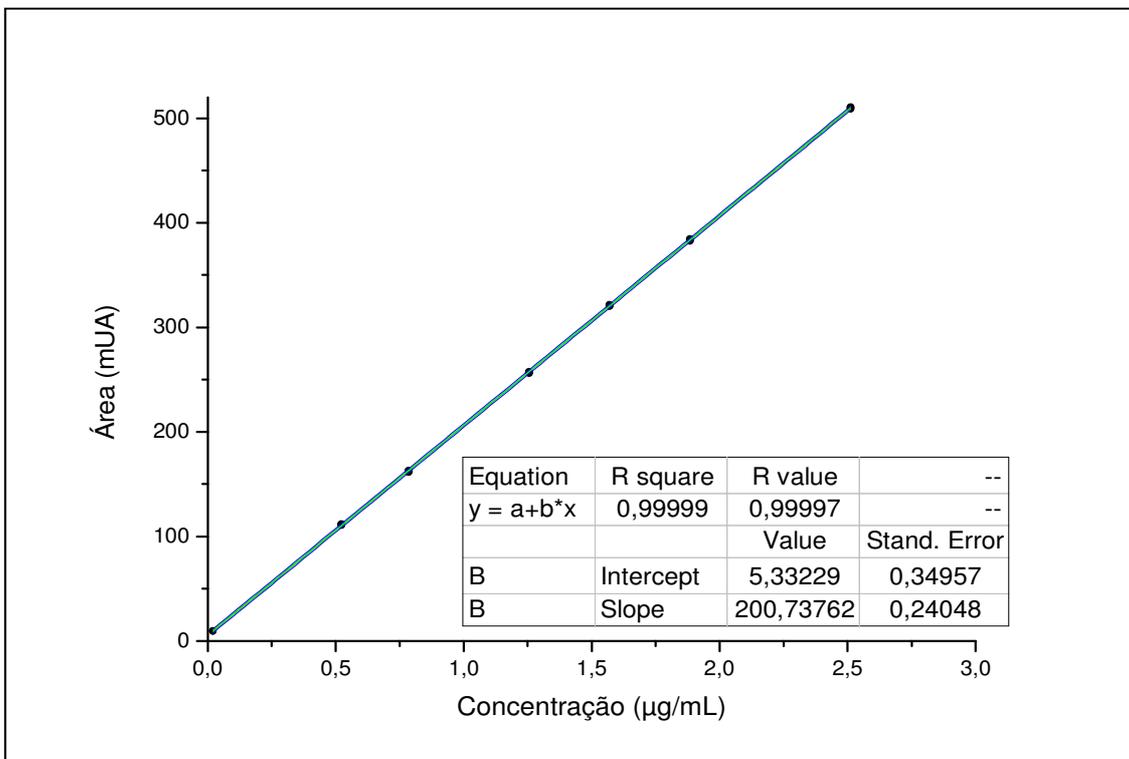


FIGURA 22 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BENZOTIADIAZINA E OS RESULTADOS DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR.

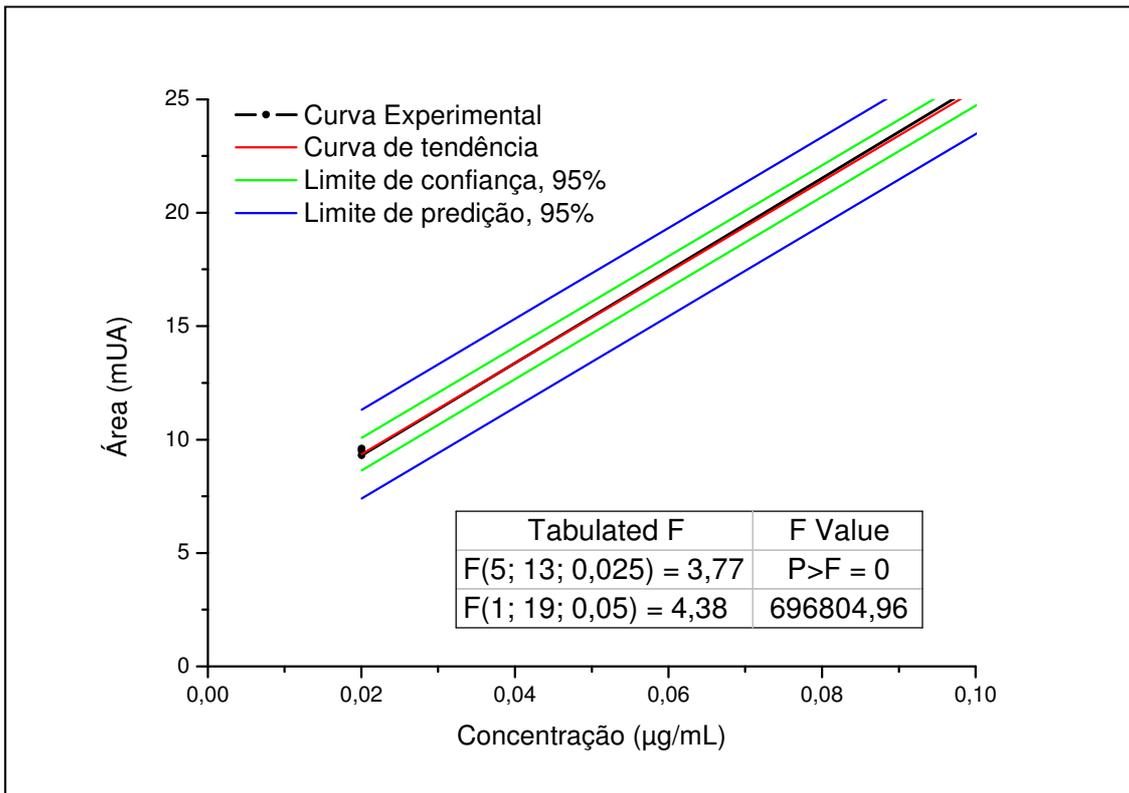


FIGURA 23 - EM DESTAQUE, OS LIMITES DE PREDIÇÃO E CONFIANÇA TRAÇADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BENZOTIADIAZINA.

Os resultados obtidos para os 5 compostos foram avaliados através do teste de ajuste do modelo linear, a probabilidade nula de $F \geq F$ crítico tabelado confirmou a linearidade do modelo e comprovou que as variações em y (área) em um mesmo nível da curva independem de x (concentração).

A aplicação de teste de validade de regressão indicou significância das regressões uma vez que os valores de F obtidos: 2538210 para CAP, 829959 para HCTZ, 51491 para CAD, 82778 para CTZ e 696804 para BTZ foram muito maiores que o F crítico tabelado (4,38), com 95% de confiança. Esse teste também permitiu concluir que a inclinação da reta de regressão não se deve ao acaso e que as variações nas áreas são reflexo das variações na concentração.

O controle da relação entre as variáveis pode ser observado nos gráficos de regressão a 95%, onde, apesar de alguns pontos se apresentarem fora do limite de confiança nenhum ultrapassa o limite de predição e a curva experimental acompanha os eixos de limite de confiança. Estes resultados

caracterizam a exatidão da curva e ausência de erros sistemáticos ou não aleatórios.

A precisão entre as três curvas foi comprovada pelo coeficiente de variação menor que 5% nos sete níveis de concentração (Tabela 7). Todos os compostos apresentaram coeficiente de correlação $R > 0,9997$ e grande eficiência de regressão com valores de $R^2 > 0,9996$ (R square).

Em decorrência dos resultados expostos o método foi considerado linear dentro das faixas de concentração estabelecidas.

5.2.3.2 Intervalo de trabalho

O intervalo de trabalho corresponde a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico e é derivado do estudo de linearidade. Ele depende da aplicação pretendida do método e é estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados dentro do intervalo de concentração especificado.

Para os compostos relacionados o limite inferior do intervalo de trabalho foi o seu respectivo limite de quantificação, uma vez que sua quantidade na forma farmacêutica não é definida, podendo se apresentar em pequenas quantidades. O limite superior foi ampliado para 3,6 vezes o limite máximo especificado para cada composto relacionado. Para dissulfeto de captopril o limite especificado é de 3% da quantidade de captopril, para clorotiazida e benzotiadiazina são de 0,5% e 1% da quantidade de hidroclorotiazida, respectivamente. Suas faixas de trabalho foram, portanto, de 0,313 a 10,8 $\mu\text{g/mL}$ (CAD), 0,078 a 0,9 $\mu\text{g/mL}$ (CTZ) e 0,02 a 1,8 $\mu\text{g/mL}$ (BTDZ).

Para captopril e hidroclorotiazida a faixa de trabalho compreendeu os limites de 80 e 120% da concentração teórica de trabalho, sendo portanto de 80 a 120 $\mu\text{g/mL}$ e 40 a 60 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. No entanto, as análises de regressão demonstraram que o método apresenta exatidão e precisão adequadas para determinação desses compostos desde o seu limite de quantificação.

5.2.4 PRECISÃO

5.2.4.1 Repetibilidade

O ensaio de repetibilidade foi realizado em três níveis de concentração para CAP (80, 100 e 120 µg/mL) e HCTZ (40, 50 e 60 µg/mL), e em quatro níveis para os compostos relacionados: CAD (0,313, 7,2, 9,0 e 10,8 µg/mL), CTZ (0,078, 0,6, 0,75 e 0,9 µg/mL) e BTDZ (0,02, 1,2, 1,5 e 1,8 µg/mL). O LQ foi avaliado para os compostos relacionados, pois não há uma previsão da sua quantidade na amostra.

Após as injeções, a dispersão entre os resultados das duas corridas analíticas foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV%) (BRASIL, 2003; USP, 2008). Em virtude dos valores de CV < 5% (Tabela 8) o método foi considerado preciso para o ensaio de repetibilidade.

TABELA 8 – ÁREAS DOS PICOS OBTIDAS PARA OS ANALITOS PARA DETERMINAÇÃO DA REPETIBILIDADE.

Analito	Concent. (µg/mL)	Manhã Área(mUA) ± DP	Tarde Área(mUA) ± DP	Média ± DP	CV (%)
CAP	80	911,32 ± 12,10	890,55 ± 6,30	900,93 ± 14,68	1,63
	100	1126,72 ± 6,63	1112,22 ± 9,01	1119,47 ± 10,25	0,92
	120	1377,80 ± 18,80	1368,57 ± 21,51	1373,19 ± 6,54	0,48
HCTZ	40	4024,63 ± 16,93	4060,37 ± 25,60	4042,50 ± 25,27	0,63
	50	4995,95 ± 25,74	5053,15 ± 33,57	5024,55 ± 40,45	0,80
	60	6017,38 ± 20,44	6109,87 ± 28,29	6063,63 ± 65,40	1,08
CAD	0,313	9,32 ± 0,37	8,77 ± 0,35	9,04 ± 0,39	4,30
	7,2	105,63 ± 0,64	103,75 ± 2,35	104,69 ± 1,33	1,27
	9	132,40 ± 2,69	129,90 ± 0,62	131,15 ± 1,77	1,35
	10,8	156,03 ± 0,50	154,85 ± 1,05	155,44 ± 0,84	0,54
CTZ	0,078	6,35 ± 0,24	6,37 ± 0,10	6,36 ± 0,01	0,19
	0,6	80,20 ± 0,17	79,88 ± 0,24	80,04 ± 0,22	0,28
	0,75	101,57 ± 1,93	100,18 ± 0,31	100,88 ± 0,98	0,97
	0,9	120,73 ± 0,46	119,68 ± 0,80	120,21 ± 0,74	0,62
BTDZ	0,02	10,75 ± 0,8	11,083 ± 0,13	10,92 ± 0,24	2,16
	1,2	255,23 ± 3,50	253,90 ± 1,70	254,57 ± 0,94	0,37
	1,5	323,73 ± 6,57	320,12 ± 2,65	321,93 ± 2,56	0,79
	1,8	385,33 ± 0,85	381,22 ± 5,12	383,28 ± 2,91	0,76

mUA = mili unidade de área.

DP = desvio padrão.

CV = coeficiente de variação.

5.2.4.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi avaliada nos mesmo níveis de concentração descritos para a repetibilidade. Para tal, um segundo analista executou o procedimento após um intervalo de dois dias, os resultados dos dois analistas foram comparados pela mesma ferramenta utilizada para a repetibilidade (BRASIL, 2003; USP, 2008).

A comparação entre os resultados dos dois analistas se encontra na Tabela 9, a variação encontrada para todos os analitos em todos os níveis de concentração foi menor que 5%, caracterizando o método como preciso para o ensaio de precisão intermediária. Em virtude dos resultados obtidos pode-se inferir que o método proposto é preciso.

TABELA 9 - ÁREAS DOS PICOS OBTIDAS PARA OS ANALITOS PARA DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.

Analito	Concent. (µg/mL)	Analista 1 Área(mUA) ± DP	Analista 2 Área(mUA) ± DP	Média ± DP	CV (%)
CAP	80	911,32 ± 12,10	892,73 ± 12,30	902,03 ± 13,14	1,46
	100	1126,72 ± 6,63	1140,57 ± 4,62	1133,64 ± 9,79	0,86
	120	1377,80 ± 18,80	1373,33 ± 15,83	1375,58 ± 3,17	0,23
HCTZ	40	4024,63 ± 16,93	3879,08 ± 43,97	3951,86 ± 102,92	2,60
	50	4995,95 ± 25,74	4956,88 ± 24,39	4976,42 ± 27,62	0,56
	60	6017,38 ± 20,44	5955,17 ± 45,50	5986,28 ± 43,99	0,73
CAD	0,313	9,32 ± 0,37	8,79 ± 0,24	9,05 ± 0,37	4,11
	7,2	105,63 ± 0,64	110,41 ± 5,21	108,02 ± 3,38	3,13
	9	132,40 ± 2,69	140,95 ± 1,80	136,68 ± 6,05	4,43
	10,8	156,03 ± 0,50	163,88 ± 5,96	159,96 ± 5,55	3,47
CTZ	0,078	6,35 ± 0,24	6,50 ± 0,17	6,43 ± 0,11	1,65
	0,6	80,20 ± 0,17	75,57 ± 0,44	77,88 ± 3,28	4,21
	0,75	101,57 ± 1,93	96,22 ± 1,77	98,89 ± 3,78	3,82
	0,9	120,73 ± 0,46	116,36 ± 3,90	118,55 ± 3,09	2,61
BTDZ	0,02	10,75 ± 0,8	10,33 ± 0,14	10,54 ± 0,29	2,79
	1,2	255,23 ± 3,50	246,40 ± 9,62	250,82 ± 6,25	2,49
	1,5	323,73 ± 6,57	314,80 ± 14,70	319,27 ± 6,32	1,98
	1,8	385,33 ± 0,85	382,83 ± 4,84	384,08 ± 1,77	0,46

5.2.5 EXATIDÃO

O parâmetro exatidão foi avaliado através do método da recuperação, foi analisado nos mesmos níveis de concentração que a precisão e, da mesma forma, realizado em triplicata. Foram comparadas as áreas correspondentes a cada composto em cada nível de concentração na mistura placebo com suas áreas na ausência de excipientes. As áreas dos compostos foram obtidas a partir de soluções de trabalho contendo todos os analitos nos mesmos níveis de concentração utilizados.

TABELA 10 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO.

Analito	Concent. Teórica (µg/mL)	Teor recuperado (µg/mL) ± DP	CV (%)	Recuperação (%)
CAP	81,043	81,132 ± 0,416	0,513	100,11
	101,303	100,112 ± 0,851	0,850	98,82
	121,564	122,528 ± 0,837	0,683	100,79
HCTZ	41,724	41,367 ± 0,162	0,392	99,15
	52,154	52,206 ± 0,387	0,741	100,10
	62,585	62,930 ± 0,336	0,535	100,55
CAD	0,309	0,312 ± 0,007	2,322	100,75
	7,181	7,140 ± 0,034	0,470	99,42
	8,977	8,920 ± 0,056	0,630	99,37
	10,772	10,836 ± 0,031	0,289	100,59
CTZ	0,077	0,077 ± 0,002	3,170	100,51
	0,606	0,614 ± 0,008	1,325	101,31
	0,757	0,765 ± 0,002	0,313	101,00
	0,909	0,907 ± 0,014	1,541	99,77
BTZD	0,020	0,020 ± 0,0004	2,06788	100,30
	1,256	1,268 ± 0,016	1,299	100,98
	1,570	1,580 ± 0,004	0,240	100,65
	1,884	1,869 ± 0,053	2,817	99,22

Os resultados foram expressos em % de recuperação, e esta se encontrou entre 98,82% e 101,31%, estando em concordância com o critério da

FDA. Esta recomenda variação na recuperação de $\pm 2\%$ para métodos de doseamento nos três níveis de concentração da faixa de trabalho (AOAC, 1993; SHABIR, 2003). Além disso, o coeficiente de variação (CV%) foi menor que 5% para todos os níveis e compostos. Devido aos valores de recuperação obtidos e à pequena variação dos dados, o método foi considerado exato.

5.2.6 ROBUSTEZ

O estudo da robustez avalia a capacidade de um método analítico em permanecer inalterado frente a pequenas e deliberadas variações. A ANVISA e o ICH recomendam para métodos por cromatografia líquida alterações em fatores como pH, composição e fluxo da fase móvel, lotes ou fabricantes de colunas e temperatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Em nossos ensaios, a robustez foi realizada pela injeção de uma sextuplicata de uma solução de trabalho contendo uma mistura de 100 $\mu\text{g/mL}$ de CAP, 50 $\mu\text{g/mL}$ de HCTZ, 3 $\mu\text{g/mL}$ de CAD, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de CTZ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de BTZ nas condições originais e modificadas do método. As ferramentas estatísticas: CV%, intervalo de confiança, teste *t* de Student e ANOVA (fator único) foram empregadas para avaliar a influência das modificações nos dados obtidos. Os resultados para avaliação da robustez estão expostos nas Tabelas 11 a 15.

TABELA 11 – FATORES DE CAUDA DOS ANALITOS DETERMINADOS SOB VARIAÇÃO DE FLUXO, TEMPERATURA, FASE MOVEL E pH.

Parâmetro avaliado	Captopril		Dissulfeto de Captopril		Hidroclorotiazida		Clorotiazida		Benzotiadiazina	
	T ± DP	CV%	T ± DP	CV%	T ± DP	CV%	T ± DP	CV%	T ± DP	CV%
Fluxo (mL/min)										
1,15	0,89 ± 0,003	0,28	1,07 ± 0,028	0,28	1,06 ± 0,002	0,17	1,07 ± 0,002	0,04	1,07 ± 0,003	0,05
1,20*	0,88 ± 0,004		1,07 ± 0,011		1,06 ± 0,002		1,07 ± 0,002		1,07 ± 0,002	
1,25	0,89 ± 0,004	0,40	1,07 ± 0,014	0,28	1,06 ± 0,003	0,18	1,07 ± 0,003	0,09	1,07 ± 0,008	0,12
Temperatura										
38°C	0,86 ± 0,006	1,95	1,10 ± 0,007	2,29	1,06 ± 0,004	0,61	1,07 ± 0,002	0,09	1,07 ± 0,005	0,24
40°C*	0,88 ± 0,004		1,06 ± 0,014		1,07 ± 0,002		1,07 ± 0,003		1,08 ± 0,003	
42°C	0,91 ± 0,005	1,85	1,06 ± 0,008	0,03	1,07 ± 0,002	0,23	1,07 ± 0,003	0,10	1,08 ± 0,002	0,39
Acetonitrila										
14,5% - 34,5%	0,88 ± 0,006	0,09	1,05 ± 0,031	0,60	1,06 ± 0,003	0,49	1,08 ± 0,003	0,60	1,07 ± 0,003	0,66
15,0% - 35,0%*	0,88 ± 0,004		1,06 ± 0,014		1,07 ± 0,002		1,07 ± 0,003		1,08 ± 0,003	
15,5% - 35,5%	0,89 ± 0,007	0,80	1,06 ± 0,025	0,39	1,06 ± 0,003	0,11	1,07 ± 0,002	0,74	1,07 ± 0,004	0,32
pH										
2,4	0,89 ± 0,008	0,81	1,08 ± 0,034	0,99	1,06 ± 0,002	0,06	1,10 ± 0,002	1,61	1,08 ± 0,002	0,03
2,5*	0,88 ± 0,004		1,06 ± 0,014		1,07 ± 0,002		1,07 ± 0,003		1,08 ± 0,003	
2,6	0,88 ± 0,005	0,23	0,99 ± 0,014	4,71	1,06 ± 0,002	0,19	1,05 ± 0,003	1,75	1,07 ± 0,002	0,22

*Condições originais do método.

TABELA 12 – RESOLUÇÕES DOS ANALITOS DETERMINADAS SOB VARIAÇÃO DE FLUXO, TEMPERATURA, FASE MOVEL E pH.

Parâmetro avaliado	Captopril		Dissulfeto de Captopril		Hidroclorotiazida		Clorotiazida		Benzotiadiazina	
	Resolução \pm DP	CV%	Resolução \pm DP	CV%	Resolução \pm DP	CV%	Resolução \pm DP	CV%	Resolução \pm DP	CV%
Fluxo (mL/min)										
1,15	7,41 \pm 0,015	8,97	1,9 \pm 0,100	1,64	3,42 \pm 0,013	0,90	3,65 \pm 0,016	2,70	1,55 \pm 0,003	0,87
1,2*	8,41 \pm 0,020		1,85 \pm 0,085		3,38 \pm 0,007		3,51 \pm 0,020		1,53 \pm 0,001	
1,25	8,88 \pm 0,021	3,82	1,89 \pm 0,055	1,55	3,36 \pm 0,011	0,35	3,57 \pm 0,056	1,23	1,55 \pm 0,002	0,60
Temperatura										
38 °C	7,19 \pm 0,040	10,84	1,88 \pm 0,032	6,64	3,45 \pm 0,012	1,14	3,65 \pm 0,019	2,33	1,61 \pm 0,005	3,10
40 °C*	8,38 \pm 0,014		2,06 \pm 0,120		3,39 \pm 0,005		3,53 \pm 0,022		1,54 \pm 0,002	
42 °C	9,73 \pm 0,059	10,49	2,38 \pm 0,097	10,04	3,34 \pm 0,011	1,08	3,39 \pm 0,021	2,89	1,46 \pm 0,005	3,88
Acetonitrila										
14,5% - 34,5%	7,53 \pm 0,029	7,53	2,13 \pm 0,074	1,26	3,41 \pm 0,007	0,38	3,78 \pm 0,038	4,74	1,62 \pm 0,002	3,31
15,0% - 35,0%*	8,37 \pm 0,012		2,14 \pm 0,122		3,39 \pm 0,005		3,54 \pm 0,021		1,54 \pm 0,002	
15,5% - 35,5%	9,33 \pm 0,009	7,67	2,34 \pm 0,065	4,42	3,35 \pm 0,019	0,84	3,26 \pm 0,070	4,78	1,46 \pm 0,002	3,88
pH										
2,4	8,59 \pm 0,062	1,69	3,32 \pm 0,033	31,98	3,39 \pm 0,014	0,17	3,51 \pm 0,015	0,54	1,54 \pm 0,005	0,35
2,5*	8,38 \pm 0,014		2,10 \pm 0,132		3,39 \pm 0,005		3,53 \pm 0,022		1,54 \pm 0,002	
2,6	8,25 \pm 0,046	1,13	1,33 \pm 0,041	31,92	3,39 \pm 0,011	0,10	3,49 \pm 0,018	0,91	1,54 \pm 0,003	0,36

*Condições originais do método.

TABELA 13 – RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO DE CAPTOPRIL E DISSULFETO DE CAPTOPRIL DETERMINADOS SOB VARIAÇÃO DE FLUXO, TEMPERATURA, FASE MOVEL E pH.

Parâmetro avaliado	Captopril					Dissulfeto de Captopril				
	Recuperação (%)**	Intervalo de Confiança (%)	CV %	<i>p</i> (T test)	<i>p</i> (ANOVA)	Recuperação (%)**	Intervalo de Confiança (%)	CV %	<i>p</i> (T test)	<i>p</i> (ANOVA)
Fluxo (mL/min)										
1,15	100,16			0,252		99,40			0,430	
1,20*	100,00	99,77 - 100,23	0,130	1,000	0,462	100,00	98,90 - 101,10	0,340	1,000	0,581
1,25	99,90			0,685		99,42			0,166	
Temperatura										
38°C	100,36			0,202		99,94			0,944	
40°C*	100,00	99,36 - 100,64	0,230	1,000	0,293	100,00	98,48 - 101,52	0,210	1,000	0,899
42°C	99,93			0,750		99,61			0,624	
Acetonitrila										
14,5% - 34,5%	100,37			0,284		99,69			0,762	
15,0% - 35,0%*	100,00	99,36 - 100,64	0,210	1,000	0,408	100,00	98,48 - 101,52	0,170	1,000	0,930
15,5% - 35,5%	100,02			0,901		99,94			0,907	
pH										
2,4	100,40			0,272		99,74			0,797	
2,5*	100,00	99,36 - 100,64	0,210	1,000	0,295	100,00	98,48 - 101,52	1,840	1,000	0,004
2,6	100,32			0,376		103,06			0,012	

*Condições originais do método.

**n=6.

TABELA 14 – RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO PARA HIDROCLOROTIAZIDA E CLOROTIAZIDA DETERMINADOS SOB VARIAÇÃO DE FLUXO, TEMPERATURA, FASE MOVEL E pH.

Parâmetro avaliado	Hidroclorotiazida					Clorotiazida				
	Recuperação (%)**	Intervalo de Confiança (%)	CV %	p (T test)	p (ANOVA)	Recuperação (%)**	Intervalo de Confiança (%)	CV %	p (T test)	p (ANOVA)
Fluxo (mL/min)										
1,15	99,97			0,804		100,18			0,639	
1,20*	100,00	99,83 - 100,17	0,020	1,000	0,886	100,00	99,73 - 100,27	0,090	1,000	0,924
1,25	99,950			0,712		100,09			0,827	
Temperatura										
38°C	100,01			0,918		99,88			0,682	
40°C*	100,00	99,84 - 100,16	0,030	1,000	0,860	100,00	99,40 - 100,60	0,150	1,000	0,539
42°C	99,96			0,530		100,17			0,512	
Acetonitrila										
14,5% - 34,5%	100,04			0,710		100,28			0,225	
15,0% - 35,0%*	100,00	99,84 - 100,16	0,040	1,000	0,673	100,00	99,40 - 100,60	0,180	1,000	0,717
15,5% - 35,5%	99,95			0,541		100,33			0,488	
pH										
2,4	99,93			0,487		100,31			0,584	
2,5*	100,00	99,84 - 100,16	0,060	1,000	0,586	100,00	99,40 - 100,60	0,170	1,000	0,801
2,6	99,88			0,217		100,07			0,848	

*Condições originais do método.

TABELA 15 – RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO PARA BENZOTIADIAZINA DETERMINADOS SOB VARIAÇÃO DE FLUXO, TEMPERATURA, FASE MOVEL E pH.

Parâmetro avaliado	Benzotiadiazina				
	Recuperação (%)**	Intervalo de Confiança (%)	CV %	<i>p</i> (T test)	<i>p</i> (ANOVA)
Fluxo (mL/min)					
1,15	100,04			0,851	
1,20*	100,00	99,72 - 100,28	0,050	1,000	0,807
1,25	99,93			0,682	
Temperatura					
38°C	99,95			0,940	
40°C*	100,00	99,72 - 100,28	0,030	1,000	0,993
42°C	100,01			0,942	
Acetonitrila					
14,5% - 34,5%	100,11			0,242	
15,0% - 35,0%*	100,00	99,72 - 100,28	0,190	1,000	0,637
15,5% - 35,5%	99,75			0,574	
pH					
2,4	100,24			0,282	
2,5*	100,00	99,72 - 100,28	0,120	1,000	0,510
2,6	100,14			0,509	

*Condição original do método.

Como pode ser observado na Tabela 11 o fator de cauda não sofreu significativa influência de nenhum dos quatro parâmetros avaliados, sendo a maior variação de 4,71%. A simetria do pico é avaliada por esse parâmetro e sua manutenção assegura reprodutibilidade ao método.

No quesito seletividade, apesar de CAP apresentar variações maiores que 5% para sua resolução com o pico de HCTZ, frente a modificações na temperatura, fluxo e composição de fase móvel, isso não comprometeu a seletividade do método, pois a resolução entre os dois compostos era alta e se manteve acima de 7,0 diante de todas as condições testadas. As variações são mais significativas quando a resolução é menor, como foi observado para CAD que apresentava resolução próxima de 2,0 e com um pH maior (2,6) a resolução atingiu o valor de 1,33, abaixo do preconizado para uma completa separação dos picos cromatográficos (1,5).

As maiores variações na resolução dos compostos foram observadas quando os fatores temperatura e composição de fase móvel foram modificados. Nestas condições observamos os valores de tempo de retenção (T_r) e resolução (R_s), sendo hidroclorotiazida e seus compostos relacionados afetados de forma distinta de captopril e dissulfeto de captopril. A temperatura menor aumenta a retenção dos compostos derivados da HCTZ, porém não afeta CAP e CAD e isso faz com que a resolução destes diminua. Ao contrário, com o aumento da temperatura uma melhora significativa da resolução foi observada. A menor e maior porcentagem de acetonitrila afetam a retenção de HCTZ e seus derivados da mesma forma que a diminuição e aumento de temperatura descritas acima. Apesar da porcentagem de acetonitrila afetar também CAP e CAD, isso ocorre com menor intensidade e determina variação na resolução destes. Essas observações são consequência de HCTZ e seus derivados apresentarem comportamento de equilíbrio entre fase estacionária e fase móvel distinto de CAP e seu dímero CAD. Embora variações de resolução maiores que 5% tenham sido observadas, a única situação em que esta determinou prejuízo na seletividade foi a já descrita para o dissulfeto de captopril em pH 2,6.

A análise dos resultados de recuperação denota a repetibilidade entre os dados, uma vez que o CV foi menor que 5% para os cinco compostos em todas as condições. O método foi, portanto, considerado robusto quanto a precisão.

A exatidão no ensaio de recuperação foi avaliada através do teste T de Student e ANOVA sendo as diferenças significativas caracterizadas por valores de p abaixo de 0,05. A análise de recuperação de dissulfeto de captopril em pH 2,6 indicou média de recuperação de 103,60%, fora do intervalo de confiança (98,48 – 101,52%). Quando o pH foi diminuído, o valor de $p = 0,797$ no teste T não indicou discrepância entre os resultados, o que não aconteceu quando o pH foi aumentado para 2,6 ($p = 0,012$). Em razão deste resultado o parâmetro foi comprometido como um todo ($p = 0,004$ ANOVA) e o método não foi considerado robusto para o composto dissulfeto de captopril frente a mudanças no pH. Como conclusão, foi observada a necessidade de um rigoroso controle do pH da fase móvel quando o objetivo for a determinação de CAD. Ainda

assim a performance do sistema (fator de cauda) e a precisão (CV<5%) não foram afetados por nenhuma das condições testadas.

Conforme exposto nas Tabelas 13, 14 e 15, a recuperação de CAP, HCTZ, CTZ e BTZ se encontrou dentro da faixa de intervalo de confiança e os resultados para teste T e ANOVA destes compostos caracterizaram a robustez do método quanto a exatidão em todas as condições testadas.

5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS COMERCIAIS

O método desenvolvido e validado foi utilizado para determinação do teor de captopril (50 mg) e hidroclorotiazida (25 mg) em associação na forma farmacêutica comprimido denominados REFCH, GCH1 e GCH2. Os resultados se encontram na Tabela 16 estando o teor de ativos em concordância com a quantidade declarada. Quanto a determinação de impurezas, CAD apresentou-se abaixo do limite de 3% da concentração de CAP, CTZ não foi detectada nas amostras e BTZ se encontrava em concentração abaixo do LQ.

O método mostrou-se adequado na determinação simultânea de compostos de interesse sendo, portanto, uma alternativa rápida, econômica e segura para a análise de formas farmacêuticas contendo captopril e hidroclorotiazida.

TABELA 16 – TEORES DOS COMPOSTOS DE INTERESSE EM AMOSTRAS COMERCIAIS (50 mg CAP / 25 mg HCTZ) DETERMINADOS ATRAVÉS DO MÉTODO DESENVOLVIDO E VALIDADO POR CLAE-DAD.

Amostra	CAP			HCTZ			CAD			CTZ	BTZ
	Área (mUA)	Teor (%)	Teor (mg)	Área (mUA)	Teor (%)	Teor (mg)	Área (mUA)	Teor (%)	Teor (mg)		
REFCH	1091,4	98,7	49,4	5257,6	102,4	25,60	18,5	1,7	0,8	<LD	<LQ
GCH1	1098,7	99,4	49,7	5132,0	100,0	25,00	25,3	2,3	1,1	<LD	<LQ
GCH2	1077,7	97,5	48,8	5347,9	104,2	26,10	11,9	1,1	0,5	<LD	<LQ

5.4 EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

A equivalência farmacêutica entre os medicamentos genéricos e similares e o medicamento referência para comprimidos de captopril e comprimidos de hidroclorotiazida foi avaliada através dos ensaios farmacopéicos previstos pela Farmacopéia Brasileira 4^a edição. Diante da inexistência de monografia para comprimidos da associação destes ativos na farmacopéia nacional os comprimidos de captopril (50 mg) e hidroclorotiazida (25 mg) foram submetidos aos ensaios previstos pela Farmacopéia Americana (USP, 2011).

5.4.1 IDENTIFICAÇÃO

A comparação dos tempos de retenção e espectros de UV dos picos principais das amostras de comprimidos de CAP, HCTZ e sua associação, com os obtidos para soluções dos padrões de CAP e HCTZ possibilitou a identificação dos ativos nas amostras e a aprovação de todas as amostras quanto ao ensaio de identificação.

5.4.2 DETERMINAÇÃO DE PESO

Dos 20 comprimidos analisados no ensaio de determinação de peso para cada medicamento, não foi reportada nenhuma unidade fora do limite de $\pm 10\%$ em relação ao peso médio. Isso ocorreu para genéricos, similares e referência tanto para as apresentações dos fármacos em separado quanto em associação, caracterizando sua aprovação nesse teste.

5.4.3 DUREZA, FRIABILIDADE, DESINTEGRAÇÃO, DISSOLUÇÃO, IMPUREZAS E DOSEAMENTO

Os resultados dos ensaios de dureza, friabilidade, desintegração, teste de dissolução, análise de impurezas e doseamento obtidos para os medicamentos contendo CAP e HCTZ isoladamente ou em associação estão dispostos na Tabela 17. Os testes foram realizados de acordo com a monografia de cada especialidade.

TABELA 17 – RESULTADOS DE DUREZA, FRIABILIDADE, DESINTEGRAÇÃO, DISSOLUÇÃO, IMPUREZAS E DOSEAMENTO DAS ESPECIALIDADES AVALIADAS.

Especialidade	Marca	Dureza ± DP (kgf)	Friabilidade (% perda)	Desintegração *	Dissolução **		Doseamento		Limite de CAD (%)	Limite de BTDZ (%)
					CAP (%)	HCTZ (%)	CAP (%)	HCTZ (%)		
CAP 25mg	REFC	7,2±1,6	0,21	19"	101,9	-	100,9	-	0,9	-
	GC1	3,6±0,4	0,22	30"	98,7	-	95,7	-	0,2	-
	GC2	4,9±1,1	0,62	30"	97,8	-	96,3	-	1,8	-
	GC3	7,9±0,7	0,71	32"	108,2	-	96,9	-	0,9	-
	GC4	5,6±0,8	0,22	29"	102,7	-	97,6	-	2,2	-
	GC5	6,3±2,5	0,28	20"	97,8	-	109,6	-	1,0	-
	GC6	8,6±1,3	0,002	33"	98,6	-	100,1	-	2,9	-
	SC1	3,9±0,5	0,14	25"	91,9	-	97,3	-	0,5	-
	SC2	4,6±1,0	0,09	14"	96,7	-	95,4	-	0,7	-
	SC3	9,8±0,7	0,03	25"	97,3	-	98,7	-	0,3	-
	SC4	6,7±0,8	0,01	31"	98,2	-	98,4	-	0,4	-
SC5	7,5±0,7	0,21	27"	98,5	-	97,5	-	0,5	-	
HCTZ 25mg	REFH	4,8±0,4	0,20	3'07"	-	92,6	-	103,8	-	-
	GH1	5,5±0,7	0,15	3'46"	-	87,3	-	98,5	-	-
	GH2	5,4±0,6	0,63	57"	-	90,8	-	101,4	-	-
	SH1	3,8±0,2	0,03	45"	-	60,7	-	106,2	-	-
	SH2	8,3±0,6	0,11	6'31"	-	61,9	-	102,1	-	-
CAP 50mg + HCTZ 25mg	REFCH	-	-	-	99,39	83,0	98,7	102,4	1,0	<LQ
	GCH1	-	-	-	97,72	72,6	99,4	100,0	1,5	<LQ
	GCH2	-	-	-	97,45	81,0	97,5	104,2	0,5	<LQ

*Tempo de desintegração total dos 6 comprimidos analisados.

** % de dissolução no tempo especificado na monografia.

Entre os resultados apresentados na Tabela 17, apenas para o teste de dureza foram obtidos valores em não conformidade com as exigências. Os lotes ensaiados dos medicamentos GC1, SC1 e SH1 apresentaram dureza média insatisfatória, ou seja, abaixo de 4,5 kgf.

O teste de dureza determina a resistência mecânica do comprimido à ruptura provocada por impactos, o que pode ocorrer durante processos como o revestimento, embalagem, transporte, armazenagem, entre outros (BRASIL, 2005). A Farmacopéia Brasileira estabelece apenas um limite mínimo para a dureza do comprimido (45 N ou 4,5 kgf), porém uma dureza excessiva poder prejudicar a desintegração da forma farmacêutica e conseqüentemente dissolução e absorção dos fármacos no organismo. A dureza é um parâmetro simples que pode ser utilizado para avaliar fatores do processo produtivo, como a força de compressão dos comprimidos e também a formulação. O não atendimento desse critério pelos medicamentos GC1, SC1 e SH1 indica uma falha no processo de produção, que promove fragilidade mecânica dos comprimidos, podendo determinar a ruptura destes durante os processos entre a produção e disponibilização do medicamento à população, e até mesmo durante seu uso. Além disso, a não integridade do medicamento o torna mais susceptível à ação de fatores ambientais, favorecendo processos de degradação do fármaco e podendo determinar diminuição do teor e formação de compostos indesejáveis, além de ser financeiramente prejudicial à indústria.

5.4.4 UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS

Após a determinação do teor de ativo em 10 unidades de cada medicamento contendo CAP e HCTZ, associados ou não, constatamos a conformidade dos resultados para todas as amostras exceto para a amostra do genérico de captopril 25 mg GC1. Os resultados da Uniformidade de Conteúdo para esta amostra podem ser vistos no Quadro 9.

Comprimido	CAP (%)
1	99,43
2	93,57
3	96,40
4	153,61
5	115,54
6	113,30
7	99,72
8	97,45
9	102,76
10	100,46

QUADRO 9 – RESULTADO DE UNIFORMIDADE DE CONTEÚDO DE GC1.

Entre os 10 comprimidos da marca GC1 analisados observamos 2 unidades acima do valor de 115%, sendo uma acima do limite de 125%. Tendo em vista o limite de no máximo uma unidade acima de 115% e nenhuma acima de 125% esse resultado determina a reprovação da amostra. No entanto, para fins de confirmação, analisamos mais 20 unidades. Nesta análise mais três unidades apresentaram resultados insatisfatórios, com teores de 119,68%, 115,77% e 135,95%. Como resultado final a amostra GC1 foi reprovada no ensaio de uniformidade de conteúdo por apresentar 5 unidades acima do limite de 115% (115,54%; 115,77%; 119,68%; 135,93%; 153,61%) dentre as quais duas com teor superior a 125% (135,93% e 153,61%) e desvio padrão relativo de 12,64% em 30 unidades testadas.

A uniformidade de dose unitária verifica a homogeneidade de teor entre as unidades farmacêuticas a fim de certificar que a variação entre elas permaneça dentro de uma faixa aceitável. Isso garante a consistência da dose em cada unidade que compõe um lote, promovendo segurança e eficácia na utilização do medicamento. O efeito de um fármaco depende de sua concentração plasmática, esta por sua vez depende da administração correta do medicamento respeitando os horários e doses. Um medicamento que possui variações muito grandes entre as suas unidades pode determinar inconstância na concentração plasmática do ativo, independente da sua administração ser correta, podendo o fármaco não atingir sua concentração mínima terapêutica ou atingir a mínima tóxica. Uma uniformidade de conteúdo inadequada é fonte

de insegurança e pode comprometer a efetividade do tratamento. Como causas, é possível apontar problemas na produção como tempo de mistura inadequado, grande variação no tamanho das partículas dos componentes, diferença na densidade dos pós e natureza do lubrificante utilizado, entre outros fatores. Tendo em vista que o medicamento GC1 foi aprovado quanto ao peso médio dos comprimidos, um problema na homogeneidade da mistura de excipientes e ativo parece ser a causa mais provável da falta de uniformidade de conteúdo. Em um tratamento anti-hipertensivo, onde o objetivo é a manutenção de um valor adequado de pressão arterial, variações de dose grandes como as observadas para GC1 podem trazer riscos graves para determinados tipos de pacientes.

Os resultados para equivalência farmacêutica de comprimidos de CAP, HCTZ e sua associação estão resumidos nas tabelas 18, 19 e 20 respectivamente.

TABELA 18 – RESULTADOS DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA DE COMPRIMIDOS DE CAPTOPRIL 25 mg.

Parâmetro	REFC	GC1	GC2	GC3	GC4	GC5	GC6	SC1	SC2	SC3	SC4	SC5
Identificação	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Determinação de Peso	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Dureza	A	R	A	A	A	A	A	R	A	A	A	A
Friabilidade	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Teste de Desintegração	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Uniformidade de Conteúdo	A	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Teste de Dissolução	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Limite de CAD	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Doseamento	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

A = aprovado **R= reprovado**

Das seis marcas de genéricos e cinco marcas de similares de comprimidos de captopril 25 mg, não foi caracterizada equivalência farmacêutica entre GC1, SC1 e o referência Capoten® (REFC).

TABELA 19 - RESULTADOS DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA DE COMPRIMIDOS DE HIDROCLOROTIAZIDA 25 MG.

Parâmetro	REFH	GH1	GH2	SH1	SH2
Identificação	A	A	A	A	A
Determinação de Peso	A	A	A	A	A
Dureza	A	A	A	R	A
Friabilidade	A	A	A	A	A
Teste de Desintegração	A	A	A	A	A
Uniformidade de Conteúdo	A	A	A	A	A
Teste de Dissolução	A	A	A	A	A
Doseamento	A	A	A	A	A

A = aprovado **R= reprovado**

Foram avaliadas duas marcas de genéricos e duas de similares de comprimidos de hidroclorotiazida 25 mg, além do referência Clorana® (REFH). Apenas um dos medicamentos testados não cumpriu as exigências quanto a equivalência farmacêutica, o similar SH1. Este apresentou dureza média de 3,8 kgf e por isso não é equivalente farmacêutico ao medicamento referência.

TABELA 20 – RESULTADOS DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA DE COMPRIMIDOS DE CAPTOPRIL (50 mg) E HIDROCLOROTIAZIDA (25 mg) EM ASSOCIAÇÃO.

Parâmetro	REFCH	GCH1	GCH2
Identificação	A	A	A
Determinação de Peso	A	A	A
Uniformidade de Conteúdo	A	A	A
Teste de Dissolução	A	A	A
Limite de CAD	A	A	A
Limite de BTZ	A	A	A
Doseamento	A	A	A

As duas marcas de genérico contendo captopril e hidroclorotiazida foram analisadas para determinação da equivalência farmacêutica com a referência Lopril-D[®]. Nenhuma não conformidade foi encontrada, atestando sua equivalência farmacêutica. O emprego do método desenvolvido e validado nas análises envolvendo a associação dos fármacos permitiu obter os resultados para os testes de identificação, limite de CAD, limite de BTZ e doseamento através de uma única amostra e análise cromatográfica, determinando economia de tempo e reagentes. Benzotiadiazina se apresentou em concentração abaixo do LQ nas amostras. Apesar do teste de limite de clorotiazida não ser requerido pela monografia da associação da USP, sua presença foi avaliada, não sendo detectada clorotiazida em nenhuma das amostras.

Um fator interessante, notado durante os ensaios de dissolução, foi a discrepância entre os critérios de aceitação para a apresentação associada e os definidos para os comprimidos dos fármacos isoladamente, estabelecidos pela USP. Captopril na associação deve atingir a mesma porcentagem de dissolução, no mesmo tempo que no comprimido composto somente de CAP, porém utilizando ácido clorídrico 10 vezes mais concentrado (HCl 0,1 mol/L). Para HCTZ o critério se torna mais rígido. Isoladamente, HCTZ deve atingir 60% de dissolução em 60 minutos utilizando HCl 0,1 mol/L e rotação de 100

rpm e quando associado a CAP a exigência passa a ser que a mesma dissolução seja atingida na metade do tempo (30 min) e utilizando metade da rotação (50 rpm). Uma hipótese para a utilização de critérios de aceitação diferenciados para a forma farmacêutica associada, é que a união de fármacos com características distintas de solubilidade, como CAP e HCTZ, poderia afetar sua liberação dos comprimidos. Seguindo esse raciocínio a liberação de HCTZ do comprimido seria facilitada pela presença de um composto altamente solúvel (captopril), assim como a liberação deste da forma farmacêutica seria dificultada pela presença de um composto de baixa solubilidade como é a HCTZ.

5.5 PERFIL DE DISSOLUÇÃO

Diante das discordâncias entre as farmacopéias brasileira e americana quanto às condições de ensaio para comprimidos de CAP e HCTZ, decidiu-se seguir a farmacopéia americana, pois é a única que apresenta também a monografia para a associação dos fármacos. A comparação entre os perfis foi feita através da ANOVA, Eficiência de Dissolução (ED%), fator de semelhança f_2 e modelos cinéticos (ordem zero, primeira ordem e Higuchi). A determinação dos ativos nas amostras foi feita através das curvas de calibração descritas na linearidade do método.

5.5.1 PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE CAPTOPRIL 25 MG

O perfil de dissolução foi desenhado para as marcas analisadas quanto à equivalência farmacêutica e mais duas conseguidas com distribuidores de medicamentos, porém estas foram avaliadas apenas quanto ao seu perfil de dissolução, totalizando sete marcas de genéricos e seis de similares. As Tabelas 21 e 22 e Figuras 24 e 25 trazem as porcentagens de dissolução para

comprimidos de CAP e o perfil de dissolução traçado a partir desses dados, respectivamente.

TABELA 21 – PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS E REFERÊNCIA DE CAPTOPRIL 25 mg EM FUNÇÃO DO TEMPO.

Tempo (min)	Quantidade Dissolvida (%)							
	REFC	GC1	GC2	GC3	GC4	GC5	GC6	GC7
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	41,72	39,31	40,86	18,51	2,00	6,08	1,71	3,50
4	69,66	73,29	60,81	47,60	29,91	48,60	37,24	31,13
6	98,20	100,63	86,37	72,44	64,26	83,80	72,69	56,95
8	103,12	103,11	89,64	87,78	83,66	104,53	94,54	76,33
10	104,61	103,80	90,86	95,25	85,46	103,84	97,95	84,50
20	104,59	103,83	91,21	98,20	89,44	102,59	98,91	96,13
30	104,62	104,16	91,17	99,49	90,06	100,93	98,57	98,04
40	105,23	104,18	91,29	99,79	90,53	103,44	99,83	101,66

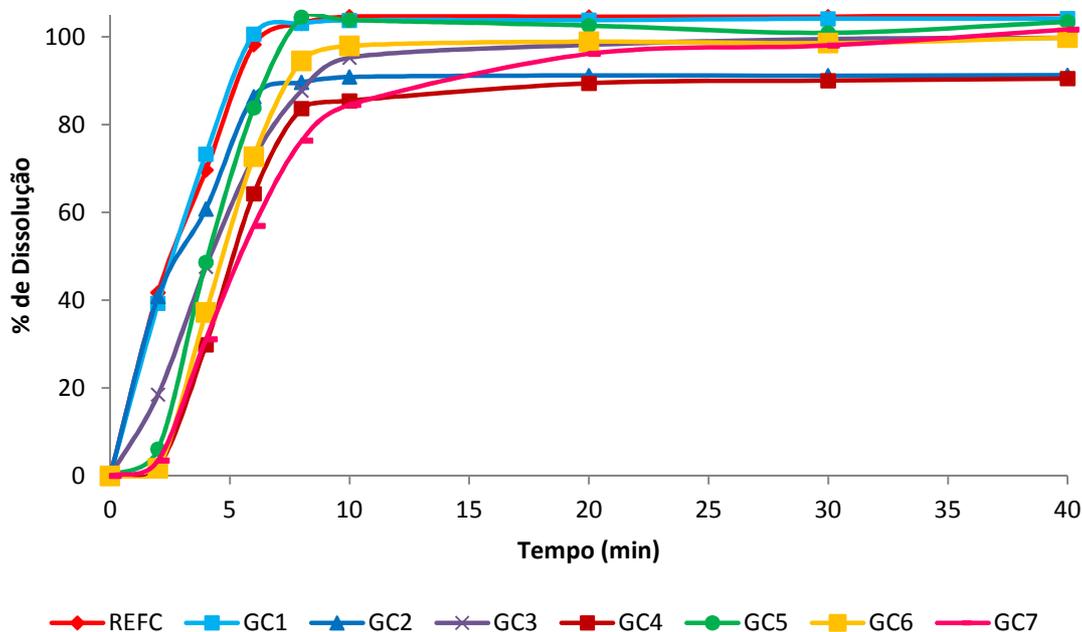


FIGURA 24 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS E REFERÊNCIA DE CAPTOPRIL 25 mg.

TABELA 22 – PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE SIMILARES E REFERÊNCIA DE CAPTOPRIL 25 mg EM FUNÇÃO DO TEMPO.

Tempo (min)	Quantidade Dissolvida (%)						
	REFC	SC1	SC2	SC3	SC4	SC5	SC6
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	41,72	24,92	15,99	36,65	35,97	23,07	1,82
4	69,66	60,15	46,94	70,15	69,81	52,20	13,95
6	98,20	88,05	76,73	97,34	96,71	78,18	32,08
8	103,12	96,61	91,37	99,46	100,26	87,02	47,40
10	104,61	98,71	94,52	100,00	100,50	90,55	59,03
20	104,59	99,31	97,19	99,92	100,52	94,43	75,22
30	104,62	99,64	97,49	99,87	102,95	99,73	98,68
40	105,23	99,60	98,67	99,86	103,24	99,53	96,30

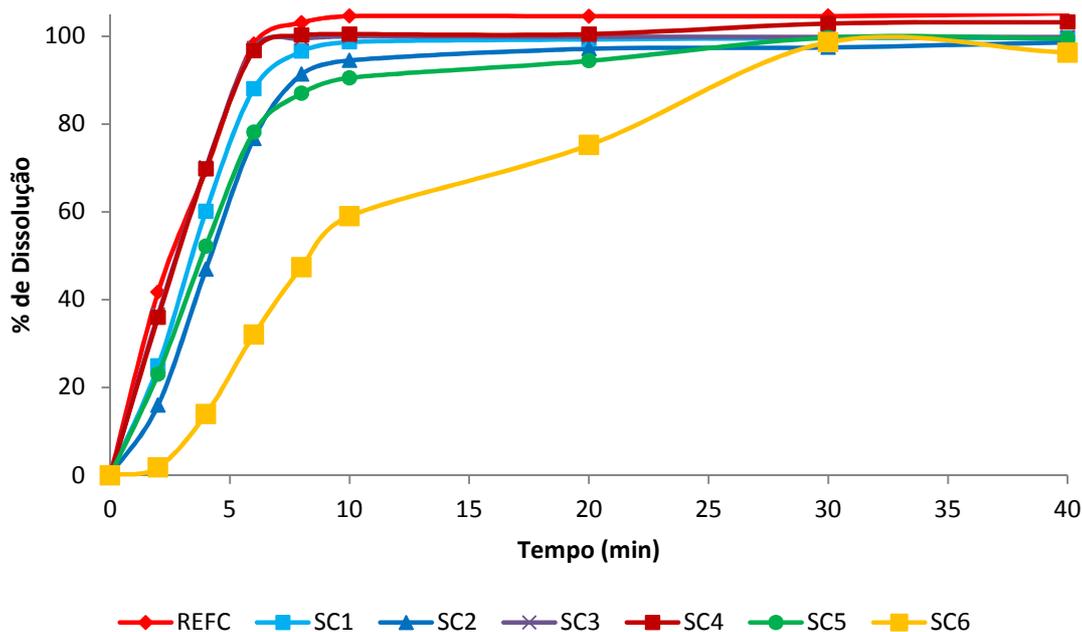


FIGURA 25 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE SIMILARES E REFERÊNCIA DE CAPTOPRIL 25 mg.

Como pode ser notado nas Tabelas 21 e 22 e Figuras 24 e 25 a simples observação dos dados não permite, na maioria dos casos, avaliar o quanto os medicamentos genéricos e similares se assemelham ao referência. Porém, esses dados nos permitem concluir que o único medicamento que não cumpriu

com o critério para teste de dissolução, no mínimo 80% de fármaco dissolvido em 20 minutos, foi o similar SC6, o qual também apresentou o perfil de dissolução mais discrepante do perfil do medicamento de referência. Já entre os genéricos, GC4 foi o que apresentou perfil mais distante do desejado.

5.5.1.1 Comparação dos perfis de dissolução de comprimidos de captopril 25 mg

A comparação entre os perfis de dissolução de comprimidos de captopril foi feita através da ANOVA, Eficiência de Dissolução (ED%) e modelos cinéticos (ordem zero, primeira ordem e Higuchi). Devido a alta solubilidade do captopril o fator de semelhança f_2 perde seu valor discriminatório e por isso não foi calculado. Os resultados podem ser observados na Tabela 23:

TABELA 23 – ANÁLISE COMPARATIVA DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS, SIMILARES E REFERÊNCIA DE COMPRIMIDOS DE CAPTOPRIL 25 mg.

Amostra	ANOVA valor de p	ED% (n=3)	ANOVA valor de p	Cinética de liberação (R^2)		
				Zero ordem	Primeira ordem	Higuchi
REFC	1,000	96,78	1,000	0,99996	0,88487	0,99329
GC1	0,993	96,41	0,881	0,99609	0,89282	0,99982
GC2	0,143	84,52	0,016	0,99496	0,93958	0,97857
GC3	0,140	87,50	0,010	0,96699	0,98308	0,99758
GC4	0,020	78,00	0,002	0,98962	0,97197	0,99099
GC5	0,361	91,54	0,059	0,99705	0,96819	0,99954
GC6	0,136	86,85	0,003	0,98877	0,92912	0,99677
GC7	0,035	82,32	0,012	0,99397	0,98476	0,99840
SC1	0,365	90,48	0,060	0,99552	0,96885	0,99992
SC2	0,142	86,73	0,001	0,99988	0,97378	0,99329
SC3	0,662	92,61	0,008	0,99641	0,91577	0,99975
SC4	0,742	93,98	0,017	0,99566	0,92497	0,99990
SC5	0,137	86,59	0,008	0,99891	0,98042	0,99329
SC6	0,001	69,13	0,009	0,99186	0,98145	0,97438

A análise da variância (ANOVA), utilizando os dados de todos os pontos de coleta, permitiu a comparação das porcentagens de dissolução dos medicamentos como um todo. Os perfis são considerados semelhantes quando $p > 0,05$, essa situação só não foi observada para 3 amostras: GC4, GC7 e SC6. Este resultado mostrou-se extremamente coerente com o observado nas Figuras 17 e 18, apresentando essas amostras visualmente os perfis mais distintos do perfil do medicamento referência.

Através da ferramenta de eficiência de dissolução (ED%) a área sob a curva foi determinada para cada comprimido testado e a comparação entre esses resultados foi realizada através de ANOVA. Valores de p menores que 0,05 confirmaram GC4, GC7 e SC6 como amostras não semelhantes ao referência quanto ao perfil de dissolução. Essa diferença estatisticamente significativa na dissolução pode não determinar uma diferença terapêutica. Seu efeito provavelmente seria melhor evidenciado para SC6, já no caso de GC4 e GC7, em que a porcentagem de dissolução desejada foi atingida, talvez não fossem observadas diferenças significativas na concentração plasmática de captopril entre teste e referência. O perfil de dissolução é um ensaio preliminar ao da bioequivalência, medicamentos que diferem muito do referência merecem atenção tanto da indústria para otimização de formulações e processos, quanto da ANVISA no que diz respeito a fiscalização. A ANOVA dos resultados de ED% se mostrou excessivamente rígida uma vez que considerou também GC2, GC3, GC6, GC7, SC2, SC3, SC4 e SC5 não comparáveis ao referência. Essa incoerência é melhor evidenciada quando observados os dados de SC3 e SC4, que possuíram ED% maiores que SC1 (92,61 e 93,98% respectivamente) e não foram considerados semelhantes ao referência. Isso se justifica na pequena variação observada nos dados de SC3 e SC4, o que fez com que a ANOVA os considerasse como grupos distintos do referência.

A cinética de liberação de um medicamento reflete características da droga e da forma farmacêutica, pode ser influenciada por polimorfismos, cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade, quantidade do fármaco na forma farmacêutica entre outros fatores e por isso é uma ferramenta

empregada para comparação de medicamentos. Espera-se que medicamentos análogos tenham sua liberação regida pelo mesmo princípio ou modelo de cinética. O modelo de cinética que melhor caracteriza a liberação do fármaco da amostra é aquele que determina a melhor linearidade dos dados quando tratados e plotados graficamente como descrito no item 4.3.12 para cada modelo cinético avaliado. Os intervalos de tempo utilizados para determinação do modelo foram os que apresentaram aumento da porcentagem de dissolução, ou seja, até o início do platô. A linearidade é avaliada através do coeficiente de correlação R^2 e o modelo que apresentar o valor mais próximo de 1 é o que melhor caracteriza a liberação.

A cinética de ordem zero foi observada para o medicamento referência Capoten[®]. Dissoluções que seguem essa ordem liberam o fármaco independente da quantidade já dissolvida, liberando a mesma quantidade por intervalo de tempo. Este tipo de comportamento é observado em formas farmacêuticas de liberação prolongada onde a forma farmacêutica não desagrega e o fármaco é liberado lentamente (MANADAS;PINA;VEIGA, 2002). Embora tenha liberado quantidades semelhantes do fármaco por unidade de tempo, essa quantidade foi grande o suficiente para o medicamento atingir 98% de dissolução em 6 min caracterizando uma liberação imediata.

A ferramenta cinética de dissolução determinou resultados duvidosos na análise de comprimidos de captopril, pois entre os quatro medicamentos que apresentaram a mesma cinética do referência encontra-se SC6, o medicamento com os piores resultados na análise por ANOVA e eficiência de dissolução. Além disso, os medicamentos com melhores resultados nestes testes apresentaram cinética de Higuchi, a qual é utilizada para descrever a dissolução de fármacos a partir de diversas formas farmacêuticas de liberação modificada. Também conhecido como pseudo-ordem zero, esse modelo descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, onde a porcentagem dissolvida é dependente da raiz quadrada do tempo (COSTA, P.;LOBO, J.M.S., 2001; MANADAS;PINA;VEIGA, 2002). Outro fato interessante foi que nenhum medicamento apresentou a cinética de primeira ordem, que é o modelo esperado para formas farmacêuticas de

liberação imediata. Concluímos que mesmo a liberação ocorrendo em função da raiz quadrada do tempo ou a quantidade sendo a mesma por intervalo de tempo acontece tão rápido e com tal intensidade que o perfil observado é de liberação imediata. Medicamentos com a mesma cinética liberam o ativo de forma semelhante em decorrência provavelmente de características de partícula e composição similares, porém para que o perfil seja semelhante a velocidade e intensidade de liberação deve ser equivalente e por isso a cinética pode ser um fator norteador no preparo de formulações mas não pode ser a única técnica de avaliação.

Com base nas ferramentas de comparação ANOVA e ED% e nos perfis observados, GC1, GC3, GC5, GC6, SC1, SC2, SC3, SC4 e SC5 foram considerados semelhantes ao Capoten[®].

5.5.2 PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE HIDROCLOROTIAZIDA 25 mg

Além das marcas analisadas quanto à equivalência farmacêutica, mais duas marcas de similares foram conseguidas junto a distribuidores de medicamentos. Porém, essas foram avaliadas apenas quanto ao seu perfil de dissolução, totalizando 2 marcas de genéricos e 4 de similares.

A Tabela 24 e a Figura 26 revelam o efeito da baixa solubilidade da hidroclorotiazida sob seu perfil de dissolução. Em 10 min sua dissolução varia de 17 a 52% enquanto captopril possui variação entre 59 e 105%. Em função dessa característica, captopril, que é um fármaco altamente solúvel, deve apresentar pelo menos 80% de dissolução em 20 min, enquanto hidroclorotiazida pelo menos 60% em três vezes esse tempo.

TABELA 24 – PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS, SIMILARES E REFERÊNCIA DE HIDROCLOROTIAZIDA 25 mg EM FUNÇÃO DO TEMPO.

Tempo (min)	Quantidade Dissolvida (%)						
	REFH	GH1	GH2	SH1	SH2	SH3	SH4
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	10,74	3,62	12,53	8,02	3,87	2,24	3,27
5	30,22	13,02	31,83	24,28	10,41	9,45	11,58
10	51,51	30,41	51,92	34,28	17,33	21,64	25,47
20	68,17	52,72	68,33	40,45	24,15	41,83	43,47
30	81,81	71,84	80,39	47,45	33,92	61,93	61,11
50	89,26	83,21	87,93	55,42	47,42	76,02	73,97
60	92,57	87,33	90,78	60,74	61,91	87,27	80,46
70	92,53	87,96	91,28	63,08	65,10	85,84	81,70

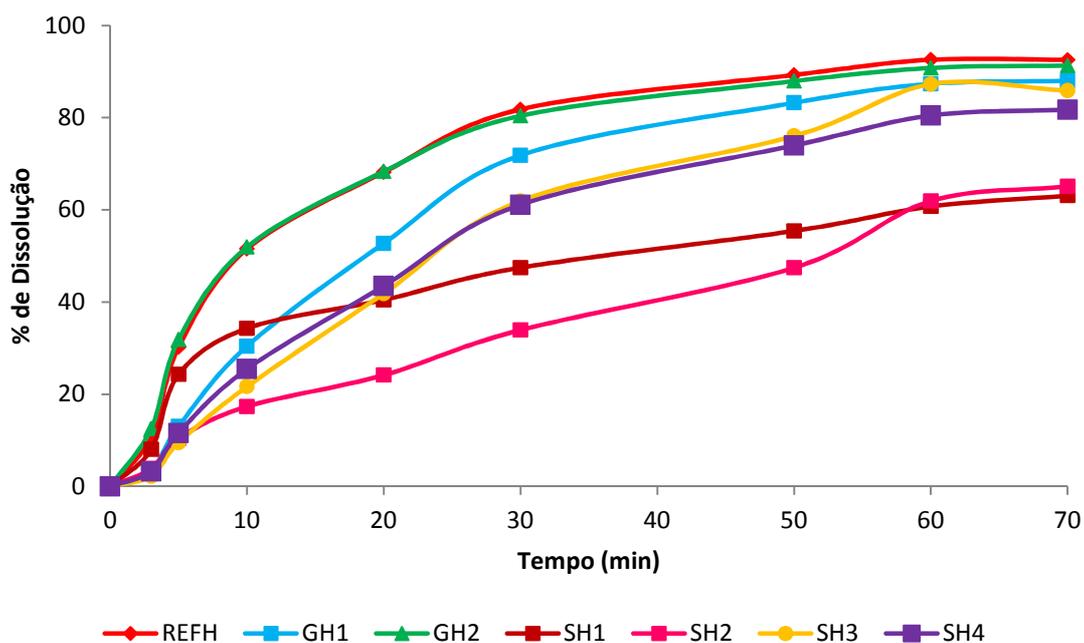


FIGURA 26 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS, SIMILARES E REFERÊNCIA DE COMPRIMIDOS DE HIDROCLOROTIAZIDA 25 mg.

Como pode ser observado na Tabela 24, todos os medicamentos analisados cumpriram o critério de 60% de dissolução em 60 minutos. Porém, SH1 e SH2 além de exibirem porcentagens muito próximas do limite, 60,74 e

61,91% respectivamente, mostraram perfil divergente do medicamento referência. Também é possível notar que, com exceção de GH2, todos os medicamentos apresentaram perfil retardado em relação a REFH.

5.5.2.1 Comparação dos perfis de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida 25 mg

A comparação dos perfis de dissolução de comprimidos de HCTZ foi feita utilizando, além das ferramentas de comparação já citadas para o CAP, o fator de semelhança f_2 . Isso devido a HCTZ ser um fármaco muito pouco solúvel em água. Os resultados obtidos com os diferentes métodos estão na Tabela 25.

TABELA 25 - ANÁLISE COMPARATIVA DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE HIDROCLOROTIAZIDA 25 mg.

Amostra	ANOVA	ED% (n=3)	ANOVA	Cinética de liberação (R^2)			f_2
	valor de p		valor de p	Zero ordem	Primeira ordem	Higuchi	
REFH	1,0000	73,66	1,00000	0,95946	0,98277	0,97962	100,00
GH1	0,2364	63,56	0,00348	0,93311	0,99758	0,99936	45,38
GH2	0,9773	72,92	0,53873	0,9391	0,97871	0,97551	88,60
SH1	0,0024	46,18	0,00006	0,83909	0,89309	0,90952	29,41
SH2	0,0001	36,89	0,00003	0,78825	0,93004	0,96612	23,37
SH3	0,0790	57,01	0,00829	0,97769	0,99911	0,99873	36,62
SH4	0,0553	55,91	0,00142	0,93285	0,99332	0,99875	37,08

FONTE: O AUTOR (2010).

Apesar de todos os medicamentos, com exceção de GH2, apresentarem perfil de dissolução retardado, a comparação por ANOVA das porcentagens de dissolução confirmou a discrepância apenas entre SH1 e SH2 e REFH, a qual havia sido notada também na Tabela 24 e Figura 26. No entanto, quando é

avaliada a área sob a curva no ensaio de ED%, é evidenciada a maior semelhança de GH2 quando comparada as demais amostras.

Clorana[®] (REFH) apresentou cinética de dissolução de primeira ordem, esta correlaciona o logaritmo neperiano da porcentagem não dissolvida com o tempo. Neste caso, a dissolução é dependente da quantidade remanescente de ativo na formulação de modo que a quantidade de fármaco liberada diminui com o tempo, comportamento característico de medicamentos de liberação imediata (COSTA, P.; LOBO, J.M.S., 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Esse modelo cinético descreveu também o comportamento de GH2 e SH3, confirmando a semelhança que provavelmente há entre essas formulações. Como pudemos observar, a liberação dos fármacos é maior no início, onde a quantidade de fármaco no comprimido é maior, sendo o modelo de primeira ordem teoricamente mais adequado para os comprimidos avaliados. Essa característica determina o formato do gráfico de perfil de dissolução da liberação imediata, íngreme no início com posterior formação de platô. A maioria dos medicamentos apresentou mais de 50% de dissolução em 50 minutos, o que nos permite classificá-los como formulações de liberação imediata. No entanto, GH1, SH1, SH2 e SH4 seguem a cinética de liberação de Higuchi, a qual descreve normalmente o perfil de formas de liberação modificada.

O fator de semelhança f_2 corresponde a uma medida da semelhança entre as porcentagens dissolvidas de duas formulações. É a transformação logarítmica da soma quadrática dos erros das diferenças entre uma formulação teste e um produto de referência. Esse é o parâmetro adotado pela ANVISA como determinante da equivalência entre perfis de dissolução. O único medicamento com f_2 entre 50 e 100 foi GH2 indicando sua semelhança com REFH. Devido aos resultados apresentados em todos os ensaios, e especialmente para f_2 , somente GH2 foi considerado semelhante.

5.5.3 PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE CAPTOPRIL (50 mg) E HIDROCLOROTIAZIDA (25 mg)

Embora as formas farmacêuticas associadas venham ganhando espaço e tragam benefícios terapêuticos, somente duas marcas dessa associação foram encontradas disponíveis em Curitiba, ambas classificadas como genérico. A porcentagem de dissolução de captopril e hidroclorotiazida, em função do tempo e para os três medicamentos avaliados, se encontra na Tabela 26.

TABELA 26 - PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE GENÉRICOS E REFERÊNCIA DA FORMA FARMACÊUTICA ASSOCIADA.

Tempo (min)	Quantidade Dissolvida (%)					
	REFCH		GCH1		GCH2	
	CAP	HCTZ	CAP	HCTZ	CAP	HCTZ
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,46	0,24	10,27	1,85	19,43	14,73
4	18,23	2,08	41,30	8,57	54,13	37,17
6	48,06	9,68	75,79	18,60	86,52	60,88
8	75,78	20,70	95,17	27,26	95,05	71,31
10	91,23	32,98	97,65	35,88	97,92	75,33
15	95,51	53,06	99,53	47,83	98,58	76,48
20	99,39	66,72	97,72	57,79	97,45	77,83
25	100,30	78,52	100,05	66,57	96,33	79,45
30	99,42	83,04	98,61	72,57	98,24	80,96
40	102,32	86,62	97,90	77,33	98,17	82,04
50	103,60	89,31	97,49	81,80	97,41	83,42
60	102,72	91,43	98,49	85,26	97,79	84,74
70	100,47	92,49	98,12	87,80	96,77	85,71
80	98,48	93,45	99,23	89,77	96,71	86,43

As Figuras 27 e 28 apresentam o perfil de dissolução dos fármacos CAP e HCTZ em comprimidos da associação, respectivamente. É possível observar a concordância entre a solubilidade dos fármacos e seu perfil de dissolução,

caracterizando-se a HCTZ pelo perfil mais lento. Isso não ficou tão evidente para GCH2, no qual a dissolução da HCTZ assumiu um formato mais parecido com o de captopril.

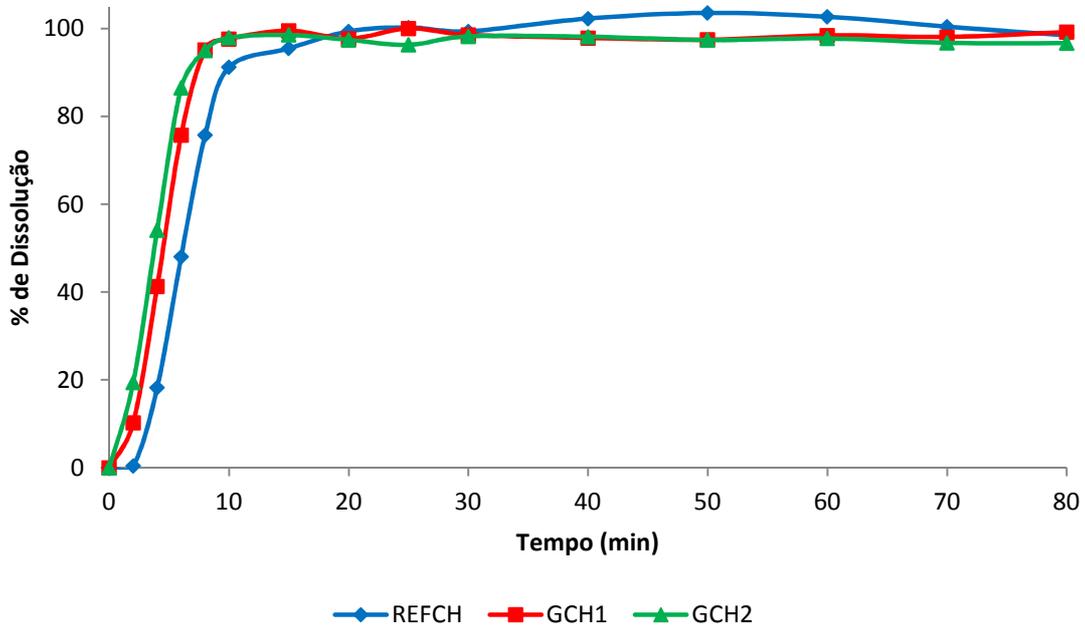


FIGURA 27 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE CAPTOPRIL EM COMPRIMIDOS DA ASSOCIAÇÃO.

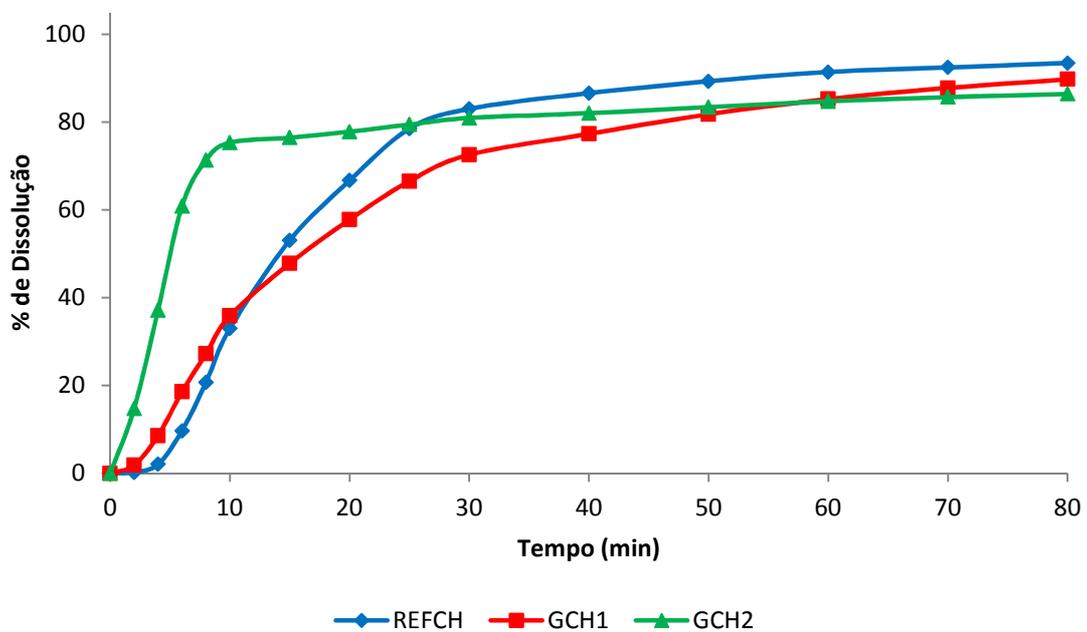


FIGURA 28 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE HIDROCLOROTIAZIDA EM COMPRIMIDOS DA ASSOCIAÇÃO.

Os três medicamentos apresentaram perfil muito semelhante quanto ao CAP. Já quanto a HCTZ, o genérico GCH2 apresentou uma dissolução quase instantânea, atingindo mais de 70% de dissolução em 8 min, porcentagem que só foi atingida pelos demais em torno de 25-30 min. Esse fato não deve ser visto como positivo, uma vez que os medicamentos genéricos e similares devem buscar apresentar características semelhantes ao referência, e não melhores, pois foi para este que os ensaios pré-clínicos e clínicos, incluindo a definição de posologia e intervalo entre doses foram realizados.

5.5.3.1 Comparação dos perfis de dissolução de comprimidos de captopril (50 mg) e hidroclorotiazida (25 mg)

Os perfis de dissolução dos dois fármacos presentes em associação foram comparados, os resultados obtidos para os dois genéricos e o referência estão colocados na Tabela 27.

TABELA 27 – ANÁLISE COMPARATIVA DOS PERFIS DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM COMPRIMIDOS DA ASSOCIAÇÃO.

Ferramenta de comparação	Captopril			Hidroclorotiazida		
	REFCH	GCH1	GCH2	REFCH	GCH1	GCH2
ANOVA (valor de p)	1,0000	0,5308	0,1845	1,0000	0,7397	0,0782
ED%	92,6209	92,8655	92,9568	73,2600	67,6765	77,4871
ANOVA (valor de p)	1,0000	0,87386	0,90276	1,0000	0,0034	0,2165
Fator de semelhança f2	-	-	-	100,00	56,56	29,44
Cinética de liberação (R²)						
Zero Ordem	0,9906	0,9991	0,9996	0,9990	0,9771	0,9998
Primeira Ordem	0,9317	0,9603	0,9564	0,9767	0,9917	0,9847
Higuchi	0,9611	0,9888	0,9969	0,9716	0,9774	0,9916

Os resultados de captopril para as três amostras se mostraram bastante parecidos, as quatro formas de comparação dos perfis determinaram a mesma resposta: os medicamentos possuem comportamento semelhante. Conforme já comentado anteriormente, apesar dos medicamentos liberarem a mesma quantidade de fármaco em função do tempo e, portanto apresentarem cinética de ordem zero, o que é característico de formas de liberação prolongada, essa liberação ocorreu em um curto período de tempo e em uma extensão próprios da liberação imediata.

A avaliação dos perfis de HCTZ pela ANOVA não determinou diferença significativa entre eles. Na análise de ED%, embora os três medicamentos possuam valores próximos, a ANOVA desses resultados determinou diferença para GCH1. O fator f2 divergiu completamente da ANOVA para ED%, mas se mostrou coerente com o perfil de dissolução observado na Figura 28, estabelecendo semelhança para GCH1 e não para GCH2. O reconhecimento do fator f2 pela ANVISA como ferramenta de referência na comparação de medicamentos unida a sua coerência com os gráficos de dissolução nos convenceu da sua capacidade de distinção entre os perfis. Com base nesses dados, apenas GCH1 foi considerado semelhante a Lopril-D.

6 CONCLUSÃO

A pesquisa bibliográfica unida à vivência laboratorial trouxe um novo desafio em relação a fármacos tão consagrados como captopril e hidroclorotiazida. A necessidade de dinamismo e otimização nas análises de controle de qualidade exigidas no atual panorama da indústria de medicamentos nos levou a desenvolver um método que permitisse a determinação desses fármacos e seus principais compostos relacionados simultaneamente.

O método desenvolvido através de CLAE-DAD se revelou adequado para a quantificação de captopril, hidroclorotiazida, dissulfeto de captopril, clorotiazida e benzotiadiazina em comprimidos. Através da validação, os parâmetros seletividade, linearidade, precisão e exatidão apresentaram conformidade com as exigências nacionais e internacionais vigentes. Quanto a robustez, pequenas variações na composição da fase móvel, fluxo e temperatura não alteraram o desempenho do método, porém o pH revelou-se um parâmetro crítico para a determinação de dissulfeto de captopril, sendo importante o rigor no seu controle. Por tornar possível a determinação simultânea dos compostos citados, o método consiste numa alternativa rápida, econômica e segura para a indústria de medicamentos, laboratórios de pesquisa e de controle de qualidade.

A constatação mundial da hipertensão como um dos principais problemas de saúde da atualidade e a extensão e importância do uso de captopril e hidroclorotiazida no tratamento desta no Brasil, reforçam a necessidade de averiguar a qualidade dos medicamentos que os contenham. Os resultados da avaliação da equivalência farmacêutica foram preocupantes, dada a não conformidade de duas amostras de captopril (GC1 e SC1) e uma de hidroclorotiazida (SH1), confirmando a necessidade de fiscalização dos medicamentos durante seu período de comercialização. Os perfis de dissolução apresentaram resultados ainda piores, pois das sete marcas de genéricos de captopril 25 mg, três possuíam perfil distinto do referencial. Já entre os similares (total de seis) isso ocorreu apenas para uma das marcas.

Entre os dois genéricos e quatro similares de hidroclorotiazida 25 mg apenas GH2 exibiu semelhança com o referência (REFH). Já na forma farmacêutica associada, dos dois genéricos testados apenas um teve perfil semelhante ao Lopril-D[®]. Esses resultados demonstram a necessidade de novos ensaios com outros lotes a fim de identificar se a falha na produção é pontual ou sistêmica. Além disso, geram preocupação quanto a qualidade dos medicamentos produzidos disponíveis comercialmente e podem refletir efeito terapêutico indesejado e ineficácia do tratamento.

7 REFERÊNCIAS

ALBERO, M. I. *et al.* Determination of captopril in pharmaceutical samples by flow injection analysis. **J Pharm Biomed Anal**, v. 11, n. 10, p.887-91, 1993.

AOAC. **Peer Verified Methods. Program, Manual on Policies and Procedures.** Arlington, Va. 1993.

ARANCÍBIA, A. Calidad biofarmacêutica: estudos "in vivo" e "in vitro". **Acta Farm. Bonaerense**, v. 10, n. 2, p.123-133, 1991.

ARROYO, C. *et al.* Determination of captopril in plasma by high-performance liquid chromatography for pharmacokinetic studies. **J Chromatogr Biomed Sci Appl**, v. 688, n. 2, p.339-44, 1997.

AYKIN, N. *et al.* Determination of captopril in biological samples by high-performance liquid chromatography with ThioGlo 3 derivatization. **Biomed Chromatogr**, v. 15, n. 7, p.427-32, 2001.

BATALLA-MARTÍNEZ, C. *et al.* Cumplimiento de la prescripción farmacológica en pacientes hipertensos. **Aten Primaria**, v. 1, n. 4, p.185-191, 1984.

BATALLA MARTINEZ, C. One more tool to improve therapeutic compliance. **Aten Primaria**, v. 41, n. 4, p.191-2, 2009.

BATHALA, M. S. *et al.* Quantitative determination of captopril in blood and captopril and its disulfide metabolites in plasma by gas chromatography. **J Pharm Sci**, v. 73, n. 3, p.340-4, 1984.

BEBAWY, L. I. *et al.* Application of first-derivative, ratio derivative spectrophotometry, TLC-densitometry and spectrofluorimetry for the simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and plasma. **II Farmaco**, v. 60, n. 10, p.859-67, 2005.

BELAL, F. *et al.* A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. **J Pharm Biomed Anal**, v. 24, n. 3, p.335-42, 2001.

BRASIL. ANVISA. Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999. Dispõe sobre a vigilância sanitária estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 1999a.

BRASIL. ANVISA. Resolução nº 391, de 9 de agosto de 1999. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, p. 62-69. 1999b.

BRASIL. ANVISA. Resolução n 899 de 29 maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2003.

BRASIL. ANVISA. Resolução RE nº 310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do "Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução". **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, p. 28, 2004.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira 4 ed.** ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº 17, de 02 de março de 2007. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2007.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº 31 de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2010.
BRIGANTE, M. *et al.* Degradation of hydrochlorothiazide in water. **Environ Chem Lett**, v. 2, n. 4, p.195-198, 2005.

BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British Pharmacopoeia**. 5. ed. London: The Stationery Office, 2005.

BUTTERFIELD, A. G.; LOVERING, E. G.; SEARS, R. W. Simultaneous determination of reserpine and hydrochlorothiazide in two-component tablet formulations by high-performance liquid chromatography. **J Pharm Sci**, v. 67, n. 5, p.650-3, 1978.

CARDIOLOGIA, S. B. D.; HIPERTENSÃO, S. B. D.; NEFROLOGIA, S. B. D. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n., 2010.

CARDIOLOGIA, S. B. D.; NEFROLOGIA, S. B. D.; ARTERIAL, S. B. D. H. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol**, v. 89, n. 3, 2007.

CARLUCCI, G. *et al.* Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. **J Pharm Biomed Anal**, v. 23, n. 1, p.185-9, 2000.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégia e Validação**. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2001.

CHOBANIAN, A. V. *et al.* Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p.1206-1252, 2003.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de Medições em Química Analítica. Estudo de caso: Determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. . **Quím Nova**, v. 24, n. 3, p.374-380, 2001.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. 1. ed: Edgar Blücher, 1998.

COHEN, A. I. *et al.* Determination of captopril in human blood and urine by GLC-selected ion monitoring mass spectrometry after oral coadministration with its isotopomer. **J Pharm Sci**, v. 71, n. 11, p.1251-6, 1982.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur J Pharm Sci**, v. 13, n. 2, p.123-133, 2001.

DU, J.; LI, Y.; LU, J. Flow injection chemiluminescence determination of captopril based on its enhancing effect on the luminol-ferricyanide/ferrocyanide reaction. **Luminescence**, v. 17, n. 3, p.165-7, 2002.

EL-ARINI, S. K.; LEUENBERGER, H. Modeling of drug release from polymer matrices: effect of drug loading. **Int J Pharm**, v. 121, n. 2, p.141-148, 1995.

EL-BRASHY, A. M. Titrimetric determination of captopril in dosage forms. **Acta Pharm Hung**, v. 65, n. 3, p.91-3, 1995.

EL-SHABRAWY, Y.; EL-ENANY, N.; SALEM, K. Sensitive kinetic spectrophotometric determination of captopril and ethamsylate in pharmaceutical preparations and biological fluids. **II Farmaco**, v. 59, n. 10, p.803-8, 2004.

EL REIS, M. A.; ABOU ATTIA, F. M.; KENAWY, I. M. Indirect determination of captopril by AAS. **J Pharm Biomed Anal**, v. 23, n. 2-3, p.249-54, 2000.

EL WALILY, A. F. *et al.* Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. **J Pharm Biomed Anal**, v. 13, n. 7, p.851-6, 1995.

EL WALILY, A. F. *et al.* Utilization of carbon disulphide for the analytical determination of betahistine hydrochloride and captopril in their pharmaceutical preparations. **J Pharm Biomed Anal**, v. 21, n. 2, p.439-49, 1999.

ELSHANAWANE, A. A.; MOSTAFA, S. M.; ELGAWISH, M. S. Development and validation of an LC method for simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in human urine. **J AOAC Int**, v. 92, n. 3, p.813-9, 2009.

ERK, N. Application of first derivative UV-spectrophotometry and ratio derivative spectrophotometry for the simultaneous determination of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide. **Pharmazie**, v. 58, n. 11, p.796-800, 2003a.

ERK, N. Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography. **J Chromatogr B**, v. 784, n. 1, p.195-201, 2003b.

ESPANOLA, F. O. **Farmacopea Oficial Espanola**. 9. ed. Madrid, 1954.

EZZATI, M. *et al.* Rethinking the "diseases of affluence" paradigm: global patterns of nutritional risks in relation to economic development. **PLoS Med**, v. 2, n. 5, p.133, 2005.

FANG, X. G. *et al.* Purification and identification of an impurity in bulk hydrochlorothiazide. **J Pharm Sci**, v. 90, n. 11, p.1800-1809, 2001.

FDA-CDER. Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. **Center for Drug Evaluation and Research (CDER)**. Rockville, 1997.

FDA. Reviewer Guidance – Validation of chromatographic methods of Food and Drug Administration. **Center for Drug Evaluation and Research (CDER)**. Rockville, 1994.

FDA. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. **Center for Drug Evaluation and Research (CDER)**. Rockville, 2000.

FERNANDES, C. **Estudo de equivalência farmacêutica de comprimidos de lamivudina 150 mg**. 189p f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

FERRARO, M. C.; CASTELLANO, P. M.; KAUFMAN, T. S. Simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in synthetic samples and pharmaceutical formulations by multivariate analysis of spectrophotometric data. **J Pharm Biomed Anal**, v. 30, n. 4, p.1121-31, 2002.

FIRMO, J. O.; BARRETO, S. M.; LIMA-COSTA, M. F. The Bambui Health and Aging Study (BHAS): factors associated with the treatment of hypertension in older adults in the community. **Cad Saude Publica**, v. 19, n. 3, p.817-27, 2003.

FRAGA, J. M. *et al.* Application of principal component regression to the determination of Captopril by differential pulse polarography with no prior removal of dissolved oxygen. **Talanta**, v. 46, n. 1, p.75-82, 1998.

FUNKE, P. T. *et al.* Gas chromatography/selected ion monitoring mass spectrometric determination of captopril in human blood. **Anal Chem**, v. 52, n. 7, p.1086-9, 1980.

GAO, L.; WU, L.; LI, Q. Catalysis reaction between sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate and hydroxyl ion using captopril as catalyzer and determination of captopril. **Anal Chim Acta**, v. 626, n. 2, p.174-9, 2008.

GAO, S.; TIAN, W.; WANG, S. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of captopril in biological fluids. **J Chromatogr**, v. 582, n. 1-2, p.258-62, 1992.

GEREZ, J. C. Indústria farmacêutica: histórico, mercado e competição. **Ciência Hoje**, v. 15, n. 89, p.21-30, 1993.

GHASEMI, N.; NIAZI, A. Determination of captopril in pharmaceutical preparation and biological fluids using two- and three-way chemometrics methods. **Chin Chem Lett**, v. 18, n. 4, p.427-430, 2007.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Anal Chem**, v. 68, n. 9, p.A305-a309, 1996.

GU, J.; CUI, Y. Determination of captopril in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Drug Metab Rev**, v. 38, p.142-142, 2006.

GUS, I. *et al.* Prevalence, awareness, and control of systemic arterial hypertension in the state of Rio Grande do Sul. **Arq Bras Cardiol**, v. 83, n. 5, p.424-433, 2004.

HAYASHI, K.; MIYAMOTO, M.; SEKINE, Y. Determination of captopril and its mixed disulphides in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr**, v. 338, n. 1, p.161-9, 1985.

HERTZOG, D. L. *et al.* Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products. **J Pharm Biomed Anal**, v. 30, n. 3, p.747-60, 2002.

HILLAERT, S.; DE GRAUWE, K.; VAN DEN BOSSCHE, W. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several inhibitors of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis. **J Chromatogr A**, v. 924, n. 1-2, p.439-449, 2001.

HILLAERT, S.; VAN DEN BOSSCHE, W. Determination of captopril and its degradation products by capillary electrophoresis. **J Pharm Biomed Anal**, v. 21, n. 1, p.65-73, 1999a.

HILLAERT, S.; VAN DEN BOSSCHE, W. Determination of captopril on a coated capillary by capillary electrophoresis. **J Pharm Belg**, v. 54, n. 3, p.83-4, 1999b.

HUANG, T. *et al.* Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide in human plasma by reverse-phase HPLC from linear gradient elution. **J Pharm Biomed Anal**, v. 41, n. 2, p.644-8, 2006.

HYPERTENSION, E. S. O.; CARDIOLOGY, E. S. O. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. **J Hypertens**, v. 21, n. 6, p.1011-53, 2003.

ICH. Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). novembro, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008. março, 2003.

IOANNIDES, X.; ECONOMOU, A.; VOULGARPOULOS, A. A study of the determination of the hypertensive drug captopril by square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 33, n. 2, p.309-16, 2003.

ITO, T. *et al.* Sensitive method for determination of captopril in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr**, v. 417, n. 1, p.79-87, 1987.

IVANOVIC, D. *et al.* Validation of the RP-HPLC method for analysis of hydrochlorothiazide and captopril in tablets. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 9, n. 1-2, p.76-81, 2004.

IVASHKIV, E.; MCKINSTRY, D. N.; COHEN, A. I. Determination of total captopril in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry with selected-ion monitoring after reduction of disulfides. **J Pharm Sci**, v. 73, n. 8, p.1113-7, 1984.

JAIN, R.; JAIN, C. L. Simultaneous quantification of captopril and hydrochlorothiazide using high-performance liquid chromatography. **Ind. Drugs**, v. 28, n. 8, p.380-382, 1991.

JR, D. M.; PIERIN, A. M. G.; GUIMARAES, A. Tratamento da hipertensão arterial - respostas de médicos brasileiros a um inquérito. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 3, 2001.

KEARNEY, P. M. *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, n. 9455, p.217-23, 2005.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **J Pharm Pharmacol**, v. 27, n. 1, p.48-9, 1975.

KIRSCHBAUM, J.; PERLMAN, S. Analysis of captopril and hydrochlorothiazide combination tablet formulations by liquid chromatography. **J Pharm Sci**, v. 73, n. 5, p.686-687, 1984.

KOCIJAN, A. *et al.* Effect of column temperature on the behaviour of some angiotensin converting enzyme inhibitors during high-performance liquid chromatographic analysis. **J Chromatogr B**, v. 755, n. 1-2, p.229-35, 2001.

KOLOCOURI, F. *et al.* Simultaneous determination of losartan, EXP-3174 and hydrochlorothiazide in plasma via fully automated 96-well-format-based solid-phase extraction and liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 387, n. 2, p.593-601, 2007.

KROUSEL-WOOD, M. *et al.* Medication adherence: a key factor in achieving blood pressure control and good clinical outcomes in hypertensive patients. **Curr Opin Cardiol**, v. 19, n. 4, p.357-62, 2004.

KUSMIEREK, K.; BALD, E. A simple liquid chromatography method for the determination of captopril in urine. **Chromatographia**, v. 66, n. 1-2, p.71-74, 2007.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. 1. ed. São Carlos: RiMa Editora, 2004.

LEIS, H. J. *et al.* Determination of captopril in human blood by gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry with [¹⁸O₄]captopril as internal standard. **J Chromatogr**, v. 529, n. 2, p.299-308, 1990.

LI, K.; TAN, L.; ZHOU, J. A. HPLC determination of captopril in human plasma and its pharmacokinetic study. **Biomed Chromatogr**, v. 10, n. 5, p.237-9, 1996.

LIU, C. *et al.* Determination of captopril in tablets by gas chromatography (GC). **Se Pu**, v. 16, n. 1, p.82-3, 1998.

LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Med J**, v. 123, n. 1, p.3-4, 2005.

LUSINA, M. *et al.* Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. **Int J Pharm**, v. 291, n. 1-2, p.127-137, 2005.

MAGGIO, R. M.; CASTELLANO, P. M.; KAUFMAN, T. S. A multivariate approach for the simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in a combined pharmaceutical tablet formulation. **Anal Bioanal Chem**, v. 391, n. 8, p.2949-55, 2008.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêutica de liberação modificada. **Rev Bras Cien Farm**, v. 38, n. 4, p.375-399, 2002.

MARCATTO, A. C. Análise de cápsulas de captopril manipuladas em farmácias. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 26, n. 3, p.221-225, 2005.

MATSUKI, Y. *et al.* Determination of captopril and its disulphide in biological fluids. **J Chromatogr**, v. 239, p.585-94, 1982.

MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Quantitative determination of captopril and prednisolone in tablets by FT-Raman spectroscopy. **J Pharm Biomed Anal**, v. 40, n. 5, p.1225-30, 2006.

MIRZA, T.; TAN, H. S. Determination of captopril in pharmaceutical tablets by anion-exchange HPLC using indirect photometric detection; a study in systematic method development. **J Pharm Biomed Anal**, v. 25, n. 1, p.39-52, 2001.

NAIAZI, A.; GHASEMI, N. PARAFAC and PLS applied to determination of captopril in pharmaceutical preparation and biological fluids by ultraviolet spectrophotometry. **Ann Chim**, v. 97, n. 9, p.845-858, 2007.

NIKOLIC, K. I.; VELASEVIC, K. R. Potentiometric determination of captopril. **J Pharm Belg**, v. 45, n. 1, p.17-9, 1990.

OATES, J. A.; BROWN, N. J. Anti-hipertensivos e Terapia Farmacológica da Hipertensão. In: MCGRAW-HILL (Ed.). **Goodman & Gilman, As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, ed. Rio de Janeiro, 2003.

OUYANG, J. *et al.* Cerium (IV)-based chemiluminescence analysis of hydrochlorothiazide. **Talanta**, v. 46, n. 5, p.961-968, 1998a.

OUYANG, J. *et al.* Narrow-bore liquid chromatography coupled to chemiluminescence detection for the analysis of pharmaceutical preparations containing hydrochlorothiazide and captopril. **Biomed Chromatogr**, v. 12, n. 3, p.160-1, 1998b.

OUYANG, J. *et al.* Chemiluminescence-based liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide and captopril. **Anal Chim Acta**, v. 386, n. 3, p.257-264, 1999.

PANDERI, I.; PARISSI-POULOU, M. Determination of captopril and captopril-hydrochlorothiazide combination in tablets by derivative UV spectrophotometry. **Int J Pharm**, v. 86, n. 2-3, p.99-106, 1992.

PAREKH, S. A. *et al.* Simultaneous determination of hydrochlorothiazide, quinapril and quinaprilat in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 873, n. 1, p.59-69, 2008.

PARHAM, H.; ZARGAR, B. Square-wave voltammetric (SWV) determination of Captopril in reconstituted serum and pharmaceutical formulations. **Talanta**, v. 65, n. 3, p.776-80, 2005.

PEREZ-RUIZ, T.; MARTINEZ-LOZANO, C.; GALERA, R. Development and validation of a capillary electrophoresis method with laser-induced fluorescence detection for the determination of captopril in human urine and pharmaceutical preparations. **Electrophoresis**, v. 27, n. 12, p.2310-6, 2006.

PHARMACOPOEIA, E. **European Pharmacopoeia**. 2. ed. Paris: Maisonneuve, 1994.

PHARMACOPOEIA, J. **The Japanese Pharmacopoeia**. 15. ed, 2006.

POLLI, J. E.; CRISON, J. R.; AMIDON, G. L. Novel approach to the analysis of in vitro-in vivo relationships. **J Pharm Sci**, v. 85, n. 7, p.753-60, 1996.

RAHMAN, N.; SINGH, M.; HODA, N. Validation of simultaneous volumetric and spectrophotometric methods for the determination of captopril in pharmaceutical formulations. **Il Farmaco**, v. 60, n. 6-7, p.569-74, 2005.

REVELLE, L. K. *et al.* Identification of chlorothiazide and hydrochlorothiazide UV-A photolytic decomposition products. **J Pharm Sci**, v. 86, n. 5, p.631-4, 1997.

REZENDE, K. R. *et al.* Determination of captopril in human plasma, using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography, coupled to mass spectrometry: application to bioequivalence study. **J Chromatogr B**, v. 850, n. 1-2, p.59-67, 2007.

RIBANI, M. *et al.* Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quim Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

ROUGE, N.; BURI, P.; DOELKER, E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. **Intern J Pharm**, v. 136, n., p.117-139, 1996.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 5. ed: Pharmaceutical Press, 2006.

SALEM, II *et al.* A selective and rapid method for the quantification of captopril in human plasma using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 37, n. 5, p.1073-80, 2005.

SALEM, H. *et al.* U.V. and U.V. Derivative Spectrophotometric Determination of Two- Component Mixtures **Spectros Lett**, v. 24, n. 3, p.451-470, 1991.

SALVADORI, M. C. *et al.* Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in human plasma by LC/MS/MS with electrospray ionization and its application to pharmacokinetics. **Clin Exp Hypertens**, v. 31, n. 5, p.415-27, 2009.

SARQUIS, L. M. *et al.* Compliance in antihypertensive therapy: analyses in scientific articles. **Rev Esc Enferm USP**, v. 32, n. 4, p.335-53, 1998.

SERRA, C. H. R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos cinéticos e eficiência de dissolução ED%. **Rev Bras Cien Farm**, v. 43, n. 1, p.79-88, 2007.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J Chromatogr A**, v. 987, n. 1-2, p.57-66, 2003.

SKOOG, D. A. *et al.* **Analytical Chemistry**. 7 ed. ed. Orlando: Saunders College Publishing, 1999.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. Danvers: John Wiley & Sons, INC, 1997.

SOCIETY, B. H. British Hypertension Society guidelines (BHS-IV). **J Fam Practice**, v. 53, n. 7, p.528-50, 2004.

SONG, M. *et al.* Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionisation. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 21, n. 21, p.3427-34, 2007.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V. O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, v. 31, n. 2, p.63-70, 1995.

STORPIRTIS, S. *et al.* A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, n. 9-10, p.51-56, 2004.

SYPNIEWSKI, S.; BALD, E. Determination of captopril and its disulphides in whole human blood and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and precolumn derivatization. **J Chromatogr A**, v. 729, n. 1-2, p.335-40, 1996.

TACHE, F. *et al.* Validation of a LC-fluorescence method for determination of free captopril in human plasma, using a pre-column derivatization reaction with monobromobimane. **J Pharm Biomed Anal**, v. 28, n. 3-4, p.549-57, 2002.

TAMAT, S. R.; MOORE, D. E. Photolytic decomposition of hydrochlorothiazide. **J Pharm Sci**, v. 72, n. 2, p.180-3, 1983.

THOMAS, B. R. *et al.* Validated Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Method for Quality-Control of the Drug Substances Hydrochlorothiazide and Chlorothiazide. **J Chromatogr B**, v. 657, n. 2, p.383-394, 1994.

TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Quim Nova**, v. 25, n. 4, p.616-623, 2002.

TUTUNJI, M. F. *et al.* Simultaneous determination of bisoprolol and hydrochlorothiazide in human plasma by HPLC coupled with tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 877, n. 16-17, p.1689-97, 2009.

TZANAVARAS, P. D. *et al.* Reversed flow-injection manifold for the spectrophotometric determination of captopril based on its inhibitory effect on the Co(II)-2,2'-dipyridyl-2-pyridylhydrazone complex formation. **Talanta**, v. 57, n. 3, p.575-81, 2002.

ULVI, V.; TAMMILEHTO, S. Photodecomposition Studies on Chlorothiazide and Hydrochlorothiazide. **Acta Pharm Nord**, v. 1, n. 4, p.195-200, 1989.

USP. **The United States Pharmacopeia**. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

USP. **The United States Pharmacopeia**. USP 34 - NF 29. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention 2011.

USTUNDAG, O.; DINC, E. Simultaneous resolution of a binary mixture of captopril and hydrochlorothiazide in tablets by bivariate and multivariate spectral calibrations. **Pharmazie**, v. 58, n. 9, p.623-628, 2003.

VAN DER MEER, M. J.; BROWN, L. W. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr**, v. 423, p.351-7, 1987.

VANCEA, S. *et al.* Determination of free captopril in human plasma by liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 79, n. 2, p.436-41, 2009.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 14, n. 8-10, p.867-869, 1996.

VIEIRA, F. S.; ZUCCHI, P. Diferenças de preços entre medicamentos genéricos e de referência no Brasil. **Rev Saude Publica**, v. 40, n. 3, p.444-9, 2006.

WAKABAYASHI, H. *et al.* Application of an electrochemical detector with a graphite electrode to liquid chromatographic determination of penicillamine and captopril in biological samples. **J Pharm Biomed Anal**, v. 12, n. 9, p.1147-52, 1994.

WHITWORTH, J. A. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. **J Hypertens**, v. 21, n. 11, p.1983-92, 2003.

WOLF-MAIER, K. *et al.* Hypertension treatment and control in five European Countries, Canada, and the United States. **Hypertension**, v. 43, n. 1, p.10-17, 2004.

ZHONG, D. *et al.* Determination of captopril plus its disulfide metabolites in human plasma. **Yao Xue Xue Bao**, v. 33, n. 8, p.605-9, 1998.

ANEXO

Simultaneous determination of captopril, hydrochlorothiazide and their related compounds in combined pharmaceutical tablet formulation by validated HPLC method

Bianca Sarturi Hess¹, João Cleverson Gasparetto¹, Marco André Cardoso¹ and Roberto Pontarolo^{1,*}

¹DEPARTMENT OF PHARMACY, FEDERAL UNIVERSITY OF PARANÁ,
AV. PREFEITO LOTHÁRIO MEISSNER, 3400, CURITIBA, PARANÁ, BRAZIL;
E-MAIL: PONTAROLO@UFPR.BR

Keywords: captopril, hydrochlorothiazide, simultaneous determination, HPLC, related compounds.

Abstract

A new sensitive, rapid and simple HPLC-DAD method was developed and validated for simultaneous determination of captopril (CAP), hydrochlorothiazide (HCTZ) and their related compounds, captopril disulfide (CAD), chlorothiazide (CTZ), and 4-amino-6-chloro-1,3 benzenedisulfonamide (BTDZ) in tablets. The chromatography separation was achieved using a phenyl column (150 x 4.6mm, 5 µm particle size) maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile and phosphoric acid solution (0.067%) eluted at 1.2 mL min⁻¹ in gradient mode. The injection volume was 20 µL and the detection wavelength set at 220 nm. The method showed to be selective and linear over a range of 0.5 to 400.0 µg mL⁻¹ for CAP, 0.313 to 14.4 µg mL⁻¹ for CAD, 0.05 to 100.0 µg mL⁻¹ for HCTZ, 0.078 to 1.2 µg mL⁻¹ for CTZ and 0.02 to 2.4 µg mL⁻¹ for BTDZ. The accuracy test resulted in recoveries range of 98.82 to 101.31% and for intra and inter-day precision RSD <5% was obtained. The robustness test indicated that changes in the pH values can compromise the selectivity. The proposed method was successfully used in real samples and presents as a fast and cheap alternative for the quality control of raw materials and tablets containing these drugs.

1. Introduction

Captopril (1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-proline), an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACE-inhibitor), and hydrochlorothiazide (6-chloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide-1,1-dioxide), a thiazide diuretic agent, are used in combination dosage form to increase the efficacy of the treatment of systemic arterial hypertension in patients whose blood pressure is not adequately controlled with either substance alone [1, 2]. Therapeutic strategies using both drugs are worldwide used as an alternative for better therapy compliance, and therefore, the determination of these substances as well as monitoring their related compounds is extremely necessary for ensuring a safe and effective therapy.

Captopril (CAP) in aqueous solution undergoes spontaneous oxidative degradation in its sulfhydryl group generating a dimer, captopril disulfide (CAD) [3]. In the same condition, hydrochlorothiazide (HCTZ) is hydrolysed to 4-amino-6-chlorobenzenedisulfonamide (BTDZ) and formaldehyde [4-6]. Chlorothiazide and 4-amino-6-chloro-1,3-benzenedisulfonamide are wellknown process impurities of HCTZ and Fang et al. (2001) identified another impurity in bulk HCTZ, HCTZ-CH₂-HCTZ isomer [7, 8]. Additionally, hydrochlorothiazide photodegradation may also occur mainly through photodehalogenation and photohydrolysis [9, 10]. In this case 4-amino-6-chlorobenzenedisulfonamide (BTDZ) and chlorothiazide (CTZ) are the main products coming from the photoprocesses [10, 11] [12].

Although no toxicity was related to the CAP and HCTZ degradation products, the presence of these compounds are directly related to the treatment efficacy, once high levels would compromise the drug dosage amounts and consequently the therapeutic effects. Therefore, monitor the actives and the main compounds related to the sample degradation is indispensable to ensure quality in raw material and medicines. To meet this requirement, several analytical methods have been applied using different techniques as spectrophotometry [13, 14], capillary electrophoresis [15, 16], HPLC [6, 17-19], GC [20] chemiluminescence [21, 22] and titrimetry [23]. Nevertheless, these methods evaluate CAP, HCTZ and their related products separately. In other cases, simultaneous CAP and HCZT determination were performed by HPLC [24-27], derivative spectrophotometry [28, 29] and multivariate spectral calibration [30]. However it involves complicated procedures and additionally no related compounds are

monitored. Finally, the United States Pharmacopoeia (USP) recognizes the necessity of CAP and HCTZ related compounds determination. Nevertheless, the official monography uses separately chromatographic systems for limit of CAD and CAP, HCTZ and BTZ determination. Additionally, the described systems not determine CTZ [31].

The aim of this work was to develop and validate a simple, rapid and sensitive method by HPLC-DAD for simultaneous determination of captopril, hydrochlorothiazide and their main related compounds, captopril disulfide, chlorothiazide and 4 -amino-6-chloro-benzenodissulfonamida in tablets. As the advantage, the new method is presented as an alternative for those described in the literature with additional economical and environment benefits, once it was considered fast, cheap, and without requires high time and chemical-consuming or sample derivatization.

2. Experimental

2.1. Chemicals, reagents, standards and samples

Commercial samples of CAP and HCTZ tablet associations were obtained in local pharmacies to Curitiba, Brazil. Phosphoric acid (85.8%), formic acid 88%, acetonitrile and methanol (HPLC grade) were purchased from J. T. Baker (Phillipsburg, USA). Ultrapure water was obtained by Milli-Q reverse osmosis Millipore (Bedford, USA). The standards of captopril disulfide (99%) and chlorothiazide (99.2%) were purchased from USP Reference Standards. Captopril (99.6%) and hydrochlorothiazide (100.1%) were acquired from Brazilian Pharmacopeia while 4-amino- 6-chloro-1,3-benzenedisulfonamide (98.0%) from Sigma-Aldrich. For the accuracy test, placebos were prepared in the laboratory using United Stated Pharmacopoeia grade excipients (starch, lactose, magnesium stearate, cellulose microcrystalline and stearic acid).

2.2. Preparation of stock and working standard solutions

Stock solutions of CAP, CAD, HCTZ, CTZ and BTZ were prepared separately in methanol at a concentration of 1 mg mL⁻¹. The solutions of CAD, BTZ and CTZ

were stored at 4 °C, in light-resistant containers, and allowed to reach room temperature before use. CAP and HCTZ solutions were prepared immediately before use. Working standard solution was prepared by mixing the stock solutions in a diluent composed of 0.067% phosphoric acid: acetonitrile (85:15, v/v) to obtain a final concentration of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CAP, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CAD, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for HCTZ, 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CTZ and 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for BZT. From these solutions, other working standard solutions were prepared through new dilutions as needed. All solutions were filtered through a PVDF syringe filter (0.45 μm , Millipore Millex) before injection.

2.3. Sample preparations

Twenty tablets of CAP and HCTZ association were crushed and mixed to obtain a homogeneous powder. An amount of powdered mass equivalent to one tablet content (50 mg of CAP and 25 mg of HCTZ) was added to a 25 mL volumetric flask containing 15 mL of diluent solution (0.067% phosphoric acid: acetonitrile; 85:15 v/v). The sample was sonicated for 15 min, and then 2.5 mL of acetonitrile was added to the sample solution for better dissolution of HCTZ. The sample solution was sonicated again (15 min) and submitted to mechanical agitation for 10 min at 40 rpm in a shaker of flasks. The final volume was adjusted with diluent solution and the sample was centrifuged for 10 min at 4000 rpm. An aliquot of 500 μL of supernatant was transferred to a 10 mL volumetric flask adjusting the volume with diluent solution. All the samples were filtered through a PVDF syringe filter (0.45 μm , Millipore Millex) before injection.

2.4. Chromatography

Chromatographic separations were performed on an Agilent 1100 LC system consisting of G1311A quaternary pump, G1379A degasser, G1329A automatic injector, G1315B diode array detector and Chemstation Rev. A.10.02 [1757] software. The analyte separations were achieved by injecting a volume of 20 μL in a Phenyl XDB, 5 μm , 150 x 4.6 mm column maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of a gradient of 0.067% phosphoric acid (pH 2.5) (A) and acetonitrile (B) as follow: $t_{0-3.0}$ min: B=15%; $t_{3.1-6.5}$ min: B=35%; $t_{6.6-8.0}$ min: B=15%. The flow rate was maintained at

1.2 mL min⁻¹ and the UV detection set at 220 nm. The mobile phase was filtered through a Millipore 0.45 µm PTFE membrane (Molsheim, France) before use.

2.5. System suitability

System suitability was determined by six replicates injections of a working standard solution containing CAP (100 µg mL⁻¹), CAD (9.0 µg mL⁻¹), HCTZ (50 µg mL⁻¹), CTZ (0.75 µg mL⁻¹) and BTZ (1.5 µg mL⁻¹). The number of theoretical plates (*N*), resolution (*R_s*), tailing factor (*T*) and retention factor (*K'*) were assessed to verify if the resolution and repeatability of the system are adequate for the analysis to be executed [31-34]. All standard solutions were prepared using a diluent solution composed of 0.067% phosphoric acid: acetonitrile (85:15 v/v) and filtered through a PVDF syringe filter before injection.

2.6. Validation of the analytical method

The proposed method was validated by determining the selectivity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), linearity, precision (intra-day and inter-day), accuracy and robustness as described in the International Conference on Harmonization guidelines [34]. The selectivity was evaluated by comparing the chromatograms obtained with a mixture of interest compounds with those obtained by placebo injections. LOD and LOQ were determined through a triplicate of injections of decreasing concentrations of working standard solutions. LOD was determined as the smallest detectable peak at a signal to noise ratio of 3:1. LOQ was determined at a signal to noise ratio of 10:1 with desirable accuracy and precision. The linearity was determined in seven levels by a triplicate of injections of CAP (0.5 to 400.0 µg mL⁻¹), CAD (0.313 to 14.4 µg mL⁻¹), HCTZ (0.05 to 100 µg mL⁻¹), CTZ (0.078 to 1.2 µg mL⁻¹) and BTZ (0.02 to 2.4 µg mL⁻¹). The data were subjected to regression analyses, and calibration curves were generated to confirm the linear relationship between the peak areas and the analyte concentrations. The slope, y-intercept, and correlation coefficient were calculated for all analytical curves.

The intra/inter day precision were investigated by a triplicates of injections of working standard solutions at three concentration levels for CAP and HCTZ and four concentration levels for the related compounds (including LOQ) as follow: CAP (80, 100, and 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$), CAD (0.313, 7.2, 9.0 and 10.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$), HCTZ (40, 50, and 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$), CTZ (0.078, 0.6, 0.75 and 0.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and BTZ (0.02, 1.2, 1.5 and 1.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The intra-day analysis was investigated by the same analyst in a short period of time while the inter-day analysis, by a second analyst using freshly-prepared solutions, after two consecutive days. The results are expressed as the relative standard deviation of the measurements (RSD%). The accuracy was measured through a recovery assay. Thus known amounts of working standard solutions were spiked in placebos at the same concentration levels of precision test. Placebos were prepared by mixing starch (12%), lactose (75%), magnesium stearate (1%), cellulose microcrystalline (10%) and stearic acid (2%). The accuracy was expressed as a percentage of the amount recovered from spiked samples. The robustness study was evaluated by small and deliberate modifications in the original method. In this way the flow rate was changed in $\pm 0.05 \text{ mL min}^{-1}$, pH of the phosphoric acid solution ± 0.1 units, column temperature $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and mobile phase composition (aqueous and organic phases) $\pm 0.5\%$. After the modifications, the is percentage of recovery, resolution and tailing factor values were evaluated by statistical tools (confidence interval, Student *t*-test and ANOVA one way).

3. Results and discussion

3.1 Method development

The first step to the method development was the definition of the wavelength detection based on the UV-absorption spectrum of each compound. Due to the reduced presence of chromophore groups on captopril and captopril disulfide, the wavelength of 220 nm was chosen for its detection, being also observed excellent absorption for hydrochlorothiazide and its related compounds. Thus it was selected to monitor all studied compounds.

After the wavelength choice, a Zorbax Eclipse XDB Phenyl (150 x 4.6 mm i.d., 5 μm , Agilent Technologies) column maintained at room temperature was tested for the

analytes separation. The mobile phase consisted of 0.067% phosphoric acid: methanol (75:25 v/v) eluted at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹ in isocratic elution mode, a similar condition of USP monography. Under this condition, no separation among captopril, captopril disulfide and hydrochlorothiazide impurities was observed and the peak shapes were compromised (flattened appearance).

In an attempt to improve peak shape and resolution between the analytes, different brands of C8 and C18 150 x 4.6 mm i.d., 5µm particle size columns were also tested (XBridge – Waters Corporation, Ireland). Additionally, different combinations of water, phosphoric acid solution, formic acid, methanol and acetonitrile were evaluated to the mobile phase composition. After the experiments, it was noticed that the isocratic elution mode was unable to separate all the compounds, being observed co-elution of captopril, captopril disulfide and unknown impurities of HCTZ. Therefore, gradient systems using methanol or acetonitrile with phosphoric acid 0.067% in the mobile phase composition were tested in the three evaluated columns. The best chromatographic profile was observed using a gradient with acetonitrile and phosphoric acid in phenyl column, the big absorbance of formic acid in 220 nm committed its use and high baseline oscillation was observed using methanol in the mobile phase composition. The XBridge C18 column was unable to separate all target analytes, which was achieved using the XBridge C8 column, however without enough resolution among the compounds. Thus, due to the good separation achieved by phenyl column, different temperatures (25 to 50 °C) and flow rates (1.0 to 1.5 mL min⁻¹) were also evaluated in this column. After the separation the second challenge was to resolve the captopril peak shape that presented fronting. The investigation showed that higher temperatures promote significant effects in the chromatography system being the best captopril peak shape achieved at 40°C. Kocijan et al. explained the effect of temperature in the peak shape of ACE-inhibitors containing a proline peptide bond, like captopril. This bond can be either cis or trans and with increasing temperature the higher rate of isomerization improves the peak shape, the same effect was demonstrated for acidic mobile phase [35]. The temperature of 40°C resolved the fronting in the peak of captopril and above it there isn't great advantage so this was the chosen temperature. Using 1.2 mL min⁻¹ the best run time without compromise the peak resolutions was obtained, bigger flow rates determined fronting in the captopril peak.

Thus, the best chromatographic conditions were obtained with a Phenyl XDB 150 x 4.6 mm (5 μm particle size) column, using a gradient of phosphoric acid 0.067% pH 2.5 (A) and acetonitrile (B) ($t_{0-3.0}$ min: B=15%; $t_{3.1-6.5}$ min: B=35%; $t_{6.6-8.0}$ min: B=15%), at a constant flow rate of 1.2 mL min⁻¹ and UV detection set at 220 nm. The column oven temperature was maintained at 40 °C and the volume of injection was 20 μL . Under these conditions, captopril, captopril disulfide, hydrochlorothiazide, chlorothiazide, 4-amino-6-chloro-benzene-disulfonamide were well separated in less than 10 min with good peak shape and resolution ($R_s > 1.5$). A representative chromatogram is shown in Fig.1 and the system suitability values presented in Table 1.

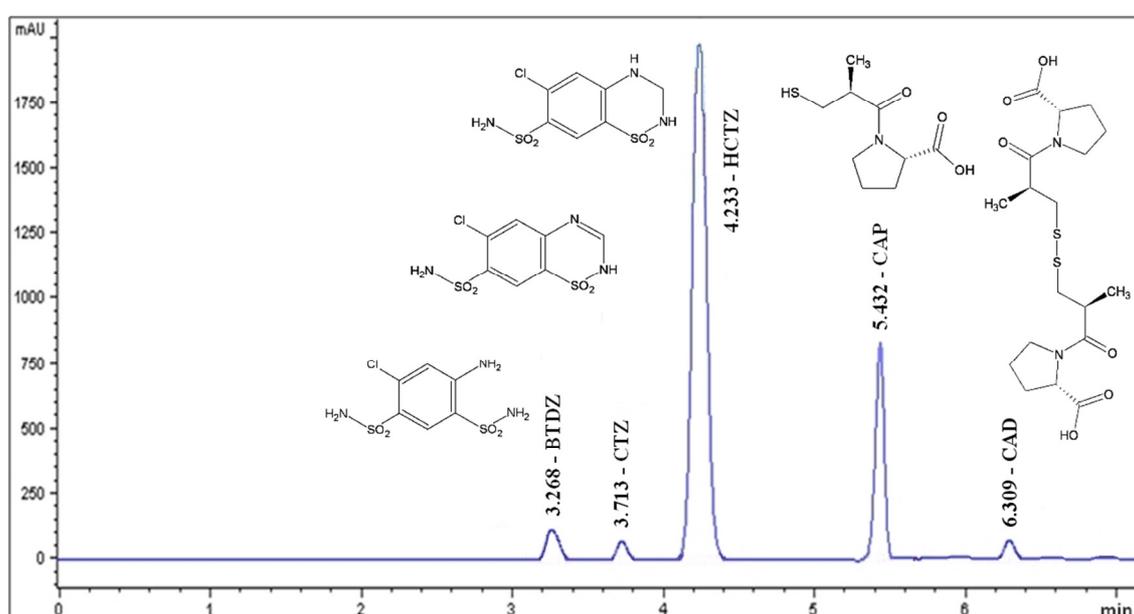


Fig. 1: Representative chromatogram of a standard mixture, containing captopril, captopril disulfide, hydrochlorothiazide, chlorothiazide and benztiazidine.

Table 1: System suitability results

Compounds	Parameters (Mean=6)				
	T_r (min)	K'	R_s	T	N
Captopril ^a	5.42	3.23	8.38	0.88	92684
Captopril disulfide ^b	6.28	3.90	2.20	1.06	37565
Hydrochlorothiazide ^c	4.23	2.30	3.39	1.07	9671
Chlorothiazide ^d	3.71	1.89	3.53	1.07	12136
4-amino-6-chloro-1,3 benzenedisulfonamide ^e	3.26	1.54	1.54	1.08	12806

^a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ^b 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ^c 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ^d 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ^e 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Number of theoretical plates (N), resolution (R_s), tailing factor (T), retention time (T_r), retention factor (K').

3.2 Method validation

3.2.1. Selectivity

The matrix comparison method demonstrated that no interferences eluted in the same retention time of the interest substances (Fig. 1) which ensure an adequate system for quantitative purposes. The developed method was appropriate showing negligible interference for the proposed assay.

3.2.2 Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ)

The new method demonstrated high sensitivity with a low LOD estimated at $0.157 \mu\text{g mL}^{-1}$ for CAP and CAD, and $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ for HCTZ, CTZ and BZT. The LOQ was estimated at $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ for CAP, $0.313 \mu\text{g mL}^{-1}$ for CAD, $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ for HCTZ, $0.078 \mu\text{g mL}^{-1}$ for CTZ and $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ for BTZ. Therefore these compounds can be quantified in the pharmaceutical formulations even they are present in low concentrations.

3.2.3. Linearity

The linearity, linear range and sensitivity were assessed from calibration curve response for each compound. The linear regression equations and correlation coefficients (r) were as follows: CAP, $y = 11.0444x + 1.4077$ ($r = 0.9999$); CAD, $y = 13.3176x + 5.3991$ ($r = 0.9996$); HCTZ, $y = 102.4342x + 11.9628$ ($r = 0.9999$); CTZ, $y = 135.4021x - 2.3506$ ($r = 0.9999$) and BTZ, $y = 200.7376x + 5.3323$ ($r = 0.9999$). The satisfactory correlation coefficient values showed that all compound responses were linear in their respective concentration ranges.

3.2.4 Precision and accuracy

Accuracy and intra/inter-day precision values are presented in Table 2. The results indicated that the developed method was precise for all compounds with RSD values ranging from 0.19 to 4.30% for intra-day, and 0.23 to 4.43% for inter-day analysis. Furthermore, the new method proved to be accurate with notable recoveries for all compounds at a range of 98.82 to 101.31%.

Table 2: Precision and accuracy of captopril, captopril disulfide, hydrochlorothiazide, chlorothiazide, 4-amino-6-chloro-1,3 benzenedisulfonamide

Compounds	Accuracy			Precision	
	Standard concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Amount recovered ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mean recovery (%)	Intra-day (RSD %)	Inter-day (RSD %)
Captopril	81.04	81.13	100.11	1.63	1.46
	101.30	100.11	98.82	0.92	0.86
	121.56	122.53	100.79	0.48	0.23
Captopril disulfide	0.31	0.31	100.75	4.30	4.11
	7.18	7.14	99.42	1.27	3.13
	8.98	8.92	99.37	1.35	4.43
	10.77	10.84	100.59	0.54	3.47
Hydrochlorothiazide	41.72	41.37	99.15	0.63	2.60
	52.15	52.21	100.10	0.81	0.56
	62.59	62.93	100.55	1.08	0.73
Chlorothiazide	0.08	0.08	100.51	0.19	1.65
	0.61	0.61	101.31	0.29	4.21
	0.76	0.77	101.00	0.97	3.82
	0.91	0.91	99.77	0.62	2.61
4-amino-6-chloro-1.3 benzenedisulfonamide	0.02	0.02	100.30	2.16	2.79
	1.26	1.27	100.98	0.37	2.49
	1.57	1.58	100.65	0.79	1.98
	1.88	1.87	99.22	0.76	0.46

3.2.5 Robustness

The robustness was evaluated under small and deliberated modification to the selected method conditions. In this context, the flow rate, column temperature, acetonitrile, and pH of the mobile phase were changed being evaluated under each modification the resolution, tailing factor, precision and accuracy.

According to the results presented in Table 3, CAP resolution was affected (RSD > 5%) when the flow rate, column temperature and acetonitrile were modified. However the selectivity was not compromised once the resolution was maintained above 7.0.

CAD resolution also presented significantly variations when the column temperature and pH were modified (RSD > 5%). Nonetheless, temperature variations not compromised the selectivity in contrast of higher pH, wich decreases considerably the resolution (1.33). Important to mention that higher pH also compromised the accuracy

of this component ($p < 0.05$ for Student test and ANOVA, Table 4). Therefore the pH of the mobile phase is a critical parameter that must be controlled carefully. The system performance (Tf) and precision was not affected under all modified conditions (RSD $< 5\%$).

Table 3. Tailing factor and resolution in different conditions assessed in the robustness study

Robustness parameter	Captopril				Captopril disulfide				Hydrochlorothiazide				Chlorothiazide				4-amino-6-chloro-1.3 benzenedisulfonamide		
	Tf	RSD%	Rs	RSD%	Tf	RSD%	Rs	RSD%	Tf	RSD%	Rs	RSD%	Tf	RSD%	Rs	RSD%	Tf	RSD%	Rs
Flow Rate																			
1.15 mLmin⁻¹	0.89	0.28	7.41	8.97	1.07	0.28	1.90	1.64	1.06	0.17	3.42	0.90	1.07	0.04	3.65	2.70	1.07	0.05	-
1.20 mLmin⁻¹*	0.88		8.41		1.07		1.85		1.06		3.38		1.07		3.51		1.07		-
1.25 mLmin⁻¹	0.89	0.40	8.88	3.82	1.07	0.28	1.89	1.55	1.06	0.18	3.36	0.35	1.07	0.09	3.57	1.23	1.07	0.12	-
Temperature																			
38°C	0.86	1.95	7.19	10.84	1.10	2.29	1.88	6.64	1.06	0.61	3.45	1.14	1.07	0.09	3.65	2.33	1.07	0.24	-
40°C*	0.88		8.38		1.06		2.06		1.07		3.39		1.07		3.53		1.08		-
42°C	0.91	1.85	9.73	10.49	1.06	0.03	2.38	10.04	1.07	0.23	3.34	1.08	1.07	0.10	3.39	2.89	1.08	0.39	-
Acetonitrile																			
14.5% - 34.5%	0.88	0.09	7.53	7.53	1.05	0.60	2.13	1.26	1.06	0.49	3.41	0.38	1.08	0.60	3.78	4.74	1.07	0.66	-
15.0% - 35.0%*	0.88		8.37		1.06		2.14		1.07		3.39		1.07		3.54		1.08		-
15.5% - 35.5%	0.89	0.80	9.33	7.67	1.06	0.39	2.34	4.42	1.06	0.11	3.35	0.84	1.06	0.74	3.26	4.78	1.07	0.32	-
pH																			
2.4	0.89	0.81	8.59	1.69	1.08	0.99	3.32	31.98	1.06	0.06	3.39	0.17	1.10	1.61	3.51	0.54	1.08	0.03	-
2.5*	0.88		8.38		1.06		2.10		1.07		3.39		1.07		3.53		1.08		-
2.6	0.88	0.23	8.25	1.13	0.99	4.71	1.33	31.92	1.06	0.19	3.39	0.10	1.05	1.75	3.49	0.91	1.07	0.22	-

* Purposed condition.

Table 4. Recovery test for robustness analysis (n=6)

Robustness parameter	Captopril				Captopril disulfide				Hydrochlorothiazide				Chlorothiazide				4-amino-6-chloro-1.3 benzenedisulfonamide			
	Recovery %	RSD %	T test (p value)	ANOVA (p value)	Recovery %	RSD %	T test (p value)	ANOVA (p value)	Recovery %	RSD %	T test (p value)	ANOVA (p value)	Recovery %	RSD %	T test (p value)	ANOVA (p value)	Recovery %	RSD %	T test (p value)	ANOVA (p value)
Flow Rate	Confidence interval (99.77 to 100.23%)				Confidence interval (98.90 to 101.10%)				Confidence interval (99.83 to 100.17%)				Confidence interval (99.73 to 100.27%)				Confidence interval (99.72 to 100.28%)			
1.15 mL/min	100.16		0.2521		99.40		0.4298		99.97		0.8037		100.18		0.6393		100.04		0.8507	
1.20 mL/min	100.00	0.13	1.0000	0.4623	100.00	0.34	1.0000	0.5811	100.00	0.02	1.0000	0.8856	100.00	0.09	1.0000	0.9242	100.00	0.05	1.0000	0.8071
1.25 mL/min	99.90		0.6852		99.42		0.1657		99.95		0.7124		100.09		0.8270		99.93		0.6818	
Temperature	Confidence interval (99.36 to 100.64%)				Confidence interval (98.48 to 101.52%)				Confidence interval (99.84 to 100.16%)				Confidence interval (99.40 to 100.60%)				Confidence interval (99.72 to 100.28%)			
38°C	100.36		0.2016		99.94		0.9438		100.01		0.9175		99.88		0.6824		99.95		0.9396	
40°C	100.00	0.23	1.0000	0.2928	100.00	0.21	1.0000	0.8992	100.00	0.03	1.0000	0.8603	100.00	0.15	1.0000	0.5394	100.00	0.03	1.0000	0.9927
42°C	99.93		0.7500		99.61		0.6244		99.96		0.5302		100.17		0.5119		100.01		0.9421	
Acetonitrile	Confidence interval (99.36 to 100.64%)				Confidence interval (98.48 to 101.52%)				Confidence interval (99.84 to 100.16%)				Confidence interval (99.40 to 100.60%)				Confidence interval (99.72 to 100.28%)			
14.5% - 34.5%	100.37		0.2842		99.69		0.7622		100.04		0.7097		100.28		0.2249		100.11		0.2421	
15.0% - 35.0%	100.00	0.21	1.0000	0.4076	100.00	0.17	1.0000	0.9297	100.00	0.04	1.0000	0.6734	100.00	0.18	1.0000	0.7173	100.00	0.19	1.0000	0.6367
15.5% - 35.5%	100.02		0.9014		99.94		0.9073		99.95		0.5405		100.33		0.4878		99.75		0.5742	
pH	Confidence interval (99.36 to 100.64%)				Confidence interval (98.48 to 101.52%)				Confidence interval (99.84 to 100.16%)				Confidence interval (99.40 to 100.60%)				Confidence interval (99.72 to 100.28%)			
2.4	100.40		0.2720		99.74		0.7966		99.93		0.4871		100.31		0.5837		100.24		0.2820	
2.5	100.00	0.21	1.0000	0.2948	100.00	1.84	1.0000	0.0036	100.00	0.06	1.0000	0.5859	100.00	0.17	1.0000	0.8007	100.00	0.12	1.0000	0.5098
2.6	100.32		0.3761		103.06		0.0119		99.88		0.2170		100.07		0.8476		100.14		0.5092	

3.3 Commercial sample analysis

The proposed method described above was used to determine the contents of CAP, HCTZ, CAD, CTZ and BTZ in commercially available samples of tablets containing CAP and HCTZ, separately or combined. Additionally, the method was applied to dissolution profile evaluation of these pharmaceutical formulations. The results for the drugs assayed were in good agreement with the label claims and demonstrated that the method is a fast, cheap and reliable tool for the quality control of these analytes in tablets.

4 Conclusion

The proposed method was successfully used in tablets for the simultaneous determination of captopril, captopril disulfide, hydrochlorothiazide, chlorothiazide and 4-amino-6-chloro-1,3 benzenedisulfonamide. The method was found to be selective, linear, precise and accurate. The robustness study indicated that the method is sensitive to pH variations in the mobile phase. This method presents as an alternative to the quality control of these analytes in raw material and in tablets containing associations of captopril and hydrochlorothiazide.

5 References

1. CARDIOLOGIA, S.B.D., S.B.D. NEFROLOGIA, and S.B.D.H. ARTERIAL, *V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2007. **89**(3).
2. Huang, T.M., et al., *Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide in human plasma by reverse-phase HPLC from linear gradient elution*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(2): p. 644-648.
3. Nishikawa, T., et al., *HPLC profile of captopril disulfide that undergoes reversible cis-trans conversion among three isomers*. Anal Sci, 2004. **20**(10): p. 1395-8.
4. Mollica, J.A., C.R. Rehm, and J.B. Smith, *Hydrolysis of Hydrochlorothiazide*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1969. **58**(5): p. 635-&.
5. Mollica, J.A., et al., *Hydrolysis of Benzothiadiazines*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1971. **60**(9): p. 1380-&.
6. Hertzog, D.L., et al., *Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products*. J Pharm Biomed Anal, 2002. **30**(3): p. 747-60.
7. Lusina, M., et al., *Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **291**(1-2): p. 127-137.
8. Fang, X.G., et al., *Purification and identification of an impurity in bulk hydrochlorothiazide*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **90**(11): p. 1800-1809.
9. Revelle, L.K., et al., *Identification of chlorothiazide and hydrochlorothiazide UV-A photolytic decomposition products*. J Pharm Sci, 1997. **86**(5): p. 631-4.
10. Tamat, S.R. and D.E. Moore, *Photolytic decomposition of hydrochlorothiazide*. J Pharm Sci, 1983. **72**(2): p. 180-3.
11. Ulvi, V. and S. Tammilehto, *Photodecomposition Studies on Chlorothiazide and Hydrochlorothiazide*. Acta Pharmaceutica Nordica, 1989. **1**(4): p. 195-200.
12. Brigante, M., et al., *Degradation of hydrochlorothiazide in water*. Environmental Chemistry Letters, 2005. **2**(4): p. 195-198.
13. Hosseinimehr, S.J., et al., *Spectrophotometric determination of captopril with DTNB reagent in pharmaceutical formulation*. Boll Chim Farm, 2004. **143**(6): p. 249-51.
14. Erk, N., *Simultaneous determination of fosinopril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by spectrophotometric methods*. J Pharm Biomed Anal, 2002. **27**(6): p. 901-12.
15. Hillaert, S. and W. Van den Bossche, *Determination of captopril and its degradation products by capillary electrophoresis*. J Pharm Biomed Anal, 1999. **21**(1): p. 65-73.

16. Hillaert, S., K. De Grauwe, and W. Van den Bossche, *Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several inhibitors of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2001. **924**(1-2): p. 439-449.
17. Mirza, T. and H.S. Tan, *Determination of captopril in pharmaceutical tablets by anion-exchange HPLC using indirect photometric detection; a study in systematic method development*. J Pharm Biomed Anal, 2001. **25**(1): p. 39-52.
18. Carlucci, G., et al., *Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography*. J Pharm Biomed Anal, 2000. **23**(1): p. 185-9.
19. Rane, V.P., J.N. Sangshetti, and D.B. Shinde, *Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparation*. J Chromatogr Sci, 2008. **46**(10): p. 887-91.
20. Liu, C., et al., *[Determination of captopril in tablets by gas chromatography (GC)]*. Se Pu, 1998. **16**(1): p. 82-3.
21. Du, J., Y. Li, and J. Lu, *Flow injection chemiluminescence determination of captopril based on its enhancing effect on the luminol-ferricyanide/ferrocyanide reaction*. Luminescence, 2002. **17**(3): p. 165-7.
22. Ouyang, J., et al., *Cerium (IV)-based chemiluminescence analysis of hydrochlorothiazide*. Talanta, 1998. **46**(5): p. 961-8.
23. el-Brashy, A.M., *Titrimetric determination of captopril in dosage forms*. Acta Pharm Hung, 1995. **65**(3): p. 91-3.
24. Ivanovic, D., et al., *Validation of the RP-HPLC method for analysis of hydrochlorothiazide and captopril in tablets*. Accreditation and Quality Assurance, 2004. **9**(1-2): p. 76-81.
25. Jain, R. and C.L. Jain, *Simultaneous quantification of captopril and hydrochlorothiazide using high-performance liquid chromatography*. Ind. Drugs, 1991. **28**(8): p. 380-382.
26. Ouyang, J., et al., *Narrow-bore liquid chromatography coupled to chemiluminescence detection for the analysis of pharmaceutical preparations containing hydrochlorothiazide and captopril*. Biomed Chromatogr, 1998. **12**(3): p. 160-1.
27. Ouyang, J., et al., *Chemiluminescence-based liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide and captopril*. Analytica Chimica Acta, 1999. **386**(3): p. 257-264.
28. Salem, H., et al., *U.V. and U.V. Derivative Spectrophotometric Determination of Two- Component Mixtures* Spectroscopy Letters, 1991. **24**(3): p. 451-470.
29. Panderi, I. and M. Parissi-Poulou, *Determination of captopril and captopril-hydrochlorothiazide combination in tablets by derivative UV spectrophotometry*. International Journal of Pharmaceutics, 1992. **86**(2-3): p. 99-106.

30. Ustundag, O. and E. Dinc, *Simultaneous resolution of a binary mixture of captopril and hydrochlorothiazide in tablets by bivariate and multivariate spectral calibrations*. *Pharmazie*, 2003. **58**(9): p. 623-628.
31. USP, *The United States Pharmacopeia*. 31 ed. 2008, Rockville: United States Pharmacopeial Convention.
32. FDA, *Reviewer Guidance – Validation of chromatographic methods do Food and Drug Administration*. 1994: Aprova Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências. Ministério da Saúde. Diário oficial da União. Brasília - DF.
33. Skoog, D.A., et al., *Analytical Chemistry*. 7 ed. ed. 1999, Orlando: Sounders College Publishing.
34. ICH, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. 2005, Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. p. novembro, 2005.
35. Kocijan, A., et al., *Effect of column temperature on the behaviour of some angiotensin converting enzyme inhibitors during high-performance liquid chromatographic analysis*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001. **755**(1-2): p. 229-35.