

JULIANA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS
MULTIVARIADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CAPTOPRIL E
HIDROCLOROTIAZIDA EM ASSOCIAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica, Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora
Co-Orientadora: Profa. Dra. Letícia N. C. Rodrigues

**Curitiba
2009**


TERMO DE APROVAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS MULTIVARIADOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM ASSOCIAÇÃO**

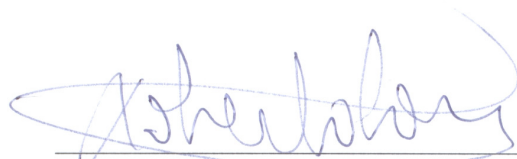
por

JULIANA DOS SANTOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador: 

Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta Zamora
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Dep. de Farmácia - UFPR



Prof^ª Dr^ª Iara Messerschmidt
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 27 de agosto de 2009.

*Dedico este trabalho à minha
família, sem ela nada seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me dar forças para prosseguir e não desistir nos momentos mais difíceis.

Gostaria de agradecer especialmente os meus pais, Elza e Jurece, por sempre me apoiarem e me ajudarem em tudo que fosse preciso.

Agradeço à minha irmã Mariana que sempre tem uma palavra amiga e “puxões” de orelha nas horas certas.

Ao meu namorado Lucas, que está sempre ao meu lado, ouvindo e aconselhando, me ajudando a tomar decisões me fazendo uma pessoa mais feliz.

Obrigada ao meu afilhado Eric pelas gargalhadas, abraços, carinho, pela alegria que me dá sempre com seu sorriso de criança - sapeca.

Às minhas sobrinhas lindas Isabela e Isadora, pelo carinho gostoso e sincero que faz a gente se sentir no céu.

À minha avó paterna Bertolina que se foi no ano passado, de quem sinto muita falta e que sempre apoiou e se orgulhou muito das conquistas de seus netos, onde quer que esteja, sei que olha por mim.

Aos meus avós maternos Ângelo e Gema, que também não estão mais entre nós, mas que moram dentro do meu coração.

Ao meu orientador e amigo Prof. Patrício Peralta-Zamora, pela paciência, pela dedicação, pelos ensinamentos, pela diversão, pelas broncas, pelo carinho, enfim, por tudo que fez por mim, o que me fez crescer como pessoa e como profissional.

À Profa. Letícia N. C. Rodrigues pela co-orientação, sugestões relacionadas à área farmacêutica e auxílio na realização dos ensaios de dissolução.

À minha amiga e colaboradora Gilcélia Cordeiro, pelas palavras de incentivo, pelo carinho, pelos conselhos, pela alegria e pelas muitas vezes que doou parte do seu tempo para me auxiliar, sempre com o melhor astral.

À Profa. Noemi Nagata, pelo carinho que sempre demonstrou por mim e pelas boas sugestões que me ajudaram a fazer um trabalho melhor.

Ao grupo TECNOTRATER, Gilcélia, Bárbara, Luciana, Kely, Adriane, Elaine, Giovane, Luiz Fernando, Elenise, Arlene, Fernanda, Loraine, Terezinha, Lutécia, Samantha, Belisa, Lídia, Danielle, Marco Antônio, Wellington e Marcus Vinícius pela companhia nas atividades no laboratório.

À professora Dra. Iara Messerschmidt, pela contribuição deste o início deste trabalho, correções de relatórios, exame de qualificação e por aceitar fazer parte da banca de defesa de mestrado, sempre com excelentes sugestões e conselhos.

Ao professor Dr. Gilberto Abate, por ter aceitado participar do meu exame de qualificação trazendo sugestões muito valiosas para continuidade deste trabalho.

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo, que disponibilizou seu laboratório no Departamento de Farmácia para realização de análises necessárias ao projeto e por ter aceitado fazer parte da banca de defesa de mestrado.

Ao Carlos e à Graça, do Departamento de Farmácia da UFPR, pela colaboração nas análises cromatográficas.

Aos colegas do LabQAM, ao Prof. Dr. Marco T. Grassi e aos alunos do Grupo de Química Ambiental, ao Prof. Dr. Aldo J. G. Zarbin e aos alunos do Grupo de Química de Materiais.

Aos amigos e amigas do coração Gilcélia Cordeiro, Daniela Gallas, Sandra Luiza, Clayton Fernandes, Cristiana Aoki, Silvio Rachinski, Sérgio Fróis, Caroline Bugay, Bárbara Duarte, Luciana Fontoura, Charlene Weiz, Luciane Santos, Maria Ana Oliveira, que fizeram e fazem parte da minha vida.

A todos os Professores do Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro do projeto.

A todos que de alguma forma tiveram envolvimento na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| TERMO DE APROVAÇÃO | ii |
| DEDICATÓRIA | iii |
| AGRADECIMENTOS | iv |
| LISTA DE TABELAS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | xiii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xvi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1. INDÚSTRIA FARMACÊUTICA | 3 |
| 2.2. HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS) | 4 |
| 2.3. TRATAMENTOS ANTIHIPERTENSIVOS | 5 |
| 2.3.1. Associação captopril - hidroclorotiazida | 7 |
| 2.4. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS | 8 |
| 2.5. ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO | 10 |
| 2.6. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA | 13 |
| 2.7. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA | 15 |
| 2.7.1. Regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR) | 17 |
| 2.8. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS | 19 |
| 2.8.1. Especificidade e Seletividade | 21 |
| 2.8.2. Linearidade | 22 |
| 2.8.3. Intervalo | 22 |
| 2.8.4. Precisão | 23 |
| 2.8.5. Limite de detecção (sensibilidade) | 24 |
| 2.8.6. Limite de quantificação | 25 |
| 2.8.7. Exatidão | 25 |
| 2.8.8. Robustez | 26 |
| 3. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 28 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 4.1. MATERIAL E REAGENTES | 29 |
| 4.2. EQUIPAMENTOS | 29 |
| 4.3. RECURSOS COMPUTACIONAIS | 29 |
| 4.4. DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.1. Espectroscopia eletrônica em solução | 30 |
| 4.4.2. Espectroscopia eletrônica em fase sólida | 31 |
| 4.4.3. Transformação de dados | 32 |
| 4.5. VALIDAÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO | 32 |
| 4.5.1. Intervalo | 32 |
| 4.5.2. Precisão | 32 |
| 4.5.3. Robustez | 33 |
| 4.5.4. Exatidão | 33 |
| 4.6. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS MEDICAMENTOS | 33 |
| 4.7. PERFIL DE DISSOLUÇÃO | 34 |
| 4.7.1. Desenvolvimento do modelo de calibração | 35 |
| 4.8. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS | 36 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 5.1. ANÁLISE UNIVARIADA CONVENCIONAL | 37 |
| 5.1.1. Método de interpolação na curva analítica | 37 |
| 5.1.2. Método da espectrofotometria derivativa | 39 |
| 5.1.3. Método da aditividade das absorvâncias | 41 |
| 5.1.4. Comentários sobre os métodos univariados convencionais | 42 |
| 5.2. ANÁLISE MULTIVARIADA | 43 |
| 5.2.1. Espectroscopia UV-Vis em solução | 43 |
| 5.2.2. Espectroscopia UV-Vis em Fase Sólida | 51 |
| 5.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO | 56 |
| 5.3.1. Precisão | 56 |
| 5.3.1.1. Repetibilidade | 57 |
| 5.3.1.2. Reprodutibilidade | 57 |
| 5.3.2. Robustez | 60 |
| 5.3.2.1. Efeito da temperatura | 60 |
| 5.3.2.2. Influência do tempo de leitura | 61 |
| 5.3.2.3. Influência do pH | 61 |
| 5.4. PERFIL DE DISSOLUÇÃO | 63 |
| 6. CONCLUSÕES | 69 |
| 6.1. ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis EM SOLUÇÃO | 69 |
| 6.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO | 69 |
| 6.3. ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis EM FASE SÓLIDA | 70 |
| 6.4. ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO | 70 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| TABELA 1. | CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES DE VALIDAÇÃO, SEGUNDO SUA FINALIDADE | 20 |
| TABELA 2. | ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS, SEGUNDO SUA FINALIDADE | 21 |
| TABELA 3. | LIMITES PERCENTUAIS DO TEOR DO ANALITO QUE DEVEM ESTAR CONTIDOS NO INTERVALO DE LINEARIDADE PARA ALGUNS MÉTODOS ANALITICOS | 23 |
| TABELA 4. | FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO | 27 |
| TABELA 5. | PARÂMETROS UTILIZADOS EM ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO DA ASSOCIAÇÃO CAPTOPRIL / HIDROCOROTIAZIDA NA FORMA DE COMPRIMIDOS | 35 |
| TABELA 6. | RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) EM MISTURAS SINTÉTICAS UTILIZANDO-SE MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS CONVENCIONAIS | 39 |
| TABELA 7. | RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) EM MISTURAS SINTÉTICAS UTILIZANDO-SE MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS EM PRIMEIRA DERIVADA | 41 |
| TABELA 8. | RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) EM MISTURAS SINTÉTICAS UTILIZANDO-SE MÉTODO DA ADITIVIDADE DE ABSORVÂNCIAS | 42 |
| TABELA 9. | ERROS RELATIVOS OBTIDOS NA ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA UV-Vis UNIVARIADA DOS MEDICAMENTOS | 43 |
| TABELA 10. | ERROS RELATIVOS MÉDIOS (%) EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VLs E DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO NA QUANTIFICAÇÃO DAS 5 AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO EXTERNA | 48 |
| TABELA 11. | ERROS RELATIVOS MÉDIOS OBTIDOS NA ANÁLISE DOS MEDICAMENTOS EM TRIPLICATA UTILIZANDO-SE DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-PROCESSAMENTOS | 49 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| TABELA 12. | RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS UTILIZANDO-SE TÉCNICA CROMATOGRÁFICA PADRÃO E MODELO MULTIVARIADO DE MELHOR DESEMPENHO (n=3) | 51 |
| TABELA 13. | ERROS RELATIVOS MÉDIOS (%) EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VLs E DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO NA QUANTIFICAÇÃO DAS 5 AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO EXTERNA | 55 |
| TABELA 14. | PREVISÃO DO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA LOPRIL-D [®] , UTILIZANDO MODELOS ELABORADOS A PARTIR DE PRÉ-PROCESSAMENTO MSC | 56 |
| TABELA 15. | RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE | 58 |
| TABELA 16. | RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA NO ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE | 59 |
| TABELA 17. | RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DA MISTURA CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM DIFERENTES TEMPERATURAS | 61 |
| TABELA 18. | RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DAS MISTURAS CONTENDO CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA | 62 |
| TABELA 19. | RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DAS MISTURAS CONTENDO CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM DIFERENTES VALORES DE pH | 63 |
| TABELA 20. | CONCENTRAÇÃO E PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA NOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR ANALISADOS POR CLAE EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA; n= 3 | 65 |
| TABELA 21. | CONCENTRAÇÃO E PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA NOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR ANALISADOS POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA; n= 5 | 67 |
| TABELA 22. | ERROS RELATIVOS OBTIDOS PELA COMPARAÇÃO DE TÉCNICA CROMATOGRÁFICA E ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO UV-Vis NOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO | 68 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| FIGURA 1. | NÚMERO DE HOSPITALIZAÇÕES POR DOENÇA CARDIOVASCULAR NO BRASIL (2000-2004) | 4 |
| FIGURA 2. | ESTRUTURAS DO CAPTOPRIL (A) E DA HIDROCLOROTIAZIDA (B) | 8 |
| FIGURA 3. | APARATO CESTA PARA ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO | 12 |
| FIGURA 4. | DETALHE DO SISTEMA DE DISSOLUÇÃO | 12 |
| FIGURA 5. | ESPECTRO UV-Vis QUE DEMONSTRA A INTERFERÊNCIA ESPECTRAL ENCONTRADA NA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA | 14 |
| FIGURA 6. | ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA | 16 |
| FIGURA 7. | DECOMPOSIÇÃO EM VARIÁVEIS LATENTES DAS MATRIZES X E Y PARA MODELOS PLS | 18 |
| FIGURA 8. | PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS EM SOLUÇÃO CONTENDO CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) | 30 |
| FIGURA 9. | PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS EM FASE SÓLIDA, CONTENDO CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) | 31 |
| FIGURA 10. | PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) PARA ANÁLISE POR CLAE | 34 |
| FIGURA 11. | PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO | 36 |
| FIGURA 12. | (A) ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis E (B) CURVA ANALÍTICA DO CAPTOPRIL EM $\lambda = 199,5$ nm | 38 |
| FIGURA 13. | (A) ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis E (B) CURVA ANALÍTICA DA HIDROCLOROTIAZIDA EM $\lambda = 271,0$ nm | 38 |
| FIGURA 14. | (A) ESPECTROS DA PRIMEIRA DERIVADA DO CAPTOPRIL E (B) CURVA ANALÍTICA DA HIDROCLOROTIAZIDA EM $\lambda = 201,5$ nm | 40 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| FIGURA 15. | (A) ESPECTROS DA PRIMEIRA DERIVADA DA HIDROCLOROTIAZIDA E (B) CURVA ANALÍTICA DO CAPTOPRIL EM $\lambda = 225,5 \text{ nm}$ | 40 |
| FIGURA 16. | ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis EM SOLUÇÃO (A) DAS MISTURAS SINTÉTICAS DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA E (B) DOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR | 44 |
| FIGURA 17. | (A) GRÁFICO DO RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES E (B) PERCENTUAL DA VARIÂNCIA CAPTURADA PELO MODELO PLS | 45 |
| FIGURA 18. | (A) VETORES DE REGRESSÃO E (B) ESPECTROS DOS FÁRMACOS PUROS (CAP $25,0 \text{ mg L}^{-1}$ e HIDRO $12,5 \text{ mg L}^{-1}$) | 46 |
| FIGURA 19. | RESÍDUOS DE “STUDENT” X “LEVERAGE” PARA O MODELO DESENVOLVIDO COM 2 VARIÁVEIS LATENTES | 47 |
| FIGURA 20. | VALORES PREVISTOS VERSUS VALORES REAIS PELO MODELO DESENVOLVIDO COM 2 VARIÁVEIS LATENTES | 47 |
| FIGURA 21. | CROMATOGRAMAS (A) E CURVA ANALÍTICA (B) PARA DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE CAPTOPRIL EM MEDICAMENTOS | 49 |
| FIGURA 22. | CROMATOGRAMAS (A) E CURVA ANALÍTICA (B) PARA DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE HIDROCLOROTIAZIDA EM MEDICAMENTOS | 50 |
| FIGURA 23. | ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis EM FASE SÓLIDA, (A) DAS MISTURAS DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA E (B) DO MEDICAMENTO LOPRIL-D [®] | 52 |
| FIGURA 24. | GRÁFICO DO RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (A) E PERCENTUAL DA VARIÂNCIA CAPTURADA PELO MODELO PLS (B) | 53 |
| FIGURA 25. | (A) VETORES DE REGRESSÃO E (B) ESPECTROS DOS FÁRMACOS PUROS (CAP $184,84 \text{ mg g}^{-1}$ e HIDRO $92,42 \text{ mg g}^{-1}$) | 53 |
| FIGURA 26. | RESÍDUOS DE “STUDENT” X “LEVERAGE” PARA O MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VARIÁVEIS LATENTES | 54 |
| FIGURA 27. | VALORES PREVISTOS PELO MODELO VERSUS VALORES REAIS | 55 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| FIGURA 28. | EFEITO DA TEMPERATURA NOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DAS MISTURAS DE CAPTOPRIL (25,00 mg L ⁻¹) E HIDROCLOROTIAZIDA (12,50 mg L ⁻¹). | 60 |
| FIGURA 29. | ESPECTROS OBTIDOS PARA AS SOLUÇÕES DE CAPTOPRIL (25,00 mg L ⁻¹) E HIDROCLOROTIAZIDA (12,50 mg L ⁻¹) EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA | 62 |
| FIGURA 30. | ESPECTROS DA MISTURA CAPTOPRIL (25,00 mg L ⁻¹) E HIDROCLOROTIAZIDA (12,50 mg L ⁻¹) EM pH 2,92, 4,21 (NATURAL) E 6,14 | 63 |
| FIGURA 31. | PERFIS DE DISSOLUÇÃO DOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR ANALISADOS POR CLAE (n= 3) | 64 |
| FIGURA 32. | PERFIS DE DISSOLUÇÃO DOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR ANALISADOS POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis (n= 5) | 66 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|---|
| ANVISA | AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA |
| AT₁ | ANGIOTENSINA I |
| CAP | CAPTOPRIL |
| CG | CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA |
| CLAE | CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA |
| CMD | CONCENTRAÇÃO MÉDIA DETERMINADA |
| CV | COEFICIENTE DE VARIAÇÃO |
| DP | DESVIO PADRÃO |
| DP_a | DESVIO PADRÃO DO INTERCEPTO COM O EIXO Y |
| DPR | DESVIO PADRÃO RELATIVO |
| ECA | ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA |
| HAS | HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA |
| HIDRO | HIDROCLOROTIAZIDA |
| IC | INCLINAÇÃO DA CURVA |
| INMETRO | INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL |
| LD | LIMITE DE DETECÇÃO |
| MSC | CORREÇÃO DO SINAL MULTIPLICATIVO (<i>do inglês, MULTIPLICATIVE SIGNAL CORRECTION</i>) |
| NIPALS | <i>do inglês, NONLINEAR INTERACTIVE PARTIAL LEAST SQUARES</i> |
| PA | PRÓ ANÁLISE |
| PLS | MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (<i>do inglês, PARTIAL LEAST SQUARE</i>) |
| PLSR | REGRESSÃO DE MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (<i>do inglês, PARTIAL LEAST SQUARE REGRESSION</i>) |
| RMSECV | RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO QUADRÁTICO PADRÃO DE VALIDAÇÃO CRUZADA |
| UV-Vis | ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA E VISÍVEL |
| VL | VARIÁVEL LATENTE |

RESUMO

Neste trabalho, a regressão de mínimos quadrados parciais está sendo proposta para a determinação espectroscópica simultânea de captopril (inibidor de enzima conversora de angiotensina) e hidroclorotiazida (diurético), em medicamentos orientados ao tratamento da hipertensão arterial. Com este objetivo, modelos multivariados foram desenvolvidos por espectroscopia eletrônica em solução e em fase sólida. Para comparação, modelos univariados convencionais foram também elaborados, recorrendo-se ao sistema de curva analítica convencional, ao método derivativo e ao sistema fundamentado no princípio da aditividade de absorvâncias.

As curvas analíticas convencionais foram elaboradas utilizando-se 5 misturas, contendo entre 20,0 e 30,0 mg L⁻¹ de captopril e entre 10,0 e 15,0 mg L⁻¹ de hidroclorotiazida. Para o desenvolvimento de modelos multivariados em solução foram produzidas 25 misturas, contendo 20,0 a 30,0 mg L⁻¹ de captopril e 10,0 a 15,0 mg L⁻¹ de hidroclorotiazida. Os espectros foram registrados entre 190 e 350 nm, sendo processados integralmente. Diversos sistemas de pré-processamento de sinais foram utilizados, destacando-se dados centrados na média, autoescalados e derivados. Para o desenvolvimento de modelos multivariados em fase sólida foram produzidas 25 misturas, contendo 147 a 221 mg g⁻¹ de captopril e 74 a 110 mg g⁻¹ de hidroclorotiazida. Os espectros foram registrados entre 200 e 360 nm, sendo processados integralmente. Diversos sistemas de pré-processamento de sinais foram utilizados, destacando-se dados centrados na média, derivados e corrigidos por correção do sinal multiplicativo (MSC). Os modelos multivariados em solução e em fase sólida foram desenvolvidos a partir de 20 misturas sintéticas, enquanto que as 5 restantes foram reservadas para a fase de validação externa.

Sistemas univariados utilizando curvas analíticas convencionais e sistemas derivativos se mostraram inadequados para a quantificação de captopril e hidroclorotiazida em medicamentos, apresentando erros relativos de 12 % a 70 %. O sistema fundamentado no princípio da aditividade de absorvâncias permitiu minimizar os efeitos da interferência espectral, porém, quando os resultados foram comparados à técnica cromatográfica de referência, se apresentaram inferiores aos obtidos utilizando modelos multivariados.

Modelos multivariados desenvolvidos a partir de espectros em solução apresentaram boa capacidade preditiva, independentemente do tipo de pré-processamento utilizado. O modelo de melhor desempenho envolveu o uso de sinais espectrais alisados e duas variáveis latentes, obtendo-se erros relativos de 6,3 % (CAP) e 2,1 % (HIDRO) no medicamento de referência, 6,6 % (CAP) e 9,2 % (HIDRO)

no medicamento genérico e 13,7 % (CAP) e 15,8 % (HIDRO) no medicamento similar, em comparação à técnica cromatográfica de referência.

Referido modelo multivariado foi validado de acordo com os critérios da ANVISA, observando-se precisão, exatidão e robustez compatíveis com as exigências impostas pela legislação vigente (DPR < 5 %). Nos ensaios de robustez, a influência da variação do pH apresentou mudanças significativas no perfil espectral da mistura, sendo por isso, necessário o uso de pH controlado em todas as etapas analíticas.

Modelos multivariados desenvolvidos a partir de espectros em fase sólida apresentaram baixa capacidade de previsão na análise de medicamentos, obtendo-se erros relativos de 37 % (CAP) e 46 % (HIDRO) no medicamento de referência, principalmente em função de a presença de excipientes provocar significativas mudanças no perfil espectral das amostras, em relação às misturas de calibração.

Os resultados obtidos por análise cromatográfica apresentaram valores que reforçam a confiabilidade do método espectroscópico, quando aplicado à análise do perfil de dissolução de medicamentos, que, ao final dos ensaios, apresentou taxa de dissolução de captopril e hidroclorotiazida de acordo com os limites permitidos pela Farmacopéia Americana.

ABSTRACT

In this work, partial least squares regression was proposed for spectroscopic simultaneous determination of captopril (an inhibitor of angiotensin converting enzyme) and hydrochlorothiazide (diuretic) in drug oriented to the treatment of arterial hypertension. With this aim, multivariate models were developed by liquid and solid phase electronic spectroscopy. For comparison, conventional univariate models were also developed, involving the use of conventional analytical curves, derivative methods and systems based on the principle of absorbance's additivity.

The conventional analytical curves were prepared using 5 synthetic mixtures containing between 20.0 and 30.0 mg L⁻¹ of captopril and between 10.0 and 15.0 mg L⁻¹ of hydrochlorothiazide. For the development of multivariate models were produced 25 aqueous mixtures containing 20.0 to 30.0 mg L⁻¹ of captopril and 10.0 to 15.0 mg L⁻¹ of hydrochlorothiazide. The spectra were recorded between 190 and 350 nm and entirely processed. Several pre-processing systems were used, especially mean-centered, autoscaled and derivate spectral signals. For the development of multivariate models were produced 25 solid mixtures, containing 147 to 221 mg g⁻¹ of captopril and 74 to 110 mg g⁻¹ of hydrochlorothiazide. The spectra were recorded between 200 and 360 nm, being fully processed. Several pre-processing systems were used, especially mean-centered, derivate and multiplicative signal correction (MSC). The multivariate models in solution and solid phase were developed from 20 synthetic mixtures, while the remaining 5 were reserved for the external validation phase.

Univariate systems using conventional analytical curves and derivative systems were not useful for quantification of captopril and hydrochlorothiazide in drug associations, providing mean relative errors of 12% to 70%. Systems based on the principle of additivity of absorbances minimize the effects of the spectral interference, however, the results shown low agreement with those obtained by the reference chromatographic technique.

Multivariate models developed from spectra in solution showed good predictive ability, regardless of the type of pre-processing used. The best performing model involved the use of smoothed spectral signals and two latent variables, resulting in relative errors of 6.3% (CAP) and 2.1% (HYDRO) in the reference drug, 6.6% (CAP) and 9.2% (HYDRO) in the generic drug and 13.7% (CAP) and 15.8% (HYDRO) in similar drug, compared to chromatographic techniques of reference.

Referred multivariate model was validated according to the criteria of ANVISA, observing precision, accuracy and robustness compatible with the requirements imposed by the current guidelines (RSD <5%). In tests of robustness a significant

influence of pH on the spectral profile of the mixture was observed, a fact that makes necessary the use of pH-controlled systems.

Multivariate models developed from spectra in solid phase showed low predictive capacity in the analysis of drugs, resulting in relative errors of 37% (CAP) and 46% (HYDRO) in the reference drug, mainly due to the significant changes provoked in the spectral profile of the samples by the presence of excipients.

The results obtained by chromatographic analysis showed values that reinforce the reliability of spectroscopic methods, when applied to analyze the dissolution profile of drugs. The tests showed dissolution rates that are in accordance with the limits imposed by the American Pharmacopeia.

1. INTRODUÇÃO

A Química Analítica é a ciência que estuda o desenvolvimento e a aplicação de métodos, instrumentos e estratégias, visando a identificação e a quantificação das espécies que compõem uma matriz de interesse.

De maneira geral, a análise de espécies químicas corresponde a um processo bastante complexo, principalmente devido a fatores limitantes representados pela necessidade de determinar quantidades cada vez menores, muitas vezes abaixo do limite de quantificação oferecido pelas técnicas disponíveis, e pelas interferências que derivam do caráter complexo de grande parte das matrizes de interesse. Estes inconvenientes têm representado um dos grandes desafios para a Química Analítica, propiciando os grandes avanços verificados na área.

Em busca de novas alternativas, o desenvolvimento de técnicas analíticas instrumentais tem sido de grande valia para o avanço em diversas áreas da pesquisa científica. Dentro deste contexto, destaca-se o desenvolvimento de rotinas analíticas orientadas a aplicações tradicionais, como o controle de qualidade de produtos industrializados, que necessitam de técnicas mais sensíveis, seletivas, confiáveis, rápidas e de baixo custo.

Dentro do contexto da indústria farmacêutica, o controle de qualidade de matérias primas e produtos acabados apresenta especial relevância, em função da necessidade de se garantir qualidade e segurança nos produtos oferecidos à população. De maneira geral, a quantificação de substâncias de interesse é realizada por técnicas cromatográficas, grande parte das quais se mostra demorada e dispendiosa.

Em função de características como rapidez, sensibilidade e versatilidade, técnicas espectroscópicas são universalmente disponíveis, podendo ser utilizadas em inúmeras aplicações de rotina. Infelizmente, a análise de fármacos em medicamentos costuma ser seriamente comprometida pela interferência espectral causada por fármacos associados e excipientes, fato que, de maneira geral, limita bastante a aplicabilidade deste grupo de técnicas de análise.

Uma forma de contornar este inconveniente está representada pelo uso de processos de calibração multivariada, ferramenta que se mostra bastante eficaz na exploração das informações fornecidas pelas técnicas espectroscópicas, permitindo o desenvolvimento de metodologias analíticas eficientes, mesmo na presença de séria interferência espectral.

Neste trabalho, ferramentas multivariadas são utilizadas (regressão de mínimos quadrados parciais), para oferecer uma alternativa para a determinação da associação captopril/hidroclorotiazida em medicamentos utilizados no controle da hipertensão arterial. Além de propor o desenvolvimento de uma metodologia que permita dosar o teor

destes fármacos em medicamentos, o trabalho objetiva a aplicação da metodologia multivariada em estudos de dissolução.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Com o intuito de racionalizar os recursos da saúde e garantir acesso aos medicamentos, os países elaboram suas políticas de medicamentos. No Brasil, a política de medicamentos tem como propósito garantir a segurança, a eficácia e a qualidade dos medicamentos, assim como promover o seu uso racional e garantir o acesso àqueles medicamentos considerados essenciais para atender a maioria dos problemas de saúde da população. Estes medicamentos devem ser disponibilizados continuamente aos que deles necessitam nas formas farmacêuticas apropriadas (GIROTTO & SILVA, 2006).

Até o final da década de 1990, o mercado brasileiro oferecia dois tipos de medicamentos: **medicamentos de referência**, lançados originalmente pelas empresas líderes da indústria mundial, com marca própria, registro junto ao órgão federal responsável pela vigilância sanitária e com eficácia, segurança e qualidade comprovada cientificamente, e **medicamentos similares**, que correspondem a cópias contendo os mesmos princípios ativos, na mesma concentração e forma farmacêutica que o medicamento de referência, sendo normalmente lançados por empresas de porte médio e pequeno.

Com o intuito de assegurar a oferta de medicamentos de qualidade e baixo custo no mercado e de fomentar o acesso da população a estes medicamentos, foram estabelecidos, pela Lei nº 9.787/996, os **medicamentos genéricos** (QUENTAL *et al*, 2008).

A confiabilidade dos medicamentos genéricos é assegurada através da definição de rígidos critérios de qualidade, adequados para análise e concessão de registros desses medicamentos, previstos na legislação. A comprovação da eficácia terapêutica, segurança e intercambiabilidade dos genéricos em relação ao medicamento de referência, através da realização dos ensaios de equivalência farmacêutica e bioequivalência, é fundamental para o deferimento do registro, (GASPAROTTO, 2005).

A legislação brasileira, editada pelo Ministério da Saúde e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece prioridades e estratégias para a inspeção dos produtos farmacêuticos. De acordo com a Lei nº 6360, art. 53, é responsabilidade da indústria manter um responsável técnico habilitado, para as diversas etapas da produção e distribuição dos produtos farmacêuticos. Embora exista obrigatoriedade no envio de relatórios ao Ministério da Saúde, esta estratégia nem sempre garante a qualidade ideal dos produtos, pois a fiscalização é precária e ineficiente. Para garantir a verdadeira procedência das matérias-primas e a veracidade dos efeitos destes produtos faz-se necessário que os órgãos competentes pela fiscalização, órgão federal de saúde (Ministério da Saúde) ou do órgão estadual de Saúde (Secretaria Estadual de Saúde),

cumpram seu papel, fiscalizando e punindo os laboratórios que não estiverem de acordo com as exigências do Ministério da Saúde (BRASIL, 1976).

2.2. HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) configura-se como um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Estimativas indicam que sua prevalência está ascendente e seu impacto nas populações será ainda mais danoso nos próximos anos. Estima-se que em todo o mundo 7,1 milhões de pessoas morram anualmente por causa de pressão sanguínea elevada e que aproximadamente 4,5% de outras doenças sejam causadas pela HAS. As taxas de prevalência de valores pressóricos superiores à 140/90 mmHg, na população urbana adulta brasileira, variam de 22 % a 44 % (BOING & BOING, 2007).

No Brasil, em 2003, 27,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares. Entre os fatores de risco para mortalidade, hipertensão arterial explica 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% causadas por doença coronariana. A mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial. A hipertensão arterial e as doenças relacionadas à pressão arterial são responsáveis por alta frequência de internações (Figura 1). Insuficiência cardíaca é a principal causa de hospitalização entre as doenças cardiovasculares, sendo duas vezes mais freqüente que as internações por acidente vascular cerebral. Em 2005 ocorreram 1.180.184 internações por doenças cardiovasculares (SOCIEDADE, 2006 – CAP. 1).

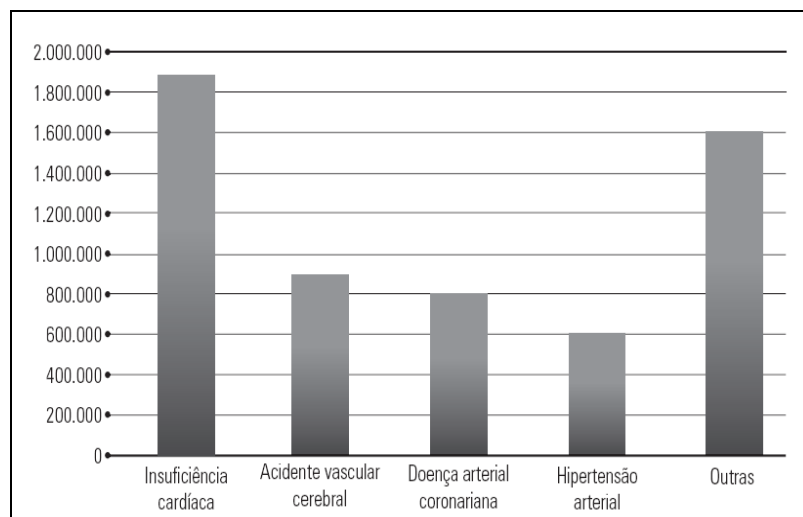


FIGURA 1. NÚMERO DE HOSPITALIZAÇÕES POR DOENÇA CARDIOVASCULAR NO BRASIL (2000-2004).

Fonte: SOCIEDADE, 2006 – CAP. 1

Em alguns casos, o tratamento não medicamentoso pode ser feito através de uma dieta com pouco sal e sem gordura, além da mudança de hábitos de vida como deixar de fumar, não ingerir álcool, fazer exercícios regularmente e emagrecer, são suficientes para manter a pressão controlada. Em outros casos, quando há um maior comprometimento dos órgãos-alvo desta doença, o uso de medicamentos se faz indispensável para o controle da hipertensão arterial (ARAÚJO, 2004).

Dentro deste contexto é possível salientar a importância do controle de qualidade de medicamentos utilizados no tratamento da hipertensão arterial, produtos que, em razão da relevância da patologia envolvida, merecem a disponibilização de metodologias analíticas rápidas e confiáveis, de maneira a facilitar operações de controle de qualidade.

2.3. TRATAMENTOS ANTIHIPERTENSIVOS

O tratamento farmacológico com antihipertensivos é indicado para pacientes com hipertensão moderada, grave e com fatores de risco para doenças cardiovasculares e/ou lesão importante de órgãos-alvo da doença. No entanto, poucos hipertensos conseguem o controle ideal da pressão com um único agente terapêutico e, muitas vezes, faz-se necessária a terapia combinada (ZAITUNE *et al*, 2006).

Muitas classes de medicamentos podem ser utilizadas para o controle da HAS. De forma simplificada, podemos entender que os medicamentos administrados visam diminuir os parâmetros que constituem a pressão arterial: o débito cardíaco e a resistência periférica total (HARDMANN & LIMBIRD, 2003).

As classes de medicamentos antihipertensivos utilizadas e seus mecanismos de ação são mostrados a seguir (PORTAL DO CORAÇÃO, 2009):

- Diuréticos: O mecanismo de ação dos diuréticos relaciona-se inicialmente à eliminação de sal e líquidos pela urina. Os diuréticos mais utilizados são os tizídicos, como por exemplo, a hidroclorotiazida. Os diuréticos de alça, como a furosemida, são administrados em situações de hipertensão arterial associada à insuficiência renal ou insuficiência cardíaca com retenção de líquidos. Diuréticos poupadores de potássio, como a espironolactona, apresentam pequena eficácia diurética, mas quando associados a outros diuréticos, são úteis na prevenção e no tratamento de hipopotassemia (queda de potássio);
- Medicamentos de ação central: Atuam estimulando certos receptores no sistema nervoso central, reduzindo a liberação de adrenalina, como fazem a alfametildopa, a clonidina ou medicamentos que atuam nos receptores imidazolidínicos (moxonidina e a rilmenidina). Seu efeito hipotensor como terapia

isolada é, em geral, leve. Entretanto, eles podem ser úteis quando utilizados em associação com medicamentos de outros grupos, particularmente no caso de evidência de hiperatividade simpática (liberação excessiva de adrenalina);

- Alfabloqueadores: Bloqueiam os receptores alfa do sistema nervoso autônomo, envolvido no controle da pressão arterial. Apresentam efeito hipotensor discreto em longo prazo como terapia isolada, devendo, portanto, ser associados com outros antihipertensivos. São exemplos desse grupo a doxazonina e o prazosin;
- Betabloqueadores: Seu mecanismo antihipertensivo envolve diminuição inicial do débito cardíaco, redução da secreção de renina pelos rins e diminuição da adrenalina nas sinapses nervosas. São exemplos desse grupo o propranolol, atenolol, metoprolol e bisoprolol;
- Bloqueadores dos canais de cálcio: A ação antihipertensiva decorre da dilatação das artérias por diminuição do cálcio nas células musculares lisas da parede dos vasos. Apesar do mecanismo final comum, esse grupo é dividido em três subgrupos: fenilalquilaminas (verapamil), benzotiazepinas (diltiazem) e diidropiridinas (nifedipino, anlodipino, entre outros);
- Inibidores da enzima conversora de angiotensina (inibidores da ECA): Agem fundamentalmente pela inibição da enzima conversora da angiotensina, bloqueando a transformação da angiotensina I em II no sangue e nos tecidos. A angiotensina II estreita as artérias e aumenta a pressão arterial. São exemplos desse grupo o captopril, enalapril, ramipril, delapril e outros;
- Bloqueadores do receptor AT₁: Antagonizam a ação da angiotensina II por meio do bloqueio específico de seus receptores AT₁. São exemplos desse grupo o losartana, valsartana, candesartana e outros;
- Vasodilatadores diretos: Atuam sobre a musculatura da parede vascular, promovendo relaxamento muscular com conseqüente dilatação e redução da resistência vascular. São utilizados em associação a diuréticos e/ou betabloqueadores. Hidralazina e minoxidil são dois dos principais representantes desse grupo.

De acordo com pesquisas realizadas por MION JR. e colaboradores (2001), as drogas mais recomendadas pelos médicos especialistas em cardiologia, clínica médica e geriatria são os diuréticos e os inibidores da ECA.

O tratamento farmacológico para hipertensos leves e moderados é iniciado com o uso de droga isolada na maioria dos casos. Quando não há controle da pressão arterial com o emprego de monoterapia, cerca de 55% dos médicos associa drogas de diferentes mecanismos de ação e 33% aumentam a dose da droga em uso.

As associações mais freqüentemente utilizadas são: a) **inibidores da ECA + diurético** (46%); b) betabloqueador + diurético (34%); e c) medicamentos de ação central + diurético (17%).

2.3.1. Associação captopril - hidroclorotiazida

Cerca de 70% dos pacientes hipertensos necessitam de duas ou mais medicações para obter um controle adequado de sua pressão arterial (PORTAL DO CORAÇÃO, 2009), portanto associações de fármacos antihipertensivos são comumente utilizados, principalmente em pacientes que apresentam estágio elevado de hipertensão.

São exemplos de associações reconhecidas como eficazes: diuréticos de diferentes mecanismos de ação; medicamentos de ação central e diuréticos; betabloqueadores e diuréticos; bloqueadores do receptor AT₁ e diuréticos; **inibidores da ECA e diuréticos**; bloqueadores dos canais de cálcio e betabloqueadores; bloqueadores dos canais de cálcio e inibidores da ECA; bloqueadores dos canais de cálcio e bloqueadores do receptor AT₁ (SOCIEDADE, 2006 – CAP. 6).

O captopril é um dos medicamentos mais vendidos para o controle da hipertensão arterial no Brasil e no mundo. Este fármaco (1-[(2S)-3-mercaptopropionil]-L-prolina, Figura 2-A) pertence à classe de inibidores da enzima conversora de angiotensina (inibidores da ECA) que atuam como potente vasoconstritor no controle da hipertensão arterial.

Um diurético amplamente utilizado em associação aos inibidores da ECA, como o captopril, é a hidroclorotiazida (1,1 dióxido de 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiazina-7-sulfonamida, Figura 2-B), que atua diretamente nos rins, aumentando a excreção de cloreto de sódio, potássio e, conseqüentemente, da água. Esta classe de diuréticos é muito eficaz, podendo ser utilizada na forma de monoterapia ou em associação com outros antihipertensivos. Os diuréticos tiazídicos foram os primeiros antihipertensivos disponíveis para uso em larga escala. Lançados em meados dos anos 50 continuam a ser administrados, isolados ou em associação, por milhões de hipertensos em todo o mundo (SANTELLO & MION JR, 1998).

Captopril é um pó cristalino branco ou quase branco, facilmente solúvel em metanol e cloreto de metileno e também solúvel em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos. Possui faixa de fusão de 105 °C a 108 °C e valores de pka de 9,8 (tiol) e 3,7 (carboxila) (ANVISA, 2009-A).

Hidroclorotiazida é 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. Possui faixa de fusão de 266-270 °C, com decomposição e valores de pka de 9,2 e 7,9 (aminas) (ANVISA, 2009-B).

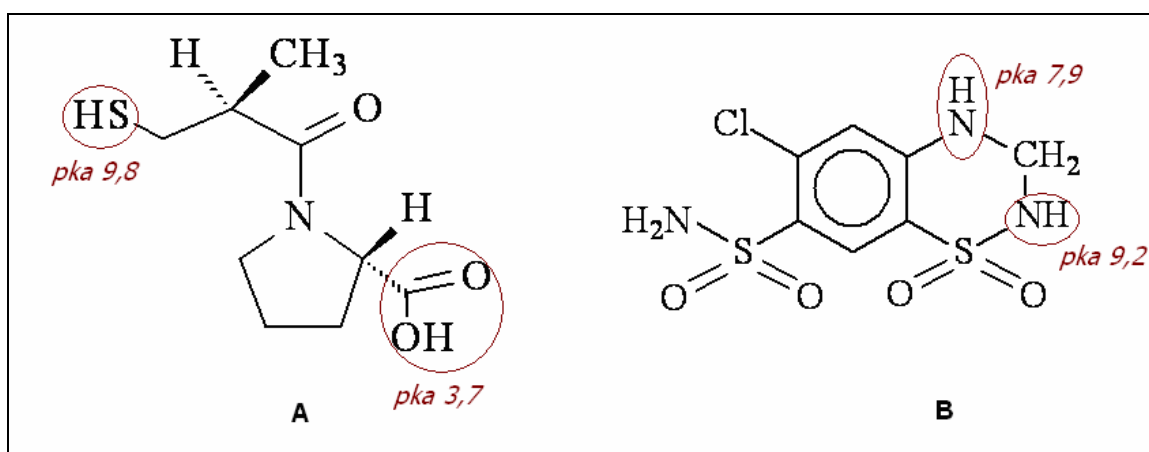


FIGURA 2. ESTRUTURAS DO CAPTOPRIL (A) E DA HIDROCLOROTIAZIDA (B).

2.4. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS

Atualmente existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar de forma contínua a produção de fármacos e medicamentos, produtos utilizados no tratamento de pessoas já debilitadas por uma doença ou sintoma particular e que requerem um rigoroso controle de qualidade. Em função da seriedade que este tipo de controle reveste, grande parte das propostas analíticas aplicadas à análise de medicamentos está fundamentada em técnicas instrumentais modernas, muitas vezes demoradas e onerosas.

Dentre as técnicas utilizadas na quantificação de fármacos é possível destacar a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (LOUHAICHI *et al*, 2009; DONGRE *et al*, 2008; BAO *et al*, 2008; BECK *et al*, 2007; HÁJKOVÁ *et al*, 2007; OH *et al*, 2007; MAIA *et al*, 2007; HAVLÍKOVÁ *et al*, 2006; JING *et al*, 2006), muitas vezes associadas a sistemas de detecção diferenciados, como espectrometria de massas (PEREIRA *et al*, 2005, WADE & MILLER, 2005) e quimiluminescência (MERVAROVÁ *et al*, 2007; GÓMEZ-TAYLOR *et al*, 2006), ou a diferentes sistemas de introdução de amostras, como

sistemas de injeção de fluxo (TZANAVARAS & THEMELIS, 2006). Outros métodos utilizados são: a cromatografia em fase gasosa (ALZAGA *et al*, 2007; LI *et al*, 2006), a cromatografia de alta eficiência em camada delgada (ÚRBAN-MORLÁN *et al*, 2007; VENKATACHALAM & CHATTERJEE, 2007), a eletroforese capilar (ABDELAL *et al*, 2008; FARINA *et al*, 2008; RAO *et al*, 2006; FELIX *et al*, 2006), a espectrometria de ressonância magnética nuclear (BALAYSSAC *et al*, 2008; SHAMSIPUR *et al*, 2007; LEHR *et al.*, 2003), a difração de raios-x, a espectroscopia Raman (CHIENG *et al*, 2009; TIAN *et al*, 2007) e a fluorescência molecular (ALVES & POPPI, 2008).

Dada a própria natureza deste conjunto de técnicas instrumentais, as possibilidades de estabelecer um sistema de análise “*on-line*” são praticamente inexistentes, motivo pelo qual o controle de qualidade continua sendo universalmente aplicado a lotes do produto, selecionados de acordo com critérios estatísticos.

Algumas técnicas para quantificação de captopril, em associações farmacêuticas ou não, estão descritas na literatura, dentre as quais se destacam: cromatografia em fase líquida de alta eficiência (SALEM *et al*, 2005; EL-GINDY *et al*, 2004; MIRZA & TAN, 2001), acoplada a espectroscopia de massas (REZENDE *et al.* 2006), espectroscopia Raman (MAZUREK & SZOSTAK, 2006), espectrometria de absorção atômica (EL REIS *et al*, 2000), espectroscopia por reflectância difusa (GOTARDO *et al*, 2005), técnicas quimiluminescentes (PULGARÍN *et al*, 2005), colorimétricas (SHAMA *et al*, 2006; PIMENTA *et al*, 2001), termoanalíticas (HUANG *et al*, 2001), voltamétricas (REZAEI & DAMIRI, 2008; PARHAM & ZARGAR, 2005; SHAHROKHIAN *et al*, 2005; IOANNIDES, 2003; SIANGPROH *et al*, 2003), potenciométricas (RIBEIRO *et al*, 2003) e sistema de injeção de fluxo com biosensores amperométricos (STEFAN *et al*, 2000).

Para quantificação de hidroclorotiazida em associações farmacêuticas podemos destacar algumas técnicas utilizadas: cromatografia em fase líquida de alta eficiência (DINÇ & ÖZDEMIR, 2005; BELAL *et al*, 2001; EL WALILY *et al*, 1995), cromatografia de alta eficiência em camada delgada (BEBAWY *et al*, 2005), eletroforese capilar (PRIETO *et al*, 2001), técnicas voltamétricas (RAZAK, 2004; PRIETO *et al*, 2003), quimiluminescentes (PULGARÍN *et al*, 2004) e condutométricas (LOURENÇÃO *et al*, 2008).

Normalmente, quantificações simultâneas da associação captopril e hidroclorotiazida são relatadas pelo uso de técnicas cromatográficas (HUANG, 2006; IVANOVIC *et al*, 2004) e com a utilização de detectores de quimiluminescência (OUYANG, 1999).

2.5. ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO

Há uma série de testes que devem ser realizados durante o desenvolvimento, produção e liberação de um produto farmacêutico no mercado (WADE & MILLER, 2005), dentre eles destacam-se os ensaios de dissolução, que permitem avaliar a taxa e o perfil de dissolução de um ou mais fármacos em um medicamento.

Dissolução é o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo. O ensaio de dissolução nada mais é que um teste físico de natureza destrutiva, no qual o fármaco passa para a forma solúvel a partir da forma farmacêutica intacta ou de seus fragmentos e partículas formados durante o teste, no caso de cápsulas e comprimidos (MARCOLONGO, 2003).

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação, da dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal (QURESHI & SHABNAM, 2003).

Dentro deste contexto, ensaios de dissolução *in vitro* para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata, tais como comprimidos e cápsulas, são utilizados como parâmetro para avaliar a qualidade dos lotes de medicamentos, para orientar o desenvolvimento de novas formulações e para assegurar o desempenho do medicamento após as alterações (ANVISA, 2002).

Outra aplicação dos estudos de dissolução, muito utilizada atualmente, é a isenção de estudos de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência para algumas dosagens de um mesmo produto. Os estudos de bioequivalência são necessários, principalmente, para o registro de medicamentos genéricos e similares. Quando se comprova que todas as dosagens de determinado produto apresentam perfis de dissolução semelhantes e existe um estudo de bioequivalência que a comprova em relação a um produto de referência para uma das dosagens, geralmente a mais alta, as demais podem ser registradas também, sem que haja a realização de novos estudos *in vivo* (MARCOLONGO, 2003).

No Brasil os ensaios de dissolução passaram a ser exigidos para o registro de medicamentos a partir de 1999, com a introdução dos medicamentos genéricos. A regulamentação destes ensaios é feita pela ANVISA, de acordo com a Resolução - RE nº 483, de 19 de março de 2002, onde há recomendações gerais para ensaios de dissolução, especificações relacionadas às características biofarmacêuticas de fármacos e métodos estatísticos para a comparação de perfis de dissolução (ANVISA, 2002).

O método de dissolução é específico para cada medicamento, estando ele em associação ou não. Os testes de dissolução fazem parte das monografias de quase todas

as formas farmacêuticas sólidas, além das especificações de cada monografia, as farmacopéias trazem também especificações em diferentes estágios deste processo.

Inúmeras são as variáveis que podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução. Todas devem ser consideradas, mas algumas devem ser rigorosamente monitoradas para obtenção de resultados confiáveis. Entre os fatores relacionados com o fármaco e sua formulação destacam-se: a solubilidade, o tamanho de partícula, a natureza química do fármaco, a forma farmacêutica, os excipientes e a tecnologia de fabricação. Dos relacionados com o equipamento podemos destacar: tipo de aparato utilizado, a geometria do sistema, a vibração do sistema, a velocidade de agitação, a posição da haste, a posição e método de amostragem e o dispositivo para formas farmacêuticas que flutuam. Relacionados ao meio de dissolução temos: o volume do meio, presença de bolhas de ar, pH, evaporação, viscosidade do meio, força iônica e presença de tensoativos. Entre os fatores relacionados com o meio ambiente destacam-se as condições de estocagem e os fatores relacionados com o método analítico, a filtração e a técnica analítica de quantificação (MARCOLONGO, 2003).

O primeiro aparato de dissolução adotado oficialmente foi o da cesta (*rotating basket*) pela Farmacopéia Americana em 1970. E em 1975, dois aparelhos se tornam oficiais: aparatos 1 (cesta) e 2 (pá), que são até hoje os equipamentos mais utilizados. O aparato cesta (Figura 3) está previsto em todas as farmacopéias consultadas (brasileira, britânica, européia, japonesa e americana), apresentando pequenas variações quanto às especificações (dimensões, capacidade, etc). O aparato consiste de uma cuba cilíndrica de vidro (boro-silício) com fundo arredondado ou de algum outro material transparente e não reagente, um regulador de velocidade, uma haste rotatória de aço inoxidável, uma cesta cilíndrica de aço inoxidável e um banho de água quente mantido a temperatura constante.

A especificação da cesta pode ser em *mesh*, que se refere ao número de aberturas por polegada de tela, ou em *micron*, que se refere ao tamanho da maior partícula que a tela permite passar (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Esse aparato tem a vantagem de confinar a forma farmacêutica a uma área limitada, enquanto a mantém imersa no meio (Figura 4). Isso é essencial para conseguir uma melhor reprodutibilidade do método. Também é vantajoso para cápsulas que tendem a flutuar e podem ter a redução da superfície de contato com o meio (ABDOU, 1989).

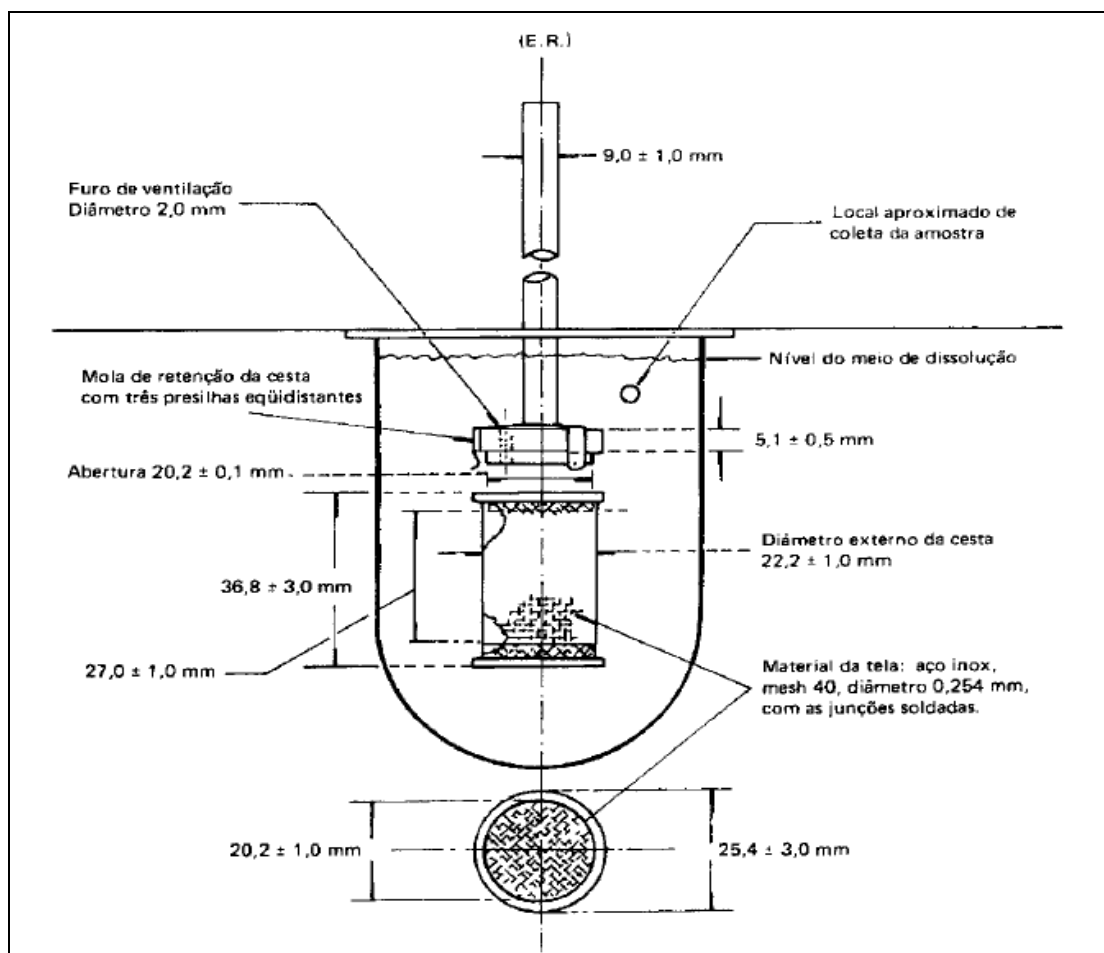


FIGURA 3. APARATO CESTA PARA ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO.

Fonte: FARMACOPÉIA BRASILEIRA, QUARTA EDIÇÃO

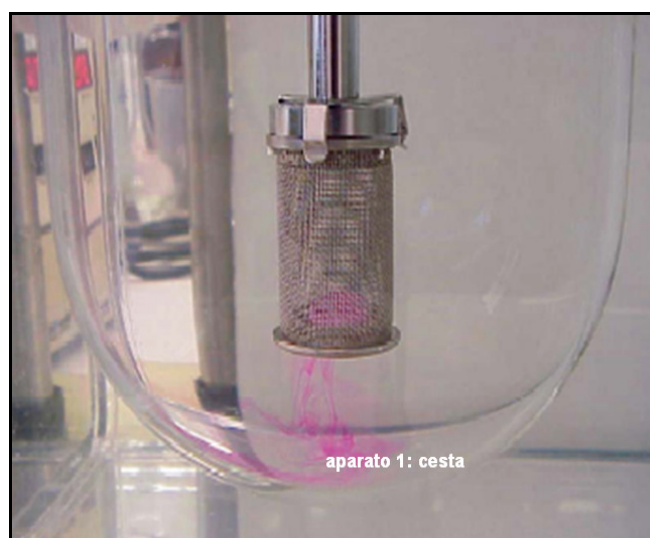


FIGURA 4. DETALHE DO SISTEMA DE DISSOLUÇÃO.

Fonte: O AUTOR

A Farmacopéia Americana estabelece, ainda, ensaios de adequação a serem conduzidos nos aparatos com comprimidos calibradores de prednisona (desintegrantes) e ácido salicílico (não desintegrantes), sendo que eles são considerados adequados se os resultados obtidos estiverem dentro dos limites especificados para cada calibrador. O uso generalizado dos padrões de calibração tem servido para a qualificação universal, pelo menos para os métodos da cesta (MANADAS, 2002; QURESHI & MCGILVERAY, 1995; ACHANTA *et al*, 1995).

Para a análise dos medicamentos dissolvidos utilizam-se métodos cromatográficos (JANTRATID *et al*, 2009; GARBACZ *et al*, 2008; IYER *et al*, 2007; MENEGOLA *et al*, 2007; ROSSI *et al*, 2007), espectrofotométricos (JOSHI *et al*, 2008; FREITAS *et al*, 2005), utilizando métodos derivativos (DINÇ *et al*, 2007) ou equipados com sensor de fibra ótica para medidas de refletância (FILIK *et al*, 2008; JOHANSSON *et al*, 2002; GEMPERLINE *et al*, 1997), espectroscopia de luminescência (SOTOMAYOR *et al*, 2008), potenciométricos (PEETERS *et al*, 2008; BOHETS *et al*, 2007), titulométricos (BRANDÃO, 2001), difração de raios-x e espectroscopia Raman (ALLESØ *et al*, 2009).

2.6. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA

A espectroscopia eletrônica apresenta um conjunto de características favoráveis, as quais deveriam garantir a sua condição de ferramenta analítica de primeira importância. Trata-se de uma técnica consolidada, de fácil implementação, baixo custo e sensibilidade compatível com muitas das necessidades analíticas citadas anteriormente (SKOOG *et al*, 2006). Infelizmente, a baixa seletividade faz com que a sua aplicabilidade fique seriamente comprometida, quando há necessidade de se analisar matrizes complexas.

Para contornar os problemas que surgem por esta falta de seletividade, muitas alternativas têm sido propostas. No entanto, grande parte delas está fundamentada na aplicação de processos de separação prévia (FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA *et al*, 2003; AKAY & OZKAN, 2002), os quais acrescentam etapas que podem prejudicar a reprodutibilidade da determinação.

Grande parte dos fármacos apresenta um sinal bastante intenso na região ultravioleta, o que faz com que a sua determinação *via* espectroscopia UV-Vis seja viável, mesmo em concentrações traço. Adicionalmente, a sua validação costuma ser mais simples e efetiva, em relação, por exemplo, a métodos fundamentados em cromatografia em fase líquida de alta eficiência (MADAN *et al*, 2005). Porém, muitos compostos absorvem na mesma região do espectro, motivo pelo qual os métodos espectroscópicos apresentam baixa seletividade (Figura 5).

Para contornar estes inconvenientes e viabilizar a determinação por espectroscopia UV-Vis, algumas propostas têm sido recentemente realizadas, dentre elas destacam-se a

utilização de espectroscopia derivativa (ROJAS & OJEDA, 2009; LÓPEZ-MARTÍNEZ *et al*, 2002; MORENO GÁLVEZ *et al*, 2002; LEMUS GALLEGO & PÉREZ ARROYO, 2001) e mais recentemente o uso de procedimentos de calibração multivariada (WU *et al*, 2009; GENDRIN *et al*, 2008; MALUF *et al*, 2008; METWALLY, 2008; SENA *et al*, 2007; NI *et al*, 2006; ABBASPOUR & MIRZAJANI, 2005; DAMIANI *et al*, 2005; GHASEMI & NIAZI, 2005; RAGNO *et al*, 2004; SENA & POPPI, 2004; ANDRADE *et al*, 2003; KARGOSHA & SARRAFI, 2001; BOERIS *et al*, 2000).

A espectrofotometria foi muito beneficiada com a introdução de processos multivariados e têm sido amplamente aplicada na análise de formas farmacêuticas contendo vários fármacos e excipientes absorvendo nas mesmas regiões do espectro (RAGNO *et al*, 2004). A calibração multivariada tem sido aplicada, por exemplo, na análise por espectroscopia derivativa em ensaios de dissolução (CUTRIGNELLI *et al*, 2008; MARKOPOULOU *et al*, 2005; MARKOPOULOU *et al*, 2004).

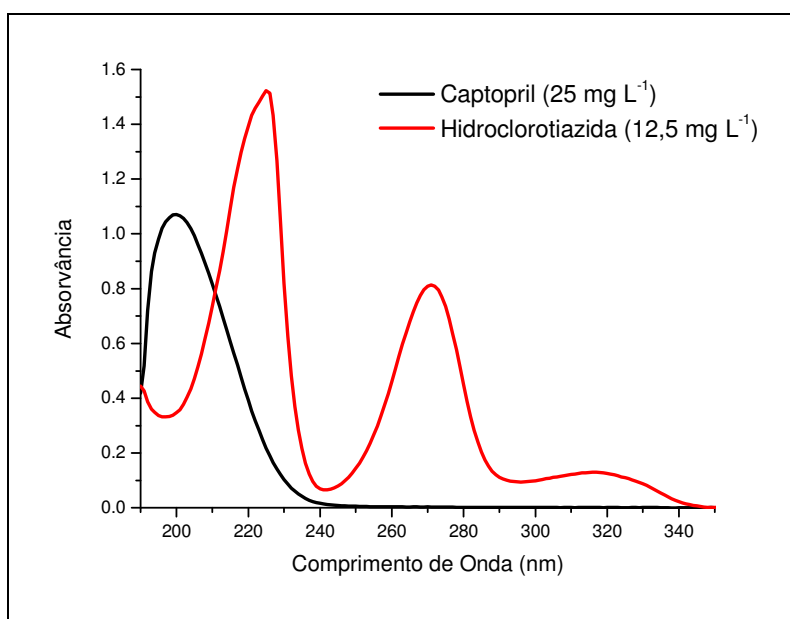


FIGURA 5. ESPECTRO UV-Vis QUE DEMONSTRA A INTERFERÊNCIA ESPECTRAL ENCONTRADA NA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA.

Fonte: O AUTOR

Com relação à espectroscopia UV-Vis, é importante salientar que a análise de associações farmacêuticas costuma ser seriamente comprometida pelas diversas interferências espectrais observadas, sendo, portanto, mais frequentemente encontrados trabalhos que utilizam métodos espectrofotométricos em ensaios de dissolução para

apenas um dos fármacos em estudo, como é o caso da hidroclorotiazida, avaliada por espectroscopia UV-Vis nos trabalhos de MAHLE *et al* (2007) e de COLONESI DA ROSA (2005). Por sua vez, ensaios de dissolução envolvendo captopril são normalmente realizados por técnicas cromatográficas (AZEVEDO *et al*, 2008).

Estudos envolvendo a associação hidroclorotiazida/captopril foram relatados por TOMŠŮ *et al* (2004), utilizando-se espectrofotometria derivativa.

Uma forma de tentar contornar os problemas de interferência espectral, que prejudicam a quantificação dos fármacos em associação utilizando técnicas espectrofotométricas, está na utilização de processos de calibração multivariada, uma poderosa ferramenta na análise de multicomponentes.

2.7. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Um dos principais objetivos da calibração multivariada consiste em explorar toda a informação fornecida pela técnica instrumental utilizada, condição que favorece a previsão de uma resposta de interesse com discrepância mínima, mesmo em condições de severa interferência inter-espécies.

Métodos de calibração multivariada têm sido cada vez mais utilizados em química analítica, principalmente quando os componentes presentes numa mistura necessitam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade (BRO, 2003; HOPKE, 2003).

O procedimento geral da análise química é composto de duas etapas fundamentais. Na primeira, alguns tratamentos químicos e físicos são utilizados, com o objetivo de transformar a amostra levando-a a um estado físico compatível com a técnica analítica disponível. Na segunda, modelos de calibração são desenvolvidos, obtendo-se uma função de regressão que permite prever uma quantidade de uma espécie química desejada, a partir de um parâmetro físico medido.

Normalmente, os modelos de calibração são desenvolvidos utilizando-se aproximações univariadas. No caso particular da espectroscopia UV-Vis, por exemplo, o sinal processado costuma corresponder à absorvância registrada no comprimento de onda de absorção máxima. Obviamente que, além de representar uma sub-utilização da informação fornecida pelo sistema instrumental, a utilização de apenas este parâmetro dificulta (e as vezes inviabiliza completamente) a determinação em amostras onde os componentes apresentam interferência espectral (ANDRADE *et al*, 2003).

A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes (ou blocos) de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas.

A calibração multivariada consiste basicamente de duas fases (MARTENS & NAES,

1989; FERREIRA *et al*, 1999): a calibração e a previsão. Na fase de calibração, “**n**” espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em “**p**” valores de energia (ou comprimento de onda) diferentes, formando uma matriz **X**, com “**n**” linhas e “**p**” colunas. Também uma matriz **Y** com os valores de concentração pode ser formada contendo “**n**” linhas, correspondendo às diferentes amostras, e “**q**” colunas, indicando a concentração de cada uma das espécies de interesse.

O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado determinando-se um vetor dos coeficientes de regressão (**b**) que melhor possa reproduzir **Ycal** a partir dos dados da matriz **Xcal** (Equação 1). Esse modelo é utilizado na fase de previsão (com um conjunto teste) para estimar as concentrações (**Yprev**) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros (**Xteste**) (Equação 2). Como estes métodos trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator **Y** da Equação 1 para a obtenção da Equação 2 implica na utilização da matriz transposta de **X**, ou seja, **(Xteste)^T**.

$$X_{cal} = b * Y_{cal} \quad (1)$$

$$Y_{teste} = (X_{teste})^T * b \quad (2)$$

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme mostrado na Figura 6. Os valores de absorvância (ou transmitância) dos espectros, a cada valor de energia (ou comprimento de onda), são as variáveis independentes, e as concentrações das espécies e interesse nas amostras, as variáveis dependentes.

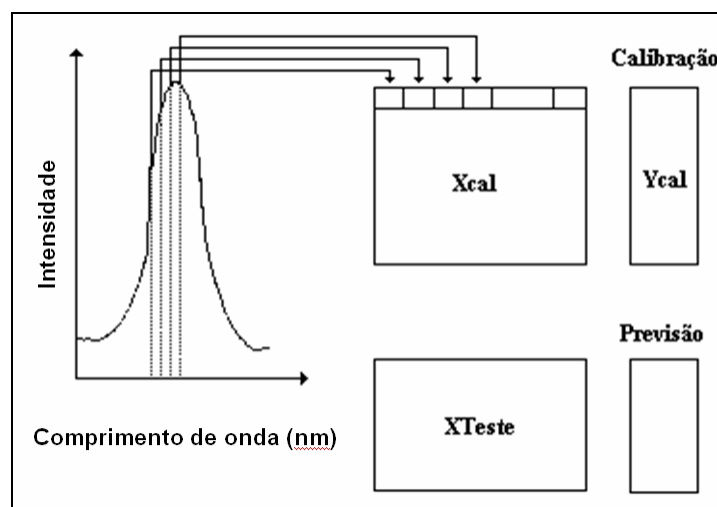


FIGURA 6. ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.

Fonte: NAGATA, 2001

2.7.1. Regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR)

A Calibração Multivariada, fundamentada em técnicas de regressão parcial, corresponde a uma ferramenta poderosa para a química analítica, de interessante potencial de aplicação em muitos problemas de análise farmacêutica (ARANCIBIA *et al*, 2000; SENA *et al*, 2000; MEDINA *et al*, 1999). Em geral, este recurso permite a determinação de um componente de interesse em matrizes complexas ou a análise de multi-componentes em sistemas mais simples.

O PLS (*do inglês, Partial Least Squares*) é um método utilizado na construção de modelos de regressão baseados na decomposição de variáveis latentes relacionando dois blocos, matrizes **X** e **Y**, que contém as variáveis independentes (**x**) e dependentes (**y**) (SENA & POPPI, 2004). A regressão por mínimos quadrados parciais estende o conceito do modelo inverso (propriedade como função da resposta instrumental) trocando as variáveis originais por um subconjunto truncado das variáveis latentes dos dados originais. Considerando um caso geral para a determinação de mais de uma espécie de interesse, logo **Y** é uma matriz de dimensão (**n x z**), onde **z** é o número de colunas de **Y**, tem-se a decomposição de ambas as matrizes **X** de dimensão (**n x m**) e **Y** em suas matrizes de “scores” e “loadings” (VALDERRAMA, 2005):

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E}_x = \sum t_{Ap} \mathbf{p}_A^T + \mathbf{E}_x \quad (3)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^T + \mathbf{E}_y = \sum u_{Aq} \mathbf{q}_A^T + \mathbf{E}_y \quad (4)$$

em que, **X** é a matriz de respostas instrumentais, **Y** é a matriz de respostas da propriedade de interesse obtida por metodologia padrão, **T** e **U** são os “scores” de **X** e **Y**, respectivamente, **P** e **Q** são os “loadings” de **X** e **Y**, respectivamente, **E_x** e **E_y** corresponde a matriz de resíduos composta pelas variáveis latentes descartadas, ou seja, as matrizes que contém a parte não modelada (VALDERRAMA, 2005). O **T** sobrescrito indica uma matriz transposta. O produto de **T** e **P^T** se aproxima das variáveis independentes (dados espectrais) e o produto de **T** e **Q^T**, das variáveis dependentes (concentrações) (SENA & POPPI, 2004).

Entre os “scores” de **X** e os “scores” de **Y**, uma relação linear é, então, estabelecida.

$$\hat{u}_A = \mathbf{b}_A \hat{t}_A \quad (5)$$

em que, \mathbf{b}_A é o vetor de coeficientes de regressão do modelo linear para cada variável latente, obtido através de (VALDERRAMA, 2005):

$$\mathbf{b}_A = \frac{\mathbf{u}_A^T \mathbf{t}_A}{\mathbf{t}_A^T \mathbf{t}_A} \quad (6)$$

A Figura 7 ilustra a decomposição das matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} no produto das matrizes de “scores” e “loadings”. A decomposição pode ser realizada através de diversos algoritmos que procedem a referida decomposição por passos diferentes chegando ao final em resultados praticamente iguais. Um exemplo desses algoritmos é o NIPALS (*do inglês, Nonlinear Iterative Partial Least Squares*) (VALDERRAMA, 2005).

$$\begin{aligned} \mathbf{X} &= \begin{matrix} m \\ \mathbf{X} \\ n \end{matrix} = \begin{matrix} l \\ \mathbf{t}_1 \\ n \end{matrix} \begin{matrix} m \\ \mathbf{p}_1^T \\ l \end{matrix} + \dots + \begin{matrix} l \\ \mathbf{t}_A \\ n \end{matrix} \begin{matrix} m \\ \mathbf{p}_A^T \\ l \end{matrix} + \begin{matrix} m \\ \mathbf{E}_x \\ n \end{matrix} \\ \mathbf{Y} &= \begin{matrix} z \\ \mathbf{Y} \\ n \end{matrix} = \begin{matrix} l \\ \mathbf{u}_1 \\ n \end{matrix} \begin{matrix} l \\ \mathbf{q}_1^T \\ l \end{matrix} + \dots + \begin{matrix} l \\ \mathbf{u}_A \\ n \end{matrix} \begin{matrix} l \\ \mathbf{q}_A^T \\ l \end{matrix} + \begin{matrix} z \\ \mathbf{E}_y \\ n \end{matrix} \end{aligned}$$

FIGURA 7. DECOMPOSIÇÃO EM VARIÁVEIS LATENTES DAS MATRIZES \mathbf{X} E \mathbf{Y} PARA MODELOS PLS.

Fonte: VALDERRAMA, 2005

O NIPALS é uma extensão do PLS utilizado para análise de dados multivariados. Como no PLS, o NIPALS é utilizado nos casos em que todas as variáveis dependentes são previstas simultaneamente (uma matriz \mathbf{Y}) (SENA & POPPI, 2004). Para análise das amostras, têm-se um tensor de dados \mathbf{X} de dimensões $i \times j \times k$. Esses métodos têm a grande vantagem de permitirem a determinação de espécies de interesse na presença de interferentes, mesmo que não tenham sido incluídos nas amostras de calibração (VALDERRAMA *et al*, 2009).

O método mais empregado para encontrar o número adequado de variáveis

latentes é a validação cruzada (*do inglês, cross-validation*) utilizando o sistema “*leave-one-out*” em que a partir das amostras de calibração, uma amostra é retirada e o modelo é desenvolvido com diferentes números de variáveis latentes. A concentração da amostra que foi retirada é prevista e por comparação com o valor esperado, a raiz quadrada da média dos erros quadráticos gerada por validação cruzada (RMSECV) é estimada para cada variável latente. Este procedimento é repetido para todas as amostras e um erro médio é calculado, podendo ser escolhido o número de variáveis latentes que apresentar o menor RMSECV (TREVISAN, 2003).

Métodos de calibração multivariada têm sido utilizados com bastante freqüência na resolução de problemas de interferência espectral. No caso da espectrofotometria UV-Vis e da espectroscopia no infravermelho, os exemplos são abundantes e atestam o grande potencial dos processos de calibração multivariada para a resolução deste tipo de problemas, sem a necessidade de recorrer a metodologias químicas, freqüentemente associadas à contaminação ou perda da amostra de interesse.

Com relação à análise de medicamentos, vários artigos foram encontrados nas fontes usuais de pesquisa bibliográfica. Artigos orientados à determinação de fármacos por espectrofotometria UV-Vis (WU *et al*, 2009; GENDRIN *et al*, 2008; MALUF *et al*, 2008; METWALLY, 2008; SENA *et al*, 2007; NI *et al*, 2006; ABBASPOUR & MIRZAJANI, 2005; DAMIANI *et al*, 2005; GHASEMI & NIAZI, 2005; RAGNO *et al*, 2004; ANDRADE *et al*, 2003; KARGOSHA & SARRAFI, 2001; BOERIS *et al*, 2000), e à análise por espectroscopia no infravermelho (AALTONEN *et al*, 2008; BENEDETTI *et al*, 2007; MATERO *et al*, 2007; PARISOTTO *et al*, 2007; SULUB *et al*, 2007; ROGGO *et al*, 2007; SOUZA & FERRÃO, 2006; LIU *et al*, 2003; KONZEN *et al*, 2003).

2.8. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a implementação de método conhecido, envolve um processo de avaliação que demonstre sua eficiência na rotina de análises de produtos industrializados, especialmente na indústria farmacêutica. Esse processo costuma ser denominado de validação. Um método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA (ANVISA 2003; BRITO *et al*, 2003).

A validação de métodos analíticos é um aspecto vital da garantia da qualidade de medicamentos e deve assegurar, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados. As características típicas utilizadas na validação de métodos analíticos são:

especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão (VALENTINI *et al*, 2007; ANVISA 2003; BARROS, 2002).

No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, a validação deverá envolver a avaliação de uma série de parâmetros, os quais dependem da finalidade do teste. Os testes necessários são classificados em 4 categorias, conforme apresentado na Tabela 1. Para cada categoria será exigido um conjunto de testes, os quais estão relacionados na Tabela 2.

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES DE VALIDAÇÃO, SEGUNDO SUA FINALIDADE.

| 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 |

Fonte: ANVISA, 2003

TABELA 2. ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS, SEGUNDO SUA FINALIDADE.

| 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 | <i>Repetibilidade</i> | SIM | SIM | NÃO | SIM | NÃO |
| | <i>Intermediária</i> | ** | ** | NÃO | ** | 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 | |

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

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

Fonte: ANVISA, 2003

2.8.1. Especificidade e Seletividade

Especificidade 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. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes, e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (VALENTINI *et al*, 2007; ANVISA, 2003).

Conforme citado por CORDEIRO (2006): “Os termos seletividade e especificidade são muitas vezes utilizados indistintamente ou com interpretações diversas, mas, de acordo com o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) (2003), seletividade e especificidade não são sinônimos”. Um método específico é aquele capaz de determinar apenas um analito presente na matriz, e seletivo é aquele capaz de determinar e distinguir cada um dos vários analitos presentes.

2.8.2. Linearidade

Entende-se por linearidade 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. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os intervalos (*ver item 2.8.3. Intervalo*) da Tabela 3 (ANVISA, 2003).

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo **Y**, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (**r**) deve ser = 0,99 (VALENTINI *et al*, 2007; ANVISA, 2003).

2.8.3. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Tabela 3). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicadas a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003).

TABELA 3. LIMITES PERCENTUAIS DO TEOR DO ANALITO QUE DEVEM ESTAR CONTIDOS NO INTERVALO DE LINEARIDADE PARA ALGUNS MÉTODOS ANALITICOS.

| ENSAIO | ALCANCE |
|---|--|
| Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas | De 80% a 120% da concentração teórica do teste |
| Determinação de impurezas | Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas |
| Uniformidade de conteúdo | De 70% a 130% da concentração teórica do teste |
| Ensaio de dissolução | De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor |

Fonte: ANVISA, 2003

2.8.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão é considerada em três níveis (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003):

- Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;
- Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes

e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (**DPR**) ou coeficiente de variação (**CV%**), segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde: **DP** é o desvio padrão e **CMD**, a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% de **DPR** (ANVISA, 2003).

2.8.5. Limite de detecção (sensibilidade)

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (ANVISA, 2003).

No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, conforme equação apresentada a seguir:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Onde: **IC** é a inclinação da curva e **DP_a** é o desvio padrão do intercepto com o eixo do **Y** de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser

obtido a partir da curva analítica proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco (ANVISA, 2003).

2.8.6. Limite de quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação,

$$LD = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Onde: **IC** é a inclinação da curva e **DP_a** é o desvio padrão do intercepto com o eixo do **Y** de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco (ANVISA, 2003).

2.8.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis:

- Fármaco: aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;
- Forma Farmacêutica: na análise de uma amostra, em que a quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

- Impurezas: análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco.

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

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

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada (ANVISA, 2003).

2.8.8. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. A Tabela 4 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

TABELA 4. FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO.

| | |
|--------------------------------------|---|
| Preparo das amostras | ·Estabilidade das soluções analíticas ·Tempo de extração |
| Espectrofotometria | ·Variação do pH da solução ·Temperatura ·Diferentes fabricantes de solventes |
| Cromatografia em fase líquida | ·Variação do pH da fase móvel ·Variação na composição da fase móvel ·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Fluxo da fase móvel |
| Cromatografia em fase gasosa | ·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Velocidade do gás de arraste |

Fonte: ANVISA, 2003

3. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo deste projeto é o desenvolvimento de métodos espectroscópicos multivariados para quantificação de captopril e hidroclorotiazida em associação.

Dentre os objetivos específicos destacam-se:

1. Desenvolvimento de modelos multivariados utilizando espectroscopia eletrônica (fase sólida e solução) e regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR);
2. Seleção do modelo de melhor desempenho, aplicação na análise de medicamentos e comparação dos resultados com técnica cromatográfica de referência;
3. Realização de ensaios de dissolução de medicamentos de referência, genérico e similar contendo a associação;
4. Seleção do modelo multivariado de melhor desempenho para quantificação dos fármacos nos ensaios de dissolução e comparação dos resultados com técnica cromatográfica de referência;
5. Validação do método analítico de acordo com normas nacionais (ANVISA).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL E REAGENTES

Os fármacos propostos para este estudo são captopril (1-[(2S)-3-mercaptopropano-2-ílo]-L-prolina) e hidroclorotiazida (1,1 dióxido de 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiazina-7-sulfonamida), cujas especialidades estudadas foram: Lopril-D (Bristol-Myers Squibb Brasil), captopril + hidroclorotiazida (Medley S/A Ind. Farm.) e Captotec HCT (Hexal do Brasil), medicamento de referência, medicamento genérico e medicamento similar, respectivamente, todos contendo em sua formulação valor nominal de 50 mg de captopril e de 25 mg de hidroclorotiazida por comprimido.

Os padrões secundários de captopril (99,6%) e hidroclorotiazida (99,7%) foram fornecidos pelo Laboratório Famos.

Outros reagentes (ácido, bases, solventes e sais) foram de grau analítico PA.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se vidraria analítica, incluindo balões, buretas e pipetas volumétricas previamente calibradas.

4.2. EQUIPAMENTOS

As pesagens foram realizadas em balança analítica digital Scientech AS 210, com aproximação de 0,0001 g.

Os espectros de absorção UV-Vis em solução foram adquiridos em espectrofotômetro Shimadzu (2410 PC), utilizando-se o software UVPC v.3.91 (Shimadzu) e cubetas de quartzo de 1 cm. Nos estudos de reprodutibilidade foi utilizado equipamento Hewlett Packard, modelo HP 8452-A Diode Array.

Espectros na região UV-Vis em fase sólida foram registrados em um espectrômetro Ocean Optics, equipado com sonda para medidas por refletância.

Os ensaios de dissolução foram realizados em dissolutor Hanson Research®, modelo SR II 6 e aparato cesta.

A análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência foi realizada em cromatógrafo VARIAN 920-LC, utilizando software GALAXIE v 1.9 e coluna Microsorb-MV 100/5 C8 (250x4,6x1/4”).

4.3. RECURSOS COMPUTACIONAIS

Para desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada (PLSR) foi utilizado o pacote de programas do PLS-toolbox 3.0 (Eigenvector), o qual opera em ambiente Matlab 6.5 (MathWork). As matrizes foram construídas utilizando o software Origin 6.1® (OriginLab).

4.4. DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO

4.4.1. Espectroscopia eletrônica em solução

Para análise univariada convencional foram elaboradas curvas analíticas individuais, utilizando-se os comprimentos de onda de máxima absorção apresentados pelos fármacos em estudo. Cada curva foi elaborada com 5 pontos, contendo entre 20,0 e 30,0 mg L⁻¹ de captopril e entre 10,0 e 15,0 mg L⁻¹ de hidroclorotiazida.

Para o desenvolvimento de modelos multivariados foram produzidas 25 soluções a partir dos fármacos puros, contendo 20,0 a 30,0 mg L⁻¹ de captopril e 10,0 a 15,0 mg L⁻¹ de hidroclorotiazida, dissolvidos em solução Etanol:Água (10 %), de acordo com o planejamento apresentado na Figura 8. Esta faixa foi definida levando-se em consideração o teor nominal dos fármacos em medicamentos comercialmente disponíveis, a variação máxima permitida pela farmacopéia ($\pm 10\%$) e o coeficiente de absorvidade de cada fármaco.

Das 25 misturas, 20 foram utilizadas para a fase de calibração e 5 foram utilizadas na fase de validação do modelo (*ver detalhes na Figura 8*). Em ambos os métodos, os espectros foram registrados entre 190 e 350 nm, sendo processados integralmente, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Os excipientes não foram considerados no planejamento das misturas.

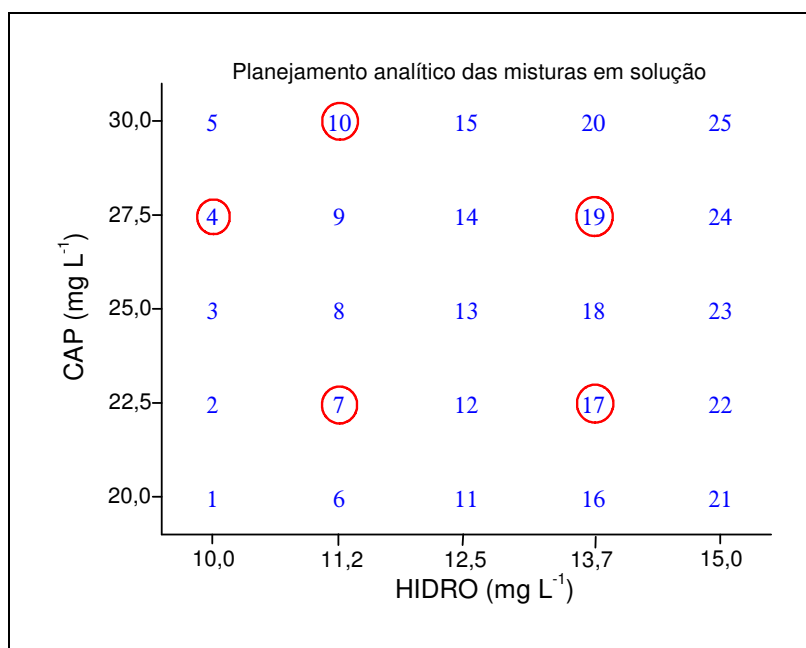


FIGURA 8. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS EM SOLUÇÃO CONTENDO CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO).

4.4.2. Espectroscopia eletrônica em fase sólida

Para o desenvolvimento de modelos multivariados foram produzidas 25 misturas, contendo 147 a 221 mg g⁻¹ de captopril e 74 a 110 mg g⁻¹ de hidroclorotiazida, de acordo com planejamento apresentado na Figura 9. Esta faixa foi definida levando-se em consideração o teor nominal dos fármacos contido em 1 grama de medicamento e a variação máxima permitida pela legislação pertinente ($\pm 10\%$).

Das 25 misturas, 20 foram utilizadas para a fase de calibração e 5 foram utilizadas na fase de validação do modelo (*ver detalhes na Figura 9*). Em todos os casos, sulfato de bário foi utilizado como diluente, por não absorver na região UV-Vis, em quantidade suficiente para completar 1,0000 g. Os espectros foram registrados entre 200 e 360 nm, sendo processados integralmente. Os excipientes não foram considerados no planejamento das misturas.

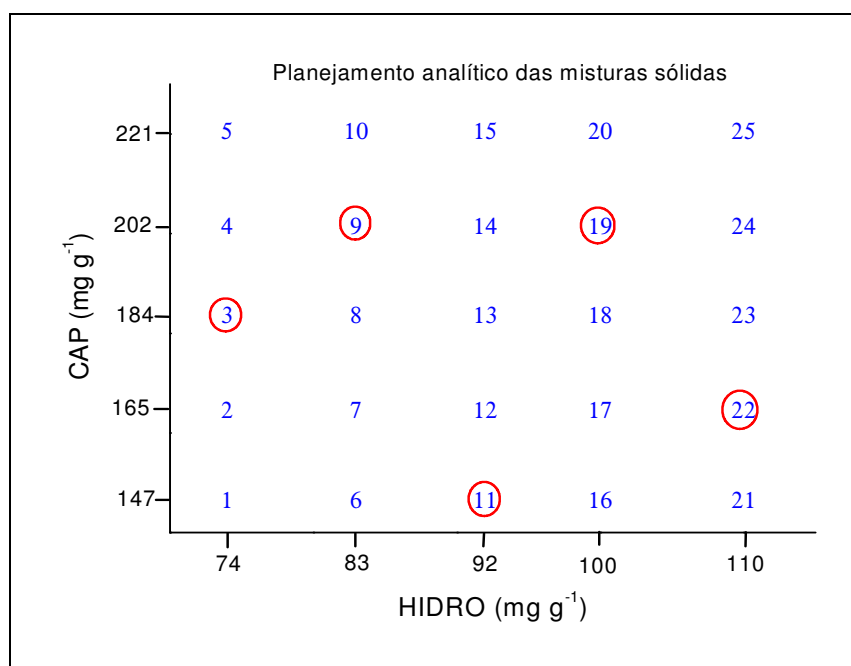


FIGURA 9. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS EM FASE SÓLIDA, CONTENDO CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO).

4.4.3. Transformação de Dados

Para melhorar a eficiência dos modelos multivariados, procedimentos de transformação de dados foram utilizados. Dentre outros destacam (PELL *et al*, 1992):

- i) Primeira e segunda derivada, para compensar o aumento de linha base e melhorar a separação de sinais não totalmente sobrepostos.
- ii) Alisamento, para diminuir os efeitos dos ruídos instrumentais.
- iii) Autoescalamento, para enfatizar sinais com baixa intensidade.
- iv) Correção do sinal multiplicativo (MSC), especialmente recomendado para correção de sinais obtidos por refletância.

4.5. VALIDAÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO

A partir dos resultados obtidos na fase de validação externa foi selecionado o modelo multivariado de melhor desempenho, o qual foi validado segundo critérios estabelecidos pela ANVISA. Os parâmetros avaliados foram: intervalo, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), robustez (tempo de leitura, temperatura e influência do pH) e exatidão.

4.5.1. Intervalo

A definição da faixa de trabalho do modelo multivariado deve considerar a concentração média do conjunto de calibração, modelando pontos de concentração ao redor desse valor, atingindo um limite de + 20% e – 20% (ANVISA, 2003). No caso das misturas contendo captopril e hidroclorotiazida, o ponto central corresponde às concentrações de 25,00 mg L⁻¹ de captopril e 12,50 mg L⁻¹ de hidroclorotiazida. Portanto, a variação de 20% configura o intervalo de 20,00 a 30,00 mg L⁻¹ para captopril e de 10,00 a 15,00 mg L⁻¹ para hidroclorotiazida.

4.5.2. Precisão

Para avaliação da precisão foram realizados ensaios de repetibilidade (intracorrída) e reprodutibilidade (inter-corrídas). Para os ensaios foram preparadas 3 misturas, em concentração baixa (20,00 mg L⁻¹ de CAP e 10,00 mg L⁻¹ de HIDRO), média (25,00 mg L⁻¹ de CAP e 12,50 mg L⁻¹ de HIDRO) e alta (30,00 mg L⁻¹ de CAP e 15,00 mg L⁻¹ de HIDRO), as quais foram analisadas em triplicata. O teste de reprodutibilidade foi viabilizado pela participação de um segundo analista (Doutoranda Gilcélia A. Cordeiro), em dia e equipamento diferentes.

A precisão foi expressa na forma de desvio padrão relativo, considerando-se aceitos valores inferiores a 5% (ANVISA, 2003).

4.5.3. Robustez

A avaliação da robustez envolveu estudos orientados a verificar o efeito do tempo de leitura (0, 1, 2, 3, 24 e 48 h), da temperatura (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C) e do pH (2,92; 4,21 e 6,14). Estes estudos foram realizados com apenas uma mistura sintética, contendo 25,00 mg L⁻¹ de captopril e 12,50 mg L⁻¹ de hidroclorotiazida.

4.5.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação. As misturas utilizadas para o ensaio de recuperação foram as mesmas empregadas na avaliação da precisão. A exatidão foi expressa na forma de erro percentual, considerando-se aceitos valores de recuperação entre 95 e 105% (ANVISA, 2003).

4.6. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS MEDICAMENTOS

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência da associação captopril/hidroclorotiazida foi realizada conforme o método da Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008), utilizando-se coluna C8 e fase móvel constituída de água deionizada, metanol (Merck, grau HPLC) e ácido fosfórico (750:250:0,5), com vazão de 1 mL min⁻¹. Nestas condições foram observados tempos de retenção de aproximadamente 4 minutos para hidroclorotiazida e 17 minutos para captopril, totalizando 20 minutos para cada corrida.

A curva analítica foi preparada a partir de 5 soluções contendo entre 0,020 e 0,200 mg mL⁻¹ de captopril e 0,010 e 0,100 mg mL⁻¹ de hidroclorotiazida, conforme planejamento da Figura 10. As soluções foram preparadas diretamente em fase móvel, contendo água deionizada, metanol e ácido fosfórico (750:250:0,5).

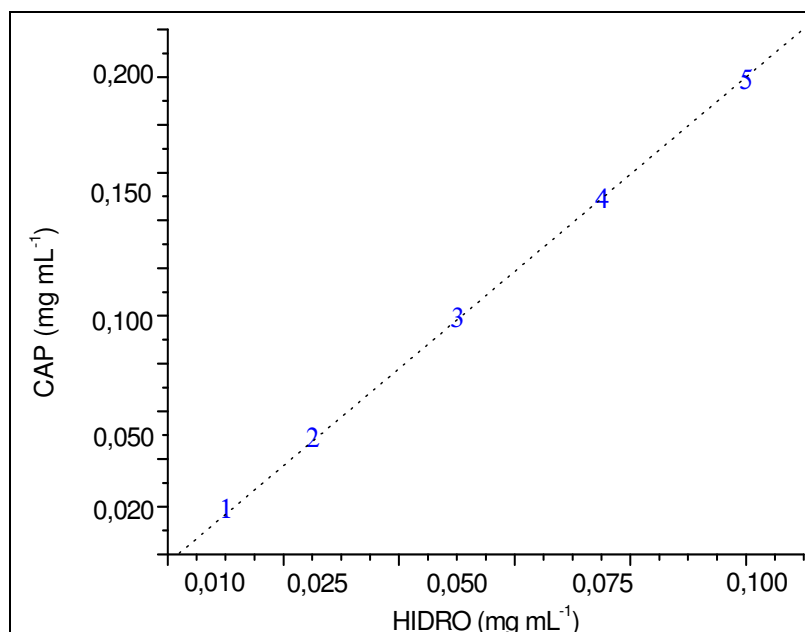


FIGURA 10. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) PARA ANÁLISE POR CLAE.

4.7. PERFIL DE DISSOLUÇÃO

Os ensaios de dissolução envolveram 3 medicamentos disponíveis comercialmente (Referência, Genérico e Similar), cada um dos quais foi avaliado em quintuplicata. Os ensaios foram realizados de acordo com a Farmacopéia Americana de 2008, utilizando-se as condições descritas na Tabela 5.

O meio de dissolução consistiu em uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹, a qual foi preparada com água deionizada previamente degaseificada. Nas cubas foram adicionados 900,00 mL de meio de dissolução, ambientados à temperatura de 37±0,5°C.

As condições do meio ácido e da temperatura pré-estabelecidas têm a finalidade de simular o ambiente no qual ocorre a dissolução do medicamento no organismo, para que se possa chegar o mais próximo possível da condição *in vivo*.

Cada comprimido foi colocado dentro da cesta e assim que entraram em contato com o meio de dissolução iniciou-se a contagem do tempo. Foram retiradas alíquotas em tempos de 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 e 30 minutos, com reposição, totalizando 120 amostras para leitura. As alíquotas foram acondicionadas em tubos de ensaio com tampa de rosca. Após filtração em membrana de celulose 0,45 µm, as alíquotas foram analisadas pela técnica de espectrofotometria na região do UV-Vis e por CLAE, para que fossem traçados os perfis de dissolução nas diferentes metodologias.

TABELA 5. PARÂMETROS UTILIZADOS EM ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO DA ASSOCIAÇÃO CAPTOPRIL / HIDROCOROTIAZIDA NA FORMA DE COMPRIMIDOS.

| CAPTOPRIL / HIDROCLOROTIAZIDA (COMPRIMIDOS) | |
|--|--|
| Meio | HCl 0,1 mol L ⁻¹ |
| Temperatura | 37 ± 0,5 °C |
| Velocidade | 50 rpm |
| Volume do meio | 900 mL |
| Aparato | 1 (cesta) |
| Quantificação | CLAE |
| Tempo de Ensaio | 20 minutos para o Captopril 30 minutos para a Hidroclorotiazida |
| Tolerância | Não menos de 80% (Q) da quantidade nominal de captopril dissolvido ao final de 20 minutos e não menos que 60% (Q) da quantidade nominal de hidroclorotiazida dissolvida em 30 minutos. |

Fonte: UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008

4.6.1. Desenvolvimento do modelo de calibração

Em função de as amostras resultantes do ensaio de dissolução encontrar-se em meio de ácido clorídrico (0,1 mol L⁻¹), houve a necessidade de se desenvolver um novo modelo de calibração nestas condições, porém sem utilizar os excipientes no planejamento. Adicionalmente, foi estendida a faixa de concentração modelada, de maneira a permitir a determinação de amostras diluídas (primeiros tempos de dissolução) e concentradas (maiores tempos de dissolução). Assim, o modelo foi desenvolvido entre 5,0 e 30,0 mg L⁻¹ de captopril e 1,0 e 15,0 mg L⁻¹ de hidroclorotiazida, totalizando 16 misturas (Figura 11). Destas, 13 foram utilizadas para a elaboração do modelo e 3 reservadas para a fase de validação externa (*ver detalhes na Figura 11*).

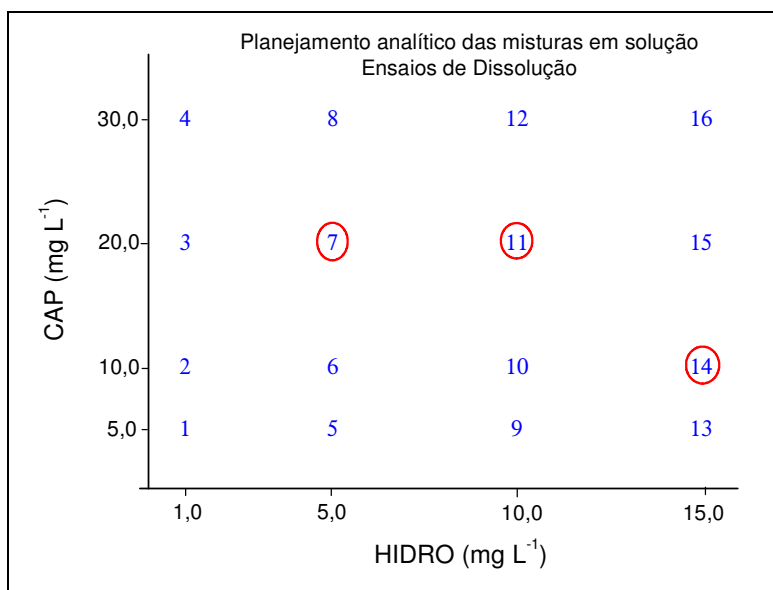


FIGURA 11. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO.

4.8. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

O modelo de calibração multivariado de melhor desempenho foi utilizado na determinação quantitativa das espécies de interesse em amostras do medicamento de referência LOPRIL-D[®] (BRISTOL-MEYERS SQUIBB), do medicamento genérico (MEDLEY) e do medicamento similar (HEXAL), que contém 50 mg de captopril e 25 mg de hidroclorotiazida por comprimido.

Na análise por espectroscopia UV-Vis em solução, 20 comprimidos foram pesados, para se obter a massa média, triturados e homogeneizados. Posteriormente, foi tomada uma alíquota equivalente a um comprimido, a qual foi dissolvida em 1000,0 mL de solução aquosa de etanol (10% v/v). Após filtração em papel de filtro, diluições convenientes foram realizadas com solução aquosa de etanol.

Na análise por espectroscopia UV-Vis de sólidos, os comprimidos foram triturados em almofariz e quantidades suficientes foram colocadas nos sistemas porta-amostra, para leitura direta do medicamento em fase sólida.

Na análise por CLAE, os comprimidos foram triturados em almofariz e, após pesagem de acordo com a massa média de 20 comprimidos, foram dissolvidos em fase móvel utilizando banho de ultra-som. Após diluições necessárias, as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm e acondicionadas em frascos *vial* para serem analisadas (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008).

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE UNIVARIADA CONVENCIONAL

5.1.1. Método de interpolação na curva analítica

Com a intenção de avaliar de maneira comparativa os resultados obtidos pelos modelos multivariados de calibração, estudos envolvendo calibração univariada convencional foram realizados preliminarmente.

A partir dos espectros das substâncias puras (Figuras 12-A e 13-A), é possível verificar que o CAP apresenta apenas uma banda de absorção centralizada em 199,5 nm, a qual é intensamente interferida pelo sinal da HIDRO. Para este segundo fármaco observam-se duas bandas de absorção, uma centralizada em 225,5 nm e outra em 271,0 nm, sendo que esta última apresenta-se livre da interferência espectral do captopril (ver Figura 5).

Em primeira análise, a quantificação convencional de HIDRO é possível, principalmente utilizando-se o sinal registrado em 271,0 nm, enquanto que para CAP há necessidade de métodos diferenciados.

Para o CAP foi construída uma curva analítica utilizando-se apenas um comprimento de onda de máxima absorção em 199,5 nm (Figura 12-A). A linearidade da curva analítica (Figura 12-B) é dada por um coeficiente de regressão de 0,99944.

Para HIDRO foram construídas duas curvas analíticas, utilizando-se os sinais de máxima intensidade em 225,5 e 271,0 nm (Figura 13-A). As curvas analíticas mostraram-se lineares, com coeficientes de regressão de 0,99766 e 0,99827, respectivamente (Figura 13-B).

Apesar do sinal da HIDRO em 225,5 nm ser o de maior intensidade, o sinal em 271,0 nm foi utilizado na etapa de previsão, pois está livre de qualquer interferência espectral causada pela presença de CAP na mistura. O resultado obtido na análise de 5 misturas sintéticas é apresentado na Tabela 6.

Como previsto, os erros na determinação de CAP foram bastante elevados, devido à forte interferência espectral observada. Para HIDRO, os erros foram baixos, pois a curva utilizada na previsão foi obtida com o sinal livre de interferências em 271,0 nm.

Os resultados obtidos demonstram a inviabilidade do sistema univariado convencional para quantificação do componente interferido, o que evidencia a necessidade de se utilizar procedimentos que permitam contornar referida interferência espectral.

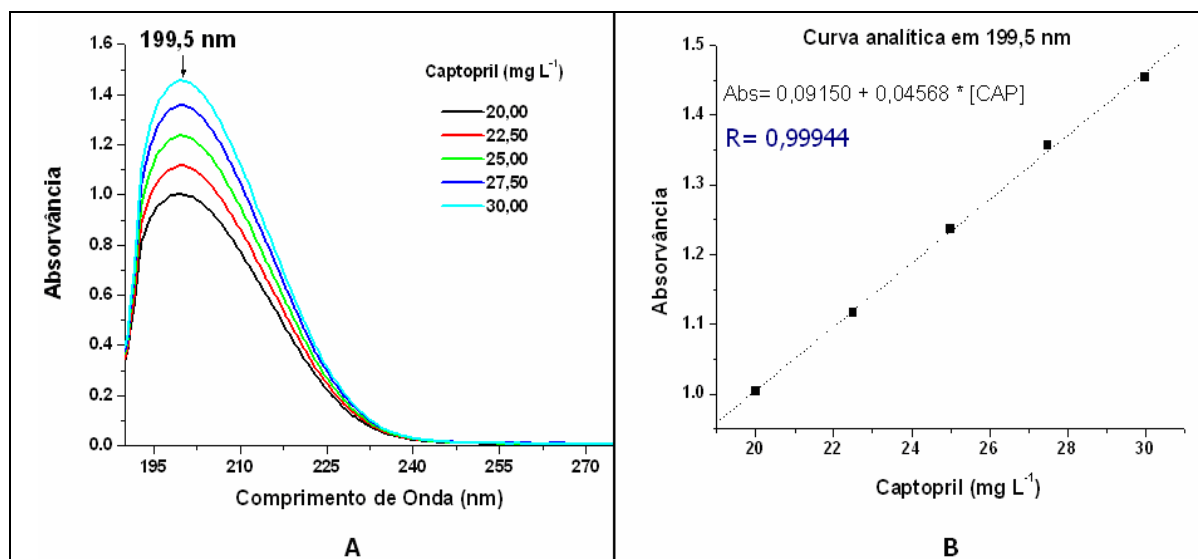


FIGURA 12. (A) ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis E (B) CURVA ANALÍTICA DO CAPTOPRIL EM $\lambda = 199,5$ nm.

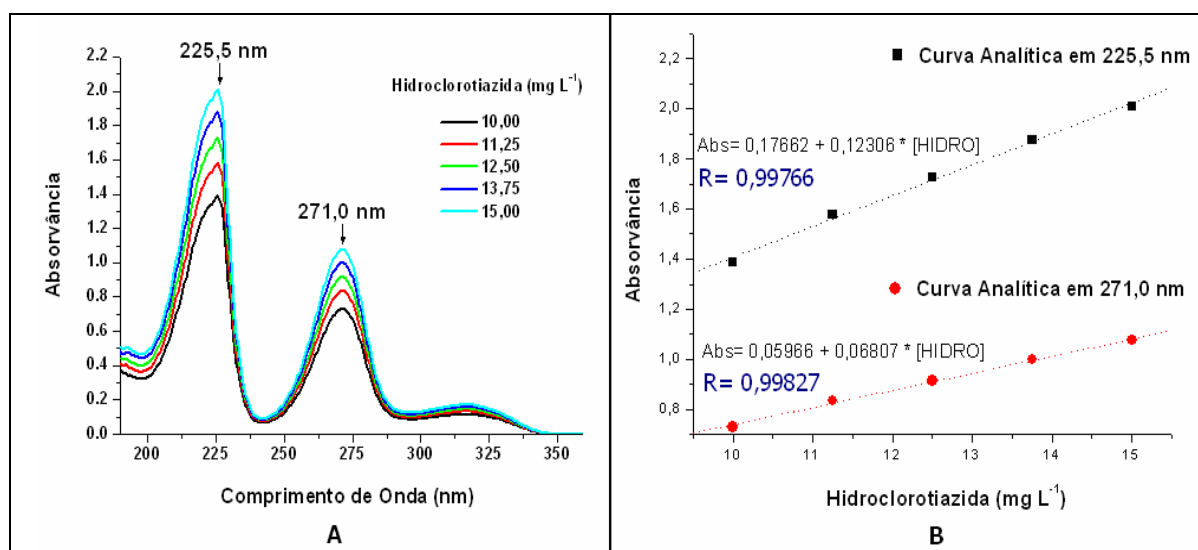


FIGURA 13. (A) ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis E (B) CURVA ANALÍTICA DA HIDROCLOROTIAZIDA EM $\lambda = 271,0$ nm.

TABELA 6. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) EM MISTURAS SINTÉTICAS UTILIZANDO-SE MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS CONVENCIONAIS.

| Misturas | Concentração declarada | | Concentração encontrada | | Erro (%) | |
|-----------------------|------------------------|-------|-------------------------|-------|-------------|------------|
| | (mg L ⁻¹) | | (mg L ⁻¹) | | | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| 4 | 27,50 | 10,00 | 34,03 | 9,62 | 23,7 | - 3,8 |
| 7 | 22,50 | 11,25 | 30,00 | 11,16 | 33,3 | - 0,8 |
| 10 | 30,00 | 11,25 | 37,79 | 11,03 | 26,0 | - 1,9 |
| 17 | 22,50 | 13,75 | 31,25 | 13,64 | 38,9 | - 0,8 |
| 19 | 27,50 | 13,75 | 36,83 | 13,91 | 33,9 | 1,2 |
| Erro Médio (%) | | | | | 31,2 | 1,7 |

5.1.2. Método da espectrofotometria derivativa

Com o objetivo de melhorar os resultados obtidos pela análise univariada convencional, os espectros foram processados em primeira derivada. Observando os espectros derivados (Figuras 14-A e 15-A) podemos verificar que o desdobramento de sinais fornece regiões de menor interferência, que podem ser utilizadas com maior segurança.

Nestas condições, observamos que o espectro do CAP (Figura 14-A) apresenta um ponto de inflexão em 201,5 nm, ponto em que a derivada do sinal de absorvância é zero, para qualquer valor de concentração. Em função desta característica, uma curva analítica livre de interferência pode ser elaborada para HIDRO, desde que esta apresente valores de absorvância neste comprimento de onda, no espectro derivado.

De maneira análoga, a HIDRO apresenta três pontos de inflexão de derivada zero em 225,5, 242,0 e 271,0 nm (Figura 15-A), porém apenas no comprimento de onda de 225,5 nm o CAP apresenta valores de absorvância para a construção da curva analítica.

De acordo com as considerações acima, a curva analítica do CAP foi elaborada em 225,5 nm (Figura 15-B), obtendo-se um coeficiente de regressão de 0,99903, e para a HIDRO a curva foi construída em 201,5 nm (Figura 14-B), apresentando um coeficiente de regressão de 0,99634.

Utilizando-se 5 misturas sintéticas para avaliar a capacidade deste sistema de calibração, obtêm-se os resultados apresentados na Tabela 7. Neste caso, o erro médio associado à determinação de CAP foi levemente reduzido, mas ainda assim, é bastante

elevado. Para HIDRO os erros que antes eram baixos, agora são muito elevados, principalmente em razão da interferência do CAP e da significativa diminuição de sensibilidade observada no modo derivativo.

Apesar de o método derivativo apresentar um ganho significativo em resolução, apresenta problemas quanto à sensibilidade, pois qualquer variação, por menor que seja, é detectada pelo equipamento, o que pode gerar sinais ou ruídos indesejados no espectro.

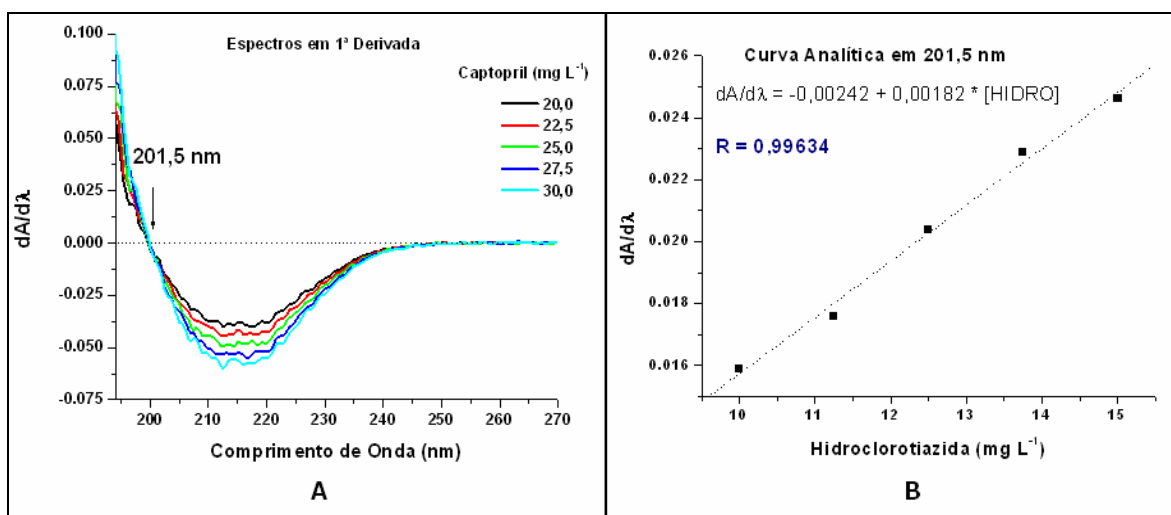


FIGURA 14. (A) ESPECTROS DA PRIMEIRA DERIVADA DO CAPTOPRIL E (B) CURVA ANALÍTICA DA HIDROCLOROTIAZIDA EM $\lambda = 201,5$ nm.

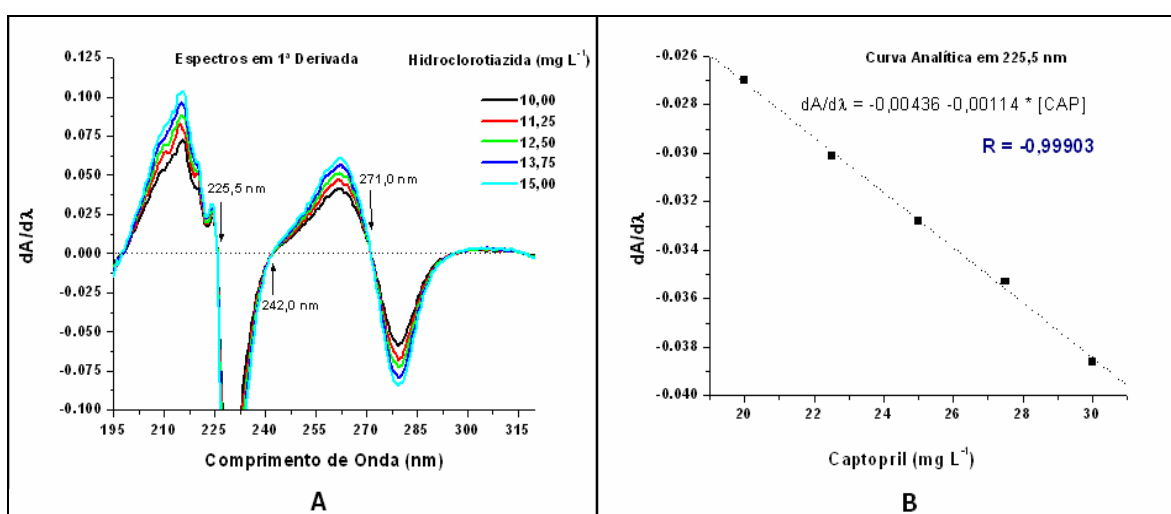


FIGURA 15. (A) ESPECTROS DA PRIMEIRA DERIVADA DA HIDROCLOROTIAZIDA E (B) CURVA ANALÍTICA DO CAPTOPRIL EM $\lambda = 225,5$ nm.

TABELA 7. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) EM MISTURAS SINTÉTICAS UTILIZANDO-SE MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS EM PRIMEIRA DERIVADA.

| Misturas | Concentração | | Concentração | | Erro (%) | |
|-----------------------|---------------------------------|-------|----------------------------------|-------|-------------|-------------|
| | declarada (mg L ⁻¹) | | encontrada (mg L ⁻¹) | | CAP | HIDRO |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | | |
| 4 | 27,50 | 10,00 | 21,35 | 2,43 | - 22,4 | - 75,7 |
| 7 | 22,50 | 11,25 | 14,95 | 4,46 | - 33,5 | - 60,3 |
| 10 | 30,00 | 11,25 | 24,24 | 4,52 | - 19,2 | - 59,8 |
| 17 | 22,50 | 13,75 | 12,05 | 8,20 | - 46,4 | - 40,4 |
| 19 | 27,50 | 13,75 | 21,26 | 7,48 | - 22,7 | - 45,6 |
| Erro Médio (%) | | | | | 28,8 | 56,4 |

5.1.3. Método da aditividade das absorvâncias

Para complementar as análises convencionais e contornar os já comentados problemas de interferência espectral, foram desenvolvidos sistemas de equações, fundamentados no princípio da aditividade das absorvâncias, de acordo com a seqüência de expressões apresentadas a seguir:

$$A(271,0 \text{ nm}) = A(\text{CAP}_{271,0 \text{ nm}}) + A(\text{HIDRO}_{271,0 \text{ nm}})$$

$$A(199,5 \text{ nm}) = A(\text{CAP}_{199,5 \text{ nm}}) + A(\text{HIDRO}_{199,5 \text{ nm}})$$

OU

$$A(271,0 \text{ nm}) = (a_{\text{CAP } 271,0 \text{ nm}} \times b \times c_{\text{CAP}}) + (a_{\text{HIDRO } 271,0 \text{ nm}} \times b \times c_{\text{HIDRO}})$$

$$A(199,5 \text{ nm}) = (a_{\text{CAP } 199,5 \text{ nm}} \times b \times c_{\text{CAP}}) + (a_{\text{HIDRO } 199,5 \text{ nm}} \times b \times c_{\text{HIDRO}})$$

Onde,

A: absorvância, **a:** absortividade (L mg⁻¹ cm⁻¹), **b:** caminho ótico (1 cm) e **c:** concentração (mg L⁻¹).

A absortividade é obtida através da regressão linear da curva analítica, ou seja, é igual ao coeficiente angular da curva (B). Registrando-se os valores de absorvância para as misturas, em ambos comprimentos de onda, e conhecendo-se os valores de absortividade, é possível calcular as concentrações, resolvendo-se um sistema de duas

equações com duas incógnitas.

Os resultados, apresentados na Tabela 8, demonstram uma boa capacidade do sistema para correção da interferência espectral, o que permite a obtenção de erros de previsão da ordem de 6,0 %, para ambos os fármacos em estudo.

TABELA 8. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL (CAP) E HIDROCLOROTIAZIDA (HIDRO) EM MISTURAS SINTÉTICAS UTILIZANDO-SE MÉTODO DA ADITIVIDADE DE ABSORVÂNCIAS.

| Misturas | Concentração declarada (mg L ⁻¹) | | Concentração encontrada (mg L ⁻¹) | | Erro (%) | |
|-----------------------|---|--------------|--|--------------|------------|--------------|
| | <i>CAP</i> | <i>HIDRO</i> | <i>CAP</i> | <i>HIDRO</i> | <i>CAP</i> | <i>HIDRO</i> |
| 4 | 27,50 | 10,00 | 29,11 | 10,46 | 5,8 | 4,6 |
| 7 | 22,50 | 11,25 | 24,05 | 12,00 | 6,9 | 6,7 |
| 10 | 30,00 | 11,25 | 31,94 | 11,87 | 6,5 | 5,5 |
| 17 | 22,50 | 13,75 | 23,69 | 14,49 | 5,3 | 5,4 |
| 19 | 27,50 | 13,75 | 29,09 | 14,74 | 5,8 | 7,2 |
| Erro Médio (%) | | | | | 6,1 | 5,9 |

5.1.4. Comentários sobre os métodos univariados convencionais

De maneira geral, os resultados apresentados indicam que os sistemas univariados de calibração, fundamentados em curvas analíticas convencionais e no uso de sistemas derivativos, se apresentam inadequados para a determinação de associações contendo captopril e hidroclorotiazida. Esta dificuldade, produzida pela já comentada interferência espectral, inviabiliza a determinação dos fármacos em estudo nas amostras de medicamentos, tal como evidenciado pelos resultados apresentados na Tabela 9.

Como esperado, em função dos bons resultados observados na determinação de ambos os fármacos em misturas sintéticas, o sistema fundamentado no princípio da aditividade permitiu contornar os problemas de interferência, o que permitiu a análise das amostras de medicamentos com erros aceitáveis, em relação ao valor declarado em bula.

Os resultados antes comentados evidenciam o principal inconveniente associado ao uso de espectroscopia eletrônica, inconveniente este que normalmente limita consideravelmente a sua aplicabilidade. Deste ponto de vista, o uso de alternativas multivariadas se justifica plenamente.

TABELA 9. ERROS RELATIVOS OBTIDOS NA ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA UV-Vis UNIVARIADA DOS MEDICAMENTOS.

| AMOSTRAS MEDICAMENTOS | INTERPOLAÇÃO | | DERIVATIVO | | ADITIVIDADE | |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Referência (1) | 23,6 | - 11,5 | - 29,7 | - 65,2 | 0,6 | - 6,3 |
| Referência (2) | 23,4 | - 12,7 | - 40,6 | - 66,5 | 0,3 | - 5,9 |
| Referência (3) | 22,4 | - 11,9 | - 34,2 | - 68,7 | - 1,0 | - 5,2 |
| Erro médio | 23,1 ± 0,6 | 12,0 ± 0,6 | 34,8 ± 5,5 | 66,8 ± 1,8 | 0,6 ± 0,4 | 5,8 ± 0,6 |
| Genérico (1) | 19,7 | - 12,3 | - 18,8 | - 54,6 | - 4,6 | - 5,5 |
| Genérico (2) | 20,8 | - 12,4 | - 17,4 | - 55,9 | 4,9 | - 5,6 |
| Genérico (3) | 20,0 | - 12,2 | - 15,3 | - 52,9 | - 3,8 | - 5,4 |
| Erro médio | 20,2 ± 0,6 | 12,3 ± 0,1 | 17,2 ± 1,8 | 54,5 ± 1,5 | 4,4 ± 0,6 | 5,5 ± 0,1 |
| Similar (1) | 16,3 | - 14,0 | -47,9 | - 70,0 | - 7,9 | - 7,3 |
| Similar (2) | 16,7 | - 13,2 | - 42,7 | - 68,2 | - 6,3 | - 6,4 |
| Similar (3) | 17,8 | - 12,8 | - 45,8 | - 72,6 | - 5,3 | - 6,1 |
| Erro médio | 16,9 ± 0,8 | 13,3 ± 0,6 | 45,5 ± 2,6 | 70,3 ± 2,2 | 6,5 ± 1,3 | 6,6 ± 0,6 |

5.2. ANÁLISE MULTIVARIADA

5.2.1. Espectroscopia UV-Vis em solução

O modelo multivariado de calibração foi estabelecido a partir de 20 misturas sintéticas, selecionadas a partir das 25 misturas apresentadas na Figura 8. As 5 misturas restantes (4, 7, 10, 17 e 19) foram reservadas para a fase de validação externa, que visa avaliar a capacidade preditiva dos modelos.

Os espectros foram registrados entre 190 e 600 nm, com intervalos de 0,5 nm. Entretanto, somente a faixa compreendida entre 190 e 350 nm foi utilizada no desenvolvimento dos modelos de calibração, em razão de apresentar toda a informação espectral relevante. A semelhança entre os espectros das misturas sintéticas e das amostras dos medicamentos pode ser observada por comparação das Figuras 16-A e 16-B. Este fato sugere, pelo menos de maneira preliminar, que os excipientes contidos na formulação do medicamento não deverão interferir significativamente na análise.

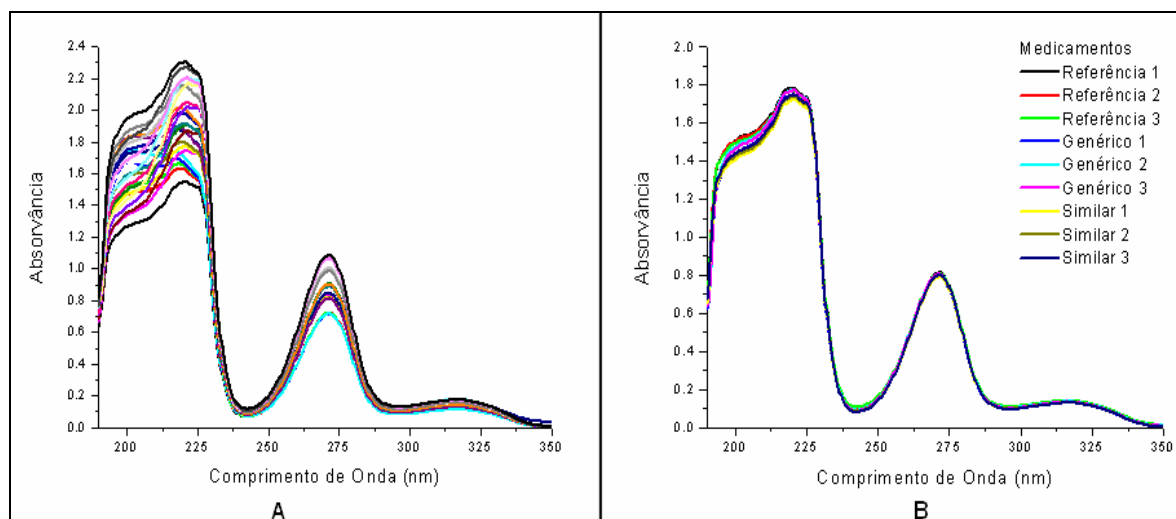


FIGURA 16. ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis EM SOLUÇÃO (A) DAS MISTURAS SINTÉTICAS DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA E (B) DOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR.

Para definir o melhor número de variáveis latentes (VLs), utilizou-se o método de validação interna cruzada, particularmente a rotina denominada "*leave one out*". Neste procedimento, um espectro é retirado do conjunto de calibração, sendo utilizado como elemento de previsão. Esta operação é repetida tantas vezes quanto necessário, de maneira a garantir que todos os elementos do conjunto participem como elemento de previsão. Os erros que surgem deste processo são apresentados como a raiz quadrada do somatório dos erros de previsão ao quadrado (RMSECV) em função do número de variáveis latentes (Figura 17-A).

Os antecedentes apresentados nesta figura nos permite observar que o erro de previsão é minimizado pela introdução de duas VLs, para ambas espécies em estudo. Para captopril, a introdução de um maior número de VLs leva a um significativo aumento no erro de previsão, enquanto que para hidroclorotiazida os erros se mantêm praticamente constantes.

Adicionalmente, observa-se que duas VLs representam 99,75% da variância apresentada pelos dados espectrais, o que, por sua vez, permite representar 98,79% da variância dos dados de concentração (Figura 17-B). A inclusão de um maior número de VLs contribui muito pouco com a variância total explicada, ao mesmo tempo em que pode provocar a criação de modelos superjustados. A este respeito, é importante salientar que modelos superajustados tendem a apresentar uma menor capacidade de previsão, em função de estarem fundamentados em pequenas variações espectrais, as quais podem ser devidas a flutuações do tipo instrumental.

Em função destes argumentos, modelos foram desenvolvidos com 2 VLs. Entretanto, para fins comparativos, modelos envolvendo um maior número de VLs foram também elaborados.

A partir dos valores apresentados na Figura 17-B é possível verificar uma das principais características da calibração multivariada. Isto é, embora cada amostra seja representada por um espectro de aproximadamente 320 valores de absorvância, em 320 valores de comprimento de onda, um conjunto de poucas VLs permite representar a maior parte da variância das amostras, utilizando praticamente toda a informação espectral disponível. Observa-se, por exemplo, que um conjunto de 5 VLs permite explicar 99,40 % da variância dos dados de concentração, recorrendo-se a aproximadamente 99,98 % da informação espectral. Esta significativa redução da dimensionalidade dos dados é que favorece o desenvolvimento de modelos de calibração, utilizando-se praticamente toda a informação espectral disponível.

Analisando-se os vetores de regressão apresentados na Figura 18-A, é possível observar uma grande semelhança entre o perfil deste parâmetro e os espectros individuais apresentados na Figura 18-B. Trata-se de uma observação de extrema relevância, uma vez que certifica o desenvolvimento de modelos realmente fundamentados em regiões espectrais que caracterizam cada um dos fármacos em estudo.

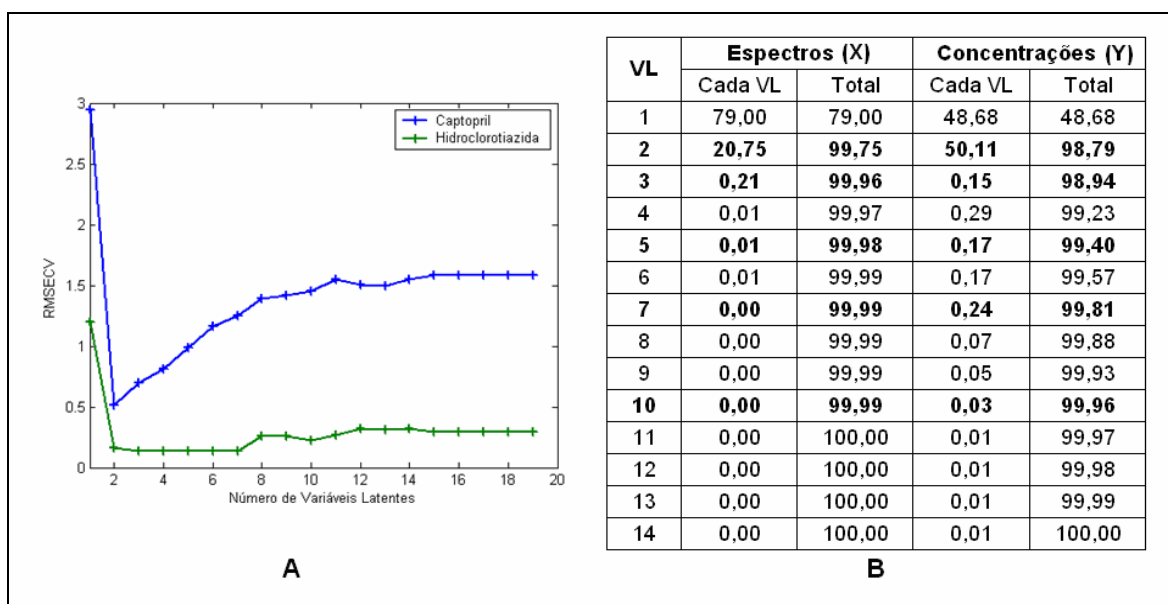


FIGURA 17. (A) GRÁFICO DO RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES E (B) PERCENTUAL DA VARIÂNCIA CAPTURADA PELO MODELO PLS.

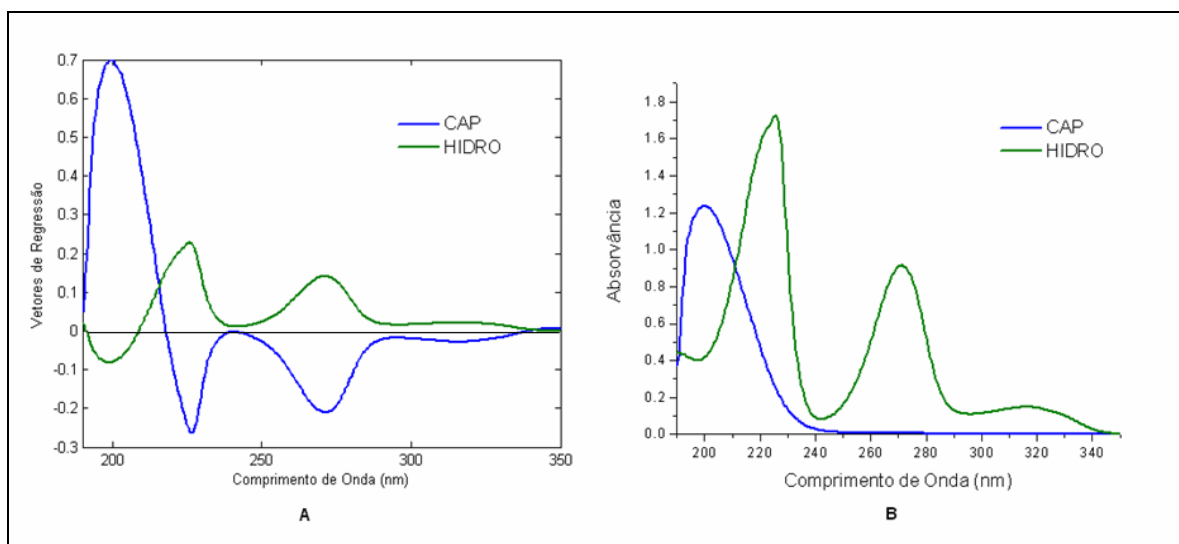


FIGURA 18. (A) VETORES DE REGRESSÃO E (B) ESPECTROS DOS FÁRMACOS PUROS (CAP 25,0 mg L⁻¹ e HIDRO 12,5 mg L⁻¹).

A Figura 19 apresenta um dos critérios de maior importância para a verificação de anomalias no conjunto de calibração, os resíduos de “Student” e o “Leverage”. Os resíduos de “Student” indicam se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95 %, enquanto que o “Leverage” corresponde a um parâmetro que representa a influência de um espectro em particular no modelo, podendo ser entendida como a distância entre cada espectro e o centróide do conjunto de espectros. Consideram-se os valores limites para resíduos de Student e Leverage corresponde a $\pm 2,5$ e 3 VL/N , respectivamente, sendo que neste último caso, **VL** representa o número de variáveis latentes utilizadas na construção do modelo e **N** é o número de amostras do conjunto de calibração.

De acordo com a Figura 19, duas amostras extrapolam os valores máximos permitidos para os resíduos de Student (amostra 2 para captopril e amostra 7 para hidroclorotiazida), o que, em princípio, pode ser associado a erros no valor de concentração, portanto, no preparo das amostras. Amostras que apresentam elevados valores de resíduos podem ser eliminadas do conjunto de calibração. Entretanto, admite-se que modelos desenvolvidos por rotinas PLS se mostram bastante robustos, o que implica em modificações pouco significativas quando amostras são retiradas ou adicionadas no conjunto de calibração. Em função deste argumento e em razão do baixo valor de Leverage, referidas amostras foram mantidas no conjunto de calibração.

A Figura 20 apresenta o gráfico que correlaciona valores previstos pelo modelo com valores reais (ver Figura 8), para cada uma das misturas utilizadas como conjunto de

calibração. Os coeficientes de regressão confirmam uma ótima correlação entre valores reais e previstos, o que, de maneira preliminar, atesta o bom ajuste do modelo desenvolvido. Tal como verificado no estudo de anomalias, as amostras 2 e 7 apresentam um desvio atípico, em relação ao teor verdadeiro de captopril e hidroclorotiazida, respectivamente.

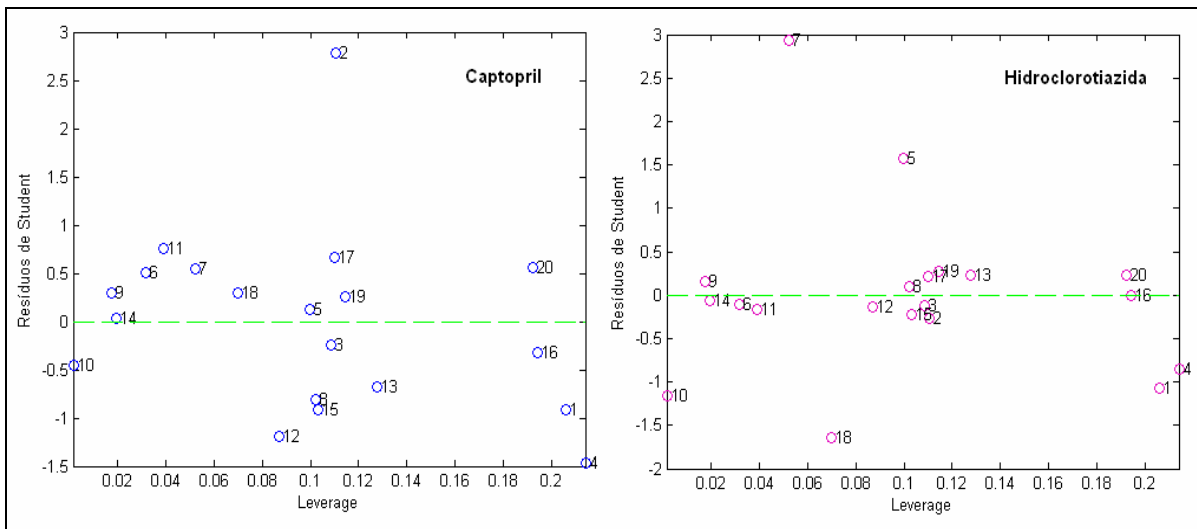


FIGURA 19. RESÍDUOS DE “STUDENT” X “LEVERAGE” PARA O MODELO DESENVOLVIDO COM 2 VARIÁVEIS LATENTES.

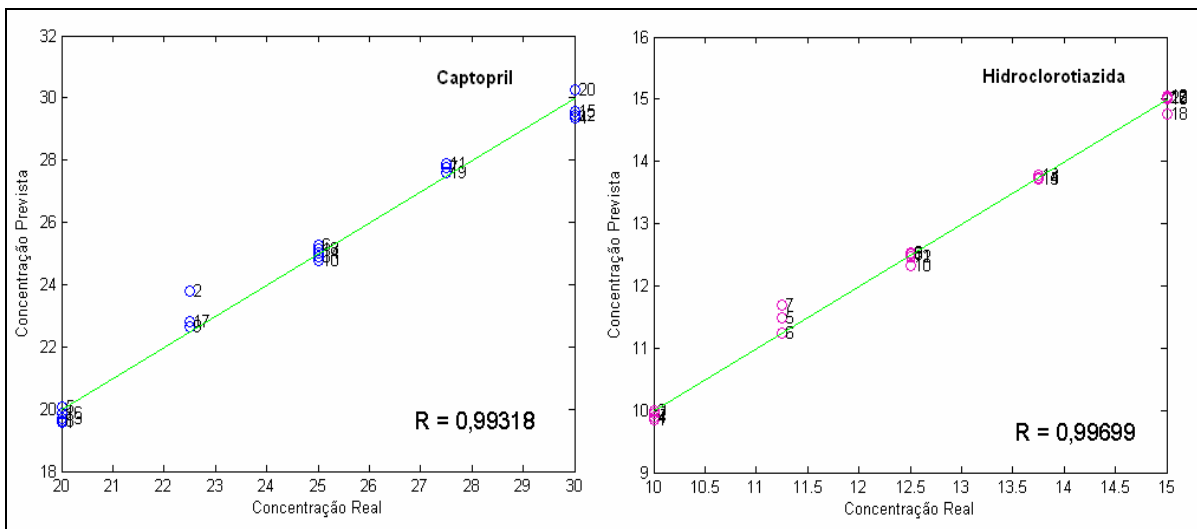


FIGURA 20. VALORES PREVISTOS VERSUS VALORES REAIS PELO MODELO DESENVOLVIDO COM 2 VARIÁVEIS LATENTES.

Para uma avaliação mais apurada, entretanto, há necessidade de uma etapa de validação externa, na qual a capacidade de previsão do modelo é avaliada frente a misturas sintéticas que não foram utilizadas na etapa de calibração. Quando esta prova é realizada, percebe-se que a capacidade de previsão do modelo é excelente (Tabela 10), permitindo erros relativos médios inferiores a 1,0 %, para ambos componentes em estudo.

TABELA 10. ERROS RELATIVOS MÉDIOS (%) EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VLs E DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO NA QUANTIFICAÇÃO DAS 5 AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO EXTERNA.

| PRÉ-PROCESSAMENTO | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------|------------|--------------|------------|-------------------------|-------|------------|------------|-------------|-------|
| VL | Centrado na média | | Autoescalado | | Alisado com 1ª derivada | | Alisado | | 1ª derivada | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| 2 | 0,7 | 0,8 | 0,6 | 1,2 | 1,7 | 0,8 | 0,7 | 0,8 | 1,0 | 0,9 |
| 3 | 0,8 | 0,9 | 0,7 | 0,7 | 1,0 | 0,9 | 0,9 | 0,8 | 1,5 | 1,1 |
| 5 | 1,1 | 0,9 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | 1,0 | 0,8 | 1,2 | 1,1 |
| 7 | 1,6 | 0,9 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 0,9 | 1,4 | 0,9 | 1,1 | 1,0 |
| 10 | 1,2 | 1,2 | 1,6 | 1,1 | 1,9 | 1,1 | 1,5 | 0,9 | 1,1 | 1,5 |

Visando a seleção de melhores modelos de calibração, estudos foram realizados com diversos tipos de pré-processamento de sinais e diferentes números de VLs (2, 3, 5, 7 e 10 VLs). Os resultados (Tabela 10) sugerem que os modelos de melhor capacidade de previsão correspondem àqueles obtidos com espectros centrados na média e 2 VLs, dados autoescalados e 3 VLs e espectros alisados e 2 VLs.

Utilizando-se estes modelos na determinação dos fármacos em amostras de medicamentos, encontraram-se os resultados apresentados na Tabela 11. Estes resultados se apresentam coerentes com as concentrações indicadas na bula dos medicamentos, com discrepâncias máximas bastante próximas ao limite aceito na quantificação da associação, de acordo com a Farmacopéia Americana ($\pm 10\%$).

TABELA 11. ERROS RELATIVOS MÉDIOS OBTIDOS NA ANÁLISE DOS MEDICAMENTOS EM TRIPLICATA UTILIZANDO-SE DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-PROCESSAMENTOS.

| Erro relativo em relação ao teor nominal (%); n= 3 | | | | | | |
|--|--------------------------|------------|---------------------|------------|----------------|------------|
| Medicamento | Centrado na média (2 VL) | | Autoescalado (3 VL) | | Alisado (2 VL) | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Referência | 6,8 ± 0,9 | 9,3 ± 0,3 | 9,7 ± 1,0 | 9,0 ± 0,4 | 6,7 ± 0,9 | 8,9 ± 0,3 |
| Genérico | 9,2 ± 1,3 | 10,0 ± 0,8 | 11,2 ± 1,0 | 10,2 ± 0,7 | 9,0 ± 1,2 | 9,5 ± 0,8 |
| Similar | 11,1 ± 1,1 | 10,9 ± 0,6 | 10,6 ± 1,2 | 10,9 ± 0,7 | 10,7 ± 1,1 | 10,3 ± 0,6 |

Em função de a concentração verdadeira poder variar mais ou menos 10% em relação ao valor declarado na bula dos medicamentos, uma avaliação mais adequada da exatidão da metodologia multivariada proposta deve ser feita em relação aos resultados obtidos pela técnica cromatográfica padrão. Para isso, foram desenvolvidas curvas analíticas para análise por CLAE com 5 misturas, contendo entre 0,020 e 0,200 mg mL⁻¹ de captopril e 0,010 e 0,100 mg mL⁻¹ de hidroclorotiazida, conforme planejamento apresentado na Figura 10.

Os cromatogramas do captopril e da hidroclorotiazida, assim como as respectivas curvas analíticas, são apresentados nas Figuras 21 e 22, as quais evidenciam uma excelente linearidade da metodologia adotada.

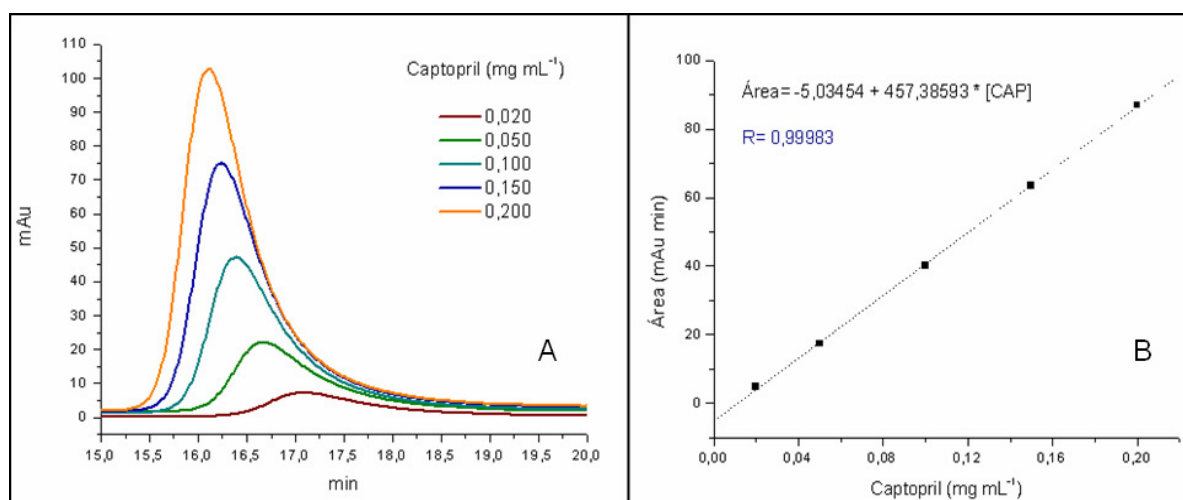


FIGURA 21. CROMATOGRAMAS (A) E CURVA ANALÍTICA (B) PARA DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE CAPTOPRIL EM MEDICAMENTOS.

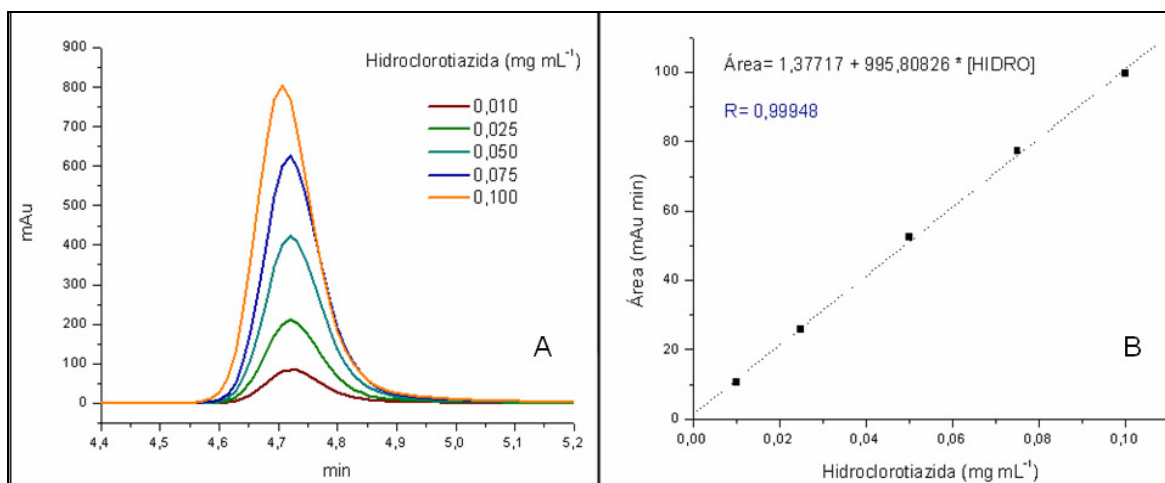


FIGURA 22. CROMATOGRAMAS (A) E CURVA ANALÍTICA (B) PARA DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE HIDROCLOROTIAZIDA EM MEDICAMENTOS.

A análise cromatográfica dos medicamentos proporcionou os resultados apresentados na Tabela 12. Se considerarmos que o resultado obtido pela utilização da técnica cromatográfica padrão corresponde ao valor verdadeiro, podemos observar, em primeira instância, a existência de inconsistências entre os valores reais e declarados na bula dos medicamentos, principalmente para as amostras de medicamento de referência. Esta diferença se encontra no limite dos valores de referência preconizados pela ANVISA (até 10%).

Comparando-se os resultados proporcionados pela técnica cromatográfica padrão e pelo método espectroscópico multivariado proposto, é possível observar uma boa aproximação na análise dos medicamentos de referência e genérico. Em ambos os casos os erros de previsão apresentados pelo método multivariado são da ordem de 6% para captopril e entre 2 e 9% para hidroclorotiazida. Para o medicamento similar observam-se resultados discrepantes, com erros da ordem de 15%.

TABELA 12. RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS UTILIZANDO-SE TÉCNICA CROMATOGRÁFICA PADRÃO E MODELO MULTIVARIADO DE MELHOR DESEMPENHO (n=3).

| Medicamento | Concentração Nominal (mg L ⁻¹) | | Concentração prevista por espectroscopia multivariada (mg L ⁻¹) | | Concentração prevista por CLAE (mg L ⁻¹) | | Erro (%) * | |
|-------------------|--|-------|---|------------|--|------------|--------------|--------------|
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Referência | 50,00 | 25,00 | 47,6 ± 0,4 | 22,8 ± 0,1 | 44,8 ± 1,4 | 23,3 ± 0,5 | 6,3 | -2,1 |
| Genérico | 50,00 | 25,00 | 45,5 ± 0,6 | 22,6 ± 0,2 | 48,7 ± 1,8 | 24,9 ± 0,3 | -6,6 | -9,2 |
| Similar | 50,00 | 25,00 | 44,7 ± 0,5 | 22,4 ± 0,1 | 51,8 ± 1,6 | 26,6 ± 0,6 | -13,7 | -15,8 |

* Erro relativo em relação ao valor determinado por técnica cromatográfica padrão.

5.2.2. Espectroscopia UV-Vis em Fase Sólida

O modelo multivariado de calibração em fase sólida foi estabelecido a partir de 20 misturas sintéticas, selecionadas a partir das 25 misturas apresentadas na Figura 9. As misturas restantes (3, 9, 11, 19 e 22) foram reservadas para a fase de validação externa, que visa avaliar a capacidade preditiva dos modelos.

Os espectros foram registrados entre 190 e 800 nm, com intervalos de 0,21 nm, porém somente a faixa compreendida entre 200 e 360 nm foi utilizada no desenvolvimento dos modelos de calibração, em razão desta região conter toda a informação relevante.

Os modelos foram desenvolvidos por uma rotina de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), utilizando-se correção do sinal multiplicativo (MSC) como método de pré-processamento. Trata-se de um sistema especialmente recomendado para correção de sinais adquiridos por refletância. Para comparação, outros tipos de pré-processamento foram também utilizados.

Os espectros das misturas sintéticas utilizadas no desenvolvimento do modelo guardam alguma semelhança com os espectros do medicamento de referência (Lopril-D®). Porém, em aproximadamente 275 nm o espectro do medicamento apresenta uma banda que não está evidenciada nos espectros das misturas (Figuras 23-A e 23-B). Tal discrepância poderá ocasionar dificuldades no estabelecimento de modelos orientados à análise do medicamento.

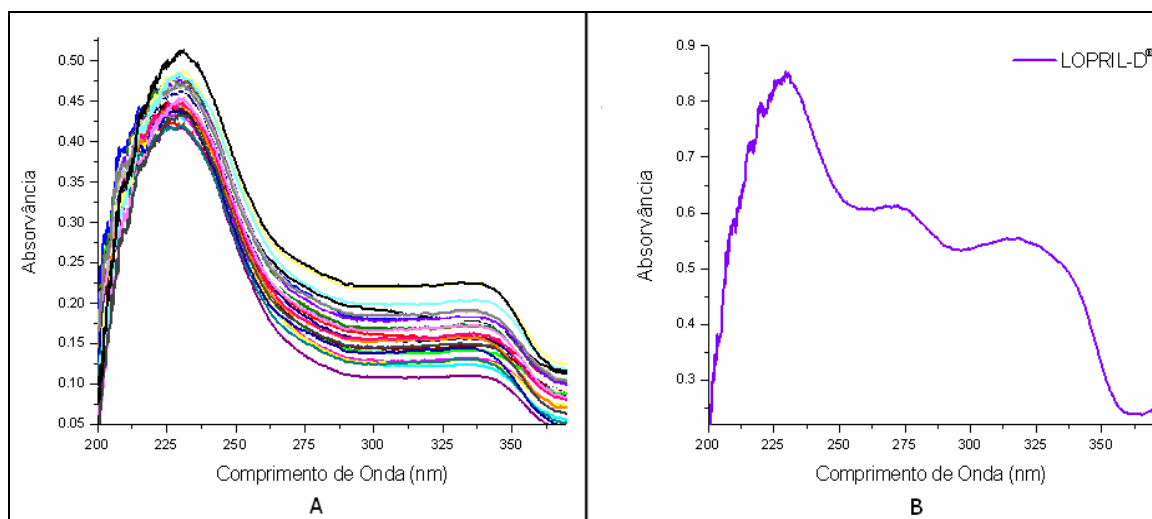


FIGURA 23. ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis EM FASE SÓLIDA, (A) DAS MISTURAS DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA E (B) DO MEDICAMENTO LOPRIL-D[®].

No gráfico que apresenta a evolução do RMSECV (Figura 24-A) é possível observar que a introdução de mais do que 2 VLs provoca um aumento nos erros de previsão para captopril, o que sugere o melhor desempenho de modelos fundamentados em um menor número de VLs. Para hidroclorotiazida o comportamento é diferente, observando-se um erro de previsão mínimo com 5 VLs. Adicionalmente, os valores apresentados na Figura 24-B demonstram que grande parte da variância dos dados de concentração pode ser representada por um número reduzido de VLs, o que, novamente, justificaria o uso de um menor número de VLs.

Buscando as melhores condições de análise, modelos foram elaborados utilizando-se 2, 3, 5, 7 e 9 VLs. Para se evitar a obtenção de modelos super-ajustados, o modelo desenvolvido com 3 VLs foi selecionado para a etapa de validação, sendo que as suas principais características são comentadas a seguir.

Analisando-se os vetores de regressão de cada espécie (Figura 25-A) é possível observar que não há muita semelhança entre o perfil deste parâmetro e os espectros individuais apresentados na Figura 25-B. O importante, entretanto, é constatar que as variáveis consideradas correspondem a sinais localizados entre 260 e 300 nm, correspondente a hidroclorotiazida, e outra centrada em 230 nm, correspondente a captopril.

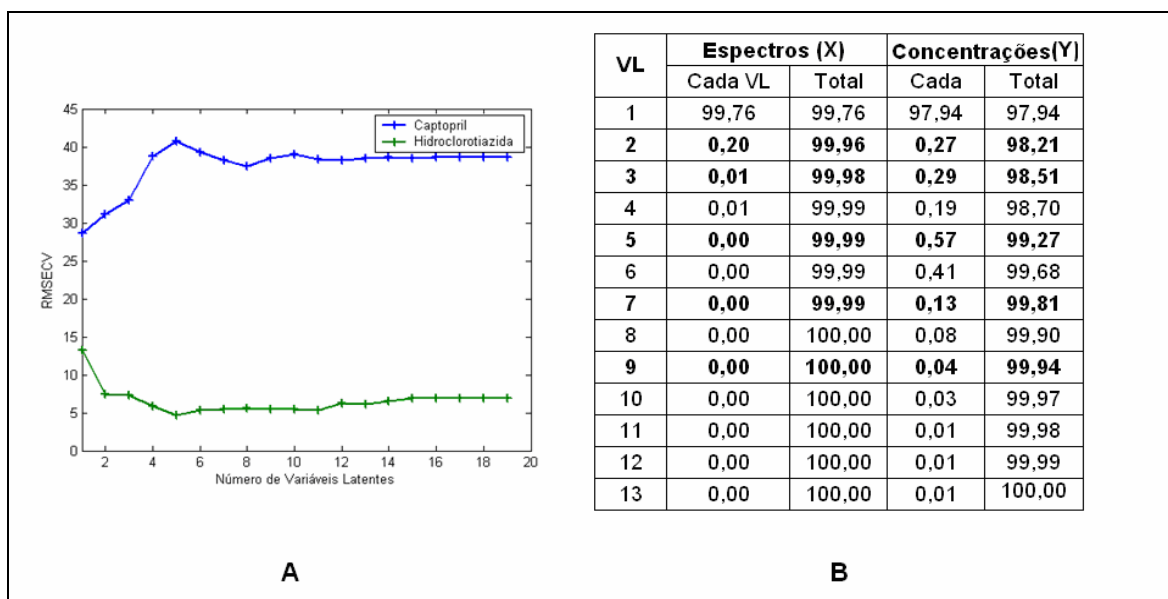


FIGURA 24. GRÁFICO DO RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (A) E PERCENTUAL DA VARIÂNCIA CAPTURADA PELO MODELO PLS (B).

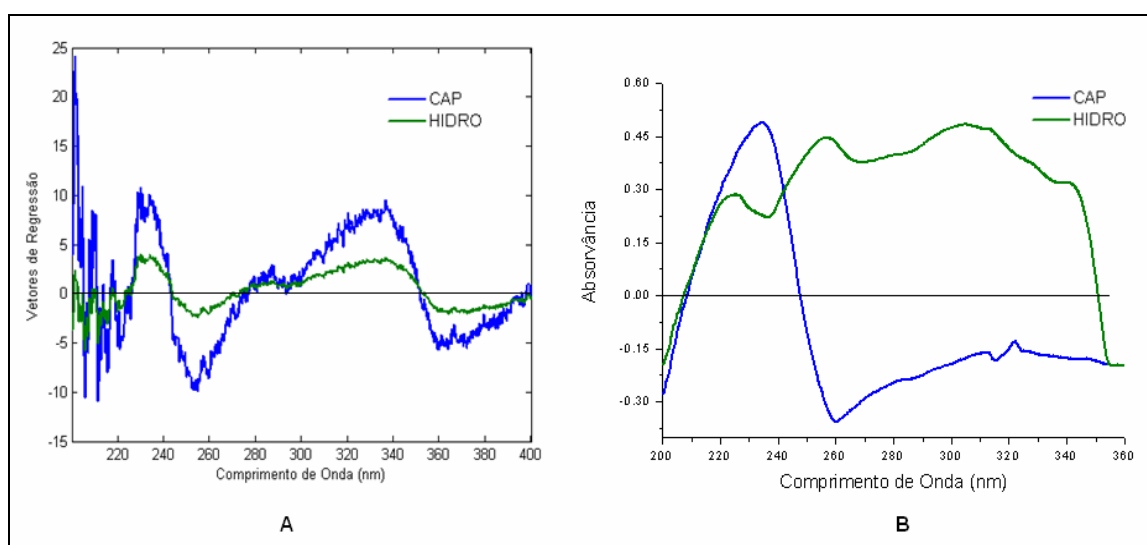


FIGURA 25. (A) VETORES DE REGRESSÃO E (B) ESPECTROS DOS FÁRMACOS PUROS (CAP 184,84 mg g⁻¹ e HIDRO 92,42 mg g⁻¹).

A Figura 26 apresenta os resíduos de “Student” e “Leverage”, os quais, conforme descrito anteriormente, apresentam valores limites de $\pm 2,5$ e $0,45$, respectivamente. Em função deste resultado, foi considerada a inexistência de anomalias no conjunto de calibração.

Na Figura 27 se apresenta o gráfico que correlaciona valores previstos pelo modelo com valores reais, para cada espécie estudada nos padrões de calibração. Observa-se que os coeficientes de regressão são absolutamente inadequados, o que implica uma também inadequada modelagem. Referida inconsistência pode estar associada a problemas de reprodutibilidade na etapa de aquisição dos espectros, a qual, realizada com o auxílio de uma sonda de fibra ótica, é extremamente influenciada pela distância existente entre o sensor e a superfície das amostras. Embora esforços tenham sido realizados para garantir a repetibilidade desta operação, a falta de um porta-amostras adequado impediu a fixação da distância.

Na etapa de validação externa encontraram-se os resultados apresentados na Tabela 13. A partir destes valores é possível observar uma melhor capacidade de previsão dos modelos desenvolvidos com pré-processamento MSC, utilizando-se 3, 5 e 7 VLs. Em todos estes casos, erros relativos médios inferiores a 9,0 % foram observados.

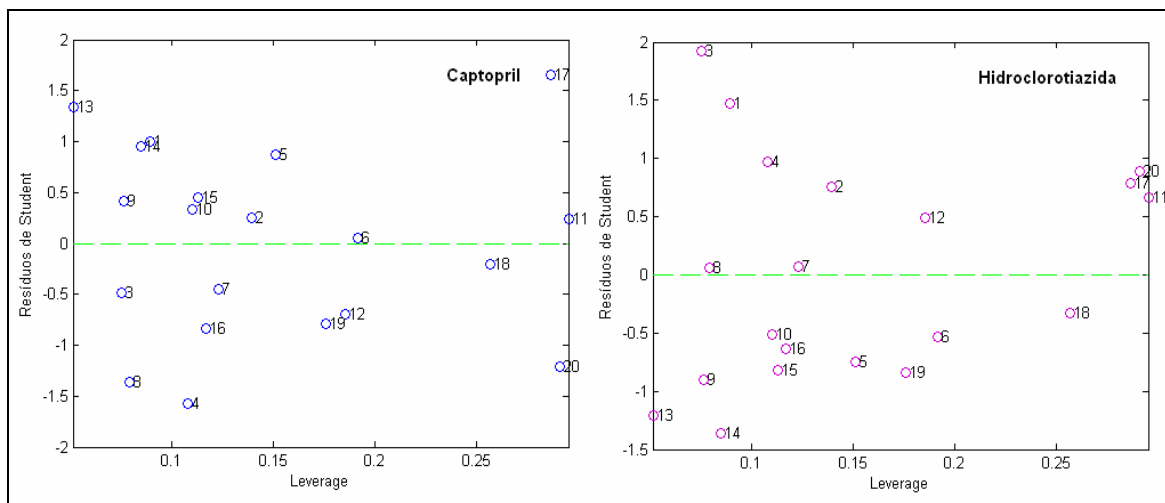


FIGURA 26. RESÍDUOS DE “STUDENT” X “LEVERAGE” PARA O MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VARIÁVEIS LATENTES.

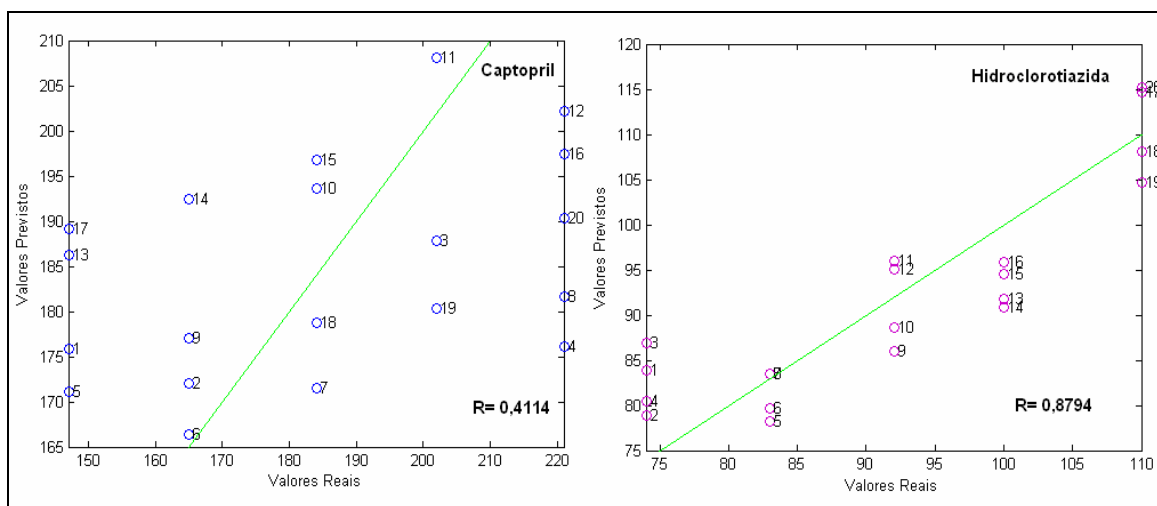


FIGURA 27. VALORES PREVISTOS PELO MODELO VERSUS VALORES REAIS.

TABELA 13. ERROS RELATIVOS MÉDIOS (%) EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VLs E DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO NA QUANTIFICAÇÃO DAS 5 AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO EXTERNA.

| PRÉ-PROCESSAMENTO | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------|-------|--------------|-------|-------------------------|-------|---------|-------|-------------|-------|------------|------------|
| VL | Centrado na média | | Autoescalado | | Alisado com 1ª derivada | | Alisado | | 1ª derivada | | MSC | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| 2 | 12,4 | 5,4 | 12,3 | 5,03 | 15,3 | 9,5 | 9,0 | 10,8 | 14,1 | 14,6 | 12,0 | 5,0 |
| 3 | 8,7 | 5,5 | 8,8 | 5,5 | 11,5 | 7,1 | 10,5 | 6,2 | 16,9 | 10,4 | 8,4 | 5,1 |
| 5 | 8,8 | 5,2 | 8,3 | 5,0 | 8,6 | 8,6 | 9,3 | 6,2 | 18,5 | 6,0 | 6,9 | 5,5 |
| 7 | 12,3 | 5,1 | 12,7 | 5,2 | 11,3 | 8,9 | 10,4 | 6,7 | 16,8 | 5,9 | 7,2 | 4,6 |
| 9 | 13,1 | 4,4 | 12,9 | 5,1 | 12,5 | 6,4 | 9,1 | 5,7 | 20,7 | 9,3 | 5,4 | 5,1 |

Na previsão de amostras de medicamento de referência (Tabela 14) observam-se erros relativos extremamente elevados, provavelmente em razão das significativas diferenças observadas nos espectros de medicamentos e misturas sintéticas, principalmente na região centrada em 275 nm (ver Figura 23). Tal discrepância pode ser devida à presença de diferentes tipos de excipientes utilizados na formulação do

medicamento, podendo ser contornada pela utilização de padrões de calibração que contenham esta mistura de excipientes.

Na análise em solução estes inconvenientes não foram observados, provavelmente devido aos excipientes serem pouco solúveis na solução em que padrões e medicamentos foram solubilizados.

TABELA 14. PREVISÃO DO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA LOPRIL-D[®], UTILIZANDO MODELOS ELABORADOS A PARTIR DE PRÉ-PROCESSAMENTO MSC.

| CONCENTRAÇÃO NOMINAL (mg g ⁻¹) | | CONCENTRAÇÕES PREVISTAS (mg g ⁻¹); n= 3 | | | | | | | | | | | |
|---|--------------|---|-------|----------|-----------------|-------|----------|----------------|-------|----------|-------|------|------|
| | | 7 VL | | | 5 VL | | | 3 VL | | | | | |
| CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | ERRO (%) | CAP | HIDRO | ERRO (%) | CAP | HIDRO | ERRO (%) | | | |
| 184,0 | 92,0 | 550,3 | 29,5 | 199,1 | 67,9 | 460,8 | 35,0 | 150,4 | 61,9 | 258,5 | 123,4 | 40,5 | 34,1 |
| 184,0 | 92,0 | 661,4 | 43,9 | 259,4 | 52,3 | 521,8 | 56,5 | 183,6 | 38,6 | 261,4 | 157,7 | 42,1 | 71,4 |
| 184,0 | 92,0 | 440,4 | 34,8 | 139,3 | 62,2 | 406,9 | 41,1 | 121,1 | 55,4 | 238,5 | 122,2 | 29,6 | 32,8 |
| ERRO (%) | CAP | 200 ± 60 | | | 152 ± 31 | | | 37 ± 7 | | | | | |
| | HIDRO | 61 ± 8 | | | 52 ± 12 | | | 46 ± 22 | | | | | |

5.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Com o intuito de validar o método multivariado fundamentado em espectroscopia eletrônica em solução, foram realizados estudos de acordo com os critérios exigidos pela ANVISA, envolvendo a avaliação de parâmetros de repetibilidade, reprodutibilidade e robustez, esta última frente a mudanças de pH, temperatura e tempo de leitura. Neste estudo, foi utilizado o modelo multivariado de melhor desempenho, ou seja, aquele desenvolvido com 2 VLs e espectros alisados.

5.3.1. Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrída) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). Ambas as avaliações foram realizadas por análise em triplicata de 3 misturas sintéticas, contendo concentrações baixas (20,00 mg L⁻¹ de CAP e 10,00 mg L⁻¹ de HIDRO), médias (25,00 mg L⁻¹ de CAP e 12,50 mg L⁻¹ de HIDRO) e altas (30,00 mg L⁻¹ de CAP e 15,00 mg L⁻¹ de HIDRO).

5.3.1.1. Repetibilidade

O teste de repetibilidade avalia a diferença entre repetições do mesmo ensaio, executado no mesmo laboratório, dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação.

Os resultados desta avaliação são apresentados na Tabela 15, os quais demonstram uma excelente precisão da metodologia analítica em avaliação, com desvios padrão relativos entre 0,15 e 1,31 %, portanto dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA (5%).

Adicionalmente, os resultados apresentados na Tabela 15 permitem avaliar a exatidão da metodologia proposta, em função da recuperação das concentrações utilizadas no ensaio. Neste caso, a recuperação alcança valores entre 95,77 e 100,05, portanto dentro do limite estabelecido (5%).

5.3.1.2. Reprodutibilidade

O teste de reprodutibilidade é semelhante ao de repetibilidade, com a diferença de que a análise deve ser realizada por outro analista, em outro laboratório e utilizando-se outro equipamento.

Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados na Tabela 16, demonstrando a obtenção de desvios padrão relativos (DPR) bem inferiores ao valor limite estabelecido pela ANVISA (5%).

TABELA 15. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE.

| AMOSTRA | CAPTOPRIL | | HIDROCLOROTIAZIDA | |
|---------|----------------------------------|---------------|----------------------------------|--------------|
| | Real | Previsto | Real | Previsto |
| Baixa 1 | 20,00 | 19,99 | 10,00 | 9,99 |
| Baixa 2 | 20,00 | 19,97 | 10,00 | 9,97 |
| Baixa 3 | 20,00 | 20,07 | 10,00 | 9,96 |
| | Média (mg L⁻¹) | 20,01 | Média (mg L⁻¹) | 9,97 |
| | DPR (%) | 0,26 | DPR (%) | 0,15 |
| | Recuperação (%) | 100,05 | Recuperação (%) | 99,7 |
| AMOSTRA | CAPTOPRIL | | HIDROCLOROTIAZIDA | |
| | Real | Previsto | Real | Previsto |
| Média 1 | 25,00 | 24,28 | 12,50 | 12,32 |
| Média 2 | 25,00 | 24,44 | 12,50 | 12,36 |
| Média 3 | 25,00 | 24,38 | 12,50 | 12,33 |
| | Média (mg L⁻¹) | 24,37 | Média (mg L⁻¹) | 12,34 |
| | DPR (%) | 0,33 | DPR (%) | 0,17 |
| | Recuperação (%) | 97,48 | Recuperação (%) | 98,72 |
| AMOSTRA | CAPTOPRIL | | HIDROCLOROTIAZIDA | |
| | Real | Previsto | Real | Previsto |
| Alta 1 | 30,00 | 28,55 | 15,00 | 14,59 |
| Alta 2 | 30,00 | 29,16 | 15,00 | 14,57 |
| Alta 3 | 30,00 | 28,47 | 15,00 | 14,61 |
| | Média (mg L⁻¹) | 28,73 | Média (mg L⁻¹) | 14,59 |
| | DPR (%) | 1,31 | DPR (%) | 0,14 |
| | Recuperação (%) | 95,77 | Recuperação (%) | 97,27 |

TABELA 16. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA NO ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE.

| Concentração Baixa | CAPTOPRIL | HIDROCLOROTIAZIDA |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | (20,00 mg L ⁻¹) | (10,00 mg L ⁻¹) |
| <i>Analista 1</i> | 19,99 | 9,99 |
| | 19,97 | 9,97 |
| | 20,07 | 9,96 |
| <i>Analista 2</i> | 19,45 | 9,92 |
| | 19,67 | 9,89 |
| | 19,78 | 9,95 |
| Média (mg L⁻¹) | 19,82 | 9,95 |
| DPR (%) | 1,18 | 0,36 |
| Concentração Média | CAPTOPRIL | HIDROCLOROTIAZIDA |
| | (25,00 mg L ⁻¹) | (12,50 mg L ⁻¹) |
| <i>Analista 1</i> | 24,28 | 12,32 |
| | 24,44 | 12,36 |
| | 24,38 | 12,33 |
| <i>Analista 2</i> | 24,99 | 12,27 |
| | 24,87 | 12,34 |
| | 24,88 | 12,29 |
| Média (mg L⁻¹) | 24,64 | 12,32 |
| DPR (%) | 1,24 | 0,27 |
| Concentração Alta | CAPTOPRIL | HIDROCLOROTIAZIDA |
| | (30,00 mg L ⁻¹) | (15,00 mg L ⁻¹) |
| <i>Analista 1</i> | 28,55 | 14,59 |
| | 29,16 | 14,57 |
| | 28,47 | 14,61 |
| <i>Analista 2</i> | 29,06 | 14,78 |
| | 28,99 | 14,66 |
| | 28,77 | 14,89 |
| Média (mg L⁻¹) | 28,83 | 14,68 |
| DPR (%) | 0,98 | 0,86 |

5.3.2. Robustez

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método, constatando-se suscetibilidade a variações nas condições analíticas, as quais deverão ser adequadamente controladas ou incluídas como precauções no procedimento.

A etapa mais importante na construção do modelo é a obtenção dos espectros das espécies de interesse. Portanto, a principal observação a ser feita está representada pelas condições experimentais que podem alterar a resposta instrumental e, conseqüentemente, os resultados de previsão.

5.3.2.1. Efeito da temperatura

A influência da temperatura nos espectros das misturas foi avaliada entre 5 e 45 °C, utilizando-se a mistura que melhor representa a composição dos medicamentos em estudo (CAP: 25,00 mg L⁻¹ e HIDRO: 12,50 mg L⁻¹).

Em primeira análise, os espectros apresentados na Figura 28 não demonstram um efeito significativo da variação da temperatura no perfil de absorção das espécies. Quando estes espectros são submetidos à fase de previsão, obtêm-se os resultados apresentados na Tabela 17. De maneira geral, os resultados se mostram consistentes, com desvios médios inferiores a 2% e erros de previsão médios inferiores a 7%, portanto dentro dos limites estabelecidos para este tipo de método.

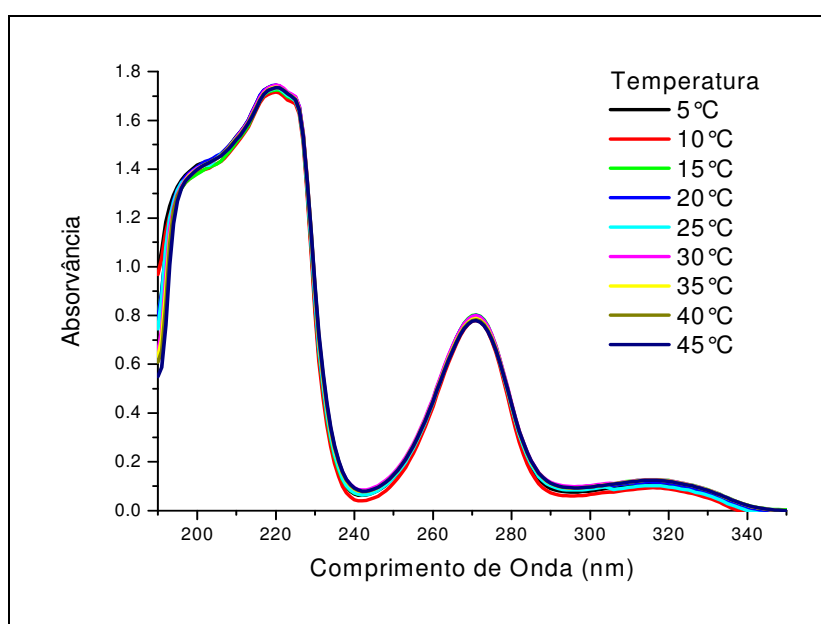


FIGURA 28. EFEITO DA TEMPERATURA NOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DAS MISTURAS DE CAPTOPRIL (25,00 mg L⁻¹) E HIDROCLOROTIAZIDA (12,50 mg L⁻¹).

TABELA 17. RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DA MISTURA CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

| T (°C) | REAL (mg L ⁻¹) | | PREVISTO (mg L ⁻¹) | | ERRO (%) | |
|--------|----------------------------|----------------|--------------------------------|--------------|-------------|-------------|
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| 5 | 25,00 | 12,50 | 24,14 | 11,89 | - 3,4 | - 4,9 |
| 10 | 25,00 | 12,50 | 23,73 | 11,61 | - 5,1 | - 7,1 |
| 15 | 25,00 | 12,50 | 23,20 | 11,97 | - 7,2 | - 4,2 |
| 20 | 25,00 | 12,50 | 23,77 | 12,01 | - 4,9 | - 3,9 |
| 25 | 25,00 | 12,50 | 23,73 | 11,86 | - 5,1 | - 5,1 |
| 30 | 25,00 | 12,50 | 23,28 | 12,13 | - 6,9 | - 3,0 |
| 35 | 25,00 | 12,50 | 23,25 | 12,02 | - 7,0 | - 3,8 |
| 40 | 25,00 | 12,50 | 23,18 | 12,00 | - 7,3 | - 4,0 |
| 45 | 25,00 | 12,50 | 22,93 | 12,02 | - 8,3 | - 3,8 |
| | | Média | 23,47 | 11,95 | 6,13 | 4,42 |
| | | DPR (%) | 1,66 | 1,24 | - | - |

5.3.2.2. Influência do tempo de leitura

A estabilidade das soluções contendo CAP e HIDRO foi avaliada em função do tempo de leitura, utilizando-se como referência as misturas contendo concentrações de CAP: 25,00 mg L⁻¹ e HIDRO: 12,50 mg L⁻¹. Os espectros foram registrados assim que as soluções foram preparadas (tempo 0) e após 1, 2, 3, 24 e 48 horas, utilizando sempre as mesmas soluções para leitura.

A Figura 29 mostra os espectros obtidos em diferentes tempos de leitura, observando-se diferenças que não parecem significativas. Os resultados obtidos na fase de previsão (Tabela 18) confirmam esta observação, mostrando desvios e erros compatíveis com a norma que regulamenta este tipo de avaliações.

5.3.2.3. Influência do pH

O efeito da variação do pH na resposta espectral de misturas contendo CAP (25,00 mg L⁻¹) e HIDRO (12,50 mg L⁻¹) foi investigada em pH 2,92, 4,21 (pH natural da solução etanol/água a 10 %) e 6,14. Como pode ser observado na seqüência de espectros apresentada na Figura 30, mudanças de pH exercem uma significativa influência no perfil espectral das amostras, fator que compromete de maneira evidente a capacidade de previsão dos modelos multivariados (Tabela 19).

Uma vez que os modelos foram desenvolvidos no pH natural das misturas utilizadas como padrão (pH = 4,21), a capacidade de previsão se mostra adequada apenas em valores próximos deste pH. Em valores diferentes de pH, a previsão leva a erros de previsão significativamente maiores, embora ainda dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Diante desta situação, o desenvolvimento de modelos em pH controlado se apresenta essencial.

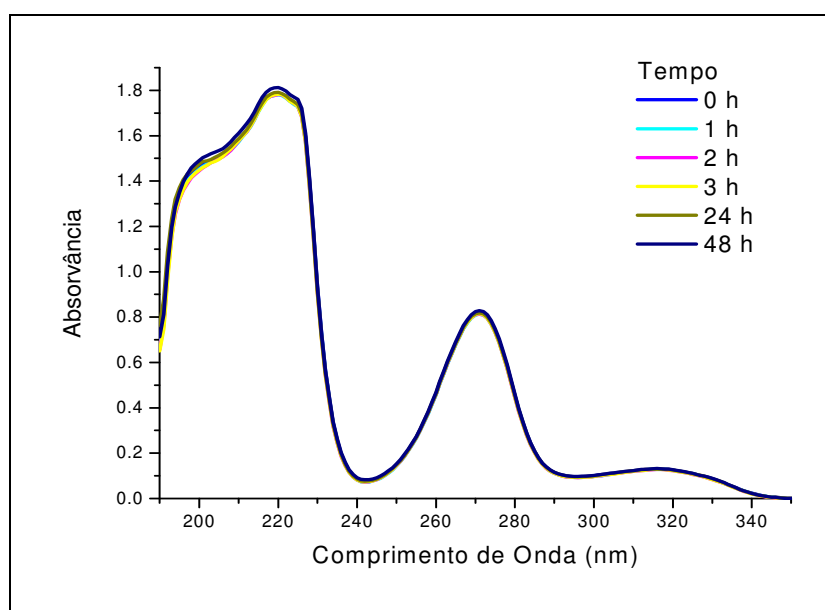


FIGURA 29. ESPECTROS OBTIDOS PARA AS SOLUÇÕES DE CAPTOPRIL (25,00 mg L⁻¹) E HIDROCLOROTIAZIDA (12,50 mg L⁻¹) EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA.

TABELA 18. RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DAS MISTURAS CONTENDO CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA.

| Tempo (h) | REAL (mg L ⁻¹) | | PREVISTO (mg L ⁻¹) | | ERRO (%) | |
|-----------|----------------------------|----------------|--------------------------------|--------------|-------------|-------------|
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| 0 | 25,00 | 12,50 | 24,44 | 12,36 | - 2,24 | - 1,12 |
| 1 | 25,00 | 12,50 | 24,27 | 12,29 | - 2,92 | - 1,68 |
| 2 | 25,00 | 12,50 | 24,11 | 12,29 | - 3,56 | - 1,68 |
| 3 | 25,00 | 12,50 | 24,13 | 12,29 | - 3,48 | - 1,68 |
| 24 | 25,00 | 12,50 | 24,75 | 12,35 | - 1,00 | - 1,20 |
| 48 | 25,00 | 12,50 | 24,81 | 12,51 | - 0,76 | 0,08 |
| | | Média | 24,42 | 12,35 | 2,32 | 1,24 |
| | | DPR (%) | 1,25 | 0,69 | - | - |

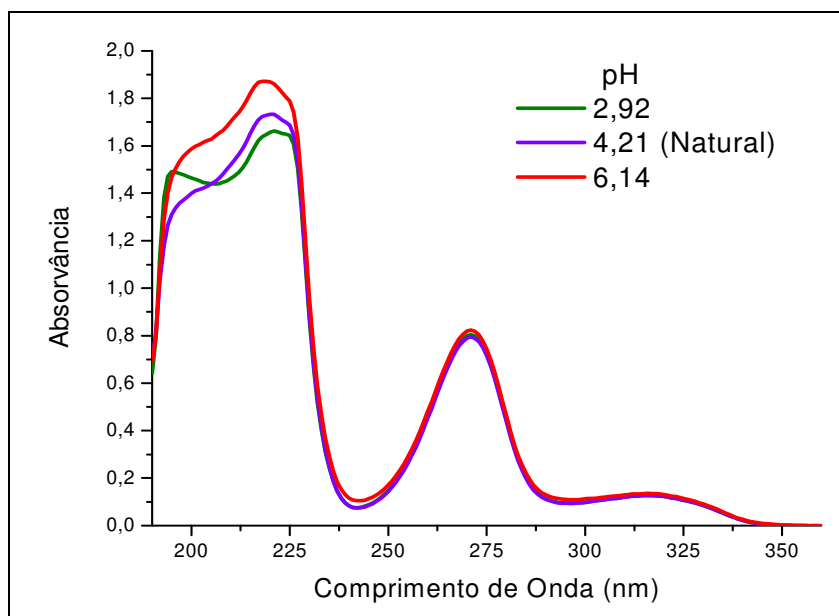


FIGURA 30. ESPECTROS DA MISTURA CAPTOPRIL ($25,00 \text{ mg L}^{-1}$) E HIDROCLOROTIAZIDA ($12,50 \text{ mg L}^{-1}$) EM pH 2,92, 4,21 (NATURAL) E 6,14.

TABELA 19. RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DAS MISTURAS CONTENDO CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM DIFERENTES VALORES DE pH.

| pH | REAL (mg L^{-1}) | | PREVISTO (mg L^{-1}) | | ERRO (%) | |
|-------------|-----------------------------|----------------|---------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| 2,92 | 25,00 | 12,50 | 24,72 | 11,52 | - 1,12 | - 7,84 |
| 4,21 | 25,00 | 12,50 | 24,34 | 12,01 | - 2,64 | - 3,92 |
| 6,14 | 25,00 | 12,50 | 27,00 | 12,67 | 8,00 | 1,36 |
| | | Média | 26,25 | 12,06 | 3,92 | 4,37 |
| | | DPR (%) | 6,36 | 4,78 | - | - |

5.4. PERFIL DE DISSOLUÇÃO

Os ensaios de dissolução envolveram 3 medicamentos disponíveis comercialmente, o medicamento de referência Lopril-D[®], do laboratório Bristol-Myers Squibb, o medicamento genérico do laboratório Medley e o medicamento similar Captotec HCT, do laboratório Hexal, cada um dos quais foi avaliado em quintuplicata, nas análises envolvendo espectroscopia UV-Vis, e em triplicata nas análises por CLAE.

Cada comprimido foi colocado dentro do aparato e assim que entraram em contato

com o meio de dissolução iniciou-se a contagem do tempo. Foram retiradas alíquotas de 10,0 mL em tempos de 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 e 30 minutos. As alíquotas foram acondicionadas em tubos de ensaio com tampa de rosca. Após filtração em membrana de celulose 0,45 μm , as alíquotas foram analisadas pela técnica de espectrofotometria na região do UV-Vis e por CLAE, para que fossem traçados os perfis de dissolução nas diferentes metodologias.

De acordo com os perfis de dissolução obtidos por análise cromatográfica (Figura 31), a dissolução do captopril é bastante rápida para os 3 medicamentos avaliados, com uma dissolução total que equivale a aproximadamente 100 % do valor informado na bula, a partir de 7 minutos de ensaio. A hidroclorotiazida dissolve mais lentamente, alcançando valores da ordem de 85 % do valor nominal, em 30 minutos de ensaio.

Segundo a Farmacopéia Americana, os teores de captopril ao término de 20 minutos de dissolução devem ser de pelo menos 80 % e da hidroclorotiazida ao final de 30 minutos não devem ser menores que 60 %, o que demonstra que a dissolução está de acordo com a legislação. Em ambos os casos, os valores máximos de dissolução estão de acordo com a resolução RE n° 899 (ANVISA, 2003), que permite valores de $\pm 20\%$ de tolerância para fármacos em ensaios de dissolução.

Para uma avaliação mais detalhada, os valores de concentração e porcentagem de dissolução de captopril e hidroclorotiazida nos medicamentos analisados são mostrados na Tabela 20.

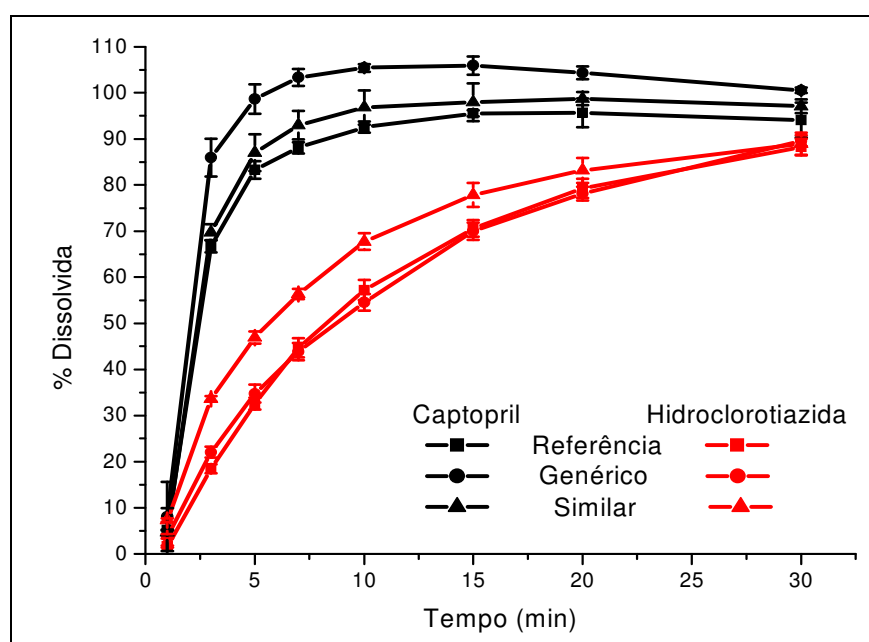


FIGURA 31. PERFIS DE DISSOLUÇÃO DOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR ANALISADOS POR CLAE (n= 3).

TABELA 20. CONCENTRAÇÃO E PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA NOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR ANALISADOS POR CLAE EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA; n= 3.

| 1 MINUTO | | | | | | |
|------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| | Média ($mg L^{-1}$) % dissolvida | 2,61 ± 0,1 5,21 | 0,40 ± 0,2 1,59 | 4,05 ± 7,5 8,12 | 0,95 ± 0,5 3,81 | 2,30 ± 5,3 4,65 |
| 3 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| | Média ($mg L^{-1}$) % dissolvida | 33,37 ± 1,3 66,74 | 4,61 ± 1,0 18,44 | 42,98 ± 4,1 85,96 | 5,51 ± 1,2 22,04 | 34,88 ± 1,7 69,76 |
| 5 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| | Média ($mg L^{-1}$) % dissolvida | 41,65 ± 1,9 83,32 | 8,15 ± 1,3 32,63 | 49,33 ± 3,2 98,66 | 8,69 ± 1,9 34,76 | 43,51 ± 4,0 87,02 |
| 7 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| | Média ($mg L^{-1}$) % dissolvida | 44,04 ± 1,2 88,08 | 11,18 ± 2,1 44,72 | 51,68 ± 1,8 103,36 | 10,96 ± 1,9 43,84 | 46,50 ± 3,1 93,02 |
| 10 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| | Média ($mg L^{-1}$) % dissolvida | 46,28 ± 1,2 92,56 | 14,31 ± 2,2 57,24 | 52,71 ± 0,8 105,42 | 13,64 ± 1,8 54,56 | 48,41 ± 3,7 96,82 |
| 15 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| | Média ($mg L^{-1}$) % dissolvida | 47,78 ± 0,7 95,56 | 17,65 ± 1,8 70,60 | 52,97 ± 2,0 105,94 | 17,50 ± 1,9 70,08 | 48,98 ± 4,1 97,96 |
| 20 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| | Média ($mg L^{-1}$) % dissolvida | 47,83 ± 3,1 95,66 | 19,83 ± 2,1 79,32 | 52,18 ± 1,4 104,36 | 19,53 ± 1,5 78,12 | 49,37 ± 1,4 98,74 |
| 30 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| | Média ($mg L^{-1}$) % dissolvida | 47,05 ± 3,8 94,11 | 22,06 ± 1,8 88,24 | 50,28 ± 0,6 100,56 | 22,40 ± 1,2 89,64 | 48,56 ± 1,5 97,12 |

As porcentagens de dissolução previstas pelo modelo multivariado fundamentado em espectroscopia eletrônica em solução são mostradas na Figura 32. Em aproximadamente 7 minutos o captopril alcança máxima dissolução (95 %), para os medicamentos de referência e genérico, já para o medicamento similar esta dissolução está na faixa de 85 %, o que condiz com a análise dos medicamentos frente ao modelo multivariado apresentado anteriormente (*ver Tabela 12*). As taxas de dissolução do captopril estão de acordo com a legislação que permite pelo menos 80 % de dissolução do fármaco em 20 minutos de ensaio (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008).

Os perfis de dissolução da hidroclorotiazida analisados por espectroscopia são bem semelhantes aos perfis analisados por CLAE, mostrando uma liberação mais rápida para o medicamento similar no início dos ensaios e mais lenta para os demais medicamentos. Ao final de 30 minutos, os 3 medicamentos apresentam cerca de 80 % de dissolução da espécie hidroclorotiazida, o que está dentro das normas da Farmacopéia Americana que permite não menos que 60 % de dissolução deste fármaco ao final do ensaio.

Para uma avaliação mais detalhada, os valores de concentração e porcentagem de dissolução de captopril e hidroclorotiazida nos medicamentos analisados são mostrados na Tabela 21.

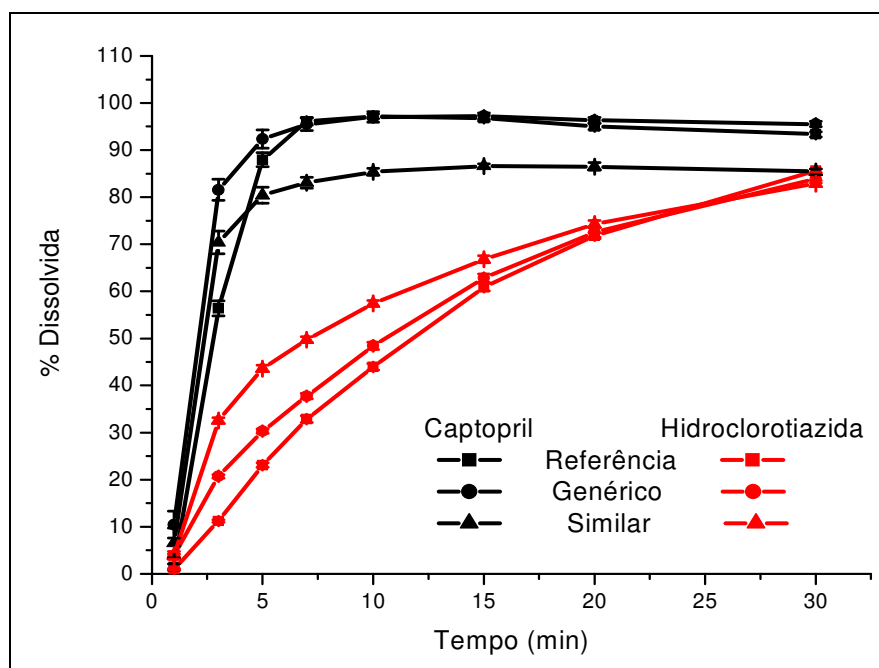


FIGURA 32. PERFIS DE DISSOLUÇÃO DOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR ANALISADOS POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis (n= 5).

TABELA 21. CONCENTRAÇÃO E PORCENTAGEM DE DISSOLUÇÃO DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA NOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR ANALISADOS POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA; n= 5

| 1 MINUTO | | | | | | |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Média (mg L ⁻¹) | 0,70 ± 0,6 | 0,24 ± 0,2 | 5,22 ± 2,8 | 0,98 ± 0,3 | 3,28 ± 3,2 | 0,98 ± 0,9 |
| % dissolvida | 1,41 | 0,97 | 10,45 | 3,93 | 6,57 | 3,90 |
| 3 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Média (mg L ⁻¹) | 28,20 ± 1,6 | 2,80 ± 0,3 | 40,78 ± 2,3 | 5,17 ± 0,4 | 35,19 ± 2,4 | 8,14 ± 0,6 |
| % dissolvida | 56,39 | 11,20 | 81,55 | 20,70 | 70,39 | 32,57 |
| 5 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Média (mg L ⁻¹) | 44,00 ± 1,5 | 5,77 ± 0,5 | 46,17 ± 1,9 | 7,58 ± 0,5 | 40,20 ± 1,7 | 10,90 ± 0,7 |
| % dissolvida | 88,00 | 23,10 | 92,34 | 30,33 | 80,40 | 43,62 |
| 7 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Média (mg L ⁻¹) | 48,06 ± 0,9 | 8,22 ± 0,7 | 47,73 ± 1,3 | 9,44 ± 0,5 | 41,53 ± 1,1 | 12,43 ± 0,6 |
| % dissolvida | 96,13 | 32,86 | 95,46 | 37,75 | 83,07 | 49,73 |
| 10 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Média (mg L ⁻¹) | 48,58 ± 0,5 | 10,99 ± 0,7 | 48,51 ± 1,1 | 12,10 ± 0,8 | 42,70 ± 0,8 | 14,36 ± 0,6 |
| % dissolvida | 97,16 | 43,95 | 97,02 | 48,41 | 85,40 | 57,43 |
| 15 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Média (mg L ⁻¹) | 48,40 ± 0,7 | 15,22 ± 0,8 | 48,60 ± 0,7 | 15,70 ± 0,9 | 43,32 ± 0,4 | 16,71 ± 0,8 |
| % dissolvida | 96,79 | 60,88 | 97,21 | 62,79 | 86,63 | 66,82 |
| 20 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Média (mg L ⁻¹) | 47,52 ± 0,7 | 17,96 ± 0,7 | 48,17 ± 0,6 | 18,13 ± 1,1 | 43,25 ± 0,8 | 18,57 ± 0,8 |
| % dissolvida | 95,04 | 71,82 | 96,33 | 72,53 | 86,50 | 74,29 |
| 30 MINUTOS | | | | | | |
| | Referência | | Genérico | | Similar | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| Média (mg L ⁻¹) | 46,68 ± 0,5 | 21,41 ± 0,4 | 47,76 ± 0,6 | 20,99 ± 0,9 | 42,71 ± 0,6 | 20,72 ± 0,6 |
| % dissolvida | 93,35 | 85,64 | 95,52 | 83,97 | 85,42 | 82,88 |

Embora os perfis de dissolução obtidos por ambas as técnicas utilizadas sejam bastante similares, erros consideráveis, da técnica espectroscópica em relação à cromatográfica, podem ser observados nos primeiros minutos do ensaio (Tabela 22). Em função dos erros se tornarem desprezíveis em maiores tempos de monitoramento, supomos que a comentada inconsistência seja devida a imprecisões na coleta de amostras, o que, em função da rápida dissolução dos medicamentos, torna-se crítico nos primeiros momentos do ensaio.

De modo geral, pode-se afirmar que a técnica espectroscópica é bastante confiável quando utilizada em testes de dissolução, demonstrando excelentes resultados frente à técnica cromatográfica padrão.

TABELA 22. ERROS RELATIVOS OBTIDOS PELA COMPARAÇÃO DE TÉCNICA CROMATOGRÁFICA E ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO UV-Vis NOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO.

| TEMPO (minutos) | ERRO (%) * | | | | | |
|--------------------|------------|--------|----------|--------|---------|--------|
| | REFERÊNCIA | | GENÉRICO | | SIMILAR | |
| | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO | CAP | HIDRO |
| 1 | - 73,2 | - 40,0 | 28,9 | 3,2 | 42,6 | - 46,4 |
| 3 | -15,5 | - 39,3 | - 5,1 | - 6,2 | 0,9 | - 3,2 |
| 5 | 5,6 | - 29,2 | - 6,4 | - 12,8 | - 7,6 | - 7,1 |
| 7 | 9,1 | - 26,5 | - 7,6 | - 13,9 | - 10,7 | - 11,8 |
| 10 | 5,0 | - 23,2 | - 8,0 | - 11,3 | - 11,8 | - 15,2 |
| 15 | 1,3 | - 13,8 | - 8,2 | - 10,3 | - 11,6 | - 14,2 |
| 20 | - 0,6 | - 9,4 | - 7,7 | - 7,2 | - 12,4 | - 10,7 |
| 30 | -0,8 | - 2,9 | - 5,0 | - 6,3 | - 12,0 | - 6,8 |

* Erro relativo em relação ao valor médio determinado por técnica cromatográfica padrão.

6. CONCLUSÕES

6.1. ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis EM SOLUÇÃO

- i. Os problemas de interferência espectral observados entre captopril e hidroclorotiazida inviabilizam a determinação de suas misturas, utilizando-se modelos de calibração univariados convencionais.
- ii. Estes problemas de interferência podem ser minimizados pela utilização de modelos elaborados empregando-se sistemas de equações, os quais consideram a interferência existente. Embora melhorados, os resultados apresentam erros acima dos obtidos através de modelos multivariados.
- iii. Utilizando poucas variáveis latentes é possível explicar praticamente toda a informação relevante contida nos espectros. Esta redução de dimensionalidade favorece o desenvolvimento de modelos que contornam os problemas de interferência espectral.
- iv. Modelos de calibração elaborados por rotinas de regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR) e envolvendo sinais alisados apresentaram boa capacidade preditiva em medicamentos de referência e genérico contendo a associação captopril e hidroclorotiazida, permitindo resultados coerentes com os valores nominais e reais, assim como com as especificações impostas pela legislação.

6.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

- i. O modelo multivariado de melhor desempenho, desenvolvido com 2 VLs e espectros alisados, foi validado de acordo com os critérios exigidos pela ANVISA, avaliando-se parâmetros de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), exatidão e robustez, esta última frente a mudanças de pH, temperatura e tempo de leitura.
- ii. Testes de repetibilidade demonstraram uma excelente precisão da metodologia analítica em avaliação, com desvios padrão relativos entre 0,15 e 1,31, portanto dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente ($\pm 5\%$). Da mesma forma, os resultados obtidos nos ensaios de reprodutibilidade apresentam valores de desvio padrão relativos (DPR) inferiores ao valor limite imposto pela norma específica (5%).
- iii. A exatidão da metodologia foi avaliada em ensaios de recuperação, observando-se valores entre 95,77 e 100,05, portanto dentro do limite imposto pela ANVISA (5%).
- iv. O método se mostrou robusto frente às variações na temperatura e no tempo de leitura.
- v. O desenvolvimento de modelos em pH controlado se apresenta essencial, devido às mudanças espectrais provocadas por variações do pH.

6.3. ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis EM FASE SÓLIDA

- i. Os problemas de interferência espectral são bastante evidentes quando se analisa a mistura CAP e HIDRO em fase sólida.
- ii. Os Modelos desenvolvidos apresentaram uma boa capacidade de previsão de amostras sintéticas da fase de validação, principalmente utilizando-se sinais espectrais processados por correção do sinal multiplicativo (MSC). Os erros de previsão, entretanto, são maiores que os obtidos por espectroscopia em solução.
- iii. A grande diferença observada entre os espectros de misturas sintéticas e do medicamento de referência faz com que a capacidade preditiva dos modelos seja seriamente comprometida, modelando ruídos e sinais dos excipientes, o que leva à obtenção de erros de previsão extremamente grandes.

6.4. ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO

- i. O perfil espectral de captopril e hidrolorotiazida se modifica sensivelmente com a introdução de mudanças no pH do meio, o que faz com que as amostras resultantes do ensaio de dissolução, obtidas em meio clorídrico 0,1 mol L⁻¹, não possam ser adequadamente previstas pelo modelo desenvolvido em pH próximo da neutralidade. Desta forma, há necessidade de modelos especificamente desenvolvidos, nas condições em que o ensaio de dissolução é realizado.
- ii. O modelo de calibração desenvolvido se mostrou bastante eficiente na previsão de amostras de validação e das amostras resultantes dos ensaios de dissolução, permitindo a observação de taxas de dissolução compatíveis com os limites impostos pela legislação.
- iii. Os resultados obtidos por análise cromatográfica apresentaram valores que reforçam a confiabilidade do método espectroscópico aplicado à análise de perfil de dissolução de medicamentos, apresentando taxas de dissolução dentro das normas da legislação vigente, aprovando, portanto, a técnica espectroscópica como método de quantificação para associação farmacêutica captopril/hidroclorotiazida utilizando calibração multivariada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTONEN, J.; GORDON, K.C.; STRACHAN, C.J; RADES, T. Perspectives in the use of spectroscopy to characterise pharmaceutical solids. *Int. J. Pharm.* 364, **2008**, 159.
- ABBASPOUR, A.; MIRZAJANI, R. Simultaneous determination of phenytoin, barbital and caffeine in pharmaceuticals by absorption (zero-order) UV spectra and first-order derivative spectra—multivariate calibration methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, **2005**, 420.
- ABDELAL, A.A.; KITAGAWA, S.; OHTANI, H.; EL-ENANY, N.; BELAL, F.; WALASH, M.I. Method development and validation for the simultaneous determination of cinnarizine and co-formulated drugs in pharmaceutical preparations by capillarity electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, **2008**, 491.
- ABDOU, H.M. Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence. *Easton: Mack Publishing Company*, **1989**.
- ACHANTA, A.S.; GRAY, V.A.; CECIL, T.L.; GRADY, L.T. Evaluation of the performance of prednisone and salicylic acid calibrators. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21, **1995**, 1171.
- AKAY, C.; OZKAN, S.A. Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, **2002**, 1207.
- ALLESØ, M.; CHIENG, N.; REHDER, S.; RANTANEN, J.; RADES, T.; AALTONEN, J. Enhanced dissolution rate and synchronized release of drugs in binary systems through formulation: Amorphous naproxen–cimetidine mixtures prepared by mechanical activation. *J. Controlled Release*, **2009**.
- ALZAGA, R.; RYAN, R.W.; TAYLOR-WORTH, K.; LIPCZYNSKI, A.M.; SZUCS, R.; SANDRA, P. A generic approach for the determination of residues of alkylating agents in active pharmaceutical ingredients by in situ derivatization-headspace-gas-chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45, **2007**, 472.
- ALVES, J.C.L.; POPPI, R.J. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine using solid-phase molecular fluorescence and parallel factor analysis. *Anal. Chim. Acta*, **2008**.
- ANDRADE, S.R.C.; SCARMINIO, I.S.; NERY, M.M.F.; OLIVEIRA, A.C. Comparison of multivariate calibration methods to determine simultaneously mebendazole--cambendazole and mebendazole-/thiabendazole in pharmaceutical preparations by UV-/visible spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33, **2003**, 655.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI) - 1/2002. Resolução - RE nº 483, de 19 de março, **2002**. Acesso pelo site: http://anvisa.gov.br/legis/resol/2002/483_02re.htm, em 13 de junho de **2009**.

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio, **2003**. Acesso pelo site: http://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm, em 13 de junho de **2009**.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia Farmacopeica Captopril. Acesso pelo site:
www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/arquivos/cp_materia_prima/CAPTOPRIL_CP.doc, em 20 de junho de **2009 A**.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia Farmacopeica: Hidroclorotiazida. Acesso pelo site:
www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/arquivos/cp_materia_prima/HIDROCLOROTIAZIDA_CP.doc, em 20 de junho de **2009 B**.
- ARANCIBIA, J.A.; NEPOTE, A.J.; ESCANDAR, G.M.; OLIVIERI A.C. Spectrofluorimetric determination of phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol. *Anal. Chim. Acta* 419, **2000**, 159.
- ARAÚJO, C.G.S. Fisiologia do exercício físico e hipertensão arterial: uma breve introdução. *Rev. Soc. Bras. Hipertensão* 4, **2001**. Acesso pelo site: http://www.sbh.org.br/revista/2001_N3_V4/index.asp, em 3 de maio de **2004**.
- AZEVEDO, R.C.P.; RIBEIRO, G.P.; ARAÚJO, M.B. Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para captopril em cápsulas magistrais por CLAE. *Rev. Bras. Cien. Farm.* 44, **2008**.
- BALAYSSAC, S.; TREFFI, S.; GILARD, V.; MALET-MARTINO, M. 2D and 3D DOSY ¹H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: Application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**.
- BAO, Y.; HE, Y.; XU, X.; MO, X.; XU, X.; WANG, X.; AN, H. Quantitative determination of anti-tumor agent bis(4-fluorobenzyl)trisulfide, fluorapacin and its pharmaceutical preparation by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, **2008**, 206.
- BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. *Biológico* 64, **2002**, 175.
- BEBAWY, L.I.; ABBAS, S.S.; FATTAH, L.A.; REFAAT, H.H. 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. *IL Fármaco* 60, **2005**, 859.
- BECK, R.C.R.; CARDOSO, S.G.; ATHAYDE, M.L.; CODEVILLA, C.; OLIVEIRA, F.K.; DALMORA, S.L. Validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da lamivudina e zidovudina em comprimidos. *Quim. Nova* 30, **2007**, 1225.

- BELAL, F.; AL-ZAAGI, I.A.; GADKARIEM, E.A.; ABOUNASSIF, M.A. A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24, **2001**, 335.
- BENEDETTI, C.; ABATZOGLOU, N.; SIMARD, J.-S.; MCDERMOTT, L.; LÉONARD, G.; CARTILIER, L. Cohesive, multicomponent, dense powder flow characterization by NIR. *Int. J. Pharm.* 336, **2007**, 292.
- BOERIS, M.S.; LUCO, J.M.; OLSINA, R.A. Simultaneous spectrophotometric determination of phenobarbital, phenytoin and methylphenobarbital in pharmaceutical preparations by using partial least-squares and principal component regression multivariate calibration. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24, **2000**, 259.
- BOHETS, H.; VANHOUTTE, K.; DE MAESSCHALCK, R.; COCKAERTS, P.; VISSERS, B.; NAGELS, L.J. Development of in situ ion selective sensors for dissolution. *Anal. Chim. Acta* 581, **2007**, 181.
- BOING, A.C.; BOING, A.F.; Hipertensão arterial sistêmica: o que nos dizem os sistemas brasileiros de cadastramentos e informações em saúde. *Rev. Bras. Hipertensão* 14(2), **2007**, 84.
- BRANDÃO, A.C.C. Ensaio para laboratório de controle de qualidade e controle da produção de medicamentos. Rio de Janeiro. Outubro de **2001**.
- BRASIL. Lei n° 6360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, **1976**.
- BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Rev. Ecotox. Meio Amb.* 13, **2003**.
- BRO, R. Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemistry? *Anal. Chim. Acta* 500, **2003**, 185.
- CHIENG, N.; REHDER, S.; SAVILLE, D.; RADES, T.; AALTONEN, J. Quantitative solid-state analysis of three solid forms of ranitidine hydrochloride in ternary mixtures using Raman spectroscopy and X-ray powder diffraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49, **2009**, 18.
- COLONESI DA ROSA, T.C. Dissolução intrínseca de hidroclorotiazida de diferentes granulometrias e sua relação com a dissolução do ativo em comprimidos. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Farmácia – UFRJ, **2005**.

- CORDEIRO, G. A. Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas. *Dissertação de Mestrado*, DQUI-UFPR, **2006**.
- CUTRIGNELLI, A.; LOPEDOTA, A.; TRAPANI, A.; BOGHETICH, G.; FRANCO, M.; DENORA, N.; LAQUINTANA, V.; TRAPANI, G. Relationship between dissolution efficiency of Oxazepam/carrier blends and drug and carrier molecular descriptors using multivariate regression analysis. *Int. J. Pharm.* 358, **2008**, 60.
- DAMIANI, P. C.; MOSCHETTI, A. C.; ROVETTO, A. J.; BENAVENTE, F.; OLIVIERI, A. C. Design and optimization of a chemometrics-assisted spectrophotometric method for the simultaneous determination of levodopa and carbidopa in pharmaceutical products. *Anal. Chim. Acta* 543, **2005**, 192.
- DINÇ, D.; KAYA, S.; DOGANAY, T.; BALEANU, D. Continuous wavelet and derivative transforms for the simultaneous quantitative analysis and dissolution test of levodopa–benserazide tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, **2007**, 991.
- DINÇ, E.; ÖZDEMİR, A. Linear regression analysis and its application to multivariate chromatographic calibration for the quantitative analysis of two-component mixtures. *IL Farmaco* 60, **2005**, 591.
- DONGRE, V.G.; SHAH, S.B.; KARMUSE, P.P.; PHADKE, M.; JADHAV, V.K. Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage form by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, **2008**, 583.
- EL-GINDY, A.; EMARA, S.; HADAD, G. M. Determination of certain drugs in binary mixtures formulations by second derivative ratio spectrophotometry and LC. *IL Farmaco* 59, **2004**, 703.
- EL REIS, M.A.; ATTIA, F.M.A.; KENAWY, I.M.M. Indirect determination of captopril by AAS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, **2000**, 249.
- EL WALILY, A.F.M.; BELAL, S.F.; HEABA, E.A.; EL KERSH, A. Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, **1995**, 851.
- FARINA, C.; KREMSER, L.; RAGGI, M. A.; KENNDLER, E. Determination of Ziprasidone in pharmaceutical formulation by capillary zone electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, **2008**, 471.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. São Paulo, *Editores Atheneu*, **1988**.
- FELIX, F.S.; QUINTINO, M.S.M.; CARVALHO, A.Z.; COELHO, L.H.G.; LAGO, C.L.; ANGNES, L. Determination of salbutamol in syrups by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C⁴D). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40, **2006**, 1288.

- FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; ORTEGA BARRALES, P.; RODRÍGUEZ TORNÉ G.; MOLINA DÍAZ, A. A flow injection sensor for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by using Sephadex SP C-25 for continuous on-line separation and solid phase UV transduction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31, **2003**, 669.
- FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P. L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Quím. Nova* 22, **1999**.
- FILIK, H.; HAYVALI, M.; KILIÇ, E.; APAK, R.; AKSU, D.; YANAZ, Z.; ÇENGEL, T. Development of an optical fibre reflectance sensor for *p*-aminophenol detection based on immobilised bis-8-hydroxyquinoline. *Talanta* 77, **2008**, 103.
- FREITAS, M.P.; SABADIN, A.; SILVA, L.M.; GIANNOTTI, F.M.; COUTO, D.A; TONHI, E.; MEDEIROS, R.S; COCO, G.L.; RUSSO, V.F.T; MARTINS, J.A. Prediction of drug dissolution profiles from tablets using NIR diffuse reflectance spectroscopy: A rapid and nondestructive method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39, **2005**, 17.
- GARBACZ, G.; WEDEMEYER, R.S.; NAGEL, S.; GIESSMANN, T.; MÖNNIKES, H.; WILSON, C.G; SIEGMUND, W.; WEITSCHIES, W. Irregular absorption profiles observed from diclofenac extended release tablets can be predicted using a dissolution test apparatus that mimics in vivo physical stresses. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* 70, **2008**, 421.
- GASPAROTTO, F.S. Fatores relacionados à síntese de matérias-primas que podem alterar a biodisponibilidade do medicamento genérico. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Farmácia – UFRGS, **2005**.
- GEMPERLINE, P.J.; CHO, J.H.; BAKER, B.; BATCHELOR, B.; WALKER, D.S. Determination of multicomponent dissolution profiles of pharmaceutical products by in situ fiber-optic UV measurements. *Anal. Chim. Acta* 345, **1997**, 155.
- GENDRIN, C.; ROGGO, Y.; COLLET, C. Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, **2008**, 533.
- GHASEMI, J.; NIAZI, A. Two- and three-way chemometrics methods applied for spectrophotometric determination of lorazepam in pharmaceutical formulations and biological fluids. *Anal. Chim. Acta* 533, **2005**, 169.
- GIROTTTO, E.; SILVA, P. V. A prescrição de medicamentos em um município do Norte do Paraná. *Rev. Bras. Epidemiologia* 9(2), **2006**, 226.
- GÓMEZ-TAYLOR, B.; PALOMEQUE, M.; MATEO, J.V.G.; CALATAYUD, J.M. Photoinduced chemiluminescence of pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, **2006**, 347.

- GOTARDO, M.A.; TOGNOLLI, J.O.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. Detection of propranolol in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A* 69, **2008**, 1103.
- HAVLÍKOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SÍCHA, J.; SOLICH, P.; Determination of estradiol and its degradation products by liquid chromatography. *J. Chromatog. A* 1119, **2006**, 216.
- HÁJKOVÁ, R.; SKLENÁROVÁ, H.; MATYSOVÁ, L.; SVECOVÁ, P.; SOLICH, P. Development and validation of HPLC method for determination of clotrimazole and its two degradation products in spray formulation. *Talanta* 73, **2007**, 483.
- HARDMANN, J. G., LIMBIRD, L. L. (Eds.). Goodman & Guilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 10^a ed. Rio de Janeiro, *Mc Graw Hill*, **2003**.
- HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. *Anal. Chim. Acta* 500, **2003**, 365.
- HUANG, T.; HE, Z.; YANG, B.; SHAO, L.; ZHENG, X.; DUAN, G. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide in human plasma by reverse-phase HPLC from linear gradient elution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, **2006**, 644.
- HUANG, Y.; CHENG, Y.; ALEXANDER, K.; DOLLIMORE D. The thermal analysis study of the drug captopril. *Thermochim. Acta* 367, **2001**, 43.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, **2003**.
- IOANNIDES, X.; ECONOMOU, A.; VOULGAROPOULOS, A. A study of the determination of the hypertensive drug captopril by square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33(2), **2003**, 309.
- IVANOVIC, D.; MEDENICA, M.; MALENOVIC, A.; JANCIC, B. Validation of the RP-HPLC method for analysis of hydrochlorothiazide and captopril in tablets. *Accred Qual Assur* 9, **2004**, 76.
- IYER, S.S.; BARR, W.H.; KARNES, H.T. Characterization of a potential medium for 'biorelevant' in vitro release testing of a naltrexone implant, employing a validated stability-indicating HPLC method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, **2007**, 845.
- JANTRATID, E.; DE MAIO, V.; RONDA, E.; MATTAVELLI, V.; VERTZONI, M.; DRESSMAN, J.B. Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of *in vivo* performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form. *Euro. J. Pharm. Sci.*, **2009**.
- JING, Q.; SHEN, Y.; TANG, Y.; REN, F.; YU, X.; HOU, Z. Determination of nelfinavir mesylate as bulk drug and in pharmaceutical dosage form by stability indicating HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, **2006**, 1065.

- JOHANSSON, J.; CAUCHI, M.; SUNDGREN, M. Multiple fiber-optic dual-beam UV/Vis system with application to dissolution testing. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29, **2002**, 469.
- JOSHI, A.; PUND, S.; NIVSARKAR, M.; VASU, K.; SHISHOO, C. Dissolution test for site-specific release isoniazid pellets in USP apparatus 3 (reciprocating cylinder): Optimization using response surface methodology. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* 69, **2008**, 769.
- KARGOSHA, K.; SARRAFI, A.H.M. Spectrophotometric simultaneous determination of triamterene and hydrochlorothiazide in Triamterene-H tablets by multivariate calibration methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, **2001**, 273.
- KONZEN, P.H.A.; FURTADO, J.C.; CARVALHO, C.W.; FERRÃO, M.F.; MOLZ, R.F.; BASSANI, I.A.; HÜNING, S.L. Otimização de métodos de controle de qualidade de fármacos usando algoritmo genético e busca tabu. *Pesq. Oper.* 23, **2003**, 189.
- LEHR, G.J.; BARRY, T.L.; FRANOLIC, J.D.; PETZINGER, G.; SCHEINER, P. LC determination of impurities in methoxsalen drug substance: isolation and identification of isopimpinellin as a major impurity by atmospheric pressure chemical ionization LC/MS and NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33, **2003**, 627.
- LEMUS GALLEGO, J.M.; PÉREZ ARROYO, J. Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of Dexamethasone, Polymyxin B and Trimethoprim in synthetic and pharmaceutical formulations. *Anal. Chim. Acta* 437, **2001**, 247.
- LI, Z.; JACOBUS, L.K.; WUELFING, W.P.; GOLDEN, M.; MARTIN, G.P.; REED, R.A. Detection and quantification of low-molecular-weight aldehydes in pharmaceutical excipients by headspace gas chromatography. *J. Chromatog. A* 1104, **2006**, 1.
- LIU, Y.; LYON, B.G.; WINDHAM, W.R.; REALINI, C.E.; PRINGLE, T.D.D.; DUCKETT, S. Prediction of color, texture, and sensory characteristics of beef steaks by visible and near infrared reflectance spectroscopy. A feasibility study. *Meat Sci.* 65, **2003**, 1107.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, L.; LOPEZ-de-ALBA, P.L.; LEO-RODRIGUEZ, L.M.; YEPEZ-MURRIETA, M.L. Simultaneous determination of binary mixtures of trimethoprim and sulfamethoxazole or sulphamethoxypyridazine by the bivariate calibration spectrophotometric method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, **2002**, 77.
- LOUHAICHI, M.R.; JEBALI, S.; LOUESLATI, M.H.; ADHOUM, N.; MONSER, L. Simultaneous determination of pseudoephedrine, pheniramine, guaifenesin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography. *Talanta* 78, **2009**, 991.
- LOURENÇÃO, B.C.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação condutométrica de captopril em formulações farmacêuticas utilizando sulfato de cobre (II) como titulante. *Quim. Nova* 31, **2008**, 349.

- MAHLE, F.; GOELZER, F.; ADRIANO, J.; FELIPPE, M.; VIER, N.; CARLI, R.B.G.; ROSA, T.; COUTO, A.G.; LUCINDA-SILVA, R.M. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida comercializados no Brasil. *Rev. Cien. Farm. Básica Apl.* 28, **2007**, 265.
- MAIA, A.M.; BABY, A.R.; YASAKA, W.J.; SUENAGA, E.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Validation of HPLC stability-indicating method for Vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants. *Talanta* 71, **2007**, 639.
- MADAN, J.; DWIVEDI, A.K.; SINGH, S. Estimation of antitubercular drugs combination in pharmaceutical formulations using multivariate calibration. *Anal. Chim. Acta* 538, **2005**, 345.
- MALUF, D.F.; NAGATA, N.; FARAGO, P.V.; PERALTA-ZAMORA, P.G. Determinação simultânea de paracetamol e cafeína por espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas. *Rev. Bras. Farm.* 89(1), **2008**, 39.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Rev. Bras. Cien. Farm.* 38, **2002**, 375.
- MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, **2003**.
- MARKOPOULOU, C.K.; MALLIOU, E.T.; KOUNDOURELLIS, J.E. Application of two chemometric methods for the determination of imipramine, amitriptyline and perphenazine in content uniformity and drug dissolution studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, **2005**, 249.
- MARKOPOULOU, C.K.; MALLIOU, E.T.; KOUNDOURELLIS, J.E. Chemometric and derivative methods as flexible spectrophotometric approaches for dissolution and assaying tests in multicomponent tablets. *IL Farmaco* 59, **2004**, 627.
- MARTENS, H.; NAES, T. *Multivariate Calibration*; John Wiley & Sons; Chichester, England, **1989**.
- MATERO, S.; PAJANDER, J.; SOIKKELI, A.M.; REINIKAINEN, S.P.; LAHTELA-KAKKONEN, M.; KORHONEN, O.; KETOLAINEN, J.; POSO, A. Predicting the drug concentration in starch acetate matrix tablets from ATR-FTIR spectra using multi-way methods. *Anal. Chim. Acta* 595, **2007**, 190.
- MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Quantitative determination of captopril and prednisolone in tablets by FT-Raman spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40(5), **2006**, 1225.

- MEDINA, A.R.; FERNANDEZ DE CÓRDOVA, M.L.; MOLINA-DIAZ, A. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet pls multiptosensing device. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21, **1999**, 983.
- MENEGOLA, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Dissolution test for citalopram in tablets and comparison of in vitro dissolution profiles. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* 67, **2007**, 524.
- MERVARTOVÁ, K.; POLÁŠEK, M.; CALATAYUD, J.M. Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45, **2007**, 367.
- METWALLY, F.H. Simultaneous determination of Nifuroxazide and Drotaverine hydrochloride in pharmaceutical preparations by bivariate and multivariate spectral analysis. *Spectrochim. Acta Part A* 69, **2008**, 343
- MION JR, D.; PIERIN, A.M.G.; GUIMARÃES, A. Tratamento da hipertensão arterial – respostas de médicos brasileiros a um inquérito. *Rev. Assoc. Med. Bras. Faculdade de Medicina – USP*, **2001**.
- MIRZA, T.; TAN, H.S.I.; Determination of captopril in pharmaceutical tablets by anion-exchange HPLC using indirect photometric detection; a study in systematic method development; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25, **2001**, 39.
- MORENO GÁLVEZ, A.; GARCÍA MATEO, J.V.; MARTÍNEZ CALATAYUD, J. Simultaneous dissolution profiles of two drugs, sulfadiazine-trimethoprim and amitriptyline-perphenazine, in solid oral dosage forms by a FIA manifold provided with a single spectrophotometric detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, **2002**, 535.
- NAGATA, N. Uso de métodos de calibração multivariada na análise de amostras de interesse industrial e espécies de importância ambiental por fluorescência e raios-X. *Tese de Doutorado. IQ-UNICAMP*, **2001**.
- NI, Y.; QI, Z.; KOKOT, S. Simultaneous ultraviolet–spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. *Chemomet. Intellig. Lab. Syst.* 82, **2006**, 241.
- OH, J.G.; JANG, W.J.; CHI, S.C. Validation of a HPLC method for the quantification and purity determination of SK3530 IM drug substance and tablet. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, **2007**, 1179.
- OUYANG, J.; BAEYENS, W.R.G.; DELANGHE, J.; VAN DER WEKEN, G.; VAN DAELE, W.; DE KEUKELEIRE, D.; GARCÍA CAMPANA, A.M. Chemiluminescence-based liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide and captopril. *Anal. Chim. Acta* 386, **1999**, 257.
- PARHAM, H.; ZARGAR, B. Square-wave voltammetric (SWV) determination of Captopril in reconstituted serum and pharmaceutical formulations. *Talanta* 65, **2005**, 776.

- PARISOTTO, G.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C.; MOLZ, R.F. Determination of amoxicillin content in powdered pharmaceutical formulations using DRIFTS and PLS. *Braz. J. of Pharm. Sci.* 43, **2007**.
- PELL, R.; SEASHOLTZ, M.; KOWALSKI, B. The relationship of closure, mean centering and matrix rank interpretation. *J. Chemomet.* 6, **1992**, 52.
- PEREIRA, A.S.; BICALHO, B.; LILLA, S.; DE NUCCI, G. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. *Quim. Nova* 28, **2005**, S107.
- PEETERS, K.; DE MAESSCHALCK, R.; BOHETS, H.; VANHOUTTE, K.; NAGELS, L. In situ dissolution testing using potentiometric sensors. *Euro. J. Pharm. Sci.* 34, **2008**, 243.
- PIMENTA, A.M.; ARAÚJO, A.N.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M. Sequential injection analysis of captopril based on colorimetric and potentiometric detection. *Anal. Chim. Acta* 438, **2001**, 31.
- PORTAL DO CORAÇÃO. Responsável Técnico: Dr. Tufi Dippe Jr. CRM 13700-PR. Medicamentos Antihipertensivos. Acesso pelo site: <http://portaldocoracao.uol.com.br/resultado.php?id=969>, em 08 de maio de **2009**.
- PRIETO, J.A.; JIMÉNEZ, R.M.; ALONSO, R.M. Square wave voltammetric determination of the angiotensin converting enzyme inhibitors cilazapril, quinapril and ramipril in pharmaceutical formulations. *IL Fármaco* 58, **2003**, 343.
- PRIETO, J.A.; AKESOLO, U.; JIMÉNEZ, R.M.; ALONSO, R.M. Capillary zone electrophoresis applied to the determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril and its active metabolite in pharmaceuticals and urine. *J. Chromatog. A* 916, **2001**, 279.
- PULGARÍN, J.A.M.; BERMEJO, L.F.G.; LÓPEZ, P. F. Sensitive determination of captopril by time-resolved chemiluminescence using the stopped-flow analysis based on potassium permanganate oxidation. *Anal. Chim. Acta* 546(1), **2005**, 60.
- PULGARÍN, J.A.M.; MOLINA, A.A.; PÉREZ-OLIVARES NIETO, G. Determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations by time resolved chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta* 518, **2004**, 37.
- QUENTAL, C.; ABREU, J.C.; BOMTEMPO, J.V.; GADELHA, C.A.G. Medicamentos genéricos no Brasil: impactos das políticas públicas sobre a indústria nacional. *Cien. Saúde Col.* 13, **2008**, 619.
- QURESHI, S.A.; SHABNAM, J. Applications of a new device (sprindle) for improved characterization of drug release (dissolution) of pharmaceutical products. *Euro. J. Pharm. Sci.* 19, **2003**, 291.
- QURESHI, S.A.; MCGILVERAY, I.J. A critical assessment of the USP dissolution apparatus suitability test criteria. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21, **1995**, 905.

- RAGNO, G.; IOELE, G.; RISOLI, A. Multivariate calibration techniques applied to the spectrophotometric analysis of one-to-four component systems. *Anal. Chim. Acta* 512, **2004**, 173.
- RAO, Y.K.; CHOU, C.H.; TZENG, Y.M. A simple and rapid method for identification and determination of cordycepin in *Cordyceps militaris* by capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta*. 566, **2006**, 253.
- RAZAK, O.A. Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, **2004**, 433.
- REZAEI, B.; DAMIRI, S. Voltammetric behavior of multi-walled carbon nanotubes modified electrode-hexacyanoferrate (II) electrocatalyst system as a sensor for determination of captopril. *Sensors and Actuators B* 134, **2008**, 324.
- REZENDE, K.R.; MUNDIM, I.M., TEIXEIRA, L.S.; SOUZA, W. C.; RAMOS, D.R.; CARDOSO, C. R.F.; SOUZA, I.C.; GRATÃO, M.Z.; BELLÓRIO, K. B. Determination of captopril in human plasma, using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography, coupled to mass spectrometry: Application to bioequivalence study. *J. Chromatog. B*, **2006**.
- RIBEIRO, P.R.S.; SANTINI, A.O.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. Potentiometric determination of captopril in pharmaceutical formulations. *Ecl. Quím.* 28, **2003**.
- ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008: A review. *Anal. Chim. Acta* 635, **2009**, 22.
- ROSSI, R.C.; DIAS, C.L.; DONATO, E.M.; MARTINS, L.A.; BERGOLD, A.M.; FRÖHLICH, P.E. Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules based on *in vivo* data. *Int. J. Pharm.* 338, **2007**, 119.
- SALEM, I.; SAIF, W. A.; JMEIAN, Y.; AL TAMIMI, J.I. 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.* 37, **2005**, 1073.
- SANTELLI, J.L.; MION JR, D. Captopril associado à hidroclorotiazida no tratamento da hipertensão leve e moderada. Estudo multicêntrico brasileiro. *Arq. Bras. Cardiol.* 71, **1998**, 713.
- SENA, M.M.; FREITAS, C.B.; SILVA, L.C.; PÉREZ, C.N.; DE PAULA, Y.O. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. *Quim. Nova* 30, **2007**, 75.

- SENA, M.M.; POPPI, R.J. N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, **2004**, 27.
- SENA, M.M.; FERNANDES, J.C.B.; ROVER, L.; POPPI, R.J.; KUBOTA, L.T. Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* 409, **2000**, 159.
- SHAHROKHIAN, S.; KARIMI, M.; KHAJEHSHARIFI, H. Carbon-paste electrode modified with cobalt-5-nitrosalophen as a sensitive voltammetric sensor for detection of captopril. *Sens. Actuators B* 109, **2005**, 278.
- SHAMA, S.A.; AMIN, A. EL-S.; OMARA, H. Colorimetric microdetermination of captopril in pure form and in pharmaceutical formulations. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 102, **2006**, 261.
- SHAMSIPUR, M.; SHAFIEE-DASTGERDI, L.; TALEBPOUR, Z.; HAGHGOO, S. ¹⁹F NMR as a powerful technique for the assay of anti-psychotic drug haloperidol in human serum and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, **2007**, 1116.
- SIANGPROH, W.; NGAMUKOT, P.; CHAILAPAKUL, O. Electrochemical determination of captopril at boron-doped diamond thin film electrode applied to a flow injection system. *Sens. Actuators B* 91, **2003**, 60.
- SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. Fundamentos da Química Analítica. Trad. 8ª ed. Americana, São Paulo, Thomson, **2006**.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial; Capítulo 1: Epidemiologia da Hipertensão Arterial, páginas 5 a 6; **2006**. Acesso pelo site: <http://departamentos.cardiol.br/dha/vdiretriz/vdiretriz.asp>, em 08 de maio de **2009**.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial; Capítulo 6: Tratamento Medicamentoso, página 28; **2006**. Acesso pelo site: <http://departamentos.cardiol.br/dha/vdiretriz/vdiretriz.asp>, em 08 de maio de **2009**.
- SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada. *Braz. J. Pharm. Sci.* 42, **2006**.
- SOTOMAYOR, M.D.P.T.; DIAS, I.L.T.; LANZA, M.R.V.; MOREIRA, A.B.; KUBOTA, L.T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Quim. Nova* 31, **2008**, 1755.

- STEFAN, R.I.; VAN STADEN, J.K.F.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Amperometric biosensors/sequential injection analysis system for simultaneous determination of S- and R-captopril. *Biosens. & Bioelect.* 15, **2000**, 1.
- SULUB, Y.; LoBRUTTO, R.; VIVILECCHIA, R.; WABUYELE, B. Near-infrared multivariate calibration updating using placebo: A content uniformity determination of pharmaceutical tablets. *Vib. Spec.*, **2007**.
- TIAN, F.; ZHANG, F.; SANDLER, N.; GORDON, K.C.; MCGOVERIN, C.M.; STRACHAN, C.J.; SAVILLE, D.J.; RADES, T. Influence of sample characteristics on quantification of carbamazepine hydrate formation by X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* 66, **2007**, 466.
- TOMŠŮ, D.; ICARDO, M.C.; CALATAYUD, J.M. Automated simultaneous triple dissolution profiles of two drugs, sulphamethoxazole–trimethoprim and hydrochlorothiazide–captopril in solid oral dosage forms by a multicommutation flow-assembly and derivative spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, **2004**, 549.
- TREVISAN, M.G. Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas. *Dissertação de Mestrado*, IQ-UNICAMP, **2003**.
- TZANAVARAS, P.D.; THEMELIS, D.G. Automated determination of flutamide by a validated flow-injection method: Application to dissolution studies of pharmaceutical tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**.
- ÚRBAN-MORLÁN, Z.; CASTRO-RIOS, R.; CHÁVES-MONTES, A.; MELGOZA-CONTRERAS, L.M.; PIÑÓN-SEGUNDO, E.; GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Determination of poloxamer 188 and poloxamer 407 using high-performance chromatography in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, **2007**.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 31. NF 25, Volume 2. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, **2008**.
- VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Quim. Nova* 32, **2009**, 1278.
- VALDERRAMA, P. Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo. *Dissertação de Mestrado*, IQ-UNICAMP, **2005**.
- VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. *Arq. Mudi.* 11(2), **2007**, 26.

- VENKATACHALAM, A.; CHATTERJEE, V. S. Stability-indicating high performance thin layer chromatography determination of Paroxetine hydrochloride in bulk drug and pharmaceutical formulations. *Anal. Chim. Acta* 598, **2007**, 312.
- WADE, N.; MILLER, B, K.; Determination of active ingredient within pharmaceutical preparations using flow injection mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, **2005**, 669.
- WU, H.; TAWAKKUL, M.; WHITE, M.; KHAN, M.A. Quality-by-Design (QbD): An integrated multivariate approach for the component quantification in powder blends. *Int. J. Pharm.* 372, **2009**, 39.
- ZAITUNE, M.P.A.; BARROS, M.B. de A.; CÉSAR, C.L.G.; CARANDINA, L.; GOLDBAUM, M. Hipertensão arterial em idosos: prevalência, fatores associados e práticas de controle no Município de Campinas, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 22(2), **2006**, 285.

