

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Patrícia Fernanda Monteiro

**Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação
orbital em frascos: padronização e definição dos
fármacos controle**

Ouro Preto

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

**Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação
orbital em frascos: padronização e definição dos
fármacos controle**

Patrícia Fernanda Monteiro

Orientadora: Prof^a Dra. Jacqueline de Souza

Co-Orientadora: Prof^a Dra. Neila Márcia Silva Barcellos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ouro Preto
2014

M775s Monteiro, Patrícia Fernanda.
Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos
[manuscrito]: padronização e definição dos fármacos controle / Patrícia Fernanda
Monteiro. – 2014.
158f.: il. color., graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline de Souza e Neila Márcia Silva-Barcellos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Farmácia.
Área de concentração: Farmacologia de Produtos Naturais.

1. Farmacologia - Teses. 2. Fármacos - Teses. 3. Biofarmácia - Teses.
I. Souza, Jacqueline de. II. Silva-Barcellos, Neila Márcia. III. Universidade
Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.015.1

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 88ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Patrícia Fernanda Monteiro** com a defesa da dissertação intitulada: “Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos: Padronização e definição dos fármacos controle”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 23 de julho de 2014.

Prof. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
USP

Prof. Dra. Flávia Dias Marques Marinho
UFOP

Prof. Dra. Jacqueline de Souza
UFOP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me abençoar todos os dias.

Às orientadoras Prof. Dra. Jacqueline de Souza e Prof. Dra. Neila Márcia da Silva Barcellos pela confiança depositada em mim para condução desse trabalho, pela oportunidade de atuar em um projeto de grande relevância na saúde pública e por contribuírem para o meu engrandecimento como pessoa.

À minha família: meus pais, Maria e Benedito, pelo apoio e, por sempre me estimularem na busca de novos conhecimentos, em especial à minha mãe por toda ajuda e disponibilidade sempre. Às minhas irmãs: à Cíntia agradeço por toda ajuda em todos os momentos, amizade, companheirismo de toda uma vida. Mesmo estando longe você fez a diferença nesse período final. À Luciana, agradeço pelo companheirismo, amizade e apoio. Aos meus lindos sobrinhos Vinícius e Beatriz, alegria e luz da minha vida.

Ao meu namorado Rory, pelo companheirismo, amizade, amor, e por me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Não tenho palavras para agradecer a infinita contribuição e apoio, em muitos sentidos, nesse e em todos os momentos da minha vida.

À Patricia Capellari que se tornou uma grande amiga. Agradeço pela amizade, apoio, ajuda em muitos momentos deste trabalho, e por ser uma excelente profissional. À Mirela Pena Fagundes, agradeço pela ajuda, apoio e amizade.

À Adriana Cotta pela amizade, contribuição, competência, cumplicidade, e por tornar os momentos no laboratório mais alegres. Obrigada pelo apoio de sempre, e por ter se tornando uma grande amiga.

Ao professor Dr. Ricardo Tavares (UFOP) agradeço muito pelas contribuições nas análises estatísticas. Agradeço a prestatividade, competência e atenção.

À Débora Lopes e Mônica Auxiliadora de Paula, agradeço a amizade, a alegria e a disponibilidade em sempre ajudar.

Ao Délio, Gleiciely, Levi, Líliam Teixeira, Ana Paula, Cristiane, Walyson e Isabel pela amizade e apoio.

Às amigas do LCQ: Agradeço pela amizade, risadas, companheirismo e contribuições: Amanda, Marina, Janine, Lorena, e todas as demais alunas de iniciação científica do laboratório.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A solubilidade de um fármaco nos líquidos biológicos é fator primordial para sua absorção e atividade terapêutica. O método da agitação orbital em frasco (*shake-flask*) para avaliação da solubilidade de fármacos é o mais aceito e recomendado pelas entidades reguladoras. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) propõe o agrupamento dos fármacos em quatro classes de acordo com sua solubilidade em condições fisiológicas e permeabilidade nas membranas biológicas. Para correta classificação dos fármacos, de acordo com o SCB, é importante a disponibilidade de dados confiáveis de solubilidade e permeabilidade. Os dados de solubilidade e as informações advindas do SCB podem ser empregados para decisão quanto à bioisenção de novos produtos. É importante ressaltar que ainda não existem, na literatura científica, protocolos padronizados do método da agitação orbital em frascos empregando fármacos de alta e baixa solubilidade. Por consequência, muitos dados disponíveis apresentam grande discrepância, devido às diferentes condições experimentais empregadas nos testes. Neste estudo foi selecionado como fármaco controle de baixa solubilidade a nimesulida e, como controle de alta solubilidade, o propranolol. Foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta, para quantificação de nimesulida, e um método por CLAE para quantificação de propranolol com detecção por fluorescência, em cada um dos meios tamponados que mimetizam as condições fisiológicas do TGI (fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE pH 1,2), tampão acetato (TA pH 4,5) e suco entérico simulado sem enzimas (SESSE pH 6,8)). Os métodos foram validados e mostraram serem seletivos, lineares, precisos, exatos e robustos. Posteriormente, foram avaliadas as solubilidades da nimesulida e propranolol utilizando o método da agitação orbital em frascos, com as condições do teste ajustadas. Em seguida, foram selecionadas e analisadas condições experimentais do método (quantidade do excesso de matéria prima, temperatura, velocidade de agitação e volume da alíquota retirada) que poderiam afetar as avaliações das solubilidades dos fármacos. A análise da influência de cada condição experimental foi realizada variando-se um parâmetro experimental por vez, mantendo-se os outros constantes. Foram comparadas as médias das solubilidades em equilíbrio das avaliações de solubilidade pela estatística *t* de *Student*, ($\alpha = 0,05$). Como principais resultados foram obtidos, para ambos os fármacos, que a temperatura empregada durante o teste deve ser rigorosamente controlada, pois esse parâmetro afetou os resultados de solubilidade. A velocidade de agitação de 150 rpm promoveu rápida obtenção do equilíbrio entre as fases. Para o fármaco de baixa solubilidade, a quantidade do excesso de matéria prima, demonstrou ser um parâmetro crítico, dessa forma recomenda-se a utilização de pequeno excesso. A partir dos resultados desse estudo, foram obtidas as principais recomendações para avaliação da solubilidade de fármacos pelo método da agitação orbital em frascos.

Palavras-chave: Método da agitação orbital em frasco; Nimesulida; Propranolol
Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB); Bioisenção.

ABSTRACT

Drug solubility in biological fluids is critical for its absorption and therapeutic activity. The shake-flask method used to evaluate drugs solubility is the most accepted and recommended by regulatory agencies. The Biopharmaceutical Classification System (BCS) proposes grouping of drugs into four classes according to their solubility under physiological conditions and permeability of biological membranes. The solubility data and information coming from SCB can be used to decide about biowaiver. Importantly, in the scientific literature, there are not standardized protocols of shake-flask method using drugs with high and low solubilities. Consequently, many available data present large discrepancy due to the different experimental conditions employed in the tests. In this study was selected as model compound: nimesulide (low solubility) and propranolol (high solubility). It was developed and validated an analytical method using liquid chromatography (HPLC). For nimesulide was used ultraviolet detection and for propranolol fluorescence detection. Each drug was quantified using buffered media simulating physiological conditions: simulated gastric fluid without enzymes, pH 1,2, acetate buffer, pH 4,5 and simulated intestinal fluid without enzymes, pH 6,8. The methods have been validated and shown to be selective, linear, precise, accurate and robust. Subsequently, the solubility of nimesulide and propranolol using the shake-flask method with the adjusted test conditions were assessed. Experimental conditions of the method were selected and analyzed (amount of raw material, temperature, stirring speed and volume withdrawal rate) that could affect the evaluations of solubility. The analysis of the effect of each experimental condition was carried out by varying experimental parameter at a time, keeping the others constant. The mean solubilities were compared by the Student's t test ($\alpha = 0.05$). The main results were obtained for both drugs, the temperature employed during the test must be strictly controlled, because this parameter affect the results of solubility. The stirring speed of 150 rpm promoted rapid achievement of equilibrium between phases. To the low solubility drug, the amount of raw material proves to be a critical parameter, so that the use of small excess is recommended. From the results of this study, the main recommendations for evaluation of drugs solubility by shake-flask method were obtained.

Key-words: Shake-flask method; Nimesulide; Propranolol; Biopharmaceutics
Classification System; Biowaiver

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da nimesulida	17
Figura 2 - Equação de Henderson Hasselbach	19
Figura 3 - Esquema do teste estatístico Durbin-Watson para avaliação da independência dos resíduos	27
Figura 4 - Fórmula utilizada para cálculo da precisão do método desenvolvido	28
Figura 5 - Fórmula utilizada para cálculo da exatidão do método desenvolvido	29
Figura 6 - Fórmula utilizada para cálculo do limite de detecção do método desenvolvido.....	31
Figura 7 - Fórmula utilizada para cálculo do limite de quantificação do método desenvolvido.....	31
Figura 8 - Espectro de UV da nimesulida SE e nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2; TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8) obtido com auxílio do detector DAD	33
Figura 9 - Cromatograma obtido da SE a partir do método farmacopeico (BRASIL, 2010) empregando fase móvel H ₂ O:CH ₃ CN (50:50 v/v), volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,8 mL min ⁻¹ e comprimento de onda de 220 nm.....	34
Figura 10 - Cromatograma obtido da SE : fase móvel H ₂ O:CH ₃ CN (50:50 v/v), volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,8 mL min ⁻¹) com comprimento de onda de 300 nm	34
Figura 11 - Cromatograma da SE (15 µg/mL) obtido com o método desenvolvido de quantificação da nimesulida (fase móvel H ₂ O:CH ₃ CN:HOAc (45:55:1 v/v/v), comprimento de onda de 300 nm, temperatura de 25 °C, fluxo de 1,2 mL/min, volume de injeção de 20 µL e coluna C18	35
Figura 12 - Cromatogramas obtidos para soluções de nimesulida em A: FGSEE (pH 1,2), B: TA (pH 4,5) e C: SESSE (pH 6,8) na concentração de 15 µg/mL , nas condições definidas para o método de quantificação da nimesulida por CLAE-UV.....	36
Figura 13 - Avaliação da estabilidade por meio da variação das áreas da nimesulida nos meios tamponados.....	37
Figura 14 - Cromatogramas obtidos com as soluções de nimesulida expostas à condições capazes de causar degradação sendo A: nimesulida em FGSSE (pH 1,2); B: em TA (pH 4,5); C: em SESSE (pH 6,8)	38

Figura 15 - Análise da pureza de pico para as soluções de nimesulida expostas a condições de degradação sendo A: nimesulida em FGSSE (pH 1,2); B: em TA (pH 4,5); C: em SESSE (pH 6,8), obtidas pelo software Empower 2 – Waters®	39
Figura 16 - Curva analítica do método de quantificação da nimesulida em FGSSE (pH 1,2).....	41
Figura 17 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da nimesulida em FGSSE (pH 1,2).....	41
Figura 18 - Curva analítica do método de quantificação da nimesulida em TA (pH 4,5)	42
Figura 19 - Figura XX – Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da nimesulida em TA (pH 4,5)	42
Figura 20 - Curva analítica do método de quantificação da nimesulida em SESSE (pH 6,8).....	43
Figura 21 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da nimesulida em SESSE (pH 6,8).....	43
Figura 22 - Fórmula estrutural do propranolol	55
Figura 23 - Espectro de UV do propranolol SE e nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2; TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8) obtido com auxílio do detector DAD.....	66
Figura 24 - Cromatogramas obtidos para soluções de propranolol em A: FGSEE (pH 1,2), B: TA (pH 4,5) e C: SESSE (pH 6,8) na concentração de 40 µg/mL , nas condições definidas para o método de quantificação do propranolol por CLAE-FLU	69
Figura 25 - Avaliação da estabilidade por meio da variação das áreas do propranolol nos meios tamponados	70
Figura 26 - Cromatogramas obtidos após exposição das soluções diluídas ao calor seco, sendo A (FGSSE, pH 1,2), B (TA, pH 4,5) e C (SESSE pH 6,8).....	72
Figura 27 - Curva analítica do método de quantificação do propranolol em FGSSE (pH 1,2).....	73
Figura 28 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do propranolol em FGSSE (pH 1,2).....	74
Figura 29 - Curva analítica do método de quantificação do propranolol em TA (pH 4,5)	74

Figura 30 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do propranolol em TA (pH 4,5).....	75
Figura 31 - Curva analítica do método de quantificação do propranolol em SESSE (pH 6,8).....	75
Figura 32 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do propranolol em SESSE (pH 6,8).....	76
Figura 33 - Fórmula utilizada para cálculo da de fármacos, de acordo com o SCB.....	89
Figura 34 - Esquema geral da avaliação da solubilidade pelo método da agitação orbital em frascos e indicação das condições avaliadas no estudo.....	101
Figura 35 - Avaliação da solubilidade da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8).....	106
Figura 36 - Avaliação da solubilidade do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8).....	108
Figura 37 - Varredura espectral da solução da nimesulida (5 µg/mL).....	135
Figura 38 - Varredura espectral da solução da nimesulida (30 µg/mL).....	135
Figura 39 - Reação da nimesulida em meio alcalino e formação do composto colorido (YAKABE, 1998).....	136
Figura 40 - Curva analítica do método espectrofotométrico de quantificação do nimesulida em FGSSE (pH 1,2).....	136
Figura 41 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do nimesulida em FGSSE (pH 1,2) (método espectrofotométrico).....	137
Figura 42 - Avaliação da seletividade do método espectrofotométrico de quantificação da nimesulida. Concentração da solução da nimesulida foi de 10 µg/mL, em FGSSE (pH 1,2).....	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coeficientes de partição octanol/água (1:10 v/v) da nimesulida em diversos solventes - adaptado de RAINSFORD (2005).....	18
Tabela 2 - Solubilidade aquosa da nimesulida em vários solventes e em relação à temperatura - adaptado de RAINSFORD (2005).....	19
Tabela 3 - Preparo das soluções de nimesulida, em FGSSE (pH 1,2), para avaliação do parâmetro linearidade do método cromatográfico	25
Tabela 4 - Preparo das soluções de nimesulida, em TA (pH 4,5), para avaliação do parâmetro linearidade do método cromatográfico	25
Tabela 5 - Preparo das soluções de nimesulida, em SESSE (pH 6,8), para avaliação do parâmetro linearidade do método cromatográfico	26
Tabela 6 - Concentração das soluções de nimesulida utilizada para avaliação da precisão nos métodos cromatográficos de quantificação do fármaco nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)	28
Tabela 7 - Concentração das soluções de nimesulida utilizada para avaliação da exatidão no método cromatográfico para quantificação do fármaco nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)	30
Tabela 8 - Avaliação da robustez do método para quantificação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8).....	32
Tabela 9 - Condições analíticas do método de quantificação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8).....	36
Tabela 10 - Avaliação dos resultados de pureza de pico das soluções diluídas da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)	40
Tabela 11 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação da nimesulida no meio FGSSE (pH 1,2), para $\alpha = 0,05$	44
Tabela 12 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação da nimesulida no meio TA (pH 4,5), para $\alpha = 0,05$	45
Tabela 13 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação da nimesulida no meio SESSE (pH 6,8), para $\alpha = 0,05$	45
Tabela 14 - Parâmetros da regressão linear obtidos para o método de quantificação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)	46

Tabela 15 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação da nimesulida em FGSSE (pH 1,2).....	47
Tabela 16 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação da nimesulida em TA (pH 4,5)	47
Tabela 17 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação da nimesulida em SESSE (pH 6,8)	48
Tabela 18 - Valores calculados da porcentagem (%) de recuperação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8), para avaliação da exatidão do método	49
Tabela 19 - LD e LQ para os métodos de quantificação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)	50
Tabela 20 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação da nimesulida no FGSSE (pH 1,2)	51
Tabela 21 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação da nimesulida no meio TA (pH 4,5)	51
Tabela 22 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação da nimesulida no SESSE (pH 6,8)	52
Tabela 23 - Variação da solubilidade aquosa do propranolol: dados obtidos na literatura.....	58
Tabela 24 - Preparo das soluções de propranolol, em FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8) para avaliação do parâmetro linearidade do método cromatográfico.....	63
Tabela 25 - Avaliação da robustez do método para quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8).....	65
Tabela 26 - Parâmetros cromatográficos para desenvolvimento de método para quantificação do propranolol (SE) utilizando diferentes concentrações de tampão fosfato e proporções dos componentes da fase móvel	67
Tabela 27 - Condições analíticas do método para quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8).....	70
Tabela 28 - Avaliação dos resultados de pureza de pico das soluções diluídas do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8).....	71
Tabela 29 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação do propranolol no meio FGSSE (pH 1,2), para $\alpha = 0,05$	77

Tabela 30 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação do propranolol no meio TA (pH 4,5), para $\alpha = 0,05$	77
Tabela 31 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação do propranolol no meio SESSE (pH 6,8), para $\alpha = 0,05$	78
Tabela 32 - Parâmetros da regressão linear obtidos para o método de quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8).....	79
Tabela 33 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação do propranolol em FGSSE (pH 1,2)	80
Tabela 34 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação do propranolol em TA (pH 4,5).....	80
Tabela 35 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação do propranolol em SESSE (pH 6,8)	81
Tabela 36 - Valores calculados da recuperação (%) do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8) para avaliação da exatidão dos métodos.....	82
Tabela 37 - LD e LQ para os métodos de quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)	83
Tabela 38 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação do propranolol no FGSSE (pH 1,2)	84
Tabela 39 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação do propranolol no meio TA (pH 4,5)	84
Tabela 40 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação do propranolol no meio SESSE (pH 6,8).....	85
Tabela 41 - Recomendações das agências reguladoras para condução da avaliação da solubilidade pelo método da agitação orbital em frascos	93
Tabela 42 - Preparo dos meios tamponados utilizados neste trabalho	98
Tabela 43 - Condições utilizadas na avaliação da solubilidade da nimesulida nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8)	99
Tabela 44 - Condições utilizadas na avaliação da solubilidade do propranolol nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8)	100

Tabela 45 - Condições utilizadas para avaliação dos parâmetros que podem afetar a solubilidade do fármaco controle de baixa solubilidade nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8).....	103
Tabela 46 - Condições utilizadas para avaliação dos parâmetros que podem afetar a solubilidade do fármaco controle de alta solubilidade nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8).....	103
Tabela 47 - Avaliação da normalidade (R de Ryan Joiner) e homoscedasticidade (tL de Levene) dos dados referentes a solubilidade do propranolol nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8), para $\alpha = 0,05$	105
Tabela 48 - Avaliação da normalidade (R de Ryan Joiner) e homoscedasticidade (tL de Levene) dos dados referentes a solubilidade do propranolol nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8), para $\alpha = 0,05$	105
Tabela 49 - Avaliação da solubilidade de nimesulida pelo método da agitação orbital em frascos nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)	107
Tabela 50 - Avaliação da solubilidade do propranolol pelo método da agitação orbital em frascos nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)	109
Tabela 51 - Relação D/S dos fármacos controle em cada meio FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)	110
Tabela 52 – Resultados das avaliações da solubilidade da nimesulida: solubilidade experimental e testes.....	112
Tabela 53 - Resultado da comparação para nimesulida entre a solubilidade experimental e testes: p-valor para cada avaliação teste nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8), $\alpha = 0,05$	113
Tabela 54 - Resultados das avaliações da solubilidade do propranolol: solubilidade experimental e testes.....	117
Tabela 55 - Resultado da comparação para propranolol entre a solubilidade experimental e testes: p-valor para cada avaliação teste nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8), $\alpha = 0,05$	118
Tabela 56 - Recomendações para avaliação da solubilidade de fármacos de alta e baixa solubilidade utilizando o método da agitação orbital em frascos.....	121
Tabela 57 - Preparo das soluções diluídas de nimesulida em FGSSE (pH 1,2), utilizando método espectrofotométrico (b)	134

Tabela 58 - Preparo das soluções de nimesulida, em FGSSE pH 1,2, para avaliação do parâmetro linearidade do método espectrofotométrico.....	135
Tabela 59 - Parâmetros da regressão linear obtidos para a quantificação espectrofotométrica da nimesulida em FGSSE (pH 1,2)	137

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a	Coeficiente linear
AINE	Antiinflamatório não esteroidal
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sobre a curva
b	Coeficiente angular
C18	Octadecilsilano
°C	Graus centígrados
CH ₃ CN	Acetonitrila
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CMD	Concentração média determinada
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CTT	Comitê técnico temático
DAD	Arranjo de diodos
D/S	Relação dose: solubilidade
DPD	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
mEU	Miliunidades de emissão
FB 5	Farmacopeia Brasileira 5ª edição
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFSOLI	Forma farmacêutica sólida oral de liberação imediata
FGSSE	Fluido gástrico simulado sem enzimas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
h	Horas
H ₂ O	Água

HCl	Ácido clorídrico
HOAc	Ácido acético glacial
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
ICH	<i>The International Conference on Harmonisation</i>
K'	Fator de cauda
LD	Limite de detecção
Log P	Coeficiente de partição octanol:água
Log S	Logaritmo da solubilidade (mol/L)
LQ	Limite de quantificação
M	mol/L
AU	Unidades de absorbância
mg	Miligramas
mL	Mililitro
min	Minutos
mm	Milímetro
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
NMS	Nimesulida
OMS	Organização Mundial de Saúde
P.A.	Para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de acidez
R	Coeficiente de correlação
R ²	Coeficiente de determinação
RE	Resolução
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotação por minuto

SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SE	Solução estoque
SESSE	Suco entérico simulado sem enzimas
SQR	Substância química de referência
TA	Tampão acetato
T	Fator de retenção
TGI	Trato Gastrointestinal
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
VDI	Velocidade de dissolução intrínseca
v/v/v	Volume por volume por volume
v/v	Volume por volume
WHO	<i>World Health Organization</i>
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
α	Nível de significância

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Biofarmácia e o sistema de classificação biofarmacêutica.....	5
3 OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo geral	11
3.2 Objetivos específicos.....	11
4 ESCOLHA DOS FÁRMACOS CONTROLE PARA PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO MÉTODO DA AGITAÇÃO ORBITAL EM FRASCO	12
CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DE NIMESULIDA NOS MEIOS FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8).....	
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 Nimesulida.....	16
2 Material e Métodos	21
2.1 Material.....	21
2.2 Métodos.....	22
3 Resultados e Discussão	33
3.1 Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação da nimesulida nos estudos de solubilidade, realizado no FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8).....	33
3.2 Avaliação da estabilidade da solução estoque (SE) e soluções diluídas	37
3.3 Validação do método analítico.....	38
4 CONCLUSÕES	53

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-FLU PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROPRANOLOL NOS MEIOS FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)..... 54

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	55
1.1	Propranolol	55
2	Material e Métodos	59
2.1	Material.....	59
2.2	Métodos.....	60
3	Resultados e Discussão	66
3.1	Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5); SESSE (pH 6,8)	66
3.2	Avaliação da estabilidade da solução estoque (SE) e soluções diluídas	70
3.3	Validação do método analítico.....	71
4	CONCLUSÕES	86

CAPÍTULO IV – PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DA AGITAÇÃO ORBITAL EM FRASCO PARA A AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE FÁRMACOS 87

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	88
1.1	Solubilidade de Fármacos	88
2	Material e Métodos	96
2.1	Material.....	96
2.2	Métodos.....	97
3	Resultados e Discussão	105
3.1	Determinação da solubilidade em equilíbrio dos fármacos controle de alta e baixa solubilidade pelo método da agitação orbital em frasco (<i>shake-flask</i>)	105
3.2	Análise dos parâmetros que podem afetar as avaliações da solubilidade em equilíbrio dos fármacos controle pelo método da agitação orbital em frascos (<i>shake-flask</i>).....	110
3.3	Recomendações para avaliação da solubilidade de fármacos utilizando o método da agitação orbital em frascos (<i>shake-flask</i>)	120

4	CONCLUSÕES	122
	REFERÊNCIAS	123
	APÊNDICE A.....	133

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A atividade farmacológica do fármaco é fator fundamental para a ação terapêutica de um medicamento, porém não é o único, sendo o desenvolvimento farmacotécnico igualmente essencial. A Biofarmácia é a ciência que estuda a influência das características físico-químicas de fármacos e formas farmacêuticas sobre os efeitos dos medicamentos. Estudos biofarmacêuticos revelam que a qualidade de um medicamento está relacionada, não somente com características fundamentais como teor, pureza, potência e identidade, mas também com o perfil de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, considerando fatores como dissolução e biodisponibilidade (STORPIRTIS; GAI, 2009)

Estudos de bioequivalência e biodisponibilidade são realizados para registro de medicamentos genéricos e similares no Brasil e se constituem de ensaios comparativos, realizados com seres humanos, onde são avaliados parâmetros como pico da concentração plasmática máxima (C_{max}) e área sobre a curva (ASC) (ARAÚJO et al., 2010). Estes estudos têm grande importância, pois correspondem ao padrão aceito para assegurar o desempenho terapêutico de medicamentos (TAKAGI et al., 2006). Apesar disso, estes estudos podem apresentar limitações técnicas, econômicas e éticas. Dessa forma, há uma demanda por métodos *in vitro* que possam substituir métodos em *in vivo*, promovendo diminuição da exposição de voluntários sadios e redução dos custos com os estudos de bioequivalência. Isso contribui economicamente para as políticas públicas de saúde, com impacto visível principalmente para países em desenvolvimento, como o Brasil, ocasionando, muitas vezes, a redução de gastos e de repasse ao consumidor de custos referentes aos ensaios de bioequivalência (BENET et al., 2008).

No contexto exposto, em 1995, foi proposto por AMIDON et al. (1995), o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) que classifica os fármacos em quatro classes diferentes, com base na solubilidade do próprio fármaco e na sua permeabilidade intestinal. O SCB tem sido útil para avaliar como e quando os testes de dissolução podem contribuir no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e na avaliação das mesmas, além de ter uma importante aplicação na prática regulatória, norteadando a possibilidade de bioisenção no processo de obtenção de registro para medicamentos genéricos e similares (TAKAGI et al., 2006).

Assim, bioisenção pode ser definida como a isenção ou substituição de testes *in vivo* de bioequivalência por avaliações *in vitro* que, uma vez associadas aos testes de equivalência farmacêutica possibilitam a comprovação da equivalência terapêutica. De forma geral, os fármacos presentes na formulação devem apresentar alta solubilidade e permeabilidade e o medicamento deve apresentar rápida dissolução, caracterizada por solubilização de 85% do fármaco em 30 minutos em condições pré-definidas (BRASIL, 2011).

Na prática regulatória, o SCB como critério de bioisenção vem sendo utilizado pelas Agências Americana (*Food and Drug Administration - FDA*) (*FDA - Guidance for Industry*, 2000), Europeia (*European Medicines Agency - EMA*) (*EMA Guideline*, 2008) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (*WHO Technical Report Series*, 2006). O Brasil passou a ter a mesma conduta ao definir o SCB como critério para bioisenção de medicamentos por meio da publicação da RDC 37/2011 (BRASIL, 2011). Esta resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), além de inserir na legislação o SCB como possível critério para bioisenção de medicamentos pertencentes à Classe I do SCB, criou uma lista dinâmica que possui atualmente 14 fármacos que são passíveis de bioisenção (BRASIL, 2013a).

Os estudos de dissolução, para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI), estão bem sedimentados e padronizados mundialmente (SOUZA et al., 2007). No entanto os estudos de solubilidade em equilíbrio, de fármacos aplicados à possibilidade de bioisenção, são ainda incipientes e necessitam de padronização das condições dos testes relacionados.

Desta forma é de suma importância a padronização de metodologias que possibilitem mimetizar as condições fisiológicas e determinar a solubilidade dos fármacos, nestas condições. A padronização do teste de solubilidade em equilíbrio para fármacos, utilizando o método da agitação orbital em frasco, poderá contribuir para a obtenção de resultados confiáveis, acerca da solubilidade de fármacos e conseqüentemente possibilitará uma importante redução dos riscos inerentes à decisão sobre bioisenção. Com o objetivo de padronizar o teste da solubilidade em equilíbrio, pelo método da agitação orbital em frascos, foi definido como fármaco controle de baixa solubilidade a nimesulida e, como de alta solubilidade, o propranolol.

Neste contexto e diante da importância do tema, a Anvisa vem subsidiando ações dos membros do Comitê Técnico Temático (CTT) de Equivalência Farmacêutica, Dissolução, Biodisponibilidade e Bioequivalência da Farmacopeia Brasileira, visando elaborar um capítulo para sua 6ª edição, delineando os procedimentos necessários à execução do estudo de solubilidade em equilíbrio pelo

método da agitação orbital em frasco. Este investimento da Anvisa gerou um projeto de colaboração desta agência com a UFOP (Universidade Federal de Ouro Preto) do qual fazem parte os membros do CTT e pesquisadores da UFOP, delineando assim o objetivo geral desta dissertação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biofarmácia e o sistema de classificação biofarmacêutica

A Biofarmácia é a ciência que estuda a influência das características físico-químicas de fármacos e formas farmacêuticas sobre os efeitos dos medicamentos. Esta tem evoluído ao longo dos anos na busca de garantia de segurança, eficácia e qualidade de fármacos e formas farmacêuticas (BONAMICI, 2009).

Estudos biofarmacêuticos revelam que a qualidade de um medicamento está relacionada, não somente com características fundamentais como teor, pureza, potência e identidade, mas também com o perfil de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, considerando fatores como dissolução e biodisponibilidade (STORPIRTIS; GAI, 2009). Dentro deste contexto foi desenvolvido o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).

O SCB foi proposto por AMIDON et al. (1995). Este sistema permitiu a classificação dos fármacos com base nos parâmetros de solubilidade e permeabilidade, em quatro classes, como mostrado no Quadro 1.

Quadro 1 – O sistema de classificação biofarmacêutica (adaptado de AMIDON et al. (1995))

Classe	Solubilidade	Permeabilidade
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

A partir das informações inerentes aos fármacos contidos em cada classe, AMIDON et al. (1995) delinearam as seguintes observações que podem advir de dados experimentais e/ ou teóricos:

Classe I: os fármacos pertencentes a essa classe são bem absorvidos e o fator limitante para a absorção é a dissolução ou o esvaziamento gástrico, caso a dissolução seja muito rápida. A velocidade de absorção de formas farmacêuticas

sólidas de liberação imediata que se dissolvem muito rápido é controlada pelo esvaziamento gástrico, e não é esperada nenhuma correlação com a velocidade de dissolução.

Classe II: para estes fármacos a dissolução *in vivo* é a etapa limitante no processo de absorção. O perfil de dissolução irá determinar a concentração do fármaco em cada porção específica do TGI. Para estes fármacos a permanência nestas porções ocorrerá por um período bem maior sendo a absorção possível em um tempo mais longo, quando comparado com o fármaco da classe I. Espera-se, assim, que os fármacos desta classe tenham absorção variável devido aos fatores associados à formulação e condições *in vivo* que possam afetar a dissolução.

Classe III: neste caso, a permeabilidade é o fator que controla a absorção. O perfil de dissolução será bem definido e a simplificação das especificações de dissolução, assim como para fármacos da classe I, será aplicável para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata, onde a passagem do fármaco para o intestino é controlada pela velocidade de esvaziamento gástrico. Tanto a velocidade quanto à extensão da absorção podem ser altamente variáveis para esta classe de fármacos.

Classe IV: estes fármacos apresentam problemas significativos para a administração oral e possuem alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção. Em decorrência de diferenciados limites para definição de alta permeabilidade indicados por agências reguladoras, a quantidade de fármacos classificados nesta categoria poderá variar.

De acordo com LINDENBERG et al. (2004), desde que o SCB foi introduzido, o sistema tem tido um crescente impacto na prática regulatória. Possibilitou um novo paradigma para os estudos de bioequivalência baseado em princípios científicos.

O principal objetivo do SCB é o de estimar o desempenho farmacocinético *in vivo* de uma forma farmacêutica, tomando-se como base os dados de permeabilidade e solubilidade. Com isso, é proporcionada uma grande contribuição no momento da tomada de decisões quanto à possibilidade de isenção dos estudos de bioequivalência (KARALIS et al., 2008).

2.1.1 Bioisenção

A bioisenção é definida como a isenção ou substituição de testes *in vivo* de bioequivalência por avaliações *in vitro*. Essas avaliações, associadas aos testes de

equivalência farmacêutica, possibilitam a comprovação da equivalência terapêutica. Para tanto os fármacos presentes na formulação devem apresentar alta solubilidade e permeabilidade, e o medicamento deve ter rápida dissolução (BRASIL, 2011).

Para AMIDON et al. (2011), os estudos de bioequivalência ainda são considerados testes padrões tanto para os medicamentos inovadores quanto genéricos. Entretanto, a questão de quais evidências científicas são necessárias para a garantia da bioequivalência está sendo muito discutida. Os testes convencionais de bioequivalência possuem diversos limites em sua aplicabilidade, como por exemplo:

a) Alto custo financeiro

O custo dos medicamentos, para alguns pacientes, muitas vezes é um grande empecilho para que os mesmos continuem o tratamento medicamentoso adequadamente. Há uma estimativa de que até 32% de idosos, nos Estados Unidos, interrompem o tratamento devido aos custos (SOUMERAI et al., 2006). Os estudos *in vivo* elevam o valor final do medicamento. Assim, os estudos *in vitro* com base no SCB, tem potencial de promover reduções dos custos financeiros dos medicamentos, quando a bioequivalência é evidente. Isso deve ser considerado, sobretudo para países em desenvolvimento econômico (POLLI, 2008).

b) Estudos *in vitro* podem avaliar mais diretamente os fármacos e o desempenho das formas farmacêuticas do que os *in vivo*

O processo de absorção dos fármacos é composto pela liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, e permeação nas membranas biológicas. Considera-se que os estudos *in vitro* avaliam mais diretamente a absorção dos fármacos, do que os estudos *in vivo*. Os métodos de avaliação da dissolução dos medicamentos e permeação dos fármacos *in vitro* são amplamente estudados e estabelecidos. Esses métodos permitem uma importante avaliação de fármacos e formas farmacêuticas (WU; BENET, 2005).

c) Estudos *in vitro* oferecem benefícios quanto à questão ética, em comparação aos estudos *in vivo*.

A realização dos estudos de bioequivalência convencionais, em indivíduos saudáveis, é inviável do ponto de vista ético, e se torna ainda mais crítico, quando os testes são realizados apenas devido a pequenas modificações na forma farmacêutica, como a mudança do corante utilizado, ou quando o fármaco possui efeitos adversos graves, como os antineoplásicos e os imunoterápicos (POLLI, 2008).

Em 1996, o FDA publicou um guia, contendo orientações sobre a realização de testes de bioequivalência para a clozapina. A agência recomendava que indivíduos saudáveis não participassem dos testes com o medicamento uma vez que, havia relatos de experiências anteriores, demonstrando que um grande número de voluntários submetidos ao estudo, apresentaram diversos efeitos adversos graves decorrentes do uso do medicamento. Dentre os efeitos indesejáveis, foram citados: hipotensão, bradicardia, síncope e assistolia (FDA, 2005).

Assim, a bioisenção baseada no SCB, tem grande importância no cenário da regulamentação de medicamentos, e é indicada em algumas situações, em que os testes *in vivo* podem ser substituídos por testes *in vitro* para determinar a bioequivalência de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI) (COOK et al., 2010).

Agências reguladoras, em todo o mundo, possuem guias sobre bioisenção baseados no SCB. O guia precursor foi publicado pelo FDA em agosto de 2000. Este guia ainda encontra-se em vigor, e preconiza a isenção de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência para fármacos altamente solúveis e permeáveis (classe I) contidos em FFSOLI, desde que a forma farmacêutica apresente rápida dissolução, ou seja, não menos que 85% em 30 minutos. Deve ser comprovada a alta solubilidade, permeabilidade e rápida dissolução, de acordo com a metodologia descrita no guia (FDA, 2000).

Em 2001, a Agência Europeia de Medicamentos¹ (EMA), também elaborou um guia sobre bioisenção (EMA, 2001), sendo que este foi atualizado em 2008 (EMA, 2008). Neste guia, a bioisenção com base no SCB é aplicável, para fármacos que possuam alta solubilidade e absorção completa (classe I), que apresentem características de dissolução *in vitro* no mínimo, rápida e que os excipientes não ocasionem impacto sobre a biodisponibilidade. A EMA considera também a bioisenção baseada no SCB para fármacos classe III, ou seja, altamente solúveis e com absorção limitada. Porém, os medicamentos devem ter comprovada dissolução *in vitro* muito rápida (85% em 15 minutos) (EMA, 2008).

Além dos guias mencionados, a Organização Mundial de Saúde (OMS) também publicou um anexo sobre o assunto, em 2006, (*Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-*

¹ A partir de dezembro de 2009, a Agência Europeia de Medicamentos, que outrora era denominada EMEA, passou a ser denominada pela sigla EMA.

release, solid oral dosage forms, Annex 8) dentro do documento '*WHO Technical Report Series n^o937*'. Este recomenda critérios de bioisenção, baseados no SCB, considerados inovadores por serem menos rigorosos que os estabelecidos pelos guias citados anteriormente. Estas recomendações da OMS são aplicadas para fármacos que fazem parte da Lista de Medicamentos Essenciais publicada pela agência. A OMS propôs a revisão de alguns critérios de classificação dos fármacos e aplicação à bioisenção, por considerar os requisitos adotados pelo guia da FDA (FDA, 2000) muito estritos e conservadores. Uma notável reformulação realizada pela OMS foi a de considerar, como requisito para classificação de um fármaco, como de alta permeabilidade, a extensão de absorção de 85% ou mais, contestando os 90% de extensão de absorção preconizada pelo guia da FDA. Com essa proposta, alguns fármacos que antes eram classificados como classe III, passaram a ser considerados de classe I, como o paracetamol, ácido acetilsalicílico, lamivudina e alopurinol (WHO, 2006).

No Brasil foi publicado em 2011, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o guia que trata sobre bioisenção (BRASIL, 2011). Este guia preconiza a isenção de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência nos casos de fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis (classe I) em FFSOLI, desde que a forma farmacêutica apresente rápida dissolução. A comprovação da solubilidade, permeabilidade e dissolução deve ser realizada de acordo com o guia. Em sequência, a Anvisa também publicou uma lista com 12 fármacos passíveis de serem bioisentos. Em 2013, a agência atualizou a lista, incluindo mais 2 fármacos (BRASIL, 2013a).

No Quadro 2 estão mostrados os critérios de elegibilidade à bioisenção das agências citadas anteriormente.

Quadro 2 – Principais critérios para elegibilidade quanto à bioisenção preconizado pelas agências regulatórias ANVISA, EMA, FDA e pela OMS (adaptado de BELLAVINHA (2012))

Critérios para elegibilidade quanto à bioisenção	ANVISA	EMA	FDA	OMS
Classificação de acordo com o SCB	*Classe I	Classes I ¹ e III ²	Classe I	Classes I ³ , II ⁴ e III ⁵
Solubilidade	Maior dose solúvel em volume ≤ 250 mL, pH 1,2-6,8, 37°C.	Maior dose solúvel em volume ≤ 250 mL, pH 1-7,5, 37°C.	Maior dose solúvel em volume ≤ 250 mL, pH 1-7,5, 37°C.	Maior dose solúvel em volume ≤ 250 mL, pH 1-7,5, 37°C.
Permeabilidade	Absorção ≥ 85%	Absorção ≥ 85%	Absorção ≥ 90%	Absorção ≥ 85%
Dissolução	Dissolução rápida	Dissolução rápida ¹ / Dissolução muito rápida ²	Dissolução rápida	Dissolução rápida ³ Dissolução rápida em pH 6,8 ⁴ Dissolução muito rápida ⁵

*Os fármacos devem estar citados na Instrução Normativa nº 2 de 14 de março de 2013 que dispõe sobre a lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica.

A solubilidade dos fármacos deve ser comprovada experimentalmente por meio do método da agitação orbital em frascos (*shake-flask*). Este é o método de escolha para avaliar a solubilidade de fármacos (FDA, 2000; WHO, 2006; BRASIL, 2011). Ainda assim, os procedimentos experimentais do método não estão adequadamente estabelecidos e, devido à importância de sua aplicabilidade, é extremamente importante proceder à padronização.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Padronizar o teste de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos (*shake-flask*) utilizando um fármaco como controle de alta solubilidade, e um como controle de baixa solubilidade.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar fármacos com potencialidade para emprego como controle de alta e baixa solubilidade;
- Desenvolver e validar o método de quantificação do fármaco de baixa solubilidade nos meios fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE, pH 1,2), tampão acetato (TA, pH 4,5) e suco entérico simulado sem enzimas (SESSE, pH 6,8).
- Desenvolver e validar o método de quantificação do fármaco de alta solubilidade nos meios fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE, pH 1,2), tampão acetato (TA, pH 4,5) e suco entérico simulado sem enzimas (SESSE, pH 6,8).
- Realizar estudos de solubilidade em equilíbrio dos fármacos controle selecionados empregando o método da agitação orbital em frasco (*shake-flask*) à temperatura de 37°C, em meios simulando diferentes porções do TGI (pH 1,2; 4,5 e 6,8);
- Testar e selecionar as melhores condições experimentais para avaliação da solubilidade em equilíbrio empregando os fármacos controle de alta e baixa solubilidade.

4 ESCOLHA DOS FÁRMACOS CONTROLE PARA PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO MÉTODO DA AGITAÇÃO ORBITAL EM FRASCO

Foram pré-selecionados fármacos para serem utilizados como controles de alta: atenolol, metoprolol, propranolol e baixa solubilidade: furosemida e nimesulida.

Para seleção do fármaco controle de alta solubilidade, o metoprolol foi pré-selecionado por ser considerado padrão de escolha (padrão ouro) para os estudos de permeabilidade (FDA, 2000). Devido à ausência da SQR do mesmo na Farmacopeia Brasileira, foram pré-selecionados dois outros fármacos (atenolol e propranolol) com funções terapêuticas e estruturas próximas ao do metoprolol.

Em relação ao fármaco controle de baixa solubilidade, após revisão na literatura sobre esse tipo de fármaco, foi preconizada a seleção das substâncias em que a solubilidade e permeabilidade já estavam completamente elucidadas (LINDENBERG et al., 2004). Além disso, também foi observada a disponibilidade da SQR na Farmacopeia Brasileira. Assim, foram pré-selecionados a furosemida e a nimesulida.

Os critérios estabelecidos para seleção dos fármacos passíveis a serem utilizados como controles na padronização das condições experimentais do método da agitação orbital em frascos foram:

Estabilidade dos fármacos nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)

A necessidade de se realizar os estudos de solubilidade nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8) configura a importância dos fármacos controle escolhidos terem uma boa estabilidade nos mesmos. O desejável para as características de estabilidade dos fármacos controle seria ausência de produtos de degradação quando mantidos a 37 °C, por aproximadamente dois dias (tempo médio para realização do estudo de solubilidade). O tempo de dois dias possibilita a obtenção de um maior volume de dados dos experimentos de solubilidade, e obtenção de resultados confiáveis (BRASIL, 2011).

Substância química de referência com custo acessível

A utilização de fármacos em que estejam disponíveis sob a forma de SQR e tenham custo acessível foi preconizada neste estudo, para que a aplicabilidade da padronização não seja prejudicada por essa questão financeira.

Disponibilidade da substância química de referência na Farmacopeia Brasileira

A utilização de fármacos controle cuja SQR esteja disponível na Farmacopeia Brasileira foi altamente considerada para este estudo.

A importância é grande frente à percepção de que as SQRs não disponíveis na Farmacopeia Brasileira devem ser adquiridas no mercado internacional com alto custo e muitas vezes com a grande demora no processo de importação.

A utilização das SQRs da Farmacopeia Brasileira já está respaldada oficialmente em publicações da Anvisa, sendo obrigatórias em ensaios de controle de qualidade de medicamentos (BRASIL, 2012).

Toxicidade dos fármacos controle

A utilização de SQR com baixa toxicidade também foi um dos critérios preconizados para a escolha dos fármacos controle. Esta condição é importante a fim de evitar uma situação de risco à saúde dos analistas que tiveram e terão contato diariamente com as substâncias selecionadas.

Rapidez e facilidade do método de quantificação

A rapidez e facilidade dos métodos de quantificação dos fármacos controle foram condições consideradas neste estudo. É importante que as análises sejam rápidas, confiáveis, seguras, e para os métodos cromatográficos, é importante que a composição da fase móvel tenha solventes simples, de fácil obtenção, de forma que os métodos de quantificação sejam facilmente reprodutíveis e ocasionem menor geração de resíduos.

Quadro 3 – Critérios de escolha dos fármacos controle usados no estudo

Fármaco	Estabilidade dos fármacos nos meios	SQR com custo acessível	Disponibilidade da SQR na FB	Baixa toxicidade	Rapidez e facilidade do método de quantificação
Nimesulida	X	X	X	X	X
Furosemida		X	X	X	X
Propranolol	X	X	X	X	X
Atenolol	X	X	X	X	
Metoprolol	X	X		X	

De acordo com o Quadro 3, a nimesulida, escolhida como fármaco controle de baixa solubilidade, possui classificação de acordo com o SCB elucidada. Como será mostrado, o fármaco possui boa estabilidade nos meios tamponados usados neste trabalho, além estar disponível como SQR na Farmacopeia Brasileira. Possui baixa toxicidade quando manipulado, e como será descrito nas etapas subsequentes deste trabalho, o método para quantificação da nimesulida desenvolvido, foi rápido, simples, e possibilitou análises confiáveis e reprodutíveis (LINDENBERG et al., 2004; TZANAVARAS; THEMELIS, 2007; BRASIL, 2012).

O propranolol, fármaco controle de alta solubilidade selecionado, também possui classificação de acordo com o SCB definida. Como será mostrado, possui boa estabilidade nos meios tamponados, está disponível como SQR na Farmacopeia Brasileira. O método para quantificação do propranolol desenvolvido neste trabalho possui as mesmas características citadas para o método da nimesulida, e finalmente, possui baixa toxicidade quando manipulado (LINDENBERG et al., 2004; BRASIL, 2012; MUSKO; SZNITOWSKA, 2013).

Os outros fármacos avaliados não possuem os pré-requisitos preconizados neste trabalho, como mostrado no Quadro 4.

**CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR
CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DE
NIMESULIDA NOS MEIOS FGSSE (pH 1,2), TA
(pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)**

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Nimesulida

A nimesulida é um efetivo anti-inflamatório não esteroidal (AINE), pertencente à classe da sulfonilidas. Possui propriedades analgésicas, antitérmicas e anti-inflamatórias. O fármaco age inibindo preferencialmente a ciclooxigenase-2 (COX-2), e dessa forma apresenta maior tolerabilidade gástrica. Geralmente é utilizada em tratamentos de curto prazo. No Brasil, a nimesulida apresentada sob a forma de comprimidos na dose de 100 mg (DELLIS et al., 2007).

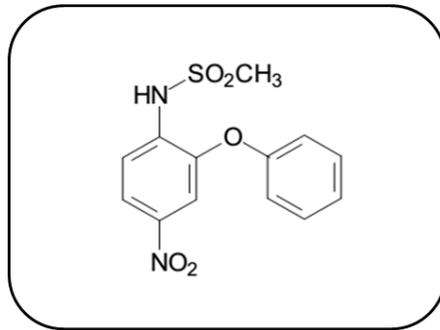
A nimesulida foi comercializada pela primeira vez na Itália em 1995, e desde então foi lançada em cerca de 50 países (TAN et al., 2007). No Brasil, sua utilização se iniciou na década de 90 (KULKARNI, 2002).

Após sua entrada no mercado, houve diversos relatos de toxicidade hepática e insuficiência hepática, com alguns casos fatais, relacionados ao uso de medicamentos contendo a nimesulida. Isso fez com que diversos países reavaliassem o perfil de segurança do fármaco, o que levou a retirada (temporária ou não) dos medicamentos contendo nimesulida, em países, como Israel e Espanha. Devido a preocupações com seu perfil de segurança, o fármaco nunca foi aprovado para uso em países como Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Austrália e Nova Zelândia. Em outros países, o fármaco é liberado para ser utilizado com restrições e, recomenda-se proceder a avaliações das funções hepáticas (MERLANI et al., 2001; TAN et al., 2007).

1.1.1 Propriedades físico-químicas

Como mostrado na Figura 1, a nimesulida (*N*-(4-nitro-2-fenoxifenil)metanosulfonamida) é um derivado da sulfonilida, tem peso molecular de 308,31 g/mol, e sua fórmula estrutural é $C_{13}H_{12}N_2O_5S$ (BRASIL, 2010).

Figura 1 - Fórmula estrutural da nimesulida



O valor do pKa do fármaco é de 6,4. É praticamente insolúvel em água. Tanto a solubilidade quanto a lipossolubilidade do fármaco é pH-dependente, devido à presença do grupo sulfonamida, em sua estrutura (DELLIS et al., 2007).

1.1.2 Propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e mecanismo de ação

O fármaco é rápida e extensivamente absorvido em sua forma oral (comprimidos, grânulos e suspensão), e tem um tempo de meia vida de eliminação relativamente curto, em seres humanos. A concentração plasmática máxima é de 3 a 4 µg/mL (KIM et al., 2012).

A nimesulida liga-se a proteínas plasmáticas, sobretudo a albumina, em aproximadamente 95 % (DAVIS; BROGDEN, 1994).

O fármaco exibe sua atividade farmacológica por meio de diversos mecanismos, sendo o principal a inibição seletiva da COX-2 (KIM et al., 2012). A cicloxigenase-1 (COX-1) controla a proteção gástrica e hemostasia vascular e, é expressada em vários tecidos. Dessa forma, a inibição da enzima COX-1, resulta em efeitos adversos gastrointestinais e renais. Por inibir prioritariamente a COX-2, a nimesulida está associada à redução da produção de prostaglandinas pró-inflamatórias, e produz efeitos terapêuticos de diminuição da inflamação, alívio da dor, com toxicidade gastrointestinal reduzida (KIM et al., 2012).

A nimesulida é eliminada principalmente por transformação metabólica, através da superfamília de enzimas componentes do citocromo P-450. O principal metabólito é

a 4-hidroxinimesulida, e este parece contribuir no efeito terapêutico da substância. Os metabólitos do fármaco são excretados na urina (70%) e nas fezes (20%), nas formas livres e conjugadas (TAN et al., 2007).

1.1.3 Classificação biofarmacêutica da nimesulida

Baseado no SCB, a nimesulida é considerada como fármaco de classe II, uma vez que esta possui baixa solubilidade nos meios do trato-gastrointestinal e alta permeabilidade nas membranas biológicas. Assim, a dissolução do fármaco nos meios biológicos, é o passo limitante para sua absorção (AMIDON et al., 1995; MUDIE et al., 2012).

O fármaco apresenta alta permeabilidade intestinal devido ao seu favorável balanço hidro-lipofílico e também a seu baixo peso molecular (380,311 g/mol). Os coeficientes de partição octanol/água, expresso por Log P, em diferentes meios estão apresentados na Tabela 1. O pH das soluções aquosas influencia o valor do Log P pois, como esperado e tendo como referência o valor do pKa do fármaco, o Log P diminui com o aumento do pH (DAVIS; BROGDEN, 1994).

Tabela 1 - Coeficientes de partição octanol/água (1:10 v/v) da nimesulida em diversos solventes - adaptado de RAINSFORD (2005)

Solvente	Log P, 25 °C
Água	2,5
Salina (0,9% NaCl)	2,5
Meio tampão pH 1	2,6
Meio tampão pH 6,8	2,2
Meio tampão pH 7,4	1,8

Como foi citado anteriormente, a solubilidade da nimesulida nas soluções aquosas é baixa e depende do pH do meio, como mostrado na Tabela 2. Em meios com pH neutro ou pouco básico, a solubilidade da nimesulida é bem maior que em

meios ácidos (SORA et al., 2007). Além disso, a solubilidade aumenta com a elevação da temperatura.

Tabela 2 - Solubilidade aquosa da nimesulida em vários solventes e em relação à temperatura - adaptado de RAINSFORD (2005)

Solvente	Temperatura (°C)	Solubilidade (mg/mL)
Água	25	5,5
	37	11,4
Salina (0,9% NaCl)	25	5,5
	37	12,2
Meio tampão pH 1	25	4,5
	37	7,8
Meio tampão pH 6,8	25	12,0
	37	27,6
Meio tampão pH 7,4	25	33,6
	37	82,9

A nimesulida possui maior solubilidade em meios aquosos com pH elevado devido à presença do grupo metanossulfonamida, que atua como um ácido fraco de Brönsted-Lowry. Em meio básico a metanossulfonamida fica desprotonada ($R_1R_2N^+$), e a carga negativa é estabilizada por ressonância. Interações intermoleculares íon-dipolo, e ligações de hidrogênio entre o fármaco ionizado e a água, mantém o fármaco solubilizado em meio aquoso alcalino. A acidificação do meio resultará na protonação da metanossulfonamida fazendo com que interações íon-dipolo deixem de existir, e conseqüentemente a solubilidade da nimesulida diminuirá (GONSALVES et al., 2013).

De acordo com a equação de Henderson-Hasselbach mostrada na Figura 2.

Figura 2 - Equação de Henderson Hasselbach

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

As formas ionizadas e não ionizadas da nimesulida estão representadas respectivamente por $[A^-]$ e $[HA]$. A partir da equação mostrada pode-se inferir que em pH 3 (ou menor), mais que 99,9% do fármaco estará na forma neutra. Nesta forma a nimesulida atravessará passivamente as membranas lipídicas, e assim será facilmente absorvida (RAINSFORD, 2005).

O intestino delgado, caracterizado pela grande área para absorção de moléculas e lúmen com propriedades neutras, é favorável à absorção da nimesulida. Em pH 6 ou 7, a porcentagem do fármaco na forma não ionizada diminui de 72% para 20%, respectivamente. No cólon, a absorção de nimesulida não é favorável devido à área de absorção menor e ao pH básico que causa diminuição da forma não ionizada do fármaco (RAINSFORD, 2005).

2 Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Substância química de referência

Nimesulida substância química de referência (SQR), fornecida pela Anvisa/Farmanguinhos – FIOCRUZ, proveniente da Farmacopeia Brasileira, lote 2049, teor de 99,8%, válido por todo período do estudo.

2.1.2 Equipamentos e materiais

Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220, com precisão de 0,010 g;

Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220D, com precisão de 0,001 g;

Bomba de vácuo Marconi, modelo MA057/2;

Coluna C18 Waters (150 x 4,6 mm; 3,5 µm);

Destilador Cristófoli;

Estufa de secagem e esterilização Fanem, modelo 315 SE;

Cromatógrafo Waters Alliance e2695, com forno, injeção automática, detector ultravioleta, software Empower versão 2;

Cromatógrafo Waters Alliance 2695, com forno, injeção automática, detector DAD (arranjo de diodos), software Empower versão 2;

Ponteiras plásticas Axygen de 200 µL, 1000 µL e 5000 µL;

Sistema de purificação de água Millipore, modelo DIRECT-Q 8;

Unidade filtrante Millex HV com membrana de durapore PVDF com poros de 0,45 µm, Millipore;

Vials de vidro âmbar Waters de 2 mL com tampa e septos de teflon.

Membrana de celulose, 0,45 µm de poro, Millipore

Pipetas Gilson, volume ajustável de 10 - 100 µL e 100 - 1000 µL; 1000 - 5000 µL, modelo Pipetman;

pHmetro Hanna;

2.2 Métodos

2.2.1 Desenvolvimento do método para quantificação da nimesulida no FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5); SESSE (pH 6,8)

Inicialmente, foi desenvolvido o método espectrofotométrico de quantificação da nimesulida (FGSSE, pH 1,2), porém durante a validação do método foi demonstrado que o mesmo não seria adequado às análises a serem efetuadas, por não apresentar seletividade apropriada (resultados apresentados no Apêndice A). Dessa forma, no processo de busca por um método adequado para quantificação da nimesulida, foi desenvolvido e validado o método cromatográfico (CLAE-UV).

2.2.2 Desenvolvimento de método cromatográfico para quantificação da nimesulida no FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)

2.2.2.1.1 Determinação das condições analíticas

As análises foram realizadas em cromatógrafo Waters Alliance[®] e2695, com detector ultravioleta e cromatógrafo Waters Alliance[®] 2695, com detector DAD. A seleção das condições cromatográficas para quantificação da nimesulida foi baseada em dados disponíveis na literatura e também em parâmetros de adequação do sistema cromatográfico.

Para as análises foi utilizada uma coluna cromatográfica empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18), da marca Waters[®], (150 x 4,6 mm; 3,5 µm). A temperatura foi mantida a 25 °C.

Fase móvel e vazão

Foram avaliadas duas fases móveis: H₂O:CH₃CN (50:50 v/v) (BRASIL, 2010) e H₂O:CH₃CN:HOAc (45:55:1 v/v/v) (FONSECA, 2007). No processo de escolha da fase móvel foram analisados o tempo de retenção da nimesulida, assimetria do pico e a pressão resultante no sistema. Foram testadas vazões de fase móvel de 1,2 e 1,8 mL/min.

Volume de injeção e comprimento de onda para detecção do analito

O volume de injeção utilizado foi de 20 µL. Foram testados dois comprimentos de onda para detecção da nimesulida: 220 nm e 300 nm.

Preparo da solução estoque (SE) de nimesulida

Foram pesados exatamente 12,5 mg de nimesulida SQR e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com acetonitrila. Foi obtida uma solução com concentração de 500 µg/mL de nimesulida.

Preparo das soluções diluídas

Para o preparo das soluções diluídas, retiraram-se alíquotas da solução estoque, e completou-se o volume das soluções com os meios tamponados utilizados no estudo de solubilidade: FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8), de acordo com as Tabelas 3, 4 e 5. A forma de preparo dos meios tamponados utilizados está mostrado na Tabela 42.

As soluções foram filtradas diretamente para o *vial*, usando uma seringa de vidro e unidades filtrantes Millex[®] de 0,45 µm.

2.2.3 Avaliação da estabilidade da solução estoque (SE) e soluções diluídas

Foi avaliada a estabilidade da SE de nimesulida e das soluções diluídas, em cada meio FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e em SESSE (pH 6,8).

A concentração da SE foi de 100 µg/mL e das soluções diluídas foi de 10 µg/mL em FGSSE (pH 1,2), 15 µg/mL em TA (pH 4,5) e 20 µg/mL em SESSE (pH 6,8).

A avaliação da estabilidade das soluções diluídas foi realizada num período de 55 horas, nas mesmas condições utilizadas nos estudos de solubilidade do fármaco: 37 °C, e sob agitação de 100 rpm. A estabilidade da SE foi avaliada por 10 horas, nas condições ambientais do laboratório. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

O critério de aceitação empregado é o preconizado por GREEN (1996). Assim, as variações das áreas não devem ser superiores a 2 % em relação à área inicial.

2.2.4 Validação do método analítico

Os métodos analíticos desenvolvidos para quantificação da nimesulida foram validados de acordo com a Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2003) e do guia Q2B da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 1995). Os parâmetros foram determinados em cada um dos meios tamponados: FGSSE pH 1,2; TA pH 4,5; SESSE pH 6,8.

Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação (teóricos) e robustez.

Todos os parâmetros da validação foram realizados utilizando nimesulida SQR. Os cálculos e análises estatísticas foram efetuados com auxílio do *software* R (versão 3.0.2) e *Microsoft Excel*® 2010.

2.2.4.1 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada para verificar a capacidade do método de quantificar a nimesulida na presença de seus produtos de degradação.

Não existem, nos guias de validação dos órgãos regulatórios, procedimentos claramente definidos para avaliação do parâmetro. Dessa forma, as soluções diluídas do fármaco nos meios tamponados foram expostas ao calor seco, à temperatura de 70 °C durante 4 horas. A temperatura e o tempo de exposição foram selecionados a partir de uma triagem para avaliação das condições de degradação do fármaco.

Todas as soluções diluídas foram preparadas com concentração de 50 µg/mL, de acordo com o mostrado em 'preparo das soluções diluídas'.

Foram avaliadas as purezas de pico de cada solução diluída degradada, com auxílio do detector DAD.

2.2.4.2 Linearidade

Foi preparada SE de nimesulida com concentração de 500 µg/mL, em acetonitrila.

A linearidade do método desenvolvido foi avaliada pela análise de 6 concentrações do fármaco, nas curvas construídas para cada um dos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8), de acordo com as Tabela 3, 4 e 5. A partir da SE da nimesulida foram preparadas as soluções diluídas

em cada um dos meios tamponados, de acordo com o descrito em 'preparo das soluções diluídas'. As análises foram realizadas em triplicata.

Nas Tabelas 3, 4 e 5 encontram-se os dados referentes às curvas analíticas realizadas, para cada meio.

Tabela 3 - Preparo das soluções de nimesulida, em FGSSE (pH 1,2), para avaliação do parâmetro linearidade do método cromatográfico

Concentração (µg/mL)	Alíquota da SE (mL)	Volume final da solução (mL)
0,5	0,01	10
1,0	0,02	10
3,0	0,06	10
5,0	0,10	10
7,0	0,14	10
10,0	0,20	10

Tabela 4 - Preparo das soluções de nimesulida, em TA (pH 4,5), para avaliação do parâmetro linearidade do método cromatográfico

Concentração (µg/mL)	Alíquota da SE (mL)	Volume final da solução (mL)
1,0	0,02	10
3,0	0,06	10
10,0	0,20	10
15,0	0,30	10
20,0	0,40	10
25,0	0,50	10

Tabela 5 - Preparo das soluções de nimesulida, em SESSE (pH 6,8), para avaliação do parâmetro linearidade do método cromatográfico

Concentração (µg/mL)	Alíquota da SE (mL)	Volume final da solução (mL)
1,0	0,02	10
3,0	0,06	10
10,0	0,20	10
20,0	0,40	10
25,0	0,50	10
40,0	0,80	10

A linearidade foi avaliada considerando-se os coeficientes de determinação e correlação (R^2 e R), coeficiente angular (b), coeficiente linear (a). Foram avaliados os resíduos da regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), de acordo com o recomendado pelo guia Q2B-ICH. Também foram analisadas as premissas dos resíduos da regressão.

Inicialmente foi avaliada a presença de valores dispersos (*outliers*) pelo teste de resíduos padronizados Jackknife (J_{ei}) (resíduos estudentizados externamente), para $\alpha = 0,05$, uma vez que o MMQO é sensível à presença desses valores (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Os resíduos de Jackknife seguem a distribuição de t de *Student* e, os valores de J_{ei} foram calculados para todos os pontos das curvas analíticas de cada um dos meios tamponados. Valores de J_{ei} maiores que o t crítico foram considerados valores dispersos. Como critério de aceitação, não puderam ser excluídos mais que 22 % (2/9) do total dos pontos de cada uma das curvas analisadas, como preconizado por THOMPSON et al. (2002).

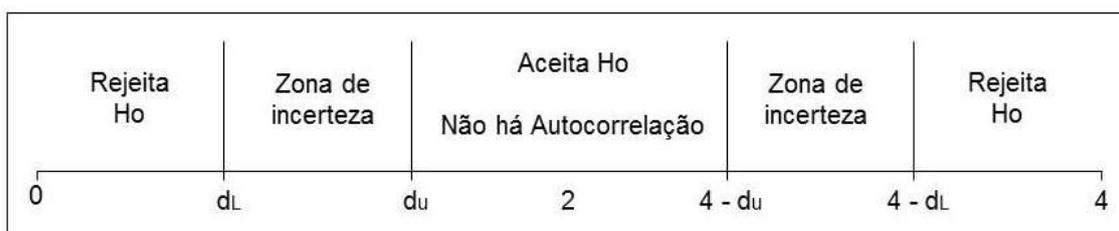
Para correta aplicação do MMQO para avaliação da linearidade é necessário comprovar que os resíduos possuem distribuição normal (normalidade), variância constante ao longo do eixo x (homoscedasticidade), e que são independentes.

A normalidade foi avaliada pelo teste de Ryan-Joiner, cuja estatística é o R (coeficiente de correlação de Ryan-Joiner). Este teste avalia a hipótese nula (H_0) de que os resíduos seguem distribuição normal e a hipótese alternativa (H_a) de que os resíduos seguem outra distribuição. Para confirmação da normalidade, H_0 não pode ser rejeitada. Para isso, R calculado deve ser maior que o R crítico, para $\alpha = 0,05$.

Para avaliação da homoscedasticidade do método foi utilizado o teste de Levene modificado por Brown e Forsythe. A H_0 desse teste é a de que as variâncias dos resíduos são constantes e a H_a de que as variâncias dos resíduos não são constantes (heteroscedasticidade). A estatística do teste é o t de Levene (t_L), e este deve ser menor que o t_L crítico, para que a H_0 não seja rejeitada, para $\alpha = 0,05$.

A independência entre os resíduos da regressão foi avaliada com o teste de Durbin-Watson. A H_0 desse teste é a de que não há autocorrelação entre os resíduos e a H_a é a de que há autocorrelação entre os resíduos. A estatística do teste é o d de Durbin-Watson. Para que a H_0 não seja rejeitada d calculado deve estar compreendido entre o limite crítico superior: d_u e $4-d_u$, para $\alpha = 0,05$. O d de Durbin-Watson varia de 0 a 4, com a média de 2. Assim, valores próximos ou igual a 2, demonstram que não há autocorrelação entre os resíduos. Na Figura 3 está mostrado o esquema para melhor visualização do teste e os resultados associados.

Figura 3 - Esquema do teste estatístico Durbin-Watson para avaliação da independência dos resíduos



Fonte: adaptado de HOLT; REFENES (1998)

Posteriormente às análises dos resíduos foram verificadas a significância e o desvio de linearidade por ANOVA (*one-way*). A estatística do teste é a razão entre as variâncias, F . A significância da regressão testa a H_0 de que a regressão não é significativa e a H_a de que a regressão é significativa. Para que a H_0 seja rejeitada, F calculado deve ser maior que o F crítico, para $\alpha = 0,05$.

O desvio de linearidade testa a H_0 de que não há desvio de linearidade e a H_a de que há desvio de linearidade. Para que a H_0 não seja rejeitada, F calculado deve ser menor que o F crítico, para $\alpha = 0,05$.

2.2.4.3 Precisão

Foi analisada a precisão por repetitividade (precisão intracorrida), em três níveis de concentração: baixa, média e alta e por reprodutibilidade parcial (precisão

intercorrida). A última foi determinada da mesma forma da precisão intracorrida, porém em 2 dias consecutivos, num total de 18 determinações.

A precisão foi avaliada para o método cromatográfico para quantificação de nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8).

Na Figura 4 está demonstrado como foi realizado o cálculo da precisão dos métodos desenvolvidos e na Tabela 6 encontram-se os dados referentes avaliação do parâmetro para cada um dos métodos desenvolvidos.

Figura 4 - Fórmula utilizada para cálculo da precisão do método desenvolvido

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

Onde: DP é o desvio padrão das três determinações e CMD é a concentração média determinada.

Tabela 6 - Concentração das soluções de nimesulida utilizada para avaliação da precisão nos métodos cromatográficos de quantificação do fármaco nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)

Tipo de meio tampão	Nível da concentração	Concentração (µg/mL)
FGSSE (pH 1,2)	Baixa	0,5
	Média	5,0
	Alta	10,0
TA (pH 4,5)	Baixa	1,0
	Média	10,0
	Alta	25,0
SESSE (pH 6,8)	Baixa	1,0
	Média	20,0
	Alta	40,0

O critério de aceitação utilizado foi o descrito na RE 899 (BRASIL, 2003), sendo assim o desvio padrão relativo (DPR) deve ser inferior a 5 %.

Foi aplicado o teste *t* de *Student* ($\alpha = 0,05$) para avaliar se as concentrações médias experimentais obtidas em dias diferentes diferiam ou não entre si. Este teste avalia a H_0 de que não há diferença significativa entre as médias das concentrações e H_a de que há diferença significativa entre as amostras.

2.2.4.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em três níveis de concentração para o método desenvolvido de quantificação da nimesulida no FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8). Cada determinação foi realizada em triplicata.

Na RE 899 (BRASIL, 2003) não estão determinados critérios de aceitação para este parâmetro. Em decorrência disto foi utilizado o critério preconizado por JENKE (1996) e GREEN (1996). Segundo esses autores os resultados devem estar compreendidos entre 98 - 102%.

Na Figura 5 está demonstrado como foi realizado o cálculo da exatidão dos métodos desenvolvidos e na Tabela 7 encontram-se os dados referentes da avaliação do parâmetro para cada um dos métodos desenvolvidos.

Figura 5 - Fórmula utilizada para cálculo da exatidão do método desenvolvido

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

Tabela 7 - Concentração das soluções de nimesulida utilizada para avaliação da exatidão no método cromatográfico para quantificação do fármaco nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)

Tipo de meio tampão	Nível da concentração	Concentração (µg/mL)
FGSSE (pH 1,2)	Baixa	0,5
	Média	5,0
	Alta	10,0
TA (pH 4,5)	Baixa	1,0
	Média	10,0
	Alta	25,0
SESSE (pH 6,8)	Baixa	1,0
	Média	20,0
	Alta	40,0

O teste *t* de *Student* ($\alpha = 0,05$) foi aplicado para avaliar se as concentrações experimentais diferem estatisticamente ou não das concentrações teóricas. As hipóteses do teste são as mesmas mostradas no item 2.2.3.3.

2.2.4.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de quantificação e detecção foram determinados utilizando os dados de três curvas analíticas obtidas para o método de quantificação da nimesulida, no FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8).

O LD e LQ foram calculados como mostrado nas Figuras 6 e 7, considerando médias das inclinações, desvio padrão do intercepto de três curvas analíticas.

Figura 6 - Fórmula utilizada para cálculo do limite de detecção do método desenvolvido

$$LD = \frac{Dpa \times 3}{b}$$

Figura 7 - Fórmula utilizada para cálculo do limite de quantificação do método desenvolvido

$$LQ = \frac{Dpa \times 10}{b}$$

Onde: DPa é o desvio padrão do intercepto e b é a média das inclinações da curva analítica.

2.2.4.6 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada considerando alguns fatores que poderiam resultar em variações na resposta do método cromatográfico.

Os parâmetros analisados e, os níveis considerados estão descritos na Tabela 8. Todas as amostras preparadas para análise do parâmetro apresentaram concentração de 16 µg/mL.

Tabela 8 - Avaliação da robustez do método para quantificação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)

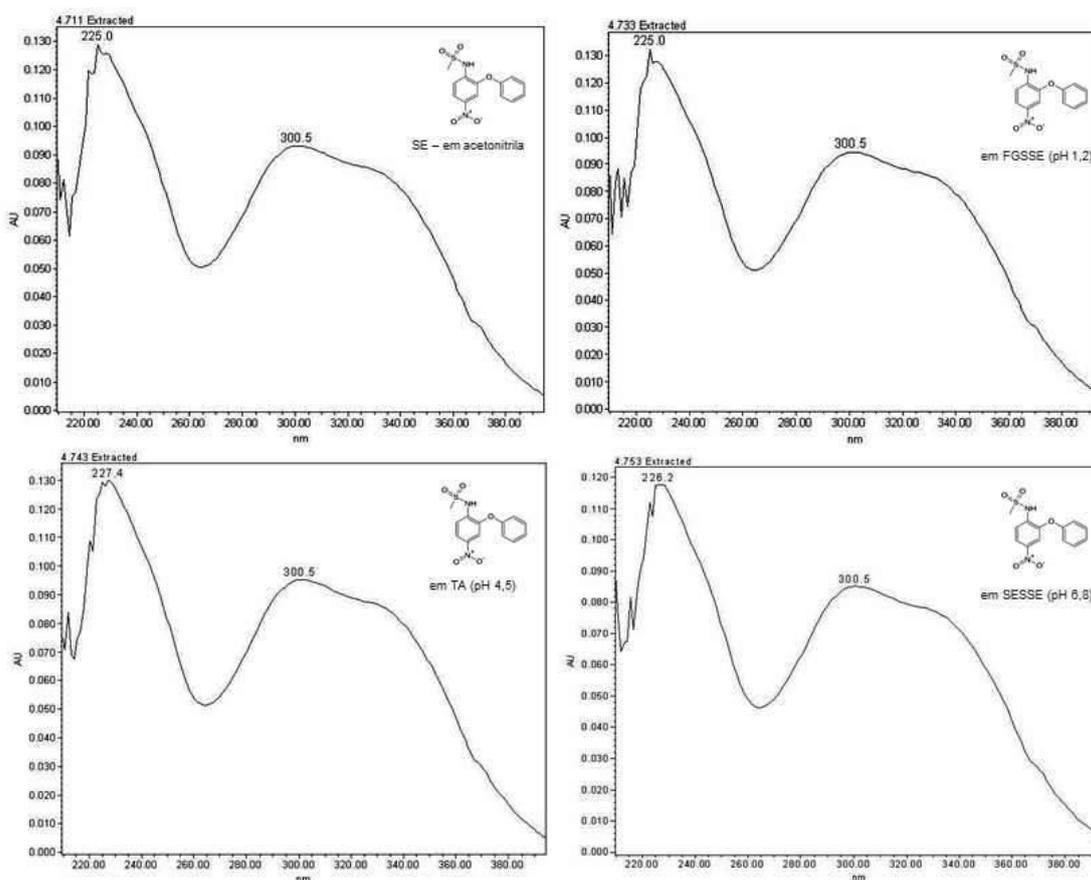
Tipo de meio tampão	Parâmetro	Nível	Valor
FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5); SESSE (pH 6,8).	Volume de injeção (µL)	Baixo	19,0
		Médio	20,0
		Alto	21,0
	Fluxo da fase móvel (mL/min)	Baixo	1,1
		Médio	1,2
		Alto	1,3
	Proporção da fase móvel (v/v)	Baixo	53:48:01
		Médio	55:45:01
		Alto	57:43:01
	Temperatura da coluna (°C)	Baixo	24,0
		Médio	25,0
		Alto	26,0

3 Resultados e Discussão

3.1 Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação da nimesulida nos estudos de solubilidade, realizado no FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)

A princípio obteve-se, com auxílio do detector DAD, espectros de UV do fármaco que estão mostrados na Figura 8.

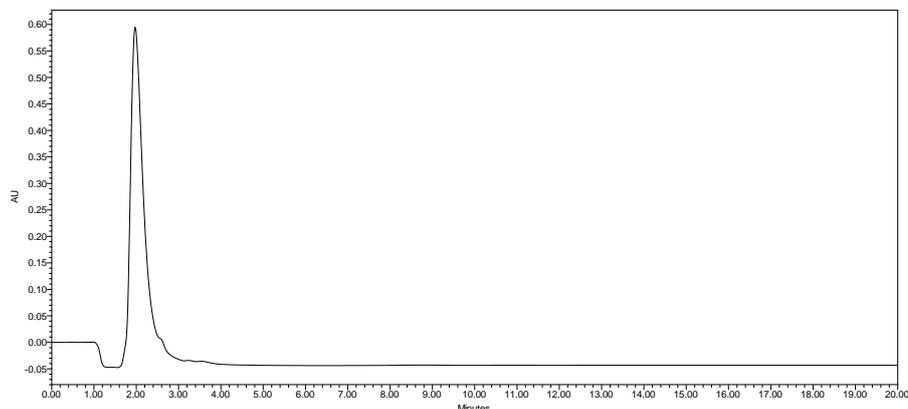
Figura 8 - Espectro de UV da nimesulida SE e nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2; TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8) obtido com auxílio do detector DAD



Por meio dos espectros mostrados, foi possível observar que o fármaco apresentava dois comprimentos de onda de máxima absorção: 225 e 300,5 nm. Dessa forma, testou-se o método farmacopeico (BRASIL, 2010), em que se preconizava a utilização da fase móvel H₂O:CH₃CN (50:50 v/v), volume de injeção

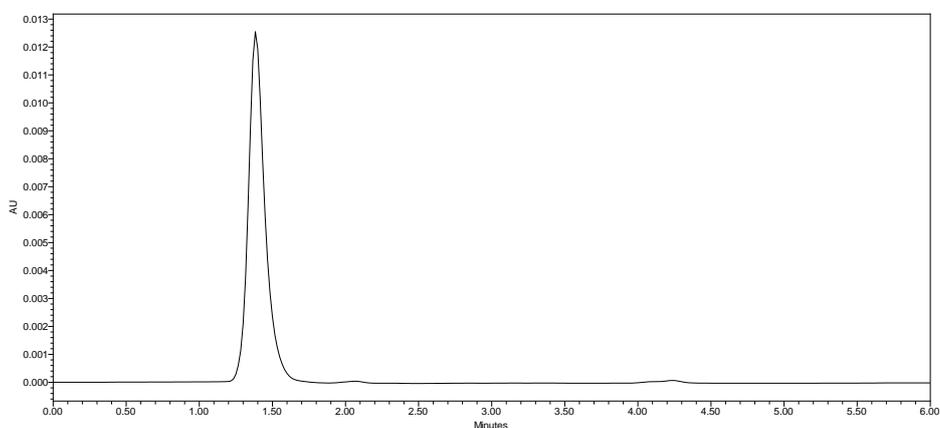
de 20 μL , fluxo de 1,8 mL min^{-1} e comprimento de onda de 220 nm. Na Figura 9 está mostrado o cromatograma obtido utilizando-se o método citado.

Figura 9 - Cromatograma obtido da SE a partir do método farmacopeico (BRASIL, 2010) empregando fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (50:50 v/v), volume de injeção de 20 μL , fluxo de 1,8 mL min^{-1} e comprimento de onda de 220 nm



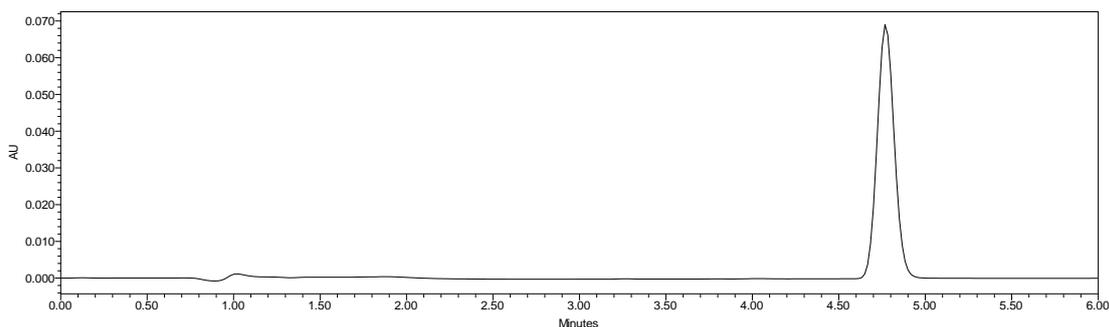
Como pode ser observado na Figura 9, o pico referente ao fármaco mostra-se assimétrico e com tempo de retenção muito pequeno, não desejável, uma vez que este foi eluído no tempo de retenção próximo ao tempo morto. Dessa forma, propôs-se a mudança do comprimento de onda para 300 nm. Esse foi utilizado em diversos trabalhos em que se quantificava a nimesulida utilizando CLAE-UV (FONSECA, 2007; SORA et al., 2007; VYAS et al., 2013). Na Figura 10 está mostrado o cromatograma em que foi utilizado o novo comprimento de onda de 300 nm.

Figura 10 - Cromatograma obtido da SE : fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (50:50 v/v), volume de injeção de 20 μL , fluxo de 1,8 mL min^{-1}) com comprimento de onda de 300 nm



Na Figura 10 nota-se que, com o aumento do comprimento de onda de detecção da nimesulida houve melhora geral no pico referente à substância em estudo. Isso ocorreu porque, geralmente as interferências da fase móvel são maiores em comprimentos de onda menores, levando a problemas referentes aos ruídos da linha de base (BRONNER; BEECHER, 1998). Quanto ao baixo tempo de retenção do fármaco, este foi solucionado ao acidificar a fase móvel, obtendo-se a proporção H₂O:CH₃CN:HOAc (45:55:1 v/v/v) (FONSECA et al., 2009) e diminuindo o fluxo da fase móvel para 1,2 ml min⁻¹. Como mostrado na Figura 11, a fase móvel acidificada promoveu aumento desejável do tempo de retenção da nimesulida, visto que a adição de ácido acético glacial ocasionou a protonação do fármaco (ácido livre). A forma protonada da nimesulida favoreceu maior interação da substância com a fase estacionária. Dessa forma, houve o aumento no tempo de retenção (FONSECA, 2007).

Figura 11 - Cromatograma da SE (15 µg/mL) obtido com o método desenvolvido de quantificação da nimesulida (fase móvel H₂O:CH₃CN:HOAc (45:55:1 v/v/v), comprimento de onda de 300 nm, temperatura de 25 °C, fluxo de 1,2 mL/min, volume de injeção de 20 µL e coluna C18



Como pode ser observado na Figura 11, o tempo de retenção da nimesulida foi de 4,75 min. Esse foi adequado à aplicação pretendida, tanto de validação do método analítico, quanto à realização das avaliações da solubilidade da nimesulida. Com esse tempo de retenção estabelecido, é possível efetuar diversas análises em um curto período.

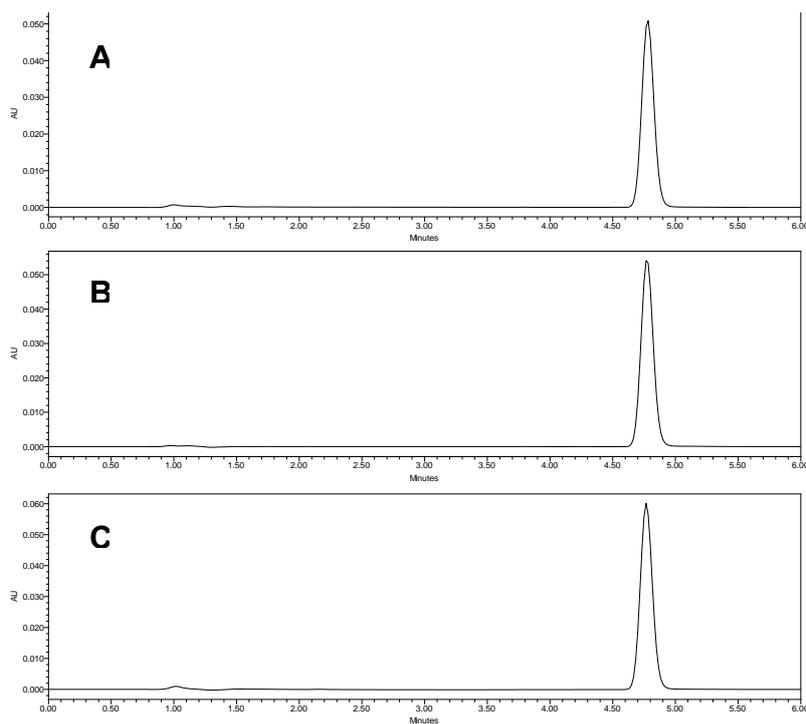
Os parâmetros do método desenvolvido e utilizado nesse trabalho, para quantificação de nimesulida nos meios tamponados, está mostrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições analíticas do método de quantificação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)

Parâmetro	Especificação
Coluna	C18 (150 x 4,6 mm; 3,5 μ m) – Waters SunFire [®]
Fase móvel	H ₂ O:CH ₃ CN:HOAc (45:55:1 v/v/v)
Fluxo	1,2 mL/min
Temperatura	25 °C
Detecção	300 nm
Volume de injeção	20 μ L

Na Figura 12, estão mostrados os cromatogramas referentes às soluções diluídas em cada um dos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8) obtidos, empregando o método desenvolvido.

Figura 12 - Cromatogramas obtidos para soluções de nimesulida em A: FGSEE (pH 1,2), B: TA (pH 4,5) e C: SESSE (pH 6,8) na concentração de 15 μ g/mL, nas condições definidas para o método de quantificação da nimesulida por CLAE-UV

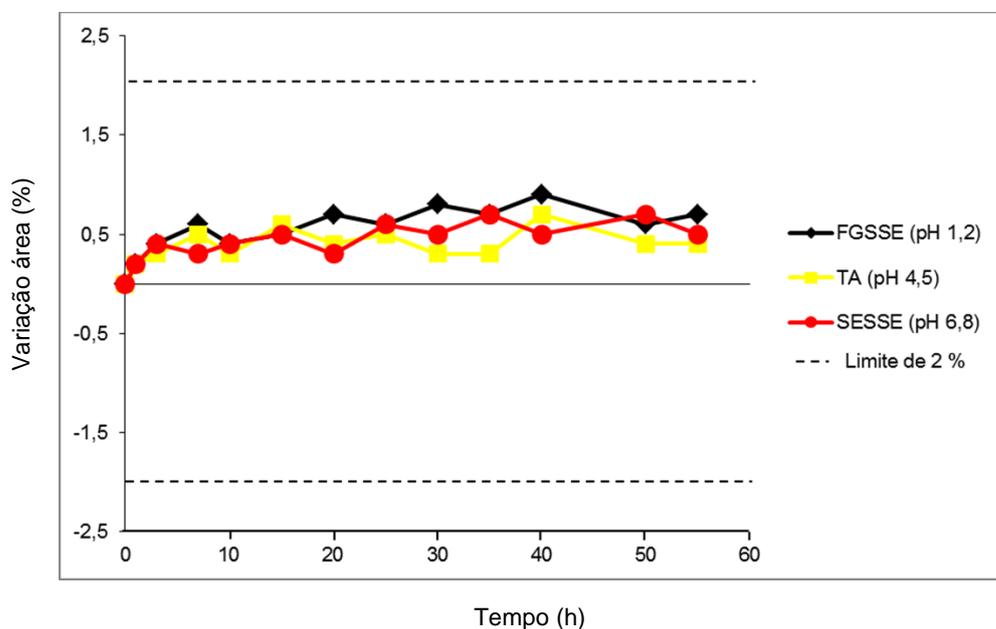


Os fatores de retenção e cauda (assimetria) de cada um dos picos referentes à nimesulida diluída nos meios tamponados, mostrados nos cromatogramas da Figura 12, foram respectivamente de 4,5 e 1,0. O valor do fator de cauda de cada pico dos cromatogramas é ideal, e indica total simetria dos mesmos. A obtenção de picos como os obtidos neste trabalho e mostrados na Figura 12 é muito relevante em CLAE, pois minimizam erros na quantificação do fármaco.

3.2 Avaliação da estabilidade da solução estoque (SE) e soluções diluídas

A SE da nimesulida demonstrou ter estabilidade durante as 10 h avaliadas, pois todas as áreas referentes aos picos das alíquotas coletadas tiveram variação menor que 2 %, em relação ao valor inicial. Os resultados da estabilidade das soluções diluídas da nimesulida em cada um dos meios tamponados (FGSSE pH 1,2; TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8) estão mostrados na Figura 13.

Figura 13 - Avaliação da estabilidade por meio da variação das áreas da nimesulida nos meios tamponados



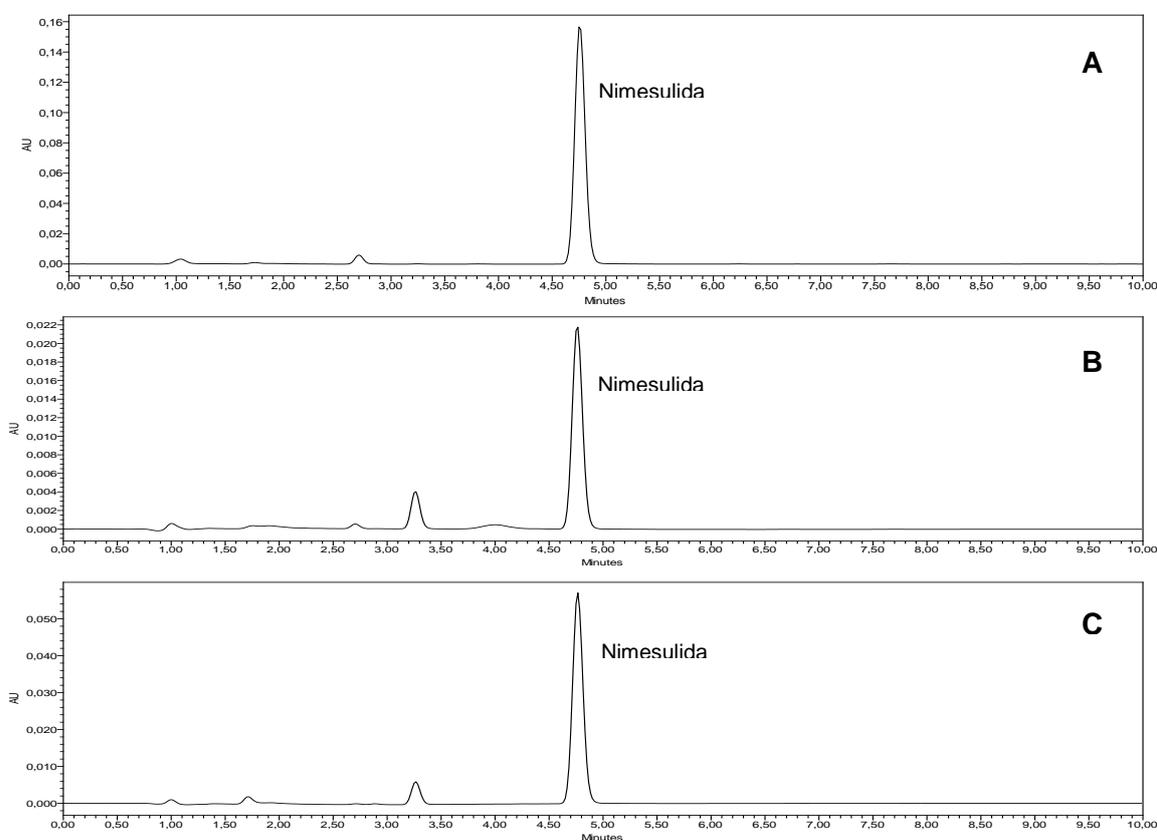
De acordo com a Figura 13, todas as soluções foram estáveis por até 55 horas de avaliação, pois a variação das áreas das mesmas não foi igual ou superior a 2 %, em relação aos valores iniciais.

3.3 Validação do método analítico

3.3.1 Seletividade

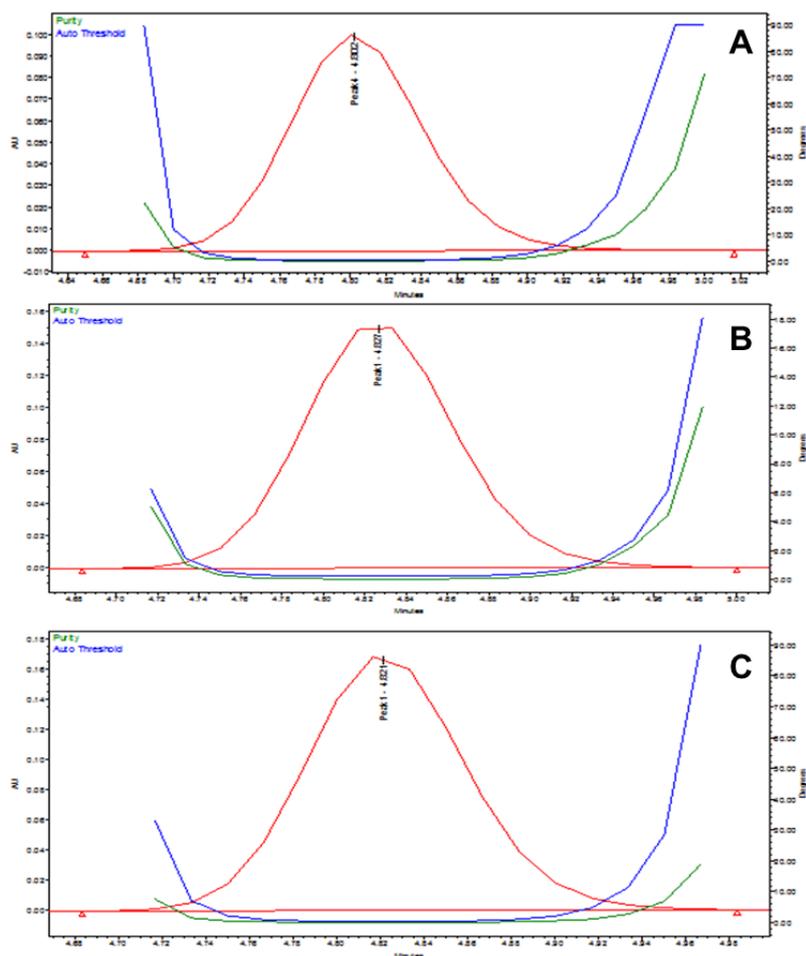
Os cromatogramas obtidos para as soluções diluídas (expostas a condições capazes de provocar degradação) em cada um dos meios tamponados estão mostrado na Figura 14. Nos cromatogramas é possível observar a presença de picos referentes aos produtos de degradação do fármaco, principalmente nos tempos de retenção entre 1,5 – 4 minutos.

Figura 14 - Cromatogramas obtidos com as soluções de nimesulida expostas à condições capazes de causar degradação sendo A: nimesulida em FGSSE (pH 1,2); B: em TA (pH 4,5); C: em SESSE (pH



A seletividade do método foi comprovada por meio da análise da pureza de pico das soluções diluídas degradadas, em cada um dos meios tamponados, por meio do detector DAD. Na Figura 15 e Tabela 10, estão demonstrados os resultados obtidos para pureza de pico da nimesulida em cada um dos meios tamponados.

Figura 15 - Análise da pureza de pico para as soluções de nimesulida expostas a condições de degradação sendo A: nimesulida em FGSSE (pH 1,2); B: em TA (pH 4,5); C: em SESSE (pH 6,8), obtidas pelo software Empower 2 – Waters®



*Purity – Ângulo de pureza (linha verde); Auto Threshold – Ângulo limite (linha azul)

De acordo com a análise dos dados de pureza de pico realizada por meio do software Empower 2 da Waters®, para que o pico seja considerado puro, as linhas verdes referentes aos ângulos de pureza devem estar abaixo da linha azul (ângulo limite), em toda a extensão do pico. Dessa forma, como podem ser observados na Figura 15 os picos referentes à nimesulida em cada um dos meios tamponados estão puros, não havendo eluição conjunta de nenhum dos produtos de degradação presentes na amostra.

Na Tabela 10 estão mostrados os valores obtidos para os ângulos de pureza e limite, referente aos dados de pureza de pico para nimesulida (Figura 15) em cada um dos meios tamponados.

Tabela 10 - Avaliação dos resultados de pureza de pico das soluções diluídas da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)

Tipo de meio tampão	Ângulo de pureza	Ângulo limite
FGSSE (pH 1,2)	0,169	0,497
TA (pH 4,5)	0,115	0,451
SESSE (pH 6,8)	0,147	0,634

Os valores dos ângulos de pureza foram menores que os correspondentes ângulos limite, para cada um dos meios tamponados. Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que o método é seletivo.

3.3.2 Linearidade

Com auxílio do teste de resíduos padronizados de Jackknife, para $\alpha = 0,05$, foi possível detectar 2 (dois) valores dispersos (*outlier*) para a curva analítica da nimesulida em meio FGSSE (pH 1,2) (primeiras replicatas das concentrações de 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$), 2 (dois) valores dispersos para a curva analítica da nimesulida em meio TA (pH 4,5) (primeira replicata da concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ e segunda replicata da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$) e 2 (dois) para a curva do mesmo fármaco em meio SESSE (pH 6,8) (terceiras replicatas das concentrações de 20 e 25 $\mu\text{g/mL}$). Os valores dispersos estão identificados nos gráficos de resíduos.

Os gráficos das regressões lineares e dos resíduos da regressão estão mostrados nas Figuras 16, 17, 18, 19, 20, 21. Cada ponto dos gráficos de regressão corresponde a médias de 3 determinações e os erros referentes as mesmas foram plotados.

Figura 16 - Curva analítica do método de quantificação da nimesulida em FGSSE (pH 1,2)

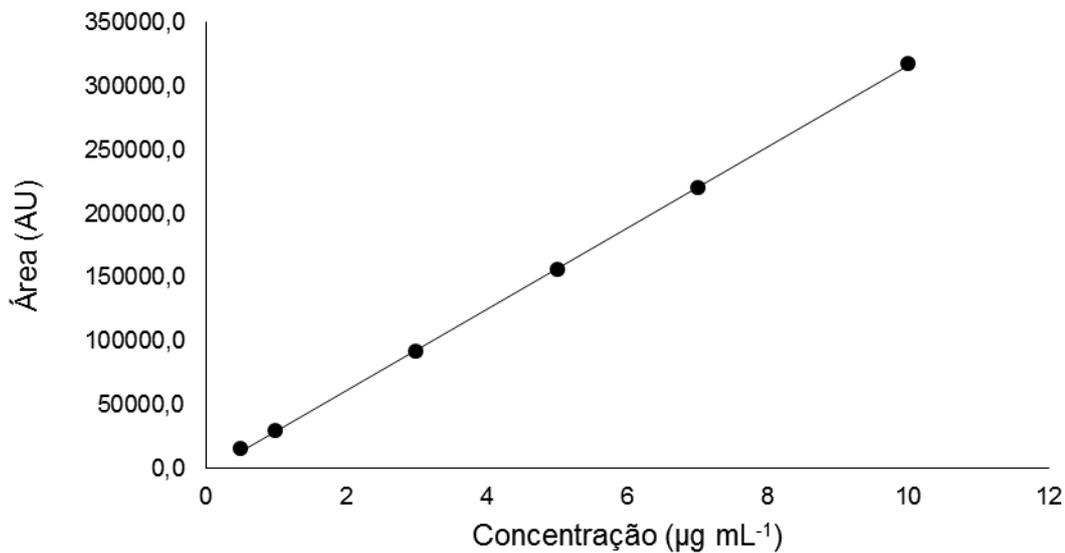


Figura 17 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da nimesulida em FGSSE (pH 1,2)

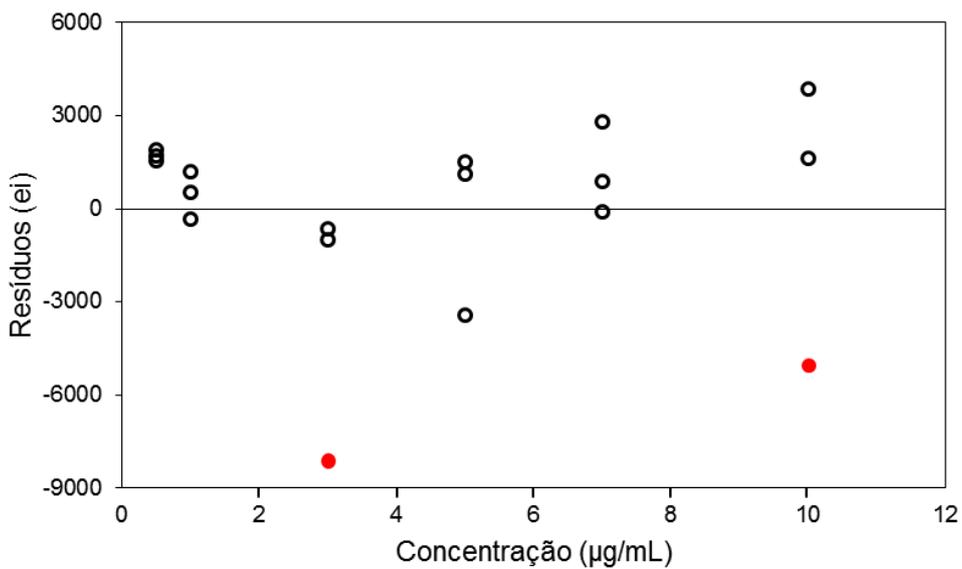


Figura 18 - Curva analítica do método de quantificação da nimesulida em TA (pH 4,5)

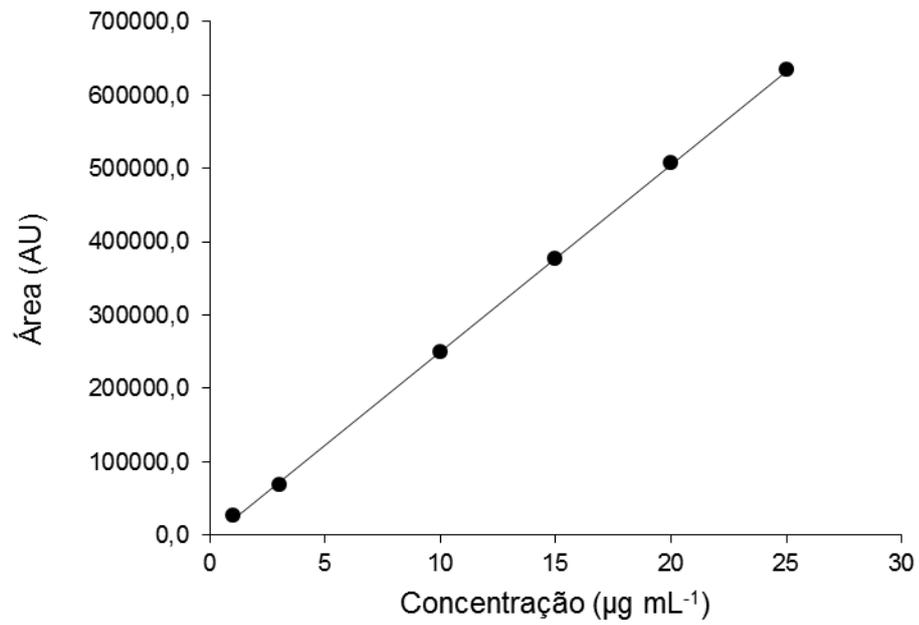


Figura 19 - Figura XX – Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da nimesulida em TA (pH 4,5)

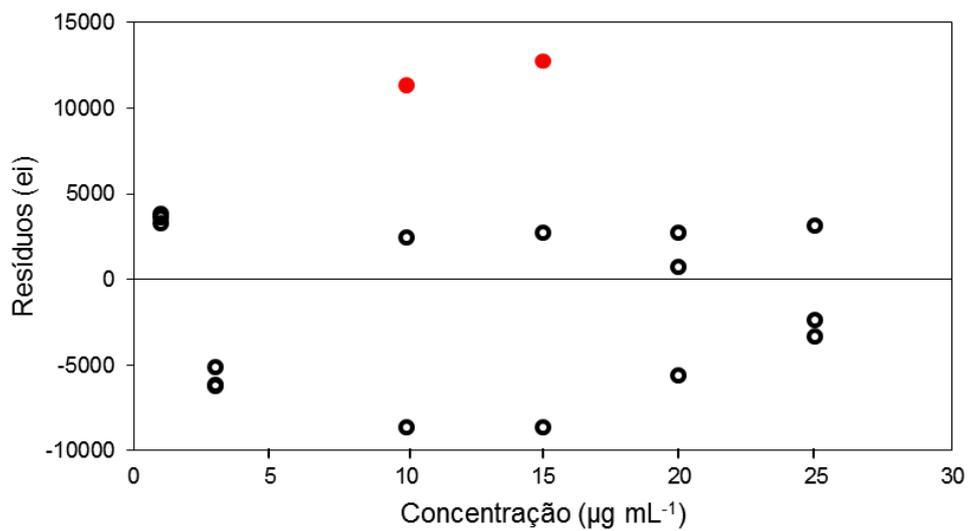


Figura 20 - Curva analítica do método de quantificação da nimesulida em SESSE (pH 6,8)

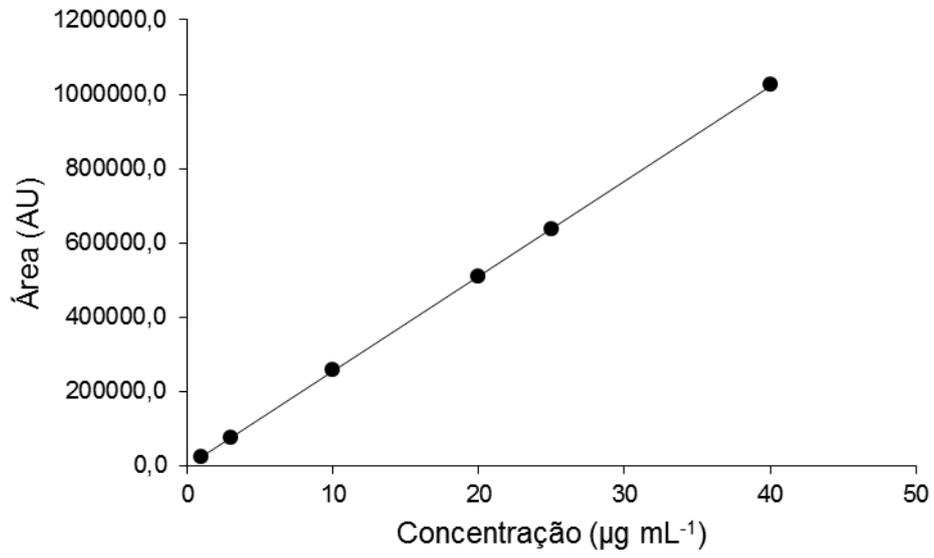
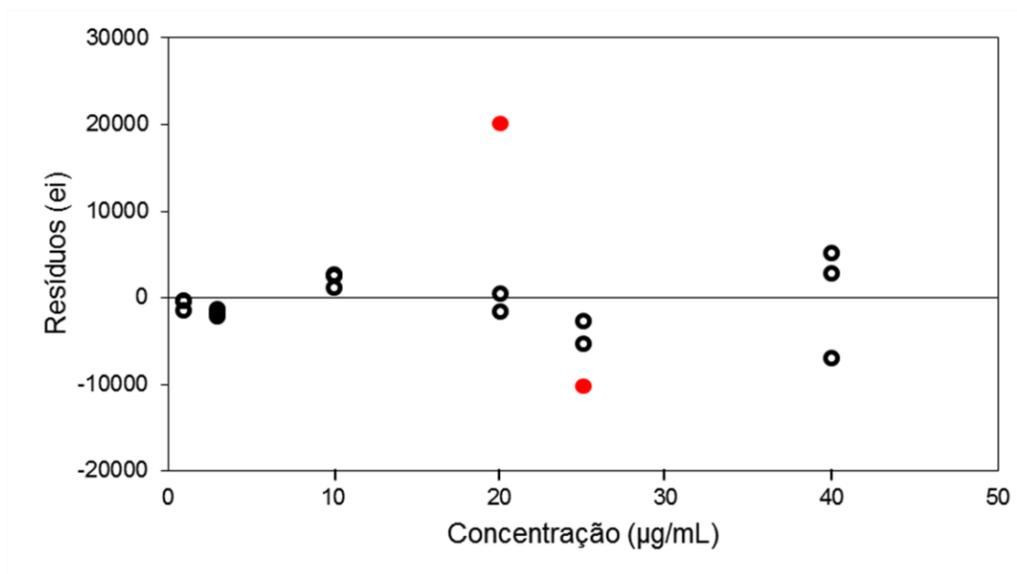


Figura 21 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da nimesulida em SESSE (pH 6,8)



Nas Figuras 17, 19 e 21 estão mostrados que os resíduos provenientes dos resultados das regressões lineares, da nimesulida em cada um dos meios tamponados, estão aleatoriamente distribuídos ao longo do eixo zero não demonstrando tendências sistemáticas.

Em relação às premissas dos resíduos, a normalidade, homoscedasticidade e a independência dos resíduos foram confirmadas, para cada uma das curvas analíticas, pelos testes de Ryan Joiner, Levene modificado por Brown e Forsythe e Durbin-Watson, como mostrado nas Tabelas 11, 12 e 13. Além disso, nas mesmas Tabelas estão mostrados os resultados da significância da regressão e desvio da linearidade, realizados por meio da ANOVA.

Tabela 11 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação da nimesulida no meio FGSSE (pH 1,2), para $\alpha = 0,05$

Avaliação / Teste estatístico	Estatística	Nimesulida em FGSSE pH (1,2)	Critério de aceitação
Normalidade / Ryan Joiner	R	0,9918	> 0,9411
Homoscedasticidade/ Levene modificado	t_L	0,6392	< 2,131
Independência/ Durbin-Watson	d	1,7669	> 1,371 / < 2,620
Significância da regressão	F	22356,6967	> 1,3441E-30
Desvio da linearidade	F	3,7699	< 4,1708

Tabela 12 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação da nimesulida no meio TA (pH 4,5), para $\alpha = 0,05$

Avaliação / Teste estatístico	Estatística	Nimesulida em TA pH (4,5)	Critério de aceitação
Normalidade / Ryan Joiner	R	0,9918	> 0,9411
Homoscedasticidade/ Levene modificado	t_L	0,8570	< 2,131
Independência/ Durbin-Watson	d	1,8453	> 1,371 / < 2,620
Significância da regressão	F	21116,2954	> 2,1214E-26
Desvio da linearidade	F	1,6445	< 4,1708

Tabela 13 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação da nimesulida no meio SESSE (pH 6,8), para $\alpha = 0,05$

Avaliação / Teste estatístico	Estatística	Nimesulida em SESSE pH (6,8)	Critério de aceitação
Normalidade / Ryan Joiner	R	0,9918	> 0,9411
Homoscedasticidade/ Levene modificado	t_L	1,1148	< 2,131
Independência/ Durbin-Watson	d	2,2904	> 1,371 / < 2,620
Significância da regressão	F	52634,4969	> 1,4285E-29
Desvio da linearidade	F	0,6773	< 4,1708

Assim, as premissas dos resíduos de cada uma das curvas analíticas referentes à nimesulida nos meios tamponados foram confirmadas. Os mesmos possuem distribuição normal (valores de R maiores que o R crítico e $p > 0,05$) são homoscedásticos (valores de t_L menores que o t_L crítico, $p > 0,05$) e independentes (valor de d calculado entre du e $4-du$, $p > 0,05$). Além disso, foi comprovada a adequação ao modelo linear por ANOVA ($\alpha = 0,05$), pois foi confirmada a significância

da regressão (valores de F calculados maiores que os F críticos) e ausência de desvio de linearidade (valores de F calculados menores que os F críticos).

Na Tabela 14 estão mostrados os parâmetros da regressão linear para o método de quantificação da nimesulida em cada um dos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8).

Tabela 14 - Parâmetros da regressão linear obtidos para o método de quantificação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)

Parâmetro da regressão	Curva em FGSSE (pH 1,2)	Curva em TA (pH 4,5)	Curva em SESSE (pH 6,8)
R ²	0,9999	0,9998	1,0000
a	32630 ± 273,7	25520 ± 175,6	25690 ± 144,7
b	-5075 ± 1517	-2930 ± 2644	-922.8 ± 3090
R	0,9999	0,9999	0,9999

R²: coeficiente de determinação; a: coeficiente linear; b: coeficiente angular; R: coeficiente de correlação linear

Como pode ser observado na Tabela 14, os valores dos coeficientes de determinação (R²) e correlação (R) foram superiores a 0,99 para a quantificação da nimesulida em cada um dos meios tamponados. Assim, o método cumpre com o requisito mínimo de linearidade preconizado pela RE 899 (BRASIL, 2003).

Dessa forma, é possível inferir que o modelo de regressão linear escolhido foi adequado, e o método é linear.

3.3.3 Precisão

Os resultados da precisão por repetitividade (precisão intracorrída), e por reprodutibilidade parcial (precisão intercorrída), para cada um dos métodos desenvolvidos, estão nas Tabelas 15, 16 e 17.

Tabela 15 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação da nimesulida em FGSSE (pH 1,2)

Concentração teórica	Concentração experimental média (n =3) (µg/mL)	DPR (%) (precisão intracorrída)	DPR (%) (precisão intercorrída)
Análise 1º dia			
0,5	0,52	1,77	1,96
5,0	5,03	2,95	
10,0	10,0	1,18	
Análise 2º dia			
0,5	0,51	1,13	2,5
5,0	5,09	2,68	
10,0	9,98	1,51	

DPR – desvio padrão relativo

Valores de DPR (%) (precisão intercorrída) correspondem respectivamente às concentrações baixa, média e alta.

Tabela 16 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação da nimesulida em TA (pH 4,5)

Concentração teórica	Concentração experimental média (n =3) (µg/mL)	DPR (%) (precisão intracorrída)	DPR (%) (precisão intercorrída)
Análise 1º dia			
1,0	1,02	0,98	1,49
10,0	10,77	2,08	
25,0	25,0	0,320	
Análise 2º dia			
1,0	1,01	1,98	1,04
10,0	10,15	1,12	
25,0	25,04	0,19	

DPR – desvio padrão relativo

Valores de DPR (%) (precisão intercorrída) correspondem respectivamente às concentrações baixa, média e alta.

Tabela 17 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação da nimesulida em SESSE (pH 6,8)

Concentração teórica	Concentração experimental média (n =3) (µg/mL)	DPR (%) (precisão intracorrída)	DPR (%) (precisão intercorrída)
Análise 1º dia			
1,0	0,98	0,96	2,60
20,0	19,98	0,17	
40,0	40,0	0,13	
Análise 2º dia			
1,0	10,01	0,26	
20,0	20,05	0,28	0,12
40,0	40,05	0,09	

DPR – desvio padrão relativo

Valores de DPR (%) (precisão intercorrída) correspondem respectivamente às concentrações baixa, média e alta.

Todos os valores de DPR calculados foram inferiores a 5 %, como preconizado pela RE 899 (BRASIL, 2003).

Para análise de variância os valores de t calculado, 0,7294, 0,4517 e 0,4150 para FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8 respectivamente, foram inferiores ao t crítico de 4,3026 ($\alpha=0,05$), comprovando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das concentrações experimentais.

Dessa forma, podemos concluir que o método desenvolvido é preciso na faixa de concentração selecionada.

3.3.4 Exatidão

Os resultados referentes à exatidão dos métodos analíticos estão mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores calculados da porcentagem (%) de recuperação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8), para avaliação da exatidão do método

Meio	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (n =3) (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
FGSSE (pH 1,2)	0,5	0,50	98,66	0,99
	5,0	5,03	100,60	
	10,0	10,00	100,00	
TA (pH 4,5)	1,0	1,01	98,36	0,40
	10,0	10,77	100,66	
	25,0	24,90	100,10	
SESSE (pH 6,8)	1,0	1,01	101,00	1,19
	20,0	20,05	100,25	
	40,0	40,05	100,12	

De acordo com a Tabela 18, pode-se afirmar que o método desenvolvido é exato, uma vez que todos os valores de recuperação mantiveram-se na faixa 98-102%. Os resultados encontrados têm concordância com o preconizado por JENKE (1996) e GREEN (1996). Além disso, os valores do DPR (%) foram inferiores a 2 %, o que também corrobora com a afirmativa de exatidão do método.

Para a avaliação da variância entre as concentrações experimentais e teóricas, os valores de t calculado, 0,4222, 0,4944 e 0,1107 para FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8 respectivamente, foram inferiores ao t crítico de 4,3026 ($\alpha=0,05$), comprovando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das concentrações teórica e experimental.

3.3.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram estimados com base nas fórmulas presentes na RE 899 (BRASIL, 2003), mostrados nas Figuras 6 e 7. Os resultados estão expostos na Tabela 19.

Tabela 19 - LD e LQ para os métodos de quantificação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)

Meio	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
FGSSE (pH 1,2)	0,09	0,32
TA (pH 4,5)	0,21	0,70
SESSE (pH 6,8)	0,04	0,15

É importante citar que os valores de LD e LQ mostrados na Tabela 19 são limites estimados. Para um resultado mais confiável, é necessário injetar amostras no cromatógrafo com valores próximos aos estimados, avaliar a relação sinal/ruído e a precisão entre as leituras de uma mesma amostra.

Porém, a menor concentração na faixa de trabalho de cada método desenvolvido foi maior que os valores de LQ apresentados e, além disso, foi mostrado que essas soluções com concentrações baixas apresentaram precisão e exatidão aceitáveis.

3.3.6 Robustez

Nas Tabelas 20, 21 e 22 estão mostrados os resultados da robustez do método de quantificação da nimesulida desenvolvido. As condições do método cromatográfico de quantificação da nimesulida estão indicados com um asterisco (*).

Tabela 20 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação da nimesulida no FGSSE (pH 1,2)

Tipo de meio tampão	Fator	Valor	Concentração média (n =3) (µg/mL)	DPR (%)
FGSSE (pH 1,2)	Volume de injeção (µL)	19,0	15,26	3,98
		20,0*	16,02	
		21,0	16,52	
	Fluxo da fase móvel (mL)	1,1	16,05	0,86
		1,2*	16,32	
		1,3	16,12	
	Proporção da fase móvel (%)	53:48:01	16,05	0,91
		55:45:01*	16,32	
		57:43:01	16,08	
	Temperatura da coluna (°C)	24,0	16,01	1,03
		25,0*	16,32	
		26,0	16,04	

Tabela 21 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação da nimesulida no meio TA (pH 4,5)

Tipo de meio tampão	Fator	Valor	Concentração média (n =3) (µg/mL)	DPR (%)
TA (pH 4,5)	Volume de injeção (µL)	19,0	15,15	5,01
		20,0*	16,13	
		21,0	16,74	
	Fluxo da fase móvel (mL)	1,1	15,95	1,86
		1,2*	16,13	
		1,3	16,54	
	Proporção da fase móvel (%)	53:48:01	15,89	0,79
		55:45:01*	16,13	
		57:43:01	15,94	
	Temperatura da coluna (°C)	24,0	15,78	1,14
		25,0*	16,13	
		26,0	15,89	

Tabela 22 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação da nimesulida no SESSE (pH 6,8)

Tipo de meio tampão	Fator	Valor	Concentração média (n =3) (µg/mL)	DPR (%)
SESSE (pH 6,8)	Volume de injeção (µL)	19,0	16,09	5,21
		20,0*	17,31	
		21,0	17,82	
	Fluxo da fase móvel (mL)	1,1	16,93	1,17
		1,2*	17,31	
		1,3	17,23	
	Proporção da fase móvel (%)	53:48:01	16,95	1,22
		55:45:01*	17,31	
		57:43:01	16,95	
	Temperatura da coluna (°C)	24,0	16,83	1,49
		25,0*	17,31	
		26,0	16,94	

Para o método desenvolvido os valores de DPR das determinações referentes à variação do fluxo e proporção da fase móvel, bem como da temperatura da coluna foram inferiores a 2 %. Segundo RIBANI et al. (2004) o método pode ser considerado robusto se as mudanças nos parâmetros estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis.

Dessa forma, o método de quantificação da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8) pode ser considerado robusto para os fatores citados.

Observa-se que a variação do volume de injeção resultou em valores de DPR com valores considerados altos, até 5,21 %. Esse resultado demonstra que, neste método, para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis é importante dar atenção ao ajuste correto do volume de injeção no cromatógrafo.

4 CONCLUSÕES

Um método por CLAE-UV foi desenvolvido e validado para quantificação de nimesulida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8).

Os picos da nimesulida em cada um dos meios tamponados apresentou tempo de retenção de 4,75, ideal para a realização de elevado número de análises em tempo reduzido, e fator de assimetria de 1,0, indicando total simetria dos picos analisados.

O método foi validado mostrando-se seletivo à presença de produtos de degradação do fármaco por calor seco. Além disso, o método é linear, preciso, exato e robusto para a maioria dos parâmetros analisados.

**CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR
CLAE-FLU PARA QUANTIFICAÇÃO DE
PROPRANOLOL NOS MEIOS FGSSE (pH 1,2),
TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)**

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Propranolol

O propranolol é um β -bloqueador não seletivo, utilizado no tratamento da angina pectoris, infarto do miocárdio, hipertensão miocárdica e arritmia cardíaca (VOGELPOEL et al., 2004). Além dessas indicações terapêuticas, o fármaco também é utilizado na profilaxia da enxaqueca e das cardiomiopatias, tremores e ansiedade.

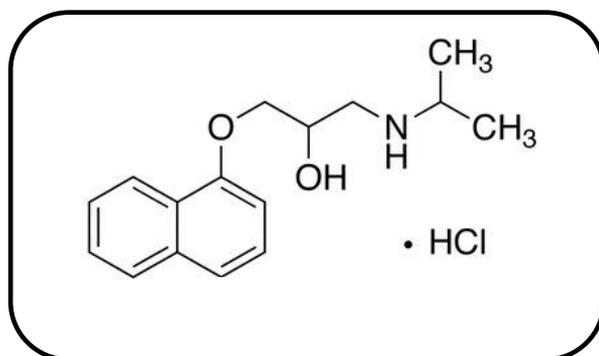
A atividade antiarrítmica do propranolol é devido principalmente ao bloqueio dos receptores cardíacos β . No tratamento com o fármaco há inibição da resposta aos estímulos adrenérgicos e, através disso o propranolol é responsável pela diminuição da taxa cardíaca, contratibilidade do miocárdio e aumento do tempo de ejeção sistólica (GROUP, 1982).

No Brasil, o cloridrato de propranolol apresentado sob a forma de comprimidos apresenta dose mínima de 10 mg e máxima de 80 mg (RODRIGUES et al., 2006).

1.1.1 Propriedades físico-químicas

A estrutura do propranolol ((\pm)-1-(Isopropilamino)-3-(1-naftiloxi)-2-propanol hidrocloreto) está mostrada na Figura 22. O fármaco tem peso molecular de 259,34 g/mol, fórmula estrutural $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$, é um sólido cristalino estável principalmente em soluções ácidas (USP, 2009).

Figura 22 - Fórmula estrutural do propranolol



O fármaco é uma base fraca com valor de pKa de aproximadamente 9,42. É solúvel em água, etanol e metanol (USP, 2009).

1.1.2 Propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e mecanismo de ação

O propranolol é quase completamente absorvido após administração oral (> 90 %). O pico de concentração plasmática é alcançado entre 1 - 2 horas após administração de dose única. A absorção é afetada pelo metabolismo de primeira passagem, em média apenas 25 % da dose administrada atingem a circulação sistêmica, porém essa porcentagem pode aumentar com o tratamento de longo prazo. É relatada uma grande variação, entre pacientes, da concentração plasmática do fármaco e seus efeitos terapêuticos. O propranolol possui meia-vida plasmática de cerca de 4 horas (FORD et al., 1985; VOGELPOEL et al., 2004).

O fármaco é amplamente distribuído no pulmão, fígado, rins e coração, e atravessa a barreira hemato-encefálica e placenta. Dessa forma, pode ser encontrado no leite materno (BANO et al., 1991).

Mais de 90 % do propranolol se liga às proteínas plasmáticas. Tanto o fármaco livre quanto o ligado às proteínas é metabolizado. A metabolização ocorre quase completamente no fígado, e a eliminação é renal. Foram identificados oito metabólitos do fármaco na urina, sendo que apenas um deles (4-hidroxiopropranolol) é considerado ativo terapeuticamente. O 4-hidroxiopropranolol tem demonstrado ter a mesma potência que o propranolol como bloqueador β -adrenérgico (BANO et al., 1991).

As principais reações adversas relatadas por pacientes em tratamento com o fármaco são: sonolência (principalmente quando administrado doses altas), cansaço, fraqueza, distúrbios gastro-intestinais, ansiedade, broncoespasmo, depressão mental e redução da circulação periférica. Há um risco aumentado de reações adversas no sistema nervoso central, visto que o fármaco atravessa a barreira hemato-encefálica (GREENBLATT; KOCH-WESER, 1973).

1.1.3 Classificação biofarmacêutica do propranolol

Baseado no SCB, o propranolol é considerado como fármaco de classe I, uma vez que possui alta solubilidade nos meios do trato gastrointestinal e alta permeabilidade nas membranas biológicas. Pode-se inferir que o fármaco é bem

absorvido e o fator limitante para absorção é a dissolução ou o esvaziamento gástrico (caso a dissolução seja muito rápida) (AMIDON et al., 1995)

O propranolol é um fármaco de alta permeabilidade, pois a extensão da absorção em humanos é superior a 90 % (FDA, 2000; VOGELPOEL et al., 2004).

A solubilidade é pH-dependente, e em meios com pH 1,2 a solubilidade é superior quando comparado a pH 6,8. Apesar disso, é relatado que nos meios com pH de 1 a 7,5 o fármaco apresenta excelente solubilidade, relação D/S menor que 250, podendo assim ser classificado como de alta solubilidade (TAYLOR et al., 1978; KRÄMER et al., 1997; VOGELPOEL et al., 2004).

O propranolol possui maior solubilidade em meio aquoso ácido devido à presença de uma amina terciária na estrutura do fármaco mostrado na Figura 22. Essa amina atua como uma base fraca de Brønsted-Lowry, e após sua protonação há formação do sal de amina quaternária ($R_1R_2NH_2^+$). O sal formado permite mais uma interação da substância com a água (íon-dipolo), além das já existentes: ligações de hidrogênio entre a água e funções éter e álcool. Todas as interações citadas atuando de forma conjunta permitem a solubilização do fármaco (AVDEEF, 2001; GONSALVES et al., 2013).

Com a alcalinização do meio, a amina ficará desprotonada e as interações íon-dipolo estarão diminuídas ou deixaram de existir, e conseqüentemente haverá redução da solubilidade (CLARKE; CAHOON, 1987; GONSALVES et al., 2013).

De acordo com a equação de Henderson-Hasselbach (Figura 2), em pH 2,5, o propranolol é quase 100 % ionizado. Em pH 7,6 o fármaco se encontra 98,76 % ionizado. Assim, a solubilidade do propranolol em pH ácido é maior que em pH básico (TAKKA et al., 2001). De acordo com MARTINEZ; AMIDON (2002), fármacos que são bases fracas tendem a apresentar dissolução lenta em pH alto, pois grande parte do fármaco estará na forma não ionizada. Assim, é possível inferir que alimentos que elevam o pH gástrico podem provocar a diminuição da dissolução de fármacos que são bases fracas.

Na Tabela 23 estão mostrados alguns dados da solubilidade do propranolol encontrados na literatura.

Tabela 23 - Variação da solubilidade aquosa do propranolol: dados obtidos na literatura

Meio	Solubilidade (mg/mL)	Temperatura	Fonte
Água	50,0	NE	WANG, et al., 2002
	30,0	NE	VOGELPOEL, et al., 2004
Tampão pH 1,2	225,0	37 °C	JAGDALE et al., 2009
Tampão pH 6,8	130,0	37 °C	JAGDALE et al., 2009
Tampão pH 7,4	101,0	37 °C	JAGDALE et al., 2009
	254,0	NE	LECOMTE et al., 2004

NE – não especificado

Como pode ser observado na Tabela 23, há grande discrepância nos dados da solubilidade aquosa do propranolol, encontrados na literatura. Os dados apresentam considerável variação, e a solubilidade de 254,0 mg/mL em pH 7,4 (quando comparado com dados em outros valores de pH) não condiz com o esperado, uma vez que é sabido que a solubilidade do fármaco é pH-dependente, como discutido anteriormente.

2 Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Substância química de referência

Propranolol substância química de referência (SQR), fornecida pela Anvisa/Farmanguinhos – FIOCRUZ, proveniente da Farmacopeia Brasileira, lote 1005, teor de 100,1 %, válido por todo período do estudo.

2.1.2 Equipamentos e materiais

Aparelho de ultrassom Unique, modelo USC-1400;

Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220, com precisão de 0,010 g;

Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220D, com precisão de 0,001 g;

Bomba de vácuo Marconi, modelo MA057/2;

Coluna C18 Agilent (50 x 4,6 mm; 5,0 µm);

Destilador Cristófoli;

Estufa de secagem e esterilização Fanem, modelo 315 SE;

Cromatógrafo Waters Alliance e2695, com forno, injeção automática, detector ultravioleta e fluorescência, software Empower versão 2;

Cromatógrafo Waters Alliance 2695, com forno, injeção automática, detector DAD (arranjo de diodos), software Empower versão 2;

Unidade filtrante Millex HV com membrana de durapore PVDF com poros de 0,45 µm, Millipore;

Vials de vidro âmbar Waters de 2 mL com tampa e septos de teflon.

Membrana de celulose, 0,45µm de poro, Millipore;

pHmetro Hanna;

Pipetas Gilson, volume ajustável de 10 - 100 µL e 100 - 1000 µL; 1000 – 5000 µL, modelo Pipetman;

Ponteiras plásticas Axygen de 200 µL, 1000 µL e 5000 µL;

Sistema de purificação de água Millipore, modelo DIRECT-Q 8;

2.2 Métodos

2.2.1 Desenvolvimento de método cromatográfico para quantificação de propranolol no FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5); SESSE (pH 6,8)

2.2.1.1 Determinação das condições analíticas

As análises foram realizadas em cromatógrafo Water Alliance[®] 2695, com detector DAD e cromatógrafo Water Alliance[®] e2695, com detector de fluorescência (multi-comprimento de onda) e UV.

Para as análises foi utilizada uma coluna cromatográfica empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18), da marca Varian[®], (50 x 4,6 mm; 5 µm). A temperatura foi mantida a 25 °C.

A seleção das condições cromatográficas para quantificação do propranolol foi baseada em dados disponíveis na literatura e também em parâmetros de adequação do sistema cromatográfico.

Fase móvel e vazão

Foram avaliadas diferentes proporções da fase móvel ACN:Tampão KH₂PO₄ (pH 3,5) e duas concentrações da solução tampão. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min. No processo de seleção da fase móvel foram analisados o fator de retenção e assimetria do pico.

Volume de injeção e comprimento de onda para detecção do analito

Foram analisados volumes de injeção de 8 e 10 µL. Os comprimentos de onda (λ) utilizados foram 290 nm para detector UV/DAD e λ_{excitação}: 290 nm e λ_{emissão}: 358 nm para detector de fluorescência.

Preparo da solução estoque (SE) de propranolol

Foram pesados exatamente 25,0 mg de propranolol SQR e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com metanol. Foi obtida uma solução com concentração de 1 mg/mL de propranolol.

Preparo das soluções diluídas

Para o preparo das soluções diluídas, retiraram-se alíquotas da solução estoque, e completou-se o volume das soluções com os meios tamponados: FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8), de acordo com a Tabela 24.

A forma de preparo dos meios tamponados utilizados está mostrado na Tabela 42.

As soluções foram filtradas diretamente para o *vial*, usando seringa de vidro e unidades filtrantes Millex[®] de 0,45 µm.

2.2.2 Avaliação da estabilidade da solução estoque (SE) e soluções diluídas

Foram avaliadas as estabilidades da SE de propranolol e das soluções diluídas, em FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e em SESSE (pH 6,8).

A concentração da SE foi de 200 µg/mL e das soluções diluídas foi de 50 µg/mL em cada meio tamponado.

A avaliação da estabilidade das soluções diluídas foi realizada num período de 52 horas, com as condições utilizadas nos estudos de solubilidade do fármaco: 37 °C, e sob agitação de 100 rpm. A estabilidade da SE foi avaliada por 10 horas, nas condições ambientais do laboratório. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

O critério para avaliação da estabilidade consistiu no preconizado por GREEN (1996). Assim, as variações das áreas não devem ser superiores a 2 % em relação à área inicial.

2.2.3 Validação do método analítico

Os métodos analíticos desenvolvidos para quantificação do propranolol foram validados de acordo com a Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2003) e do guia Q2B-ICH (ICH, 1995). Os parâmetros foram determinados em cada um dos meios tamponados: FGSSE pH 1,2; TA pH 4,5; SESSE pH 6,8.

Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação (teóricos) e robustez.

Todos os parâmetros da validação foram realizados utilizando propranolol SQR.

Os cálculos e análises estatísticas foram efetuados com auxílio do *software* R (versão 3.0.2) e *Microsoft Excel*[®] 2010.

2.2.3.1 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada para verificar a capacidade do método de quantificar o propranolol na presença de seus produtos de degradação.

As soluções diluídas do fármaco nos meios tamponados foram expostas ao calor seco, à temperatura de 80 °C durante 6 horas. A temperatura e o tempo de exposição foram selecionados a partir de uma triagem para avaliação das condições de degradação do fármaco.

Todas as soluções diluídas foram preparadas com concentração de 100 µg/mL.

Foram avaliadas as purezas de pico de cada solução diluída degradada, com auxílio do detector DAD e posteriormente as amostras, expostas as mesmas condições anteriormente citadas, foram analisadas com detector de fluorescência.

2.2.3.2 Linearidade

A linearidade do método desenvolvido foi avaliada pela análise de 6 concentrações do fármaco, nas curvas construídas para cada um dos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8), de acordo com a Tabela 24. A partir da SE do propranolol, com concentração de 1 mg/mL foram preparadas as soluções diluídas em cada um dos meios tamponados, de acordo com o descrito em 'preparo das soluções diluídas'. As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 24 - Preparo das soluções de propranolol, em FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8) para avaliação do parâmetro linearidade do método cromatográfico

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Alíquota da SE (mL)	Volume final da solução (mL)
40,0	0,4	10
60,0	0,6	10
80,0	0,8	10
100,0	1,0	10
120,0	1,2	10
160,0	1,6	10

A linearidade foi avaliada considerando-se os coeficientes de determinação e correlação (R^2 e R), coeficiente angular (b), coeficiente linear (a). Foram avaliados os resíduos da regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), de acordo com o recomendado pelo guia Q2B-ICH (ICH, 1995). Também foram analisadas as premissas dos resíduos da regressão.

Assim como para a avaliação da linearidade da nimesulida, a presença de valores dispersos (*outliers*) foi avaliada pelo teste de resíduos padronizados Jackknife (J_{ei}), para $\alpha = 0,05$.

Para correta aplicação do MMQO para avaliação da linearidade é necessário comprovar que os resíduos possuem distribuição normal (normalidade), variância constante ao longo do eixo x (homoscedasticidade), e que são independentes.

A normalidade foi avaliada pelo teste de Ryan-Joiner, a homoscedasticidade do método foi verificada aplicando-se o teste de Levene modificado por Brown e Forsythe, e a independência entre os resíduos da regressão foi avaliada com o teste de Durbin-Watson ($\alpha = 0,05$).

A estatística de cada um dos testes e as hipóteses estão descritas no item 2.2.3.2.

Posteriormente às análises dos resíduos foram verificadas a significância e o desvio de linearidade por ANOVA (*one-way*), para $\alpha = 0,05$.

2.2.3.3 Precisão

Foi avaliada a precisão por repetitividade (precisão intracorrída), em três níveis de concentração: baixa, média e alta (40, 100 e 160 µg/mL) e por reprodutibilidade parcial (precisão intercorrída). A última foi determinada da mesma forma da precisão intracorrída, porém em 2 dias consecutivos, num total de 18 determinações.

A precisão foi avaliada em cada meio tamponado: FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8).

O cálculo da precisão do método desenvolvido foi realizado com a fórmula mostrada na Figura 4.

O critério de aceitação utilizado foi o descrito na RE 899 (BRASIL, 2003), sendo assim o desvio padrão relativo (DPR) não pode ser superior a 5 %. Além disso, foi aplicado o teste *t* de *Student* ($\alpha = 0,05$) para avaliar se as concentrações médias experimentais obtidas em dias diferentes diferiam ou não entre si. Neste teste a H_0 é de que a concentração experimental não difere da concentração teórica e a H_a de que a concentração experimental difere da concentração teórica. Assim, para a H_0 não ser rejeitada, *t* calculado deve ser menor que o *t* crítico.

2.2.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em três níveis de concentração (40, 100 e 160 µg/mL) para o método desenvolvido de quantificação do propranolol no FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8). Cada determinação foi realizada em triplicata. Na Figura 5 está demonstrado como foi realizado o cálculo da exatidão do método.

A RE 899 (BRASIL, 2003), não determina critérios de aceitação para este parâmetro. Em decorrência disto, foi utilizado o critério preconizado por JENKE (1996) e GREEN (1996). Segundo esses autores os resultados devem estar compreendidos entre 98 - 102%.

O teste *t* de *Student* ($\alpha = 0,05$) foi aplicado para avaliar se as concentrações experimentais diferem estatisticamente ou não das concentrações teóricas.

2.2.3.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram determinados utilizando os dados de três curvas analíticas obtidas para o método de quantificação do propranolol, nos meios tamponados: FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8).

O LD e LQ foram calculados como mostrado nas Figuras 6 e 7 considerando médias das inclinações e o desvio padrão do intercepto de três curvas analíticas.

2.2.3.6 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada considerando alguns fatores que poderiam resultar em variações na resposta do método cromatográfico.

Os parâmetros analisados e, os níveis considerados estão descritos na Tabela 25. Todas as amostras preparadas para análise do parâmetro apresentaram concentração de 80 µg/mL.

Tabela 25 - Avaliação da robustez do método para quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)

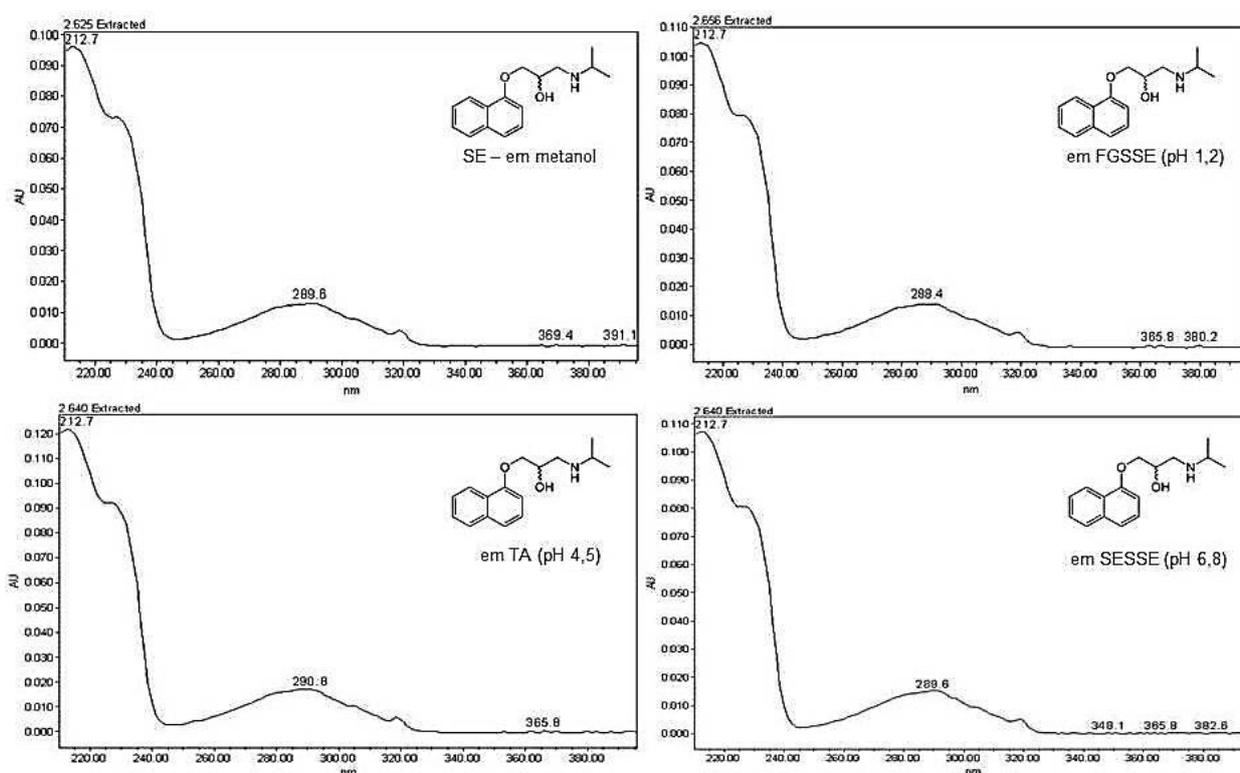
Tipo de meio tampão	Fator	Nível	Valor
FGSSE (pH 1,2);	Volume de injeção (µL)	Baixo	7,0
		Médio	8,0
		Alto	9,0
TA (pH 4,5);	Fluxo da fase móvel (mL/min)	Baixo	0,9
		Médio	1,0
		Alto	1,1
SESSE (pH 6,8)	Proporção da fase móvel (v/v)	Baixo	26:74
		Médio	28:72
		Alto	30:70
	Temperatura da coluna (°C)	Baixo	24,0
		Médio	25,0
		Alto	26,0

3 Resultados e Discussão

3.1 Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5); SESSE (pH 6,8)

Inicialmente foi obtido com o detector DAD, os espectros de UV do propranolol mostrados na Figura 23.

Figura 23 - Espectro de UV do propranolol SE e nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2; TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8) obtido com auxílio do detector DAD



Por meio dos espectros obtidos foi possível observar que o fármaco apresenta dois comprimentos de onda de máxima absorção: aproximadamente 290 e 212 nm. A utilização do comprimento de onda de 212 nm resulta em cromatogramas com interferentes, devido à absorção do solvente orgânico que compõe a fase móvel. É sabido que interferências da fase móvel são maiores em comprimentos de onda menores (BRONNER; BEECHER, 1998) Dessa forma, para esse método foi selecionado comprimento de onda de 290 nm.

O propranolol é um fármaco básico, com pKa 9,42 (JÄRVINEN et al., 1998) e assim, a utilização de colunas C18 para quantificação do mesmo pode gerar picos

com fatores de cauda próximos a 1,5 devido à interação secundária com os grupos silanóis residuais ionizáveis, que podem estar presentes na sílica da coluna cromatográfica. Para evitar o problema uma das estratégias usadas é a de utilizar fase móvel (FM) com pH baixo de forma a protonar os grupos silanóis residuais (BORGES et al., 2012; FERNÁNDEZ-NAVARRO et al., 2012). Apesar disso, não é recomendável a utilização de FM com pH menor que 2, devido a possibilidade de dissolução da sílica (SILVA et al., 2004). Assim, nesse trabalho utilizou-se a FM com pH de 3,5.

Utilizou-se como FM acetonitrila e tampão fosfato de potássio. Os componentes selecionados foram utilizados em vários métodos de análises do propranolol por cromatografia a líquido de alta eficiência (EL-SAHARTY, 2003; PANCHAGNULA et al., 2004; VENKATESH et al., 2007).

Foram avaliadas diferentes concentrações do tampão fosfato de potássio e proporções dos componentes da FM como mostrado na Tabela 26.

Tabela 26 - Parâmetros cromatográficos para desenvolvimento de método para quantificação do propranolol (SE) utilizando diferentes concentrações de tampão fosfato e proporções dos componentes da fase móvel

Composição da fase móvel (v/v) ACN:Tampão KH₂PO₄ 25 mM, pH 3,5	K'	T
70:30	1,85	1,70
75:25	1,65	2,00
72:28	1,50	2,90
Composição da fase móvel (v/v) ACN:Tampão KH₂PO₄ 40 mM, pH 3,5	K'	T
70:30	1,45	1,30
75:25	1,35	1,95
72:28	1,18	2,26

Como pode ser observado na Tabela 26, a fase móvel composta por ACN:Tampão KH₂PO₄ 40 mM na proporção 72:28 (v/v) proporcionou a obtenção do pico com fator de cauda próximo a 1,00. O valor obtido para K' é considerado bom e aceitável, pelo fato do fármaco ser uma base fraca (SNYDER et al., 2012). O tempo de

retenção foi de 2,85 minutos e fator de retenção (T) de 2,26 minutos, valor aceitável já que o tempo morto para a coluna utilizada é de 0,59 minutos. Assim, a proporção citada foi escolhida para ser utilizada para quantificação do propranolol.

O fluxo utilizado nesse método foi de 1 mL/min. Em relação ao volume de injeção foram analisados de 8 e 10 µL. A utilização do volume de injeção de 8 µL resultou em picos mais finos e simétricos. Assim, o mesmo foi escolhido para o método desenvolvido.

Após a definição das condições do método cromatográfico, foi avaliada a seletividade do mesmo. A partir da análise foi concluído que o método de quantificação do propranolol por CLAE/UV não apresentava seletividade adequada à aplicação pretendida, como mostrado no item 3.3.1. Assim, foi utilizado o detector de fluorescência para a quantificação do propranolol.

A obtenção de um método seletivo para quantificação do propranolol nos meios tamponados era imprescindível, não só pela obrigatoriedade perante às recomendações presentes nos guias de validação, mas também devido à importância da seletividade para confiabilidade e reprodutibilidade das análises a serem realizadas. Assim amostras submetidas às condições descritas no item 3.3.1 foram avaliadas com o detector de fluorescência (multi-comprimento de onda). É extensamente discutido na literatura o fato de que métodos analíticos luminescentes possuem alta sensibilidade e seletividade.

O detector de fluorescência é um dos mais sensíveis em cromatografia a líquido de alta eficiência. Este detector proporciona alta seletividade combinada com menores limites de detecção quando comparado ao detector de UV (OGAN et al., 1979; JAVADZADEH et al., 2008; SOTOMAYOR et al., 2008). A maior seletividade observada pode ser atribuída ao fato de que moléculas fluorescentes possuem comprimento de onda característico de excitação e emissão. Ademais, o comprimento de onda de excitação de moléculas fluorescentes está localizado em uma faixa de comprimento de onda diferente do espectro de emissão (SOTOMAYOR et al., 2008).

Apesar das diversas vantagens citadas na utilização de detectores de fluorescência, uma das desvantagens notáveis é a de que há estimativa que apenas 10 % das moléculas orgânicas possuem fluoróforo em sua estrutura, o que permite que a molécula absorva energia em um comprimento de onda e, posteriormente emita em outro comprimento de onda maior. No caso do propranolol, como pode ser observado em sua estrutura química na Figura 22, este possui diversas características

para ser um bom fluoróforo: anéis aromáticos fundidos, heteroátomos e grupos doadores de elétrons.

Existem trabalhos em que a quantificação do propranolol foi realizada por meio da cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de fluorescência, utilizando diferentes matrizes. Nestes estudos, os autores obtiveram maiores sensibilidade e seletividade relacionados ao método, utilizando detector de fluorescência, ao invés do UV (JATLOW et al., 1979; AUGUSTIJNS; MOLS, 2004; PALMGRÉN et al., 2004).

Com o método desenvolvido mostrado na Tabela 27, foram obtidos os cromatogramas da Figura 24, em cada um dos meios tamponados.

Figura 24 - Cromatogramas obtidos para soluções de propranolol em A: FGSEE (pH 1,2), B: TA (pH 4,5) e C: SESSE (pH 6,8) na concentração de 40 µg/mL , nas condições definidas para o método de quantificação do propranolol por CLAE-FLU

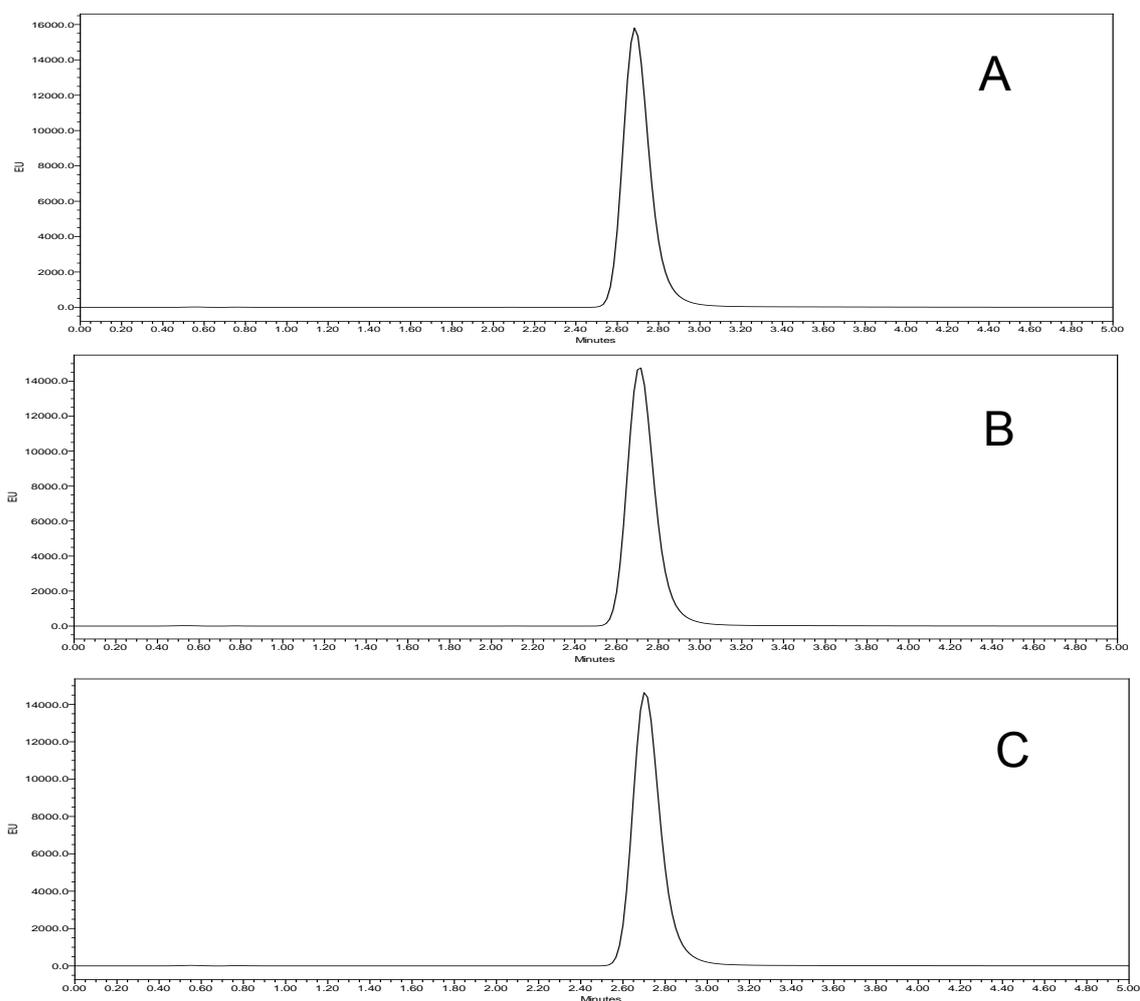


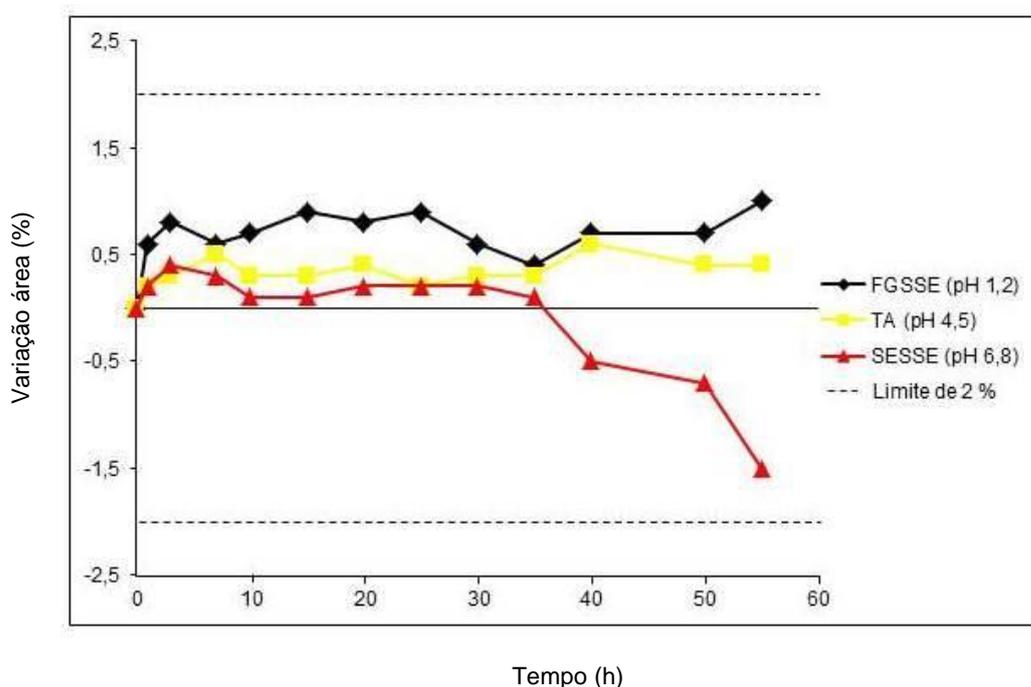
Tabela 27 - Condições analíticas do método para quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)

Parâmetro	Especificação
Coluna	C18 (50 x 4,6 mm; 5 µm) – Varian
Fase móvel	ACN:Tampão KH ₂ PO ₄ 40 mM, pH 3,5 (72:28, v/v)
Fluxo	1,0 mL/min
Temperatura	25 °C
Deteção	Fluorescência (multi-λ) - λ _{excitação} : 290 nm; λ _{emissão} : 358 nm
Volume de injeção	8 µL

3.2 Avaliação da estabilidade da solução estoque (SE) e soluções diluídas

A SE do propranolol demonstrou ter estabilidade durante as 10 horas avaliadas, pois todas as áreas referentes aos picos das alíquotas coletadas tiveram variação menor que 2 %, em relação ao valor inicial. Os resultados da estabilidade das soluções diluídas do propranolol em cada um dos meios tamponados (FGSSE pH 1,2; TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8) estão mostrados na Figura 25.

Figura 25 - Avaliação da estabilidade por meio da variação das áreas do propranolol nos meios tamponados



De acordo com a Figura 25, todas as soluções foram estáveis em até 55 horas de avaliação, pois a variação das áreas das mesmas não foi igual ou superior a 2 %, em relação aos valores iniciais. Nota-se que a solução do fármaco em SESSE (pH 6,8) apresentou indicação de início de degradação, a partir de 35 horas. Isso já era esperado, pois a estabilidade do propranolol é menor em matrizes com pH mais elevados (LIEDHOLM et al., 1990; MUSKO; SZNITOWSKA, 2013).

3.3 Validação do método analítico

3.3.1 Seletividade

Inicialmente foram verificadas os resultados de pureza dos picos referentes ao propranolol, com auxílio do detector DAD, de cada uma das soluções diluídas (sob condição de estresse) do propranolol nos meios tamponados, FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8). Os resultados das análises estão na Tabela 28.

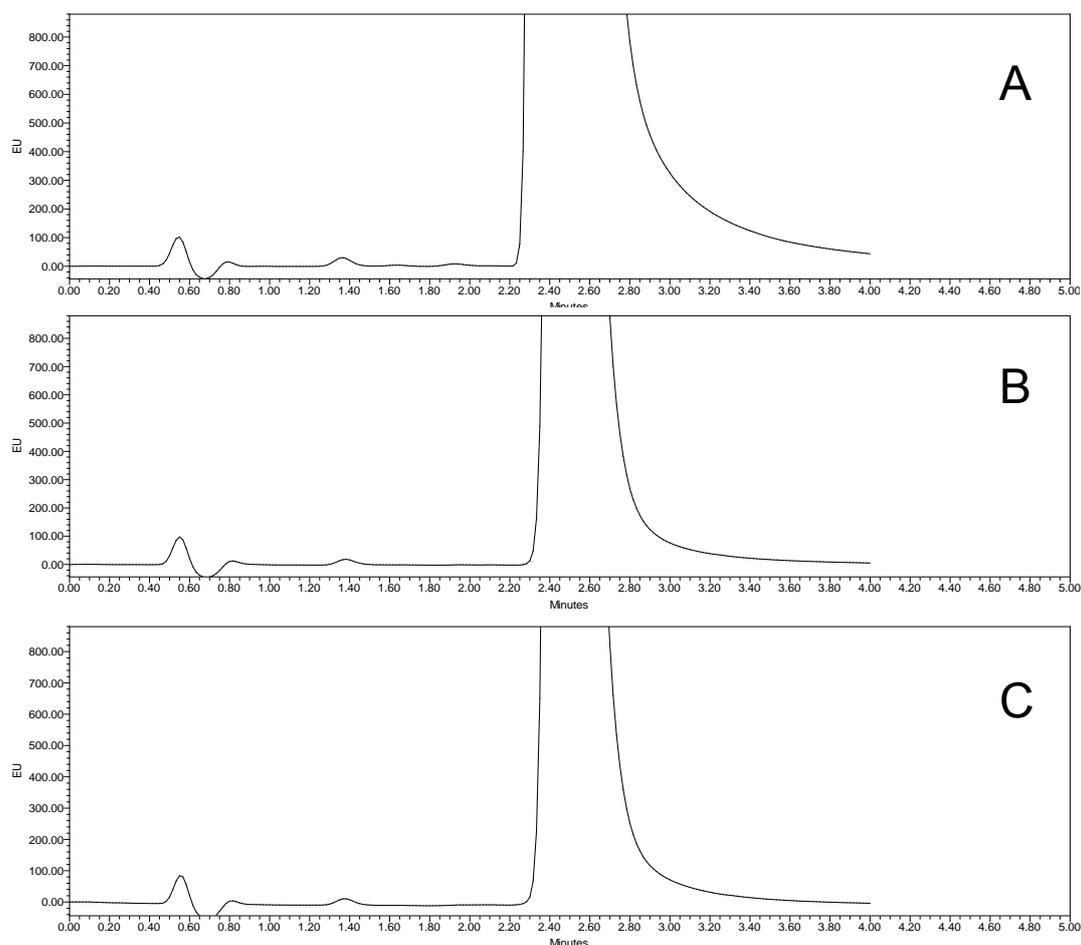
Tabela 28 - Avaliação dos resultados de pureza de pico das soluções diluídas do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)

Tipo de meio tampão	Ângulo de pureza	Ângulo limite
FGSSE (pH 1,2)	0,492	0,462
TA (pH 4,5)	0,601	0,556
SESSE (pH 6,8)	0,497	0,481

Como pode ser observado na Tabela 28, o método desenvolvido para quantificação do propranolol por CLAE-UV nos meios tamponados não demonstrou ser seletivo. De acordo com a análise dos dados de pureza de pico realizada por meio do *software* Empower versão 2, os ângulos de pureza devem ser menores que os correspondentes ângulos limites, para que possam ser considerados puros e, para esse método todos os valores dos ângulos de pureza foram superiores aos ângulos limites. Assim, analisou-se a utilização do detector de fluorescência.

Inicialmente foram analisadas amostras (soluções diluídas) recém-preparadas, antes de serem submetidas à degradação forçada. Posteriormente foram analisadas as soluções diluídas degradadas nos meios tamponados. Os cromatogramas dessas amostras estão mostrados na Figura 26. A partir das análises pôde-se notar que as áreas referentes ao propranolol diminuíram consideravelmente quando comparados com as áreas das amostras recém-preparadas, sobretudo nos meios TA (pH 4,5) (40 %) e SESSE (pH 6,8) (60 %). Para o meio FGSSE (pH 1,2), houve uma menor diminuição da área do pico do propranolol, em comparação com os outros meios (20 %). Em diversos estudos de estabilidade do propranolol foi observado que este fármaco possui excelente estabilidade em meios com pH ácido abaixo de 3, com uso de aquecimento ou não. Nos meios com pH maior que 3 observou-se menor estabilidade do fármaco, sobretudo quando exposto à luz (LIEDHOLM et al., 1990; L.A., 1996; MUSKO; SZNITOWSKA, 2013). Assim, os resultados observados neste estudo estão de acordo com os trabalhos citados.

Figura 26 - Cromatogramas obtidos após exposição das soluções diluídas ao calor seco, sendo A (FGSSE, pH 1,2), B (TA, pH 4,5) e C (SESSE pH 6,8)



Dessa forma, o método de quantificação do propranolol por CLAE-fluorescência é seletivo.

3.3.2 Linearidade

Com auxílio do teste de resíduos padronizados de Jackknife, para $\alpha = 0,05$, foi possível detectar 1 (um) valor disperso (*outlier*) para a curva analítica do propranolol em meio TA (pH 4,5) (segunda replicata da concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$) e 1 (um) *outlier* para a curva do mesmo fármaco em meio SESSE (pH 6,8) (terceira replicata da concentração de 160 $\mu\text{g/mL}$). Para a curva do propranolol em FGSSE (pH 1,2) não foram identificados valores dispersos. Os valores dispersos estão identificados nos gráficos de resíduos.

Os gráficos das regressões lineares e dos resíduos da regressão estão mostrados nas Figuras 27, 28, 29, 30, 31, 32. Cada ponto dos gráficos de regressão corresponde a médias de 3 determinações e os erros referentes as mesmas foram plotados.

Figura 27 - Curva analítica do método de quantificação do propranolol em FGSSE (pH 1,2)

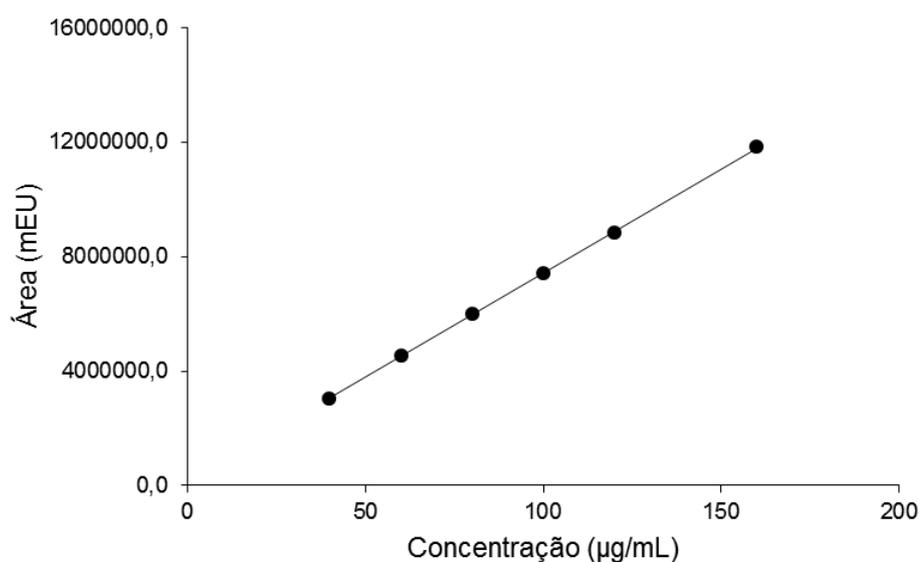


Figura 28 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do propranolol em FGSSE (pH 1,2)

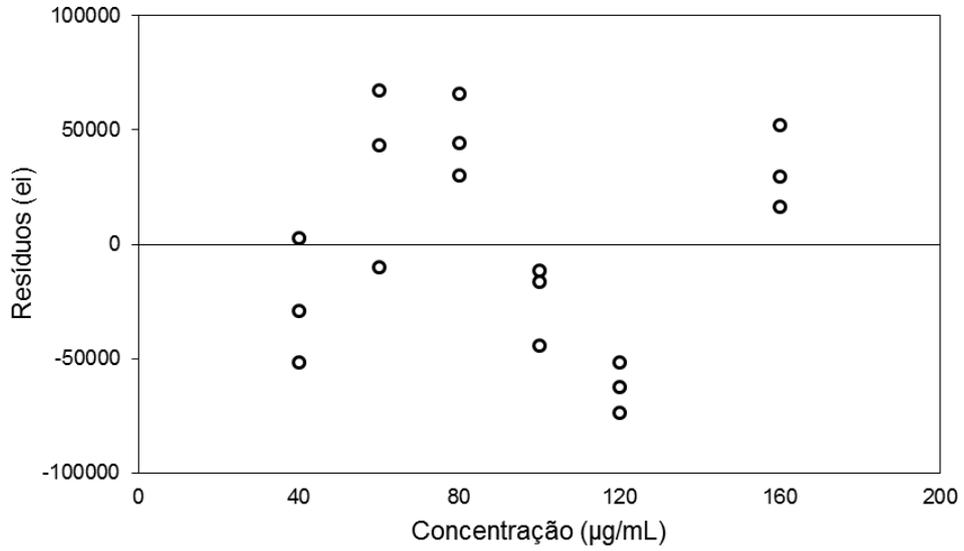


Figura 29 - Curva analítica do método de quantificação do propranolol em TA (pH 4,5)

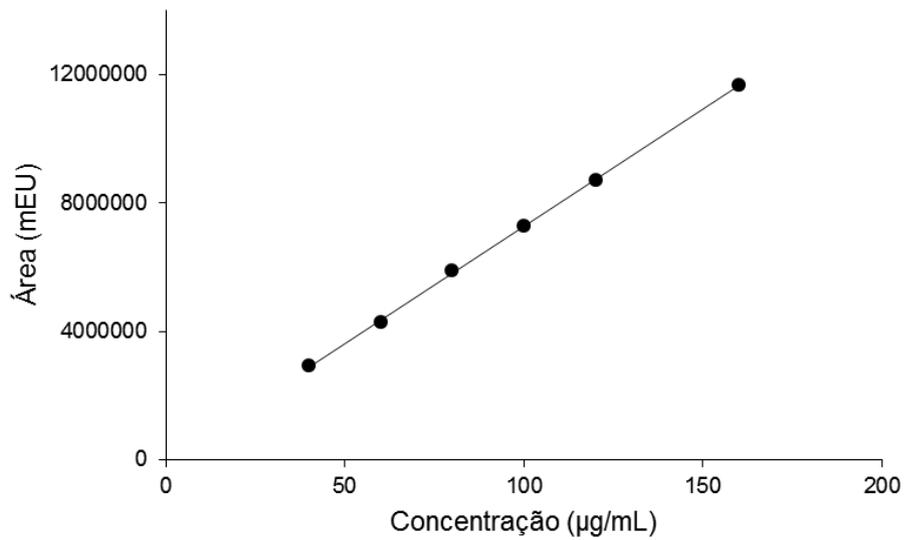


Figura 30 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do propranolol em TA (pH 4,5)

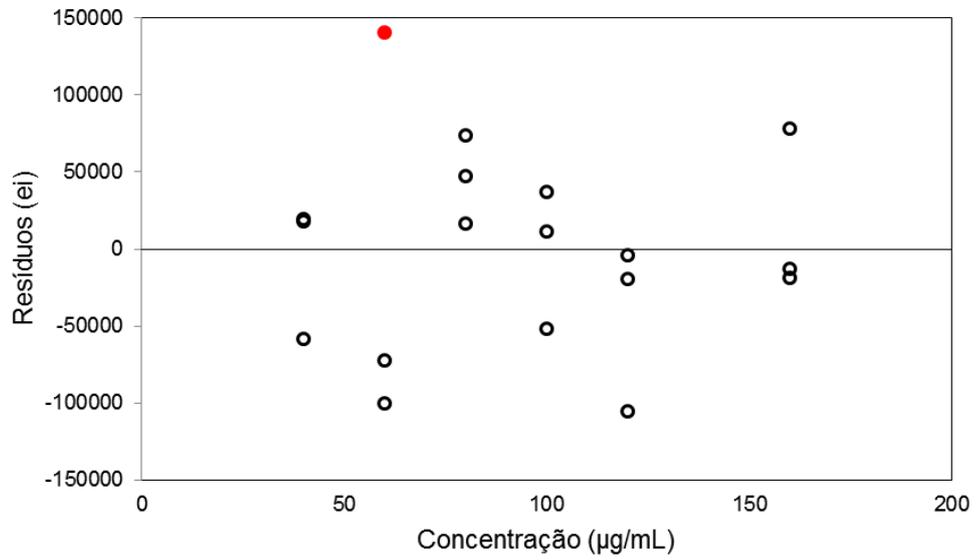


Figura 31 - Curva analítica do método de quantificação do propranolol em SESSE (pH 6,8)

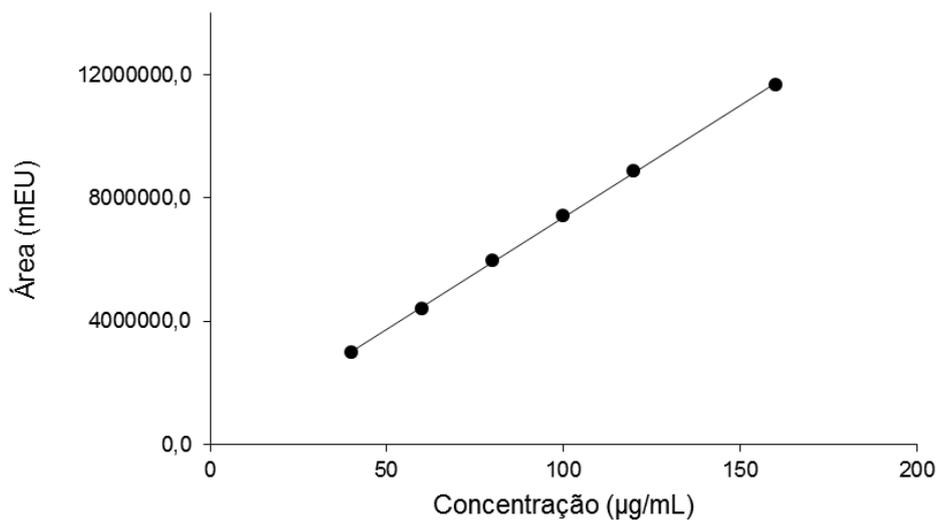
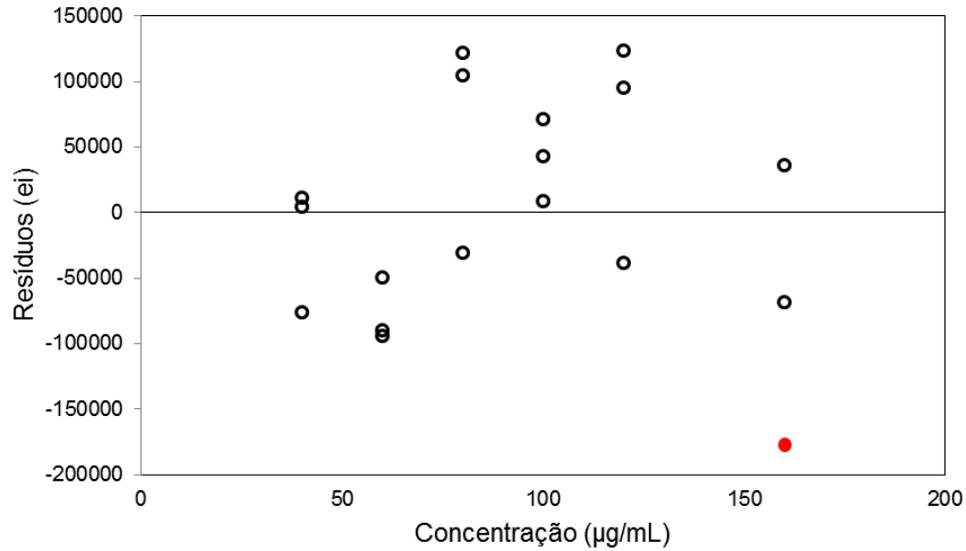


Figura 32 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do propranolol em SESSE (pH 6,8)



Nas Figuras 28, 30 e 32 estão mostrados que os resíduos provenientes dos resultados das regressões lineares, de cada um dos meios tamponados, estão aleatoriamente distribuídos ao longo do eixo zero não demonstrando tendências sistemáticas.

Em relação às premissas dos resíduos, a normalidade, homoscedasticidade e a independência dos resíduos foram confirmadas, para cada uma das curvas analíticas, pelos testes de Ryan Joiner, Levene modificado por Brown e Forsythe e Durbin-Watson, como mostrado nas Tabelas 29, 30 e 31. Além disso, nas mesmas Tabelas estão mostrados os resultados da significância da regressão e desvio da linearidade, realizados por meio da ANOVA.

Tabela 29 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação do propranolol no meio FGSSE (pH 1,2), para $\alpha = 0,05$

Avaliação / Teste estatístico	Estatística	Propranolol em FGSSE pH (1,2)	Critério de aceitação
Normalidade / Ryan Joiner	R	0,9918	> 0,9461
Homoscedasticidade/ Levene modificado	t_L	0,5274	< 2,110
Independência/ Durbin-Watson	d	2,2324	> 1,391 / < 2,609
Significância da regressão	F	67048,0688	> 2,0615E-30
Desvio da linearidade	F	7,5136E-5	< 4,1300

Tabela 30 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação do propranolol no meio TA (pH 4,5), para $\alpha = 0,05$

Avaliação / Teste estatístico	Estatística	Propranolol em TA pH (4,5)	Critério de aceitação
Normalidade / Ryan Joiner	R	0,9917	> 0,9437
Homoscedasticidade/ Levene modificado	t_L	0,1082	< 2,120
Independência/ Durbin-Watson	d	2,0619	> 1,381 / < 2,619
Significância da regressão	F	34175,1459	> 4,5168E-28
Desvio da linearidade	F	0,3938	< 4,1490

Tabela 31 - Resultados das premissas dos resíduos e ajuste ao modelo linear para método de quantificação do propranolol no meio SESSE (pH 6,8), para $\alpha = 0,05$

Avaliação / Teste estatístico	Estatística	Propranolol em SESSE pH (6,8)	Critério de aceitação
Normalidade / Ryan Joiner	R	0,9918	> 0,9437
Homoscedasticidade/ Levene modificado	t_L	0,3615	< 2,120
Independência/ Durbin-Watson	d	2,2074	> 1,381 / < 2,619
Significância da regressão	F	19118,4128	> 4,6956E-26
Desvio da linearidade	F	0,3252	< 4,1490

Assim, as premissas dos resíduos de cada uma das curvas analíticas do propranolol nos meios tamponados foram confirmadas. Os mesmos possuem distribuição normal (valores de R maiores que o R crítico e $p > 0,05$) são homoscedásticos (valores de t_L menores que o t_L crítico, $p > 0,05$) e independentes (valor de d calculado entre du e $4-du$, $p > 0,05$). Além disso, foi comprovada a adequação ao modelo linear por ANOVA ($\alpha = 0,05$), pois foi confirmada a significância da regressão (valores de F calculados maiores que os F críticos) e ausência de desvio de linearidade (valores de F calculados menores que os F críticos).

Na Tabela 32 estão mostrados os parâmetros da regressão linear para o método de quantificação do propranolol em cada um dos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8).

Tabela 32 - Parâmetros da regressão linear obtidos para o método de quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), no TA (pH 4,5) e no SESSE (pH 6,8)

Parâmetro da regressão	Curva em FGSSE (pH 1,2)	Curva em TA (pH 4,5)	Curva em SESSE (pH 6,8)
R ²	0,9999	0,9998	0,9996
a	72929 ± 421,0	72780 ± 393,7	73342 ± 523,3
b	107073 ± 42660	22910 ± 39890	40496 ± 53030
R	0,9999	0,9999	0,9997

R²: coeficiente de determinação; a: coeficiente linear; b: coeficiente angular; R: coeficiente de correlação linear

Como pode ser observado na Tabela 32, os valores dos coeficientes de determinação (R²) e correlação (R) foram superiores a 0,99 para a quantificação do propranolol em cada um dos meios tamponados. Assim, o método cumpre com o requisito mínimo de linearidade preconizado pela RE 899 (BRASIL, 2003).

Dessa forma, é possível inferir que o modelo de regressão linear escolhido foi adequado às análises efetuadas.

3.3.3 Precisão

Os resultados da precisão por repetitividade (precisão intracorrída), e por reprodutibilidade parcial (precisão intercorrída), para cada um dos métodos desenvolvidos, estão nas Tabelas 33, 34, 35.

Tabela 33 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação do propranolol em FGSSE (pH 1,2)

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (n=3) (µg/mL)	DPR (%) (precisão intracorrída)	DPR (%) (precisão intercorrída)
Análise 1º dia			
40	39,96	0,77	0,38
80	80,22	0,33	
160	160,40	0,12	
Análise 2º dia			
40	40,18	2,77	0,12
80	80,36	1,95	
160	160,44	0,09	

DPR – desvio padrão relativo.

Valores de DPR (%) (precisão intercorrída) correspondem respectivamente às concentrações baixa, média e alta.

Tabela 34 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação do propranolol em TA (pH 4,5)

Concentração teórica	Concentração experimental média (n=3) (µg/mL)	DPR (%) (precisão intracorrída)	DPR (%) (precisão intercorrída)
Análise 1º dia			
40	39,31	1,56	1,613
80	79,33	0,49	
160	158,33	0,47	
Análise 2º dia			
40	38,13	1,87	0,964
80	80,42	0,29	
160	158,34	0,57	

DPR – desvio padrão relativo.

Valores de DPR (%) (precisão intercorrída) correspondem respectivamente às concentrações baixa, média e alta.

Tabela 35 - Precisão intracorrída e intercorrída do método para quantificação do propranolol em SESSE (pH 6,8)

Concentração teórica	Concentração experimental média (n=3) (µg/mL)	DPR (%) (precisão intracorrída)	DPR (%) (precisão intercorrída)
Análise 1º dia			
40	40,06	1,67	0,031
80	81,45	1,42	
160	159,05	0,92	
Análise 2º dia			
40	40,04	2,21	0,121
80	81,44	2,87	
160	159,32	0,43	

DPR – desvio padrão relativo.

Valores de DPR (%) (precisão intercorrída) correspondem respectivamente às concentrações baixa, média e alta.

Todos os valores de DPR calculados foram inferiores a 5 %, como preconizado pela RE 899 (BRASIL, 2003).

Para análise de variância os valores de *t* calculado, 0,1246, 0,9093 e 0,4986 para FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8 respectivamente, foram inferiores ao *t* crítico de 4,3026 ($\alpha=0,05$), comprovando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das concentrações experimentais.

Dessa forma, podemos concluir que o método desenvolvido é preciso na faixa de concentração selecionada.

3.3.4 Exatidão

Os resultados referentes à exatidão dos métodos analíticos estão mostrados na Tabela 36.

Tabela 36 - Valores calculados da recuperação (%) do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8) para avaliação da exatidão dos métodos

Meio	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (n=3) (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
FGSSE (pH 1,2)	40,0	39,96	99,90	0,105
	80,0	80,22	100,27	
	160,0	160,40	100,25	
TA (pH 4,5)	40,0	39,31	98,27	1,270
	80,0	79,33	99,16	
	160,0	158,33	98,95	
SESSE (pH 6,8)	40,0	40,06	100,15	0,421
	80,0	81,45	101,81	
	160,0	159,05	99,40	

De acordo com a Tabela 36, pode-se afirmar que o método desenvolvido é exato, uma vez que todos os valores de recuperação mantiveram-se na faixa 98-102 %. Os resultados encontrados têm concordância com o preconizado por JENKE (1996) e GREEN (1996). Além disso, os valores do DPR (%) foram inferiores a 2 %, o que também corrobora com a afirmativa de exatidão do método.

Para a avaliação da variância entre as concentrações experimentais e teóricas, os valores de t calculado, 0,2692, 0,0922 e 0,8136 para FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8 respectivamente, foram inferiores ao t crítico de 4,3026 ($\alpha=0,05$), comprovando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das concentrações teórica e experimental.

3.3.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados com base nas fórmulas presentes na RE 899 (BRASIL, 2003), mostrados nas Figuras 6 e 7 (LQ e LD). Os resultados estão expostos na Tabela 37.

Tabela 37 - LD e LQ para os métodos de quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)

Meio	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
FGSSE (pH 1,2)	0,336	0,995
TA (pH 4,5)	0,281	0,762
SESSE (pH 6,8)	0,375	0,936

Os resultados de LD e LQ mostrados na Tabela 37 são limites estimados. Ainda assim, a menor concentração na faixa de trabalho de cada método desenvolvido foi maior que os valores de LQ apresentados e, além disso, foi mostrado que as soluções com concentrações menores, de cada faixa de trabalho, apresentaram precisão e exatidão aceitáveis.

3.3.6 Robustez

Nas Tabelas 38, 39 e 40 estão mostrados os resultados da robustez do método de quantificação do propranolol. As condições do método cromatográfico de quantificação do propranolol estão indicados com um asterisco (*).

Tabela 38 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação do propranolol no FGSSE (pH 1,2)

Tipo de meio tampão	Fator	Valor	Concentração média (µg/mL)	DPR (%)
FGSSE (pH 1,2)	Volume de injeção (µL)	7,0	79,30	1,13
		8,0*	80,20	
		9,0	81,12	
	Fluxo da fase móvel (mL)	0,9	81,25	0,69
		1,0*	80,20	
		1,1	80,39	
	Proporção da fase móvel (%)	26:74	82,01	1,11
		28:72*	80,20	
		30:70	81,01	
		24,0	80,69	
	Temperatura da coluna (°C)	25,0*	80,20	0,32
		26,0	80,31	

Tabela 39 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação do propranolol no meio TA (pH 4,5)

Tipo de meio tampão	Fator	Valor	Concentração média (µg/mL)	DPR (%)
TA (pH 4,5)	Volume de injeção (µL)	7,0	79,87	0,71
		8,0*	80,20	
		9,0	80,98	
	Fluxo da fase móvel (mL)	1,0	80,97	0,48
		1,1*	80,20	
		1,2	80,45	
	Proporção da fase móvel (%)	26:74	81,81	1,02
		28:72*	80,20	
		30:70	81,41	
		24,0	80,26	
	Temperatura da coluna (°C)	25,0*	80,20	0,09
		26,0	80,10	

Tabela 40 - Resultados das concentrações médias e DPR para avaliação da robustez do método para quantificação do propranolol no meio SESSE (pH 6,8)

Tipo de meio tampão	Fator	Valor	Concentração média (µg/mL)	DPR (%)
SESSE (pH 6,8)	Volume de injeção (µL)	7,0	79,53	0,93
		8,0*	80,20	
		9,0	81,02	
	Fluxo da fase móvel (mL)	1,0	80,16	0,09
		1,1*	80,20	
		1,2	80,31	
	Proporção da fase móvel (%)	26:74	81,30	0,76
		28:72*	80,20	
		30:70	81,27	
	Temperatura da coluna (°C)	24,0	80,41	0,16
		25,0*	80,20	
		26,0	80,16	

Para o método desenvolvido os valores de DPR das determinações referentes à variação do fluxo, proporção da fase móvel, volume de injeção, bem como da temperatura da coluna foram inferiores a 2 %.

Segundo RIBANI et al. (2004) o método pode ser considerado robusto se as mudanças nos parâmetros estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis.

Dessa forma, o método de quantificação do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8) pode ser considerado robusto para os fatores citados.

4 CONCLUSÕES

Um método por CLAE-FLU foi desenvolvido e validado para quantificação de propranolol nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8).

Os picos do propranolol em cada um dos meios tamponados apresentou tempo de retenção de 2,85, ideal para a realização de elevado número de análises em tempo reduzido, e fator assimetria de 1,18. Este valor é considerado bom e aceitável, pois o fármaco é uma base fraca, sendo comuns problemas quanto à assimetria do pico ao se utilizar coluna C18.

O método foi validado e apresentou seletividade quanto à presença de produtos de degradação do fármaco por calor seco. Além disso, o método foi linear, preciso, exato e robusto em todos os meios tamponados.

**CAPÍTULO IV – PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO
DA AGITAÇÃO ORBITAL EM FRASCO PARA A
AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE
FÁRMACOS**

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Solubilidade de Fármacos

1.1.1 Conceitos gerais

Solubilidade é uma constante física e se refere à habilidade de uma dada substância de ser dissolvida em um solvente específico (SIKARRA et al., 2012). Em termos quantitativos pode ser definida como a concentração do soluto em uma solução saturada, numa determinada temperatura. Em termos qualitativos, é definida como a interação espontânea entre duas ou mais substâncias para formar uma dispersão molecular homogênea (SIKARRA et al., 2012).

A extensão da solubilidade de uma substância em um solvente específico é medida como concentração de saturação, quando a adição de mais soluto não altera a concentração (SAVJANI et al., 2012)

A solubilidade aquosa é dependente das características moleculares dos fármacos e também é função da sua habilidade em formar ligações de hidrogênio com as moléculas de água. No geral, a solubilidade aquosa de uma substância é diretamente proporcional ao número de ligações de hidrogênio que pode ser formada com a água (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

No Quadro 3 estão descritos critérios gerais para classificar a solubilidade de substâncias.

Quadro 4 – Critérios para classificação da solubilidade de substâncias (Baseado em USP (2009))

Termo descritivo	Parte de solvente necessária por parte de soluto
Altamente solúvel	Menos que 1
Muito solúvel	De 1 a 10
Solúvel	De 10 a 30
Moderadamente solúvel	De 30 a 100
Ligeiramente solúvel	De 100 a 1000
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10.000
Praticamente insolúvel	10.000 ou mais

De acordo com o SCB é possível classificar um fármaco como de alta ou baixa solubilidade, com base na maior dose comercializada do fármaco, ou administrada de uma única vez. Para tal é necessário obter o valor experimental da solubilidade do fármaco, na faixa de pH normalmente entre 1 – 8, e temperatura de 37 ± 1 °C. Para ser considerado de alta solubilidade, a maior dose do fármaco deve se solubilizar em uma quantidade máxima de 250 mL, de cada meio (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

O cálculo é realizado de acordo com a Figura 33.

Figura 33 - Fórmula utilizada para cálculo da de fármacos, de acordo com o SCB

$$D/S = \frac{\text{Dose (mg)}}{\text{Solubilidade (mg/mL)}} \times 100$$

Onde: D/S é a relação dose:solubilidade;

Dose (mg) é a maior dose oral administrada do fármaco em uma forma farmacêutica, comercializada no país.

Solubilidade (mg/mL) é a solubilidade determinada experimentalmente.

A solubilidade aquosa de um fármaco é considerada alta quando a razão dose:solubilidade for igual, ou menor que 250 (AMIDON et al., 1995; MARTINEZ; AMIDON, 2002; AMIDON et al., 2011).

1.1.2 Importância da solubilidade

A via oral é a mais comum e conveniente forma de administração de medicamentos devido à facilidade, custo, cooperação do paciente e flexibilidade no desenvolvimento das formulações quanto à variação de dosagens. Porém, é a via de administração que resulta nos maiores problemas referentes à absorção. A biodisponibilidade oral depende de vários fatores, incluindo solubilidade aquosa, permeabilidade do fármaco, dissolução, metabolismo de primeira passagem e suscetibilidade a mecanismos de efluxo. Porém, as causas mais frequentes de baixa biodisponibilidade oral são atribuídas à baixa solubilidade (SAVJANI et al., 2012).

Fármacos com baixa solubilidade geralmente requerem altas doses para alcançar a concentração terapêutica plasmática após a administração oral. Baixa solubilidade aquosa é o maior problema encontrado no desenvolvimento de formulação com novos fármacos. Qualquer fármaco para ser absorvido, deve estar dissolvido no local de absorção e sabe-se que grande parte dos fármacos são ácidos ou bases fracas, tendo baixa solubilidade aquosa (LEVIS et al., 2003)

1.1.3 Fatores intrínsecos que afetam a solubilidade de fármacos

Alguns dos fatores que afetam a solubilidade de fármacos estão citados a seguir:

Lipossolubilidade

Substâncias apolares tendem a serem pouco solúveis em meios aquosos. Isso ocorre devido à incapacidade de serem formadas ligações de hidrogênio.

A lipossolubilidade de uma substância normalmente é estimada em termos de log P, a partir da partição em um sistema octanol/água. Fármacos muito lipofílicos tendem a apresentar elevados valores de log P, e assim, podem apresentar significativos problemas de absorção, por não estarem corretamente dissolvidas no local de absorção. Entretanto, substâncias com valores muito baixos de log P poderão apresentar problemas quanto à permeabilidade nas membranas biológicas (LINDENBERG et al., 2004).

Tamanho da partícula

A biodisponibilidade e a velocidade de dissolução dos fármacos são afetadas pelo tamanho da partícula. Partículas muito grandes podem dificultar a absorção dos fármacos, e dessa forma a utilização de pós na forma micronizada é muito utilizada, porém é importante notar que para fármacos hidrofóbicos, a redução do tamanho da partícula pode resultar na formação de agregados que finalmente irão gerar problemas quanto à dissolução (VASCONCELOS et al., 2007).

Grau de ionização do fármaco

Em geral, os fármacos ionizados possuem maior solubilidade em água do que os não ionizados. Conseqüentemente, a dissolução da substância em meios aquosos pode ser significativamente afetada pelo pH. De acordo com o efeito do pH sobre a ionização de moléculas, pode-se concluir que: fármacos que são bases fracas tendem a se dissolver lentamente em pH alto. Os que são ácidos fracos poderão se dissolver mais rapidamente em pH alto. Isso porque em pH alto, as bases fracas estão na sua forma neutra, enquanto que os ácidos fracos estarão em sua maior parte, na forma ionizada (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

1.1.4 Métodos utilizados na avaliação da solubilidade de fármacos

Estão listados abaixo alguns dos principais métodos para avaliação da solubilidade de fármacos.

1.1.4.1 Método da agitação orbital em frasco (*shake-flask*)

Este método é o de escolha (padrão ouro) para avaliação da solubilidade de fármacos, de acordo com diversas agências reguladoras, e a OMS (BRASIL, 2011; FDA, 2000; WHO, 2006).

A solubilidade em equilíbrio (termodinâmica) é avaliada por meio da adição de excesso da substância (a ter sua solubilidade determinada), em um meio líquido. Esta é submetida à agitação numa determinada velocidade e temperatura. Após atingir o estado de equilíbrio entre o excesso da substância não dissolvida e a solução saturada, a solubilidade de saturação (em equilíbrio) pode ser determinada. Para confirmação do alcance de equilíbrio entre as fases, a solubilidade deve ser constante em pontos de tempo consecutivos (BAKA, 2011).

O método clássico para avaliar a solubilidade em equilíbrio de fármacos é o da agitação orbital em frascos (*shake-flask*). Este método ainda não foi descrito em farmacopeias, e assim é possível encontrar diferentes protocolos, com diferentes condições experimentais de realização do método, na literatura (HEIKKILA et al., 2011).

O guia de bioisenção da Anvisa recomenda que a avaliação da solubilidade dos fármacos pelo método da agitação orbital deve ser realizada em no mínimo, três condições de pH (1,2; 4,5 e 6,8), e três replicatas para cada condição. Os volumes dos meios considerados para os cálculos devem ser de 250 mL, este valor é originado de protocolos de estudos de bioequivalência, que recomendam a administração de medicamentos com um copo de água de 250 mL. Deve ser utilizada quantidade em excesso de matéria prima e, os frascos devem ser acondicionados em incubadora com plataforma de agitação orbital, mantida a 37 ± 1 °C, durante todo o estudo. As alíquotas de amostras devem ser retiradas nos tempos pré-estabelecidos, e os meios devem ser repostos, com o mesmo volume da alíquota retirada. O método de quantificação deve ser capaz de diferenciar o fármaco de eventuais produtos de degradação. O pH deve ser registrado no início e no final do experimento (BRASIL, 2011).

Recentemente, a Anvisa publicou uma nota técnica (BRASIL, 2013) atualizando e adicionando novas informações sobre o tema. As informações contidas nesta nota técnica e no guia de bioisenção estão mostradas na Tabela 41.

Tabela 41 - Recomendações das agências reguladoras para condução da avaliação da solubilidade pelo método da agitação orbital em frascos

Parâmetro	Anvisa	FDA
Tipo de meio tampão	Dentro da faixa pH fisiológico (pH 1,2; 4,5 e 6,8) (FB ou outras compêndios aceitos)	Dentro da faixa pH fisiológico (pH 1,0 - 7,5 e pH = pKa + 1) (USP)
Temperatura (°C)	37 ± 1	37 ± 1
Excesso da substância a ser adicionada (mg)	Não especificado	Não especificado
Velocidade de agitação (rpm)	Não especificado	Não especificado
Volume alíquota a ser retirada (mL)	Não especificado	Não especificado
Tempo mínimo de duração do experimento (h)	Aproximadamente 24 - 48 h	Não especificado
Método para separar as fases	Filtração (Avaliar necessidade de centrifugação)	Não especificado
Critério de aceitação	Coefficiente de variação < 5 % ; (n ≥ 3)	(n ≥ 3)
Método de quantificação	Método validado indicativo de estabilidade	Método validado indicativo de estabilidade

Ao utilizar este método é possível classificar os fármacos com de alta ou baixa solubilidade, devendo ser utilizada a fórmula mostrada na Figura 33.

1.1.4.2 Dissolução intrínseca

Na dissolução intrínseca executa-se a dissolução da substância pura e a determinação da velocidade de dissolução. Este método tem grande aplicabilidade no processo de desenvolvimento de novos fármacos, porque demanda pequena quantidade de amostra (ISSA; FERRAZ, 2011).

A dissolução intrínseca tem sido utilizada para caracterizar fármacos na forma sólida, esclarecer a relação entre a velocidade de dissolução e a forma cristalina de uma substância e avaliar os efeitos de surfactantes e pH na solubilização de compostos pouco solúveis. Além disso, este tipo de ensaio permite a obtenção da velocidade de dissolução intrínseca (VDI - expressa em mg/min/cm²), que é definida como a velocidade de dissolução de um fármaco puro (transferência de massa da superfície do sólido para a fase líquida) sob condições de área de superfície, tipo e velocidade de agitação, pH e força iônica do meio de dissolução. A VDI é determinada por meio do valor da inclinação das equações (*slope*) obtidas a partir da regressão linear das curvas de dissolução intrínseca para cada meio empregado no estudo (PEREIRA, 2011).

1.1.4.3 Diagrama de fases

A avaliação da solubilidade de uma substância utilizando-se o método do diagrama de fases consiste na previsão da microestrutura de um material em função da temperatura e composição. Para realização do método é necessário adicionar porções crescentes de amostra a volumes constantes de solvente no qual a substância analisada mostra apenas ligeira solubilidade, visando à obtenção de solução saturada dessa substância. Após haver atingido o equilíbrio do sistema por agitação prolongada, sob temperatura constante, deve ser determinado o conteúdo total de soluto na solução sobrenadante (geralmente por técnica gravimétrica). A seguir é necessário traçar o diagrama de solubilidade por fases, plotando a composição da solução, em mg de soluto por g de solvente, no eixo das ordenadas, pela composição do sistema, em mg de amostra adicionada por g de solvente, no eixo das abscissas (BRASIL, 2010).

Apesar de o método estar descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5), a Anvisa publicou uma nota técnica recente (BRASIL, 2013), em que afirmava que após estudo detalhado, a técnica citada não é recomendada pela agência para avaliação da solubilidade de fármacos para fins de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo. Nesta mesma nota técnica, a Anvisa reafirma que o método da agitação

orbital em frascos (*shake-flask*) é o método de escolha e a incubadora com plataforma de agitação orbital com temperatura controlada como equipamento obrigatório, para avaliação da solubilidade em equilíbrio.

2 Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Substâncias químicas de referência e matérias primas

Nimesulida substância química de referência (SQR), fornecida pela Anvisa/Farmanguinhos – FIOCRUZ, proveniente da Farmacopeia Brasileira, lote 2049, teor de 99,8%, válido por todo período do estudo.

Nimesulida matéria prima, adquirida no mercado nacional, proveniente da DEG, lote 01.9295, teor de 100,5%, validade 01/04/2014.

Propranolol substância química de referência (SQR), fornecida pela Anvisa/Farmanguinhos – FIOCRUZ, proveniente da Farmacopeia Brasileira, lote 1005, teor de 100,1 %, válido por todo período do estudo.

Propranolol matéria prima, adquirida no mercado nacional, All Chemistry, lote M111011, teor de 100,24 %, validade 25/10/2015.

2.1.2 Equipamentos e materiais

Aparelho de ultrassom Unique, modelo USC-1400;

Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220, com precisão de 0,010 g;

Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220D, com precisão de 0,001 g;

Bomba de vácuo Marconi, modelo MA057/2;

Coluna C18 Waters (150 x 4,6 mm; 3,5 µm);

Coluna C18 Agilent (50 x 4,6 mm; 5,0 µm);

Estufa de secagem e esterilização Fanem, modelo 315 SE;

Cromatógrafo Waters Alliance e2695, com forno, injeção automática, detector ultravioleta e fluorescência, software Empower versão 2;

Cromatógrafo Waters Alliance 2695, com forno, injeção automática, detector DAD (arranjo de diodos), software Empower versão 2;

Incubadora Shaker SPLabor, modelo SP-222-CF-135;

Incubadora Shaker IKA KS 4000 i control;

Membrana de celulose, 0,45µm de poro, Millipore;

pHmetro Hanna;

Pipetas Gilson, volume ajustável de 10 - 100 µL e 100 - 1000 µL; 1000 – 5000 µL, modelo Pipetman;

Ponteiras plásticas Axygen de 200 µL, 1000 µL e 5000 µL;

Sistema de purificação de água Millipore, modelo DIRECT-Q 8;

Unidade filtrante Millex HV com membrana de durapore PVDF com poros de 0,45 µm, Millipore;

Vials de vidro âmbar Waters de 2 mL com tampa e septos de teflon.

2.2 Métodos

2.2.1 Padronização do método da agitação orbital em frasco para avaliação da solubilidade de fármacos

Para padronização do método da agitação orbital em frasco foram realizadas avaliações da solubilidade dos fármacos controle (nimesulida e propranolol) com as condições experimentais selecionadas de acordo com as recomendações dos guias de bioensação das agências reguladoras (FDA, 2000; BRASIL, 2011) mostradas na Tabela 41. Os ajustes dos parâmetros não especificados pelos guias de bioensação foram selecionados de acordo com recomendações de trabalhos publicados utilizando-se o método da agitação orbital em frasco (JOZAN et al., 1996; GLOMME et al., 2005; BAKA et al., 2008).

O critério de aceitação para os estudos de solubilidade foi o preconizado pela Anvisa. Assim o coeficiente de variação entre as replicatas das alíquotas coletadas deveria ser menor que 5 %.

Após o estabelecimento da solubilidade em equilíbrio, de cada fármaco controle, foram selecionadas e analisadas condições experimentais do método que poderiam afetar as avaliações das solubilidades dos fármacos (BAKA, 2008). A análise da influência de cada condição experimental foi realizada variando-se um parâmetro experimental por vez, mantendo-se os outros constantes.

Todos os dados de solubilidade dos fármacos obtidos nesse trabalho foram avaliados quanto à normalidade (pelo teste de Ryan-Joiner) e homoscedasticidade

(pelo teste de Levene modificado por Brown Forsythe). Essa avaliação é necessária pois se os dados não tiverem distribuição normal e/ou forem heteroscedásticos não é possível à correta aplicação dos testes *t* ou *F* (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

2.2.2 Avaliação da solubilidade em equilíbrio dos fármacos controle pelo método da agitação orbital em frasco

2.2.2.1.1 Nimesulida

A quantidade em excesso de matéria prima utilizada foi selecionada com base em dados de solubilidade da nimesulida encontrados na literatura (SILVA; VOLPATO, 2002; RAINSFORD, 2005; DELLIS et al., 2007; FONSECA et al., 2009).

A forma como foram preparados os meios tamponados utilizados (USP, 2009) estão descritos na Tabela 42.

Tabela 42 - Preparo dos meios tamponados utilizados neste trabalho

Meio tamponado	Modo de preparo
FGSSE (pH 1,2)	Foram dissolvidos 2,0 g de cloreto de sódio em 7,0 mL de ácido clorídrico. Transferiu-se para balão volumétrico de 1 L, que já continha água ultrapurificada. Completou-se o volume com água ultrapurificada e a solução foi homogeneizada
TA (pH 4,5)	Foram adicionados 2,99 g de acetato de sódio triidratado e 14,0 mL de ácido acético 2 N em um balão volumétrico de 1 L. Completou-se o volume com água ultrapurificada e a solução foi homogeneizada
SESSE (pH 6,8)	Foram adicionados 250 mL de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M e 112 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,2 M em um balão volumétrico de 1 L. Completou-se o volume com água ultrapurificada e a solução foi homogeneizada

Foram avaliados os valores de pH de cada meio tampão, no início e final do experimento. O ajuste do pH, quando necessário foi realizado com soluções de HCl ou NaOH (1,0 M). As alíquotas coletadas foram filtradas com filtro de seringa Millex® PVDF (0,45 µm).

Foi utilizada incubadora com movimento orbital cujas presilhas de fixação apresentavam capacidade para *erlenmeyers* de 250 mL. A faixa de velocidade do equipamento era de 10 a 300 rpm. O ajuste de temperatura foi realizado pelo aparelho, sendo utilizada 37 ± 1 °C.

As principais condições utilizadas na avaliação da solubilidade da nimesulida estão descritas na Tabela 43.

Tabela 43 - Condições utilizadas na avaliação da solubilidade da nimesulida nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8)

Parâmetro	Condição utilizada no estudo
Quantidade em excesso de MP (mg)	3,0
Volume de meio (mL)	50
Temperatura (°C)	37 ± 1
Volume alíquota (mL)	5
Velocidade de agitação (rpm)	100
Tempo total do experimento (h)	71,0
Método de quantificação	HPLC-UV

Foram preparadas curvas analíticas (faixa de concentração linear desenvolvida neste trabalho) para quantificação da nimesulida em cada um dos meios tamponados, a cada dia de análise.

2.2.2.1.2 Propranolol

A quantidade em excesso de matéria prima utilizada foi selecionada de acordo com o procedimento para avaliação da solubilidade descrito na Farmacopeia Americana (USP, 2009), uma vez que os dados de solubilidade aquosa do propranolol descritos em trabalhos publicados apresentavam valores discrepantes quando

comparados uns com os outros (YAMINI et al., 2003; D'EMANUELE et al., 2004; VOGELPOEL et al., 2004; JAGDALE et al., 2009; WANG et al., 2013). Dessa forma, foram pesados e adicionados a 5 mL de cada meio, 10 mg de matéria prima propranolol, sucessivamente, até o aparecimento de um excesso da mesma (solução supersaturada). Utilizou-se um aparelho de ultrassom para verificar a permanência ou não do excesso da substância: as amostras foram sonicadas durante 5 minutos, na temperatura de 37 °C e, após o procedimento, fez-se observação visual para constatar a permanência do sólido (excesso de matéria prima).

Os meios tamponados utilizados, o ajuste do pH e a filtração das alíquotas foram os mesmos descritos na Tabela 42.

Foi utilizada incubadora com movimento orbital cujas presilhas de fixação tinham capacidade para *erlenmeyers* de 50 mL. A faixa de velocidade do equipamento era de 10 a 500 rpm. A temperatura foi a mesma utilizada para nimesulida: 37 ± 1 °C.

As principais condições utilizadas nessa avaliação da solubilidade estão descritas na Tabela 44.

Tabela 44 - Condições utilizadas na avaliação da solubilidade do propranolol nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8)

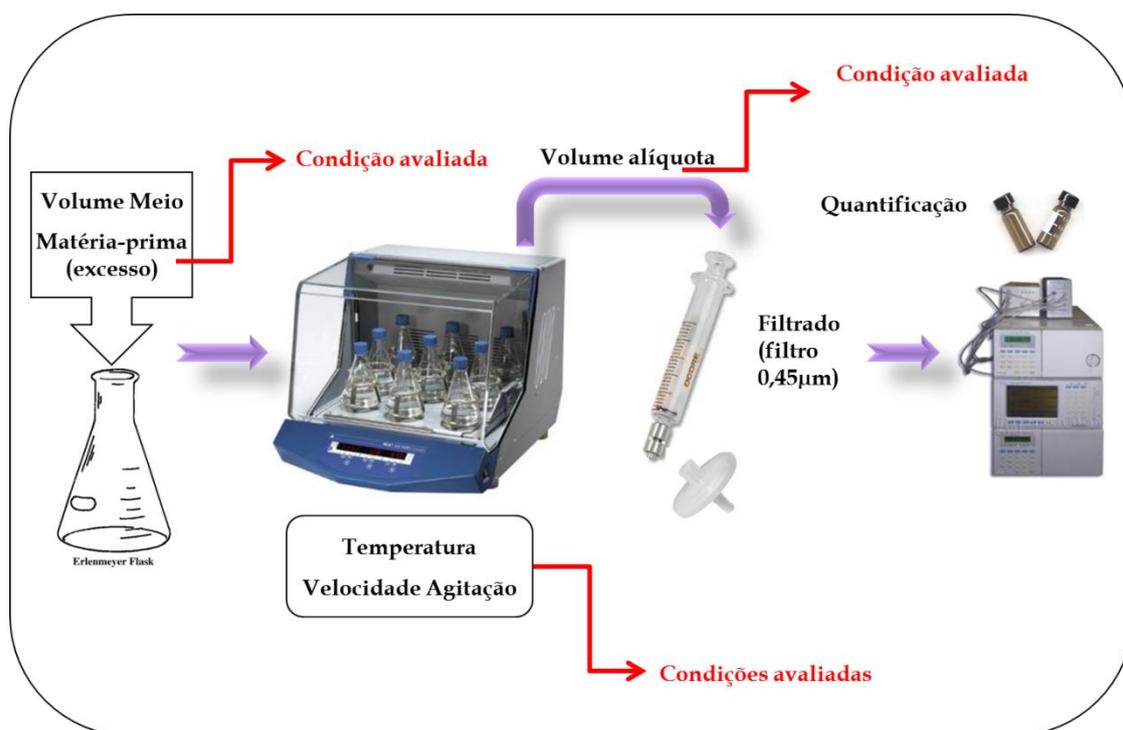
Parâmetro	Condição utilizada no estudo
Quantidade em excesso de MP (mg)	300,0
Volume de meio (mL)	10
Temperatura (°C)	37 ± 1
Velocidade de agitação (rpm)	100
Volume alíquota (mL)	0,3
Tempo total do experimento (min)	49,30
Método de quantificação	HPLC-FLU

Foram preparadas curvas analíticas na faixa de concentração obtida nesse trabalho, em cada um dos meios tamponados para cada dia de análise.

2.2.3 Análise dos parâmetros que podem afetar as avaliações da solubilidade em equilíbrio dos fármacos controle pelo método da agitação orbital em frascos (shake-flask)

Após as avaliações da solubilidade dos fármacos utilizando-se os parâmetros mostrados nas Tabelas 43 e 44, foram examinadas as condições experimentais que poderiam influenciar as medições da solubilidade em equilíbrio dos fármacos controle: nimesulida e propranolol. Por conseguinte, foram analisadas as etapas críticas do método da agitação orbital em frascos variando-se um parâmetro experimental por vez. Na Figura 34 está mostrado o esquema geral de avaliação da solubilidade pelo método da agitação orbital em frascos, e as condições avaliadas.

Figura 34 - Esquema geral da avaliação da solubilidade pelo método da agitação orbital em frascos e indicação das condições avaliadas no estudo



As condições avaliadas foram selecionadas pelo fato da maioria não estar especificada nos guias de bioensação, e por haver relatos na literatura citando que estas condições poderiam influenciar os resultados da solubilidade de fármacos (BAKA et al., 2008).

As seguintes avaliações foram realizadas para a nimesulida:

- Teste 1: Diminuição da temperatura de 37 ± 1 para 34 ± 1 °C;

- Teste 2: Aumento da temperatura de 37 ± 1 para 40 ± 1 °C;
- Teste 3: Aumento do excesso de matéria prima do fármaco de 3 para 20 mg;
- Teste 4: Diminuição da velocidade de agitação de 100 para 50 rpm;
- Teste 5: Aumento da velocidade de agitação de 100 para 150 rpm;
- Teste 6: Diminuição do volume da alíquota de 5,0 para 2,0 mL;
- Teste 7: Aumento do volume da alíquota de 5,0 para 7,0 mL.

As seguintes avaliações foram realizadas para o propranolol:

- Teste 1: Diminuição da temperatura de 37 ± 1 para 34 ± 1 °C;
- Teste 2: Aumento da temperatura de 37 ± 1 para 40 ± 1 °C;
- Teste 3: Aumento do excesso de matéria prima do fármaco de 300 para 400 mg;
- Teste 4: Diminuição da velocidade de agitação de 100 para 50 rpm;
- Teste 5: Aumento da velocidade de agitação de 100 para 150 rpm;
- Teste 6: Diminuição do volume da alíquota de 0,3 para 0,1 mL;
- Teste 7: Aumento do volume da alíquota de 0,3 para 0,5 mL;

As Tabelas 45 e 46 a seguir mostram as condições experimentais analisadas para cada fármaco controle.

Tabela 45 - Condições utilizadas para avaliação dos parâmetros que podem afetar a solubilidade do fármaco controle de baixa solubilidade nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8)

Parâmetro	Testes (1 a 7)	Solubilidade experimental (valor nominal)	Testes (1 a 7)
Temperatura (°C)	34 ± 1	37 ± 1	40 ± 1
Excesso da substância adicionada (mg)	-----	3,0	20,0
Velocidade de agitação (rpm)	50	100	150
Volume alíquota (mL)	2,0	5,0	7,0

Tabela 46 - Condições utilizadas para avaliação dos parâmetros que podem afetar a solubilidade do fármaco controle de alta solubilidade nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8)

Parâmetro	Testes (1 a 7)	Solubilidade experimental (valor nominal)	Testes (1 a 7)
Temperatura (°C)	34 ± 1	37 ± 1	40 ± 1
Excesso da substância adicionada (mg)	-----	300,0	400,0
Velocidade de agitação (rpm)	50	100	150
Volume alíquota (mL)	0,1	0,3	0,5

Foi utilizado o teste *t* de *Student* para avaliar se as médias das solubilidades em equilíbrio diferiam ou não das médias obtidas pelos testes.

O t de Student avalia a H_0 de que não há diferença significativa entre as amostras e H_a de que há diferença significativa entre as amostras, para $\alpha = 0,05$. Para aceitar H_0 , o p-valor deve ser maior que 0,05.

3 Resultados e Discussão

3.1 Determinação da solubilidade em equilíbrio dos fármacos controle de alta e baixa solubilidade pelo método da agitação orbital em frasco (*shake-flask*)

Inicialmente foram verificadas a normalidade (teste de Ryan-Joiner) e homoscedasticidade (teste de Levene modificado por Brown Forsythe) de todos os dados referentes às análises da solubilidade dos fármacos controle. Os resultados estão mostrados na Tabela 47 e 48.

Tabela 47 - Avaliação da normalidade (R de Ryan Joiner) e homoscedasticidade (tL de Levene) dos dados referentes a solubilidade do propranolol nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8), para $\alpha = 0,05$

	FGSSE pH 1,2		TA pH 4,5		SESSE pH 6,8	
	Normalidade	Homoscedasticidade	Normalidade	Homoscedasticidade	Normalidade	Homoscedasticidade
Solubilidade experimental	0,991 - p > 0,60	0,232 - p > 0,98	0,991 - p > 0,69	0,789 - p > 0,63	0,991 - p > 0,69	0,422 - p > 0,92
Teste 1	0,991 - p > 0,59	0,342 - p > 0,95	0,991 - p > 0,61	0,829 - p > 0,69	0,992 - p > 0,70	0,621 - p > 0,85
Teste 2	0,991 - p > 0,66	0,541 - p > 0,90	0,991 - p > 0,67	0,298 - p > 0,99	0,991 - p > 0,61	0,325 - p > 0,95
Teste 3	0,991 - p > 0,60	0,638 - p > 0,81	0,991 - p > 0,62	0,397 - p > 0,96	0,991 - p > 0,53	0,203 - p > 0,99
Teste 4	0,991 - p > 0,62	0,532 - p > 0,91	0,991 - p > 0,63	0,325 - p > 0,97	0,991 - p > 0,62	0,522 - p > 0,91
Teste 5	0,991 - p > 0,64	0,261 - p > 0,96	0,991 - p > 0,65	0,692 - p > 0,79	0,991 - p > 0,69	0,321 - p > 0,95
Teste 6	0,991 - p > 0,61	0,362 - p > 0,92	0,991 - p > 0,63	0,431 - p > 0,92	0,991 - p > 0,60	0,426 - p > 0,92
Teste 7	0,991 - p > 0,66	0,218 - p > 0,99	0,991 - p > 0,67	0,797 - p > 0,61	0,991 - p > 0,64	0,527 - p > 0,90

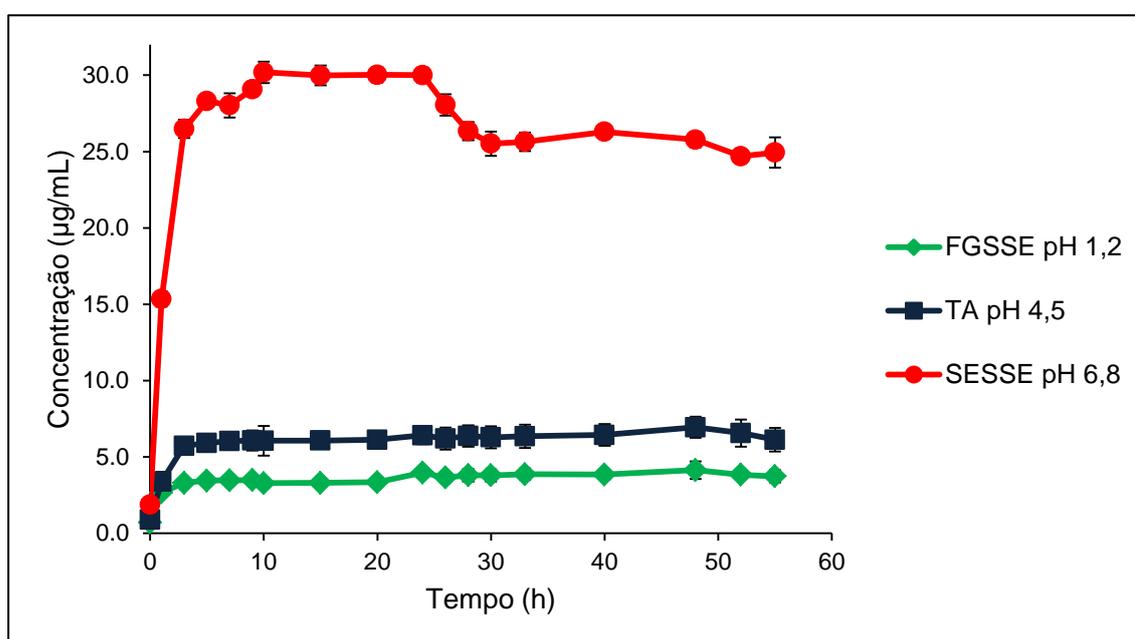
Tabela 48 - Avaliação da normalidade (R de Ryan Joiner) e homoscedasticidade (tL de Levene) dos dados referentes a solubilidade do propranolol nos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8), para $\alpha = 0,05$

	FGSSE pH 1,2		TA pH 4,5		SESSE pH 6,8	
	Normalidade	Homoscedasticidade	Normalidade	Homoscedasticidade	Normalidade	Homoscedasticidade
Solubilidade experimental	0,991 - p > 0,51	0,852 - p > 0,57	0,991 - p > 0,48	0,894 - p > 0,48	0,991 - p > 0,48	0,894 - p > 0,54
Teste 1	0,991 - p > 0,52	0,837 - p > 0,56	0,991 - p > 0,49	0,382 - p > 0,86	0,991 - p > 0,50	0,324 - p > 0,87
Teste 2	0,991 - p > 0,50	0,327 - p > 0,90	0,991 - p > 0,51	0,823 - p > 0,54	0,991 - p > 0,52	0,547 - p > 0,78
Teste 3	0,991 - p > 0,53	0,582 - p > 0,81	0,991 - p > 0,50	0,302 - p > 0,80	0,991 - p > 0,53	0,453 - p > 0,85
Teste 4	0,991 - p > 0,54	0,302 - p > 0,91	0,991 - p > 0,53	0,521 - p > 0,79	0,991 - p > 0,49	0,346 - p > 0,90
Teste 5	0,991 - p > 0,47	0,298 - p > 0,96	0,991 - p > 0,52	0,402 - p > 0,89	0,991 - p > 0,50	0,638 - p > 0,75
Teste 6	0,991 - p > 0,48	0,300 - p > 0,92	0,991 - p > 0,50	0,431 - p > 0,84	0,991 - p > 0,51	0,535 - p > 0,82
Teste 7	0,991 - p > 0,52	0,210 - p > 0,99	0,991 - p > 0,48	0,634 - p > 0,77	0,991 - p > 0,52	0,616 - p > 0,77

Como pode ser observado nas Tabelas 47 e 48, os dados referentes às avaliações da solubilidade dos fármacos controle, nimesulida e propranolol, apresentam distribuição normal e são homoscedásticos ($p > 0,05$). Assim, foi comprovada a possibilidade da correta aplicação do teste *t* de *Student* e das inferências relacionadas para análise dos resultados deste trabalho.

Os resultados referentes às avaliações das solubilidades da nimesulida e propranolol estão mostrados nas Figuras 35 e 36.

Figura 35 - Avaliação da solubilidade da nimesulida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)



A partir da Figura 35, é possível observar que a solubilidade da nimesulida é pH-dependente. Isso decorre pela presença do grupo metanossulfonamida fracamente ácido na estrutura do fármaco (DELLIS et al., 2007). Em meio básico a metanossulfonamida fica desprotonada, e haverá interações intermoleculares íon-dipolo e ligações de hidrogênio entre o fármaco ionizado e a água mantendo o fármaco solubilizado em meio aquoso alcalino (GONSALVES et al., 2013). Ainda, de acordo com a equação de Henderson-Hasselbach em pH 6 ou 7, a porcentagem do fármaco na forma não ionizada diminui de 72% para 20% (RAINSFORD, 2005).

Dessa forma, a nimesulida apresentou a menor solubilidade no FGSSE (pH 1,2) e maiores valores de solubilidade no SESSE (pH 6,8). Os dados referentes à

solubilidade em equilíbrio do fármaco e os respectivos tempos para atingir o equilíbrio estão mostrados na Tabela 49.

Tabela 49 - Avaliação da solubilidade de nimesulida pelo método da agitação orbital em frascos nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)

Meio tamponado	Solubilidade experimental média (mg/mL) (n = 3)	log S (S: mol/L)	Tempo para atingir equilíbrio (h)	Coefficiente de variação (CV %)
FGSSE (pH 1,2)	0,0034	- 4,95	7	< 5 %
TA (pH 4,5)	0,0064	- 4,68	7	< 5 %
SESSE (pH 6,8)	0,0301	- 4,01	10	< 5 %

A solubilidade em equilíbrio da nimesulida em pH 6,8 foi aproximadamente 9 vezes maior que em pH 1,2, demonstrando a solubilidade pH-dependente do fármaco. Os coeficientes de variação calculados foram menores que 5 %, como preconizado pelo guia de bioensação da Anvisa (BRASIL, 2011).

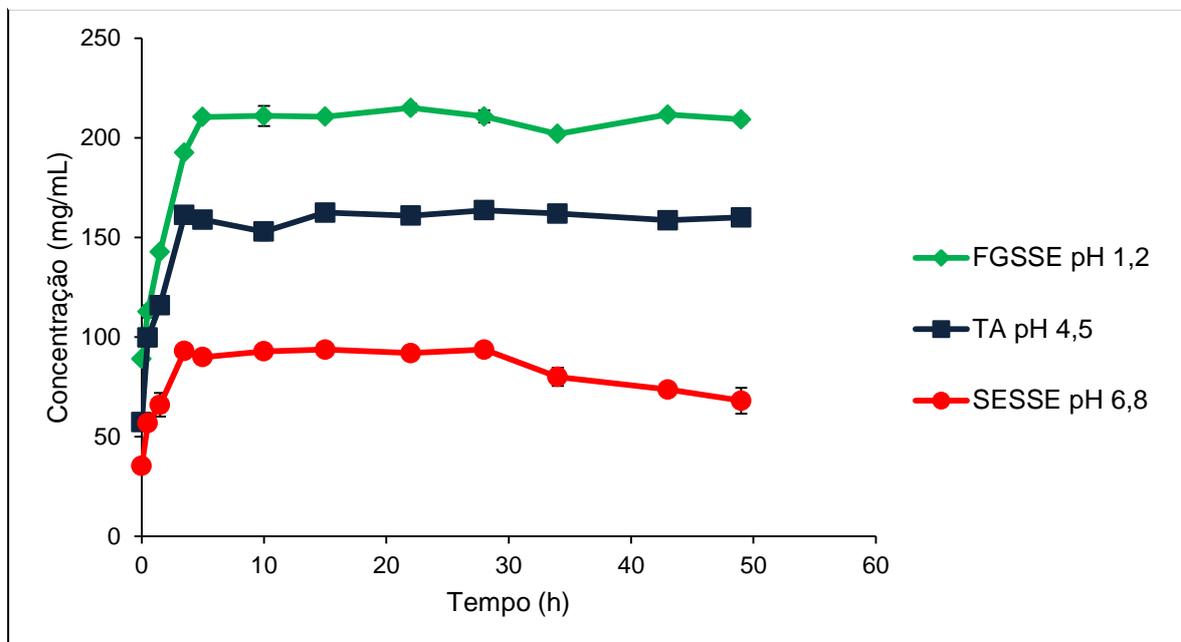
O equilíbrio entre a solução do fármaco e o excesso de matéria prima foi atingido com maior tempo (10 horas) para o SESSE (pH 6,8) e, em 7 horas para o FGSSE (pH 1,2) e TA (pH 4,5). Para todos os meios, esse tempo é considerado reduzido e, possibilita a realização de diversas análises de solubilidade do fármaco em pouco tempo.

Os resultados da solubilidade em equilíbrio da nimesulida estão de acordo com o mostrado em outros trabalhos. AGRAWAL et al. (2004) analisaram a solubilidade da nimesulida em PBS (tampão fosfato salina) em pH 6,8 a 37 °C e obtiveram solubilidade de 0,0312 mg/mL, valor próximo ao encontrado neste trabalho.

Os valores de log S mostrados na Tabela 49 demonstram novamente que a solubilidade no FGSSE (pH 1,2) é menor que nos outros meios, pois quanto menor for o valor de log S, menor é a solubilidade do fármaco. No estudo de solubilidade da nimesulida realizado por DELLIS et al. (2007), os autores obtiveram valor de log S de - 4,25 em meio pH 7,4, a 25 °C. O log S encontrado pelos autores é menor que o valor de - 4,01 mostrado na Tabela 49, para o SESSE (pH 6,8). Apesar do valor de pH usado pelos autores ser maior que o utilizado neste trabalho, é sabido que a

temperatura influencia a solubilidade da maioria dos fármacos. A solubilização da nimesulida é endotérmica e, assim, acréscimos na temperatura irão provocar aumentos na solubilidade (AGRAWAL et al., 2004).

Figura 36 - Avaliação da solubilidade do propranolol nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)



O estudo da solubilidade do propranolol nos meios tamponados está mostrado na Figura 36 e, é possível observar que o perfil de solubilidade do fármaco também é pH-dependente. Os dados referentes à solubilidade em equilíbrio do propranolol e os respectivos tempos para atingir o equilíbrio estão mostrados na Tabela 50.

Tabela 50 - Avaliação da solubilidade do propranolol pelo método da agitação orbital em frascos nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)

Meio tamponado	Solubilidade experimental média (mg/mL) (n = 3)	log S (S:mol/L)	Tempo para atingir equilíbrio (h)	Coefficiente de variação (CV %)
FGSSE (pH 1,2)	210,45	- 0,14	5,0	< 5 %
TA (pH 4,5)	161,23	- 0,26	5,0	< 5 %
SESSE (pH 6,8)	92,98	- 0,50	5,0	< 5 %

Os valores da solubilidade em equilíbrio do propranolol foram maiores nos meios de menor pH. De acordo com a equação de Henderson-Hasselbach, em pH ácido (< 2,5) quase 100 % do fármaco estará na forma ionizada. Além disso, a amina presente na estrutura do fármaco estará protonada, formando o sal de amina quaternária. O sal formado permitirá interação da substância com a água (íon-dipolo), além das ligações de hidrogênio já existentes. Assim, a solubilidade do fármaco é maior em pH ácido (AVDEEF et al., 2000; WANG et al., 2010; GONSALVES et al., 2013). Como já esperado os valores de log S foram menores nos meios de menor pH.

Os dados de solubilidade do propranolol foram próximos aos encontrados no trabalho de TAKKA et al. (2001). Os autores obtiverem solubilidade do fármaco de 225 mg/mL em pH 1,2, e 130 mg/mL em pH 6,8.

O equilíbrio entre a solução do fármaco e o excesso de matéria prima foi atingido em 5 horas para o SESSE (pH 6,8), FGSSE (pH 1,2) e TA (pH 4,5). Os tempos citados são considerados reduzidos e, assim como para a nimesulida, possibilita a realização de diversas análises de solubilidade do fármaco em pouco tempo.

Foram calculados as relações D/S da nimesulida e propranolol a partir das solubilidades experimentais obtidas neste trabalho. Os resultados estão mostrados na Tabela 51. Para o cálculo foram consideradas as doses máximas de 100 e 80 mg para, respectivamente, nimesulida e propranolol.

Tabela 51 - Relação D/S dos fármacos controle em cada meio FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8)

Nimesulida			
	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
D/S	29411,17	15625,00	3322,25

Propranolol			
	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
D/S	0,38	0,49	0,86

A partir da Tabela 51, pode-se concluir que a nimesulida é um fármaco de baixa solubilidade e o propranolol, de alta solubilidade, de acordo com o SCB. Conforme o sistema, um fármaco é considerado de alta solubilidade se, a relação D/S for igual ou menor a 250 mL, em cada um dos meios tamponados com pH na faixa fisiológica (AMIDON et al., 1995).

Os valores de D/S do propranolol foram baixos, bem menores que 250, denotando a alta solubilidade do fármaco nos meios e, em contrapartida, as relações D/S da nimesulida foram muito altas, maiores que 250, demonstrando sua baixa solubilidade nos meios com pH fisiológico.

Os dados presentes na Tabela 51 estão de acordo com vários estudos de solubilidade e classificação biofarmacêutica de ambos os fármacos (LINDENBERG et al., 2004; VOGELPOEL et al., 2004; AMIDON et al., 2011)

3.2 Análise dos parâmetros que podem afetar as avaliações da solubilidade em equilíbrio dos fármacos controle pelo método da agitação orbital em frascos (*shake-flask*)

O método da agitação orbital em frascos ou *shake-flask* é um método de avaliação da solubilidade de substâncias e, é amplamente empregado para avaliação da solubilidade de fármacos. Apesar disso, valores precisos de solubilidade em equilíbrio são difíceis de serem obtidos, pois os resultados são afetados por muitos fatores experimentais conhecidos ou não (VOLGYI et al., 2011)

O método para avaliação da solubilidade, apesar de ser um procedimento simples, é um procedimento que ocupa tempo considerável e, requer muito trabalho manual (BOX et al., 2006). Os dados de solubilidade publicados utilizam diferentes

condições experimentais, como temperatura, velocidade de agitação e, dessa forma acarreta em variações consideráveis nos resultados.

Diante do exposto, demonstra-se a necessidade da avaliação das condições experimentais do método da agitação orbital em frascos e, verificação da influência dessas condições nos resultados da solubilidade de fármacos. Os resultados das avaliações das condições experimentais selecionadas, para os fármacos controle de alta e baixa solubilidade, estão mostrados a seguir.

Tabela 52 – Resultados das avaliações da solubilidade da nimesulida: solubilidade experimental e testes

	FGSSE (pH 1,2)			TA (pH 4,5)			SESSE (pH 6,8)		
	Se (mg/mL)	Te (h)	CV (%)	Se (mg/mL)	Te (h)	CV (%)	Se (mg/mL)	Te (h)	CV (%)
Solubilidade experimental	0,0034	7,0	< 5	0,0064	7,0	< 5	0,0301	10,0	< 5
Teste 1	0,0023	7,0	<5	0,0045	7,0	< 5	0,0253	10,0	< 5
Teste 2	0,0052	7,0	<5	0,0071	7,0	< 5	0,0309	10,0	< 5
Teste 3	0,0050	7,0	> 5	0,0068	7,0	> 5	0,0263	10,0	> 5
Teste 4	0,0033	7,0	<5	0,0065	7,0	< 5	0,0298	10,0	< 5
Teste 5	0,0030	5,0	<5	0,0063	5,0	< 5	0,0302	7,0	< 5
Teste 6	0,0036	7,0	< 5	0,0065	7,0	< 5	0,0299	10,0	< 5
Teste 7	0,0032	7,0	< 5	0,0063	7,0	< 5	0,0306	10,0	< 5

Se – solubilidade média em equilíbrio

Te – tempo em que a solubilidade em equilíbrio foi alcançada

CV – coeficiente de variação

Teste 1: Diminuição da temperatura de 37 ± 1 para 34 ± 1 °C;

Teste 2: Aumento da temperatura de 37 ± 1 para 40 ± 1 °C;

Teste 3: Aumento do excesso de matéria prima do fármaco de 3 para 20 mg;

Teste 4: Diminuição da velocidade de agitação de 100 para 50 rpm;

Teste 5: Aumento da velocidade de agitação de 100 para 150 rpm;;

Teste 6: Diminuição do volume da alíquota de 5,0 para 2,0 mL;

Teste 7: Aumento do volume da alíquota de 5,0 para 7,0 mL.

As solubilidades experimentais e as solubilidades provenientes dos testes, mostradas na Tabela 52, foram analisados estatisticamente utilizando o teste *t* de *Student* e, os resultados estão mostrados na Tabela 53.

Tabela 53 - Resultado da comparação para nimesulida entre a solubilidade experimental e testes: p-valor para cada avaliação teste nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8), $\alpha = 0,05$

Avaliação	FGSSE (pH 1,2) (p-valor)	TA (pH 4,5) (p-valor)	SESSE (pH 6,8) (p-valor)
Teste 1	0,00065	0,00026	0,00003
Teste 2	0,00012	0,00897	0,00115
Teste 3	0,00023	0,04742	0,00001
Teste 4	0,45116	0,72466	0,06468
Teste 5	0,06334	0,50716	0,32106
Teste 6	0,46760	1,00000	0,23020
Teste 7	0,07393	0,13178	0,09126

Como pode ser observado nas Tabelas 52 e 53 houve diferenças estatisticamente significativas entre as solubilidades experimentais e os testes para algumas das variações de parâmetros.

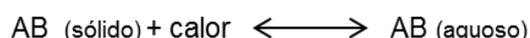
Influência da temperatura

A variação da temperatura, para um nível menor (34 ± 1 °C) provocou diminuição do valor da solubilidade em equilíbrio da nimesulida em comparação com o valor obtido da solubilidade experimental. A diminuição ocorreu em todos os meios e foi significativa ($p < 0,05$), demonstrando influência da temperatura nas avaliações da solubilidade da nimesulida.

Por outro lado, o aumento da temperatura para 40 ± 1 °C promoveu um elevação da solubilidade em equilíbrio da nimesulida em todos meios tamponados (FGSSE pH 1,2, TA 4,5, SESSE pH 6,8) e, a diferença também foi significativa para estes meios ($p < 0,05$).

A influencia da temperatura na solubilidade é amplamente discutida, e pode ser compreendida a partir do principio de *Le Chatelier*. Considerando-se uma solução

saturada em equilíbrio, ao ser fornecido calor, o equilíbrio irá se deslocar na direção de absorção de calor. Dessa forma, caso o processo de dissolução seja endotérmico, a absorção de calor promoverá deslocamento do equilíbrio para a direita (como mostrado no esquema abaixo), aumentando a massa de soluto na fase aquosa. Assim, haverá aumento da solubilidade devido ao aumento da temperatura (TREPTOW, 1984).



A maioria dos fármacos tem o processo de dissolução endotérmica e como discutido, para essas substâncias, o aumento da temperatura ocasionará a elevação da solubilidade (LIU et al., 2010).

Foi realizado por BAKA et al. (2008) um estudo cujo objetivo era o de padronizar o método da agitação orbital em frascos utilizando a hidroclorotiazida como fármaco controle. Os autores avaliaram a influência da temperatura nos estudos da solubilidade em equilíbrio do fármaco, para tal avaliaram três valores de temperatura: 15 °C, 25 °C e 37 °C e, obtiveram como resultado que a solubilidade da hidroclorotiazida foi maior (o dobro) em 37 °C, quando comparado com a medição obtida em 25 °C.

Para os autores, o fato de que a maioria dos fármacos tem maior solubilidade a 37 °C do que a 25 °C pode ser uma vantagem perante o desenvolvimento de novos fármacos, pois a substância terá maior biodisponibilidade do que esperado. Além disso, isso demonstra a necessidade e aplicabilidade da avaliação da solubilidade de fármacos na temperatura corporal (BAKA et al., 2008).

Diante dos resultados encontrados, recomenda-se que as avaliações da solubilidade de fármacos, pelo método da agitação orbital em frasco, sejam realizadas com a temperatura completamente controlada, com variação máxima de ± 1 °C, como preconizado nos guias de bioensação das agências reguladoras (FDA, 2000; BRASIL, 2011)

Influência da quantidade de matéria prima em excesso

O excesso de matéria prima adicionado a cada um dos meios tamponados (teste 3), resultou em valores de solubilidade em equilíbrio estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Houve um aumento da solubilidade em todos os meios tamponados. Além disso, os coeficientes de variação (CV) das análises realizadas foram elevadas (> 5 %), sobretudo no SESSE (pH 6,8) em que se obteve alguns valores de CV maiores

que 10 %. Como mostrado nas análises, essa tendência de aumento da solubilidade e CV altos foram encontrados apenas para o fármaco controle de baixa solubilidade.

A hipótese considerada nesse trabalho é de que os fármacos de baixa solubilidade apresentam maiores influências quanto à quantidade de matéria prima utilizada no método da agitação orbital em frascos. Neste estudo, quando foi utilizado pequeno excesso de matéria prima, foram obtidos $CV < 5 \%$.

A nimesulida além de ser um fármaco de baixa solubilidade apresenta também, baixa molhabilidade (SILVA; VOLPATO, 2002). Sem a utilização de tensoativos, as partículas do fármaco tendem a flutuar na superfície, sobretudo quando há adição de grande excesso da substância. Durante as avaliações da solubilidade, no momento da coleta das alíquotas das soluções do fármaco nos meios tamponados, considera-se que pode haver a retirada, juntamente com a solução, de pequenas partes do excesso da matéria prima. Esse sólido pode interferir nos resultados do teste.

BAKA et al. (2008) avaliaram a solubilidade em equilíbrio da hidroclorotiazida utilizando pequenos e grandes excessos de matéria prima e, não obtiveram diferenças significativas entre as médias obtidas para cada experimento. Apesar disso, os autores recomendam a utilização de pequenos excessos de matéria prima, para não haver dificuldades durante a amostragem.

Um estudo realizado com diversos fármacos de baixa solubilidade por KAWAKAMI et al. (2005) mostrou que há uma forte tendência da quantidade do excesso de matéria prima adicionada afetar os resultados da solubilidade desses fármacos.

Diante do que foi discutido recomenda-se a utilização de pequenos excessos de matéria prima, para avaliação da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco. BAKA et al. (2008) recomendam um excesso de no máximo, 5 a 10 mg em 5 mL. Ao se tratar de fármacos com baixa molhabilidade é necessário avaliar a viabilidade da utilização da centrifugação quando houver obtenção persistente de elevados valores de CV entre as replicatas.

Influência da velocidade da agitação

A influência da velocidade de agitação foi avaliada em três níveis, considerando a solubilidade experimental (50, 100 e 150 rpm). As velocidades selecionadas foram as mais utilizadas em trabalhos de avaliação da solubilidade de substâncias utilizando-se o método da agitação orbital em frasco (GLOMME et al., 2005; BAKA et al., 2008;

HEIKKILA et al., 2011; TAKÁCS-NOVÁK et al., 2013). Não há consenso sobre qual velocidade utilizar, nem estudos avaliando este parâmetro para o método da agitação orbital em frascos.

Neste trabalho, para avaliação da solubilidade da nimesulida variando-se a velocidade de agitação, não foram obtidas diferenças significativas entre as médias das solubilidades em equilíbrio obtidas ($p > 0,05$) e, todos os coeficientes de variação foram inferiores a 5 %.

Apesar disso, como pode ser observado na Tabela 52, o tempo de alcance da solubilidade em equilíbrio, na velocidade de 150 rpm, foi de 5 horas, enquanto que na solubilidade experimental, o equilíbrio foi atingido com 7 horas para FGSSE (pH 1,2) e TA (pH 4,5). Para o SESSE (pH 6,8) o equilíbrio foi atingido com 7 horas e na solubilidade experimental foi atingido com 10 horas.

Dessa forma, para avaliação da solubilidade do fármaco controle de baixa solubilidade, não houve diferenças entre as médias das solubilidades em equilíbrio utilizando-se diferentes velocidades de agitação. Obteve-se um menor tempo para se atingir o equilíbrio com 150 rpm. Estudos realizados com fármacos que levam longos períodos de tempo para que se atinja o equilíbrio, podem se valer dessa estratégia.

Influência do volume da alíquota retirada

Neste estudo avaliou-se a influência do volume da alíquota retirada e, de acordo com a Tabela 53, não houve diferenças significativas entre as avaliações ($p > 0,05$).

Foram utilizados volumes da alíquota de 10 % (solubilidade experimental), 4 % (teste 6) e 14 % (teste 7) em relação ao volume total de meio tamponado.

Diante do exposto, o volume da alíquota retirada nos estudos de solubilidade de fármacos pelo método da agitação orbital em frascos deve ser escolhido conforme a necessidade de cada estudo não devendo, porém ser excessivo em relação ao volume total do meio (≤ 10 % do volume total do meio). Além disso, é necessário proceder à reposição do meio retirado com tampão adequado e, este deve estar mantido à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Tabela 54 - Resultados das avaliações da solubilidade do propranolol: solubilidade experimental e testes

	FGSSE (pH 1,2)			TA (pH 4,5)			SESSE (pH 6,8)		
	Se (mg/mL)	Te (h)	CV (%)	Se (mg/mL)	Te (h)	CV (%)	Se (mg/mL)	Te (h)	CV (%)
Solubilidade experimental	210,450	5,0	< 5	161,230	5,0	< 5	92,980	5,0	< 5
Teste 1	210,444	5,0	< 5	161,098	5,0	< 5	92,587	5,0	< 5
Teste 2	210,865	5,0	< 5	161,543	5,0	< 5	92,798	5,0	< 5
Teste 3	210,697	5,0	< 5	161,347	5,0	< 5	92,874	5,0	< 5
Teste 4	210,697	5,0	< 5	161,276	5,0	< 5	92,769	5,0	< 5
Teste 5	210,735	3,0	< 5	161,321	3,0	< 5	92,809	3,5	< 5
Teste 6	210,722	5,0	< 5	161,402	5,0	< 5	92,845	5,0	< 5
Teste 7	210,712	5,0	< 5	161,425	5,0	< 5	92,945	5,0	< 5

Se – solubilidade média em equilíbrio

Te – tempo em que a solubilidade em equilíbrio foi alcançada

CV – coeficiente de variação

Teste 1: Diminuição da temperatura de 37 ± 1 para 34 ± 1 °C;

Teste 2: Aumento da temperatura de 37 ± 1 para 40 ± 1 °C;

Teste 3: Aumento do excesso de matéria prima do fármaco de 300 para 400 mg

Teste 4: Diminuição da velocidade de agitação de 100 para 50 rpm

Teste 5: Aumento da velocidade de agitação de 100 para 150 rpm

Teste 6: Diminuição do volume da alíquota de 0,3 para 0,1 mL

Teste 7: Aumento do volume da alíquota de 0,3 para 0,5 mL

As médias das solubilidades experimentais e das provenientes dos testes estão mostradas na Tabela 54. Estes foram analisados estatisticamente utilizando o teste *t* de *Student* e, os resultados estão mostrados na Tabela 55.

Tabela 55 - Resultado da comparação para propranolol entre a solubilidade experimental e testes: p-valor para cada avaliação teste nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8), $\alpha = 0,05$

Avaliação	FGSSE (pH 1,2) (p-valor)	TA (pH 4,5) (p-valor)	SESSE (pH 6,8) (p-valor)
Teste 1	0,00382	0,000002	0,00040
Teste 2	3,4E-05	0,00001	0,02492
Teste 3	0,05945	0,42967	0,21583
Teste 4	0,05945	0,01621	0,07534
Teste 5	0,10119	1,09210	0,18473
Teste 6	0,34864	0,09523	0,08732
Teste 7	0,10119	0,06278	0,36120

Influência da temperatura

Para o propranolol, a avaliação da influência da temperatura nos resultados da solubilidade em equilíbrio foi realizada utilizando-se os mesmos valores mostrados anteriormente para a nimesulida.

No valor de 34 ± 1 °C houve diminuição da solubilidade em equilíbrio do propranolol, com diferença significativa ($p < 0,05$).

Para o valor maior de temperatura, 40 ± 1 °C, também houve diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) e, além disso, houve aumento da solubilidade. Nota-se que o processo de dissolução do propranolol também é endotérmico.

Os resultados encontrados apresentaram a mesma tendência encontrada para fármaco de baixa solubilidade, mostrado anteriormente. Dessa forma, a discussão e as recomendações apresentadas são aplicáveis a este tópico.

Influência da quantidade de matéria prima em excesso

O excesso de matéria prima adicionado não influenciou a avaliação da solubilidade em equilíbrio, quando comparada às médias das solubilidades experimentais. Não houve diferença significativa em nenhum dos meios tamponados ($p > 0,05$).

O resultado já era esperado, pois o relato de influência desse parâmetro perante a avaliação da solubilidade cita apenas fármacos de baixa solubilidade (KAWAKAMI et al., 2005).

Ainda assim, recomenda-se a utilização de pequeno excesso para não ocorrerem problemas quanto à amostragem, de 5 a 10 mg em 5 mL (BAKA et al., 2008).

Influência da velocidade da agitação

Quanto à influência da velocidade da agitação houve a mesma tendência mostrada para o fármaco controle de baixa solubilidade. Foram avaliadas as mesmas velocidades de agitação (50, 100 e 150 rpm). Os experimentos realizados a 150 rpm promoveram a diminuição do tempo para que o equilíbrio fosse atingido, em todos os meios tamponados, como mostrado na Tabela 54.

Não houve diferenças significativas entre as médias das solubilidades experimentais e testes ($p > 0,05$). As recomendações descritas anteriormente para a nimesulida, considerando este parâmetro, são aplicáveis a este tópico.

Influência do volume da alíquota retirada

Na avaliação da influência do volume da alíquota retirada, não houve diferenças significativas entre as médias das solubilidades experimentais e testes ($p > 0,05$), de acordo com a Tabela 55.

Foram utilizados volumes da alíquota de 3 % (avaliação controle), 1 % (avaliação teste 6) e 5 % (avaliação teste 7) em relação ao volume total de meio tamponado.

As recomendações mostradas anteriormente neste parâmetro para nimesulida são aplicáveis a este tópico.

3.3 Recomendações para avaliação da solubilidade de fármacos utilizando o método da agitação orbital em frascos (shake-flask)

Na Tabela 56 a seguir estão mostradas as principais recomendações para avaliação da solubilidade de fármacos com o método da agitação orbital em frascos. As recomendações mostradas foram baseadas principalmente nos resultados obtidos neste estudo e, também de dados retirados da literatura científica acerca do tema (discutidos anteriormente).

Tabela 56 - Recomendações para avaliação da solubilidade de fármacos de alta e baixa solubilidade utilizando o método da agitação orbital em frascos

Parâmetro	Fármaco baixa solubilidade	Fármaco alta solubilidade
Tipo de meio tampão (para classificação quanto ao SCB - Anvisa)	Dentro da faixa pH fisiológico (pH 1,2; 4,5 e 6,8) (FB ou outras compêndios aceitos)	
Temperatura (°C)	37 ± 1 (rigorosamente controlada)	
Excesso da substância a ser adicionada (mg)	Pequeno excesso (fator crítico) (5 a 10 mg – 5 mL)	Pequeno excesso (5 a 10 mg – 5 mL)
Velocidade de agitação (rpm)	50, 100 - para 150 (avaliar necessidade)	
Volume alíquota a ser retirada (mL)	Avaliar para cada estudo (≤ 10 % volume meio)	
Método para separar as fases	Filtração	
Critério de aceitação	Coeficiente de variação < 5 % ; (n ≥ 3)	
Método de quantificação	Método validado indicativo de estabilidade	

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidos dados de solubilidades em equilíbrio da nimesulida e propranolol utilizando-se o método da agitação orbital em frascos. A partir dos resultados de solubilidade obtidos, foram variadas e analisadas as condições do teste que poderiam influenciar os resultados do método da agitação orbital em frasco.

Para o fármaco de baixa e alta solubilidade, pequenas variações da temperatura do teste, superior ou inferior ao valor de 37 °C provocou diferenças estatisticamente significativas entre as médias das solubilidades em equilíbrio analisadas.

A quantidade em excesso de matéria prima também influenciou nos resultados da solubilidade do fármaco de baixa solubilidade, e recomenda-se a utilização de pequeno excesso. O excesso de matéria prima não foi uma etapa crítica para o fármaco de alta solubilidade.

Para ambos os fármacos, a variação da velocidade de agitação do método (50 a 150 rpm) não provocou diferenças entre os valores das solubilidades em equilíbrio, porém a 150 rpm o equilíbrio entre as fases (solução saturada e sólido) foi atingido mais rapidamente. O volume da alíquota retirada em cada coleta, visando avaliação da solubilidade, também não influenciou nas avaliações do fármaco de baixa e alta solubilidade.

Com os resultados obtidos nesse trabalho foram selecionadas recomendações gerais para a avaliação da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos, para fármacos de baixa e alta solubilidade.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S. et al. Hydrotropic solubilization of nimesulide for parenteral administration. **Int. J. Pharm.**, v. 274, n. 1–2, p. 149-155, 4/15/ 2004.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm Res**, v. 12, n. 3, p. 413-20, Mar 1995.

AMIDON, K. S. et al. Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation, and public policy. **Clin Pharmacol Ther**, v. 90, n. 3, p. 467-70, Sep 2011.

ARAÚJO, L. U. et al. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação; Generic drugs in Brazil: historical overview and legislation. **Rev. panam. salud pública**, v. 28, n. 6, p. 480-492, 2010.

AUGUSTIJNS, P.; MOLS, R. HPLC with programmed wavelength fluorescence detection for the simultaneous determination of marker compounds of integrity and P-gp functionality in the Caco-2 intestinal absorption model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p. 971-978, 3/10/ 2004.

AVDEEF, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). **Current topics in medicinal chemistry**, v. 1, n. 4, p. 277-351, 2001.

AVDEEF, A.; BERGER, C. M.; BROWNELL, C. pH-metric solubility. 2: correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH methods. **Pharm Res**, v. 17, n. 1, p. 85-9, Jan 2000.

BAKA, E. [Good laboratory practice of equilibrium solubility measurement]. **Acta Pharm Hung**, v. 81, n. 1, p. 18-28, 2011.

BAKA, E.; COMER, J. E.; TAKACS-NOVAK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **J Pharm Biomed Anal**, v. 46, n. 2, p. 335-41, Jan 22 2008.

BANO, G. et al. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 6, p. 615-617, 1991.

BELLAVINHA, K. R. **AVALIAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO COMO POTENCIAL CANDIDATO À BIOISENÇÃO**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal de Ouro Preto. 2012. (Dissertação de mestrado)

BENET, L. Z. et al. The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 3, p. 483-488, 2008.

BONAMICI, D. **Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisenções**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, p.159. 2009. (Dissertação de mestrado)

BORGES, E. M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. **Química Nova**, v. 35, p. 993-1003, 2012.

BOX, K. J. et al. Equilibrium versus kinetic measurements of aqueous solubility, and the ability of compounds to supersaturate in solution—a validation study. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 95, n. 6, p. 1298-1307, 2006.

BRASIL. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 2003.

_____. **Farmacopeia Brasileira, volume 2**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil, Anvisa, 2010. 808.

_____. **Resolução nº 37, de 05 de Agosto De 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências**. , Brasília: 2011.

_____. **Resolução - RDC nº 47, de 29 de agosto de 2012. “Dispõe sobre oficialização de novos lotes Substâncias Químicas de Referência da Farmacopeia Brasileira”**. . DF 2012.

_____. **Nota Técnica nº 003/2013/CEFAR/GTFAR/GGMED/ANVISA**, 2013.

_____. **Instrução Normativa nº 02, de 14 de março de 2013. “Dispõe sobre a lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) e dá outras providências”**. Brasília, DF 2013a.

BRONNER, W. E.; BEECHER, G. R. Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 805, n. 1–2, p. 137-142, 5/1/ 1998.

CLARKE, F. H.; CAHOON, N. M. Ionization constants by curve fitting: Determination of partition and distribution coefficients of acids and bases and their ions. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 76, n. 8, p. 611-620, 1987.

COOK, J. A.; DAVIT, B. M.; POLLI, J. E. Impact of Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 5, p. 1539–1544, 2010.

D'EMANUELE, A. et al. The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 3, p. 447-453, 3/24/ 2004.

DAVIS, R.; BROGDEN, R. N. Nimesulide. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 48, n. 3, p. 431-54, Sep 1994.

DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25-35, 11/3/ 2005.

DELLIS, D.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Physicochemical profile of nimesulide: Exploring the interplay of lipophilicity, solubility and ionization. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 44, n. 1, p. 57-62, 5/9/ 2007.

EL-SAHARTY, Y. S. Simultaneous high-performance liquid chromatographic assay of furosemide and propranolol HCL and its application in a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 4, p. 699-709, 11/24/ 2003.

EMA. **European Agency for Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence.** 2001.

_____. **EUROPEAN MEDICINES EVALUATION AGENCY, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) - Guidance on the Investigation of Bioequivalence** 2008.

FDA. **Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System** , US Department of Health and Human Services 2000.

_____. **Guidance for Industry: Clozapine Tablets: In Vivo Bioequivalence and In Vitro Dissolution Testing.** FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, C. F. D. E. A. R. C. 2005.

FERNÁNDEZ-NAVARRO, J. J. et al. Silanol suppressing potency of alkyl-imidazolium ionic liquids on C18 stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, n. 0, p. 166-175, 4/6/ 2012.

FONSECA, L. et al. Development and Validation of a Discriminative Dissolution Test for Nimesulide Suspensions. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1145-1152, 2009/12/01 2009.

FONSECA, L. B. 2007. Dissertação de mestrado Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

FORD, J. L.; RUBINSTEIN, M. H.; HOGAN, J. E. Propranolol hydrochloride and aminophylline release from matrix tablets containing hydroxypropylmethylcellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 24, n. 2-3, p. 339-350, 5// 1985.

GLOMME, A.; MARZ, J.; DRESSMAN, J. B. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. **J Pharm Sci**, v. 94, n. 1, p. 1-16, Jan 2005.

GONSALVES, A. D. A. et al. Contextualizando reações ácido-base de acordo com a teoria protônica de Brønsted-Lowry usando comprimidos de propranolol e nimesulida. **Química Nova**, v. 36, p. 1236-1241, 2013.

GREEN, J. M. Practical Guide to Analytical Method Validation. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GREENBLATT, D. J.; KOCH-WESER, J. Adverse reactions to propranolol in hospitalized medical patients: a report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. **American heart journal**, v. 86, n. 4, p. 478-484, 1973.

GROUP, B.-B. H. A. T. R. A randomized trial of propranolol in patients with acute myocardial infarction. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 247, n. 12, p. 1707-1714, 1982.

HEIKKILA, T. et al. Equilibrium drug solubility measurements in 96-well plates reveal similar drug solubilities in phosphate buffer pH 6.8 and human intestinal fluid. **Int J Pharm**, v. 405, n. 1-2, p. 132-6, Feb 28 2011.

HOLT, W.; REFENES, P. The Durbin-Watson Test for Neural Regression Models. In: BOL, G.; NAKHAEIZADEH, G., *et al* (Ed.). **Risk Measurement, Econometrics and Neural Networks**: Physica-Verlag HD, 1998. cap. 5, p.57-68. (Contributions to Economics). ISBN 978-3-7908-1152-0.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B(CPMP/ICH/281/95)**. 1995.

ISSA, M. G.; FERRAZ, H. G. Intrinsic Dissolution as a Tool for Evaluating Drug Solubility in Accordance with the Biopharmaceutics Classification System. **Dissolution Technologies**, 2011.

JAGDALE, S. C. *et al*. Formulation and evaluation of gastroretentive drug delivery system of propranolol hydrochloride. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 1071-1079, 2009.

JÄRVINEN, K. *et al*. Drug Release from pH and Ionic Strength Responsive Poly(acrylic acid) Grafted Poly(vinylidene fluoride) Membrane Bags In Vitro. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5, p. 802-805, 1998/05/01 1998.

JATLOW, P.; BUSH, W.; HOCHSTER, H. Improved liquid-chromatographic determination of propranolol in plasma, with fluorescence detection. **Clinical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 777-9, May 1, 1979 1979.

JAVADZADEH, Y.; MUSAALREZAEI, L.; NOKHODCHI, A. Liquisolid technique as a new approach to sustain propranolol hydrochloride release from tablet matrices. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 362, n. 1–2, p. 102-108, 10/1/ 2008.

JENKE, D. R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II Guidelines for primary parameters. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 19, n. 5, p. 737-757, 1996.

JOZAN, M.; TAKACSNE-NOVAK, K.; SZASZ, G. [Equilibrium solubility of new potential drugs in water, 1-octanol and cyclohexane]. **Acta Pharm Hung**, v. 66, n. 3, p. 141-6, May 1996.

KARALIS, V. *et al*. Bioavailability and Bioequivalence: Focus on Physiological Factors and Variability. **Pharm. Res.**, v. 25, n. 8, p. 1956-1962, 2008/08/01 2008.

KAWAKAMI, K.; MIYOSHI, K.; IDA, Y. Impact of the Amount of Excess Solids on Apparent Solubility. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 9, p. 1537-1543, 2005/09/01 2005.

KIM, M. S. et al. Quantification of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC-UV): application to pharmacokinetic studies in 28 healthy Korean subjects. **J Chromatogr Sci**, v. 50, n. 5, p. 396-400, May 2012.

KRÄMER, S. D.; JAKITS-DEISER, C.; WUNDERLI-ALLENSPACH, H. Free fatty acids cause pH-dependent changes in drug-lipid membrane interactions around physiological pH. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 6, p. 827-832, 1997.

KULKARNI, S. K. On the safety of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor. **CURRENT SCIENCE**, v. 83, n. 12, 2002.

L.A., T. Stability of compounded formulations. **Am. Pharm. Assoc.**, p. p. 224, 1996.

LEVIS, K. A.; LANE, M. E.; CORRIGAN, O. I. Effect of buffer media composition on the solubility and effective permeability coefficient of ibuprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 253, n. 1-2, p. 49-59, 3/6/ 2003.

LIEDHOLM, H.; W»HLIN-BOLL, E.; MELANDER, A. Mechanisms and variations in the food effect on propranolol bioavailability. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 469-475, 1990/05/01 1990.

LINDENBERG; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 58, n. 2, p. 265-78, Sep 2004.

LIU, H. et al. Effects of extrusion process parameters on the dissolution behavior of indomethacin in Eudragit® E PO solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1-2, p. 161-169, 1/4/ 2010.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **J Clin Pharmacol**, v. 42, n. 6, p. 620-43, Jun 2002.

MERLANI, G. et al. Fatal hepatotoxicity secondary to nimesulide. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 57, n. 4, p. 321-6, Jul 2001.

MUDIE, D. M. et al. Mechanistic analysis of solute transport in an in vitro physiological two-phase dissolution apparatus. **Biopharm Drug Dispos**, v. 33, n. 7, p. 378-402, Oct 2012.

MUSKO, M.; SZNITOWSKA, M. Stability of extemporaneous pediatric oral liquids compounded from tablets and drug substance: case of propranolol and theophylline. **Acta Pol Pharm**, v. 70, n. 1, p. 137-45, Jan-Feb 2013.

OGAN, K.; KATZ, E.; PORRO, T. J. The role of spectral selectivity in fluorescence detection for liquid chromatography. **J Chromatogr Sci**, v. 17, n. 11, p. 597-600, Nov 1979.

PALMGRÉN, J. J. et al. Characterization of Caco-2 cell monolayer drug transport properties by cassette dosing using UV/fluorescence HPLC. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 319-328, 3// 2004.

PANCHAGNULA, R. et al. Reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection for simultaneous quantitation of indinavir and propranolol from ex-vivo rat intestinal permeability studies. **Journal of Chromatography B**, v. 806, n. 2, p. 277-282, 7/5/ 2004.

PEREIRA, T. M. **Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica**. São Paulo. 2011

POLLI, J. In Vitro Studies are Sometimes Better than Conventional Human Pharmacokinetic In Vivo Studies in Assessing Bioequivalence of Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms. **The AAPS Journal**, v. 10, n. 2, p. 289-299, 2008/06/01 2008.

RAINSFORD, K. D. **Nimesulide - Actions and Uses**. Springer London, Limited, 2005. ISBN 9783764374105. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=S5w8N0crEJwC> >.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, P. O. et al. Equivalência farmacêutica entre comprimidos de propranolol comercializados no mercado nacional. **Infarma**, v. 18, n. 3-4, p. 16-21, 2006.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. **ISRN Pharm**, v. 2012, p. 195727, 2012.

SIKARRA, D. et al. TECHNIQUES FOR SOLUBILITY ENHANCEMENT OF POORLY SOLUBLE DRUGS: AN OVERVIEW. **Journal of Medical Pharmaceutical And Allied Sciences**, 2012.

SILVA, C. R. et al. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, p. 270-276, 2004.

SILVA, R. L. **Dissolução de comprimidos de nimesulida de liberação imediata, biodisponibilidade e correlação in vivo-in vitro**. 2001. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SILVA, R. L. D.; VOLPATO, N. M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 163-172, 2002.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. John Wiley & Sons, 2012. ISBN 1118591518.

SORA, I. et al. Determination of nimesulide and its active metabolite in plasma samples based on solvent deproteinization and HPLC-DAD analysis. **Rev. Roum. de Chim**, v. 52, n. 5, p. 501, 2007.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, p. 1755-1774, 2008.

SOMERAI, S. B. et al. Cost-related medication nonadherence among elderly and disabled medicare beneficiaries: a national survey 1 year before the medicare drug benefit. **Arch Intern Med**, v. 166, n. 17, p. 1829-35, Sep 25 2006.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica: Princípios de Biodisponibilidade, Bioequivalência, Equivalência Farmacêutica, Equivalência Terapêutica e Intercambialidade de Medicamentos**. . Rio de Janeiro: 2009.

TAKÁCS-NOVÁK, K. et al. Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, n. 0, p. 279-285, 9// 2013.

TAKAGI, T. et al. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. **Molecular pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 631-643, 2006.

TAKKA, S.; RAJBHANDARI, S.; SAKR, A. Effect of anionic polymers on the release of propranolol hydrochloride from matrix tablets. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 52, n. 1, p. 75-82, 2001.

TAN, H. H. et al. Nimesulide-induced hepatotoxicity and fatal hepatic failure. **Singapore Med J**, v. 48, n. 6, p. 582-5, Jun 2007.

TAYLOR, E. A.; KASPI, T. L.; TURNER, P. The pH dependent absorption of propranolol and indomethacin by Parafilm, a stimulant of salivary secretion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 813-814, 1978.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TREPTOW, R. S. Le Châtelier's principle applied to the temperature dependence of solubility. **Journal of Chemical Education**, v. 61, n. 6, p. 499, 1984.

TZANAVARAS, P. D.; THEMELIS, D. G. Validated high-throughput HPLC assay for nimesulide using a short monolithic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1483-1487, 3/12/ 2007.

USP. U.S. Pharmacopeia National Formulary, Rockville, 32th ed

2009.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23–24, p. 1068-1075, 12// 2007.

VENKATESH, G. et al. Development and validation of RP-HPLC-UV method for simultaneous determination of buparvaquone, atenolol, propranolol, quinidine and verapamil: A tool for the standardization of rat in situ intestinal permeability studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1546-1551, 3/12/ 2007.

VOGELPOEL, H. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: Verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 8, p. 1945-1956, 2004.

VOLGYI, G. et al. [Good laboratory practice of equilibrium solubility measurement II. Study of pH-dependent solubility of ionizable compounds]. **Acta Pharm Hung**, v. 81, n. 2, p. 87-95, 2011.

VYAS, A. J. et al. A new RP-HPLC method for the simultaneous determination of drotaverine hydrochloride and nimesulide in a tablet dosage form **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 5, n. 1, p. 299-305, 2013.

WANG, H.; ZOU, G.; WAN, A. T. K. Adaptive LASSO for varying-coefficient partially linear measurement error models. **Journal of Statistical Planning and Inference**, v. 143, n. 1, p. 40-54, 1// 2013.

WANG, Y. et al. Improving sublingual delivery of weak base compounds using pHmax concept: Application to propranolol. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 272-278, 2/19/ 2010.

WHO. **WORLD HEALTH ORGANIZATION. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms.** Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. nº 937 2006.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharm Res**, v. 22, n. 1, p. 11-23, Jan 2005.

YAKABE, C. **Determinação espectrofotométrica da nimesulida em formulações farmacêuticas.** 1998. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo

YAMINI, Y.; ARAB, J.; ASGHARI-KHIAVI, M. Solubilities of phenazopyridine, propranolol, and methimazole in supercritical carbon dioxide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 1, p. 181-187, 4/24/ 2003.

APÊNDICE A

Método espectrofotométrico para quantificação de nimesulida no FGSSE (pH 1,2)

Métodos

Foi desenvolvido e avaliado método de quantificação da nimesulida, inicialmente apenas no FGSSE (pH 1,2). O método foi baseado no descrito por SILVA (2001), com as modificações pertinentes.

Foram propostas modificações para possibilitar a quantificação da nimesulida nos meios tamponados a serem utilizados no estudo. Inicialmente considerou-se apenas a quantificação da nimesulida no FGSSE (pH 1,2).

Preparo da solução estoque (SE) de nimesulida

Foram pesados 12,5 mg de nimesulida SQR e transferidos em um balão de 25 mL completando o volume com metanol. Foi obtido uma solução com concentração final de 0,5 mg/mL.

Preparo das soluções diluídas

Para o preparo das soluções diluídas, foram retiradas alíquotas da solução estoque, como mostrado na Tabela 57, a seguir. Em cada amostra foi adicionada solução de NaOH 0,1 M, de forma que a concentração final do álcali fosse de 0,1 M. Com a adição da solução do álcali, percebeu-se a formação de coloração nas soluções, sendo que as de maior concentração tinham a coloração mais forte. O volume de cada solução, no balão volumétrico, foi aferido com FGSSE (pH 1,2).

Foram efetuadas varreduras espectrais com soluções de nimesulida, para verificar o comprimento de onda (λ_{max}) de máxima absorção, entre 200-500 nm.

Tabela 57 - Preparo das soluções diluídas de nimesulida em FGSSE (pH 1,2), utilizando método espectrofotométrico (b)

Concentração (µg/mL)	Alíquota da SE (mL)	Volume NaOH (mL)	Volume final da solução (mL)
0,5	0,025	5,0	50
1,0	0,050	2,5	25
2,0	0,100	2,5	25
3,0	0,150	2,5	25
5,0	0,250	2,5	25
10,0	0,500	2,5	25
15,0	0,750	2,5	25
20,0	1,000	2,5	25
30,0	1,500	2,5	25

O ensaio em branco foi realizado para cada concentração utilizada, obedecendo-se a mesma proporção dos constituintes da amostra: metanol, solução de NaOH 0,1 M e FGSSE (pH 1,2).

Validação do método analítico – Linearidade e Seletividade

A linearidade e seletividade do método analítico desenvolvido para quantificação da nimesulida foram avaliados de acordo com a Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

Os cálculos e análises estatísticas foram efetuados com auxílio do software Microsoft Excel® 2010.

Foi preparada SE de nimesulida com concentração de 0,5 mg/mL, em metanol. Posteriormente foram realizadas as diluições, em FGSSE pH 1,2, como mostrado na Tabela 58.

Tabela 58 - Preparo das soluções de nimesulida, em FGSSE pH 1,2, para avaliação do parâmetro linearidade do método espectrofotométrico

Concentração (µg/mL)	Alíquota da SE (mL)	Volume NaOH (mL)	Volume final da solução (mL)
0,5	0,025	5,0	50
1,0	0,050	2,5	25
2,0	0,100	2,5	25
3,0	0,150	2,5	25
5,0	0,250	2,5	25
7,0	0,350	2,5	25
10,0	0,500	2,5	25

Resultados e Discussão

Foram realizadas varreduras espectrais com várias concentrações da nimesulida (0,5 a 30 µg/mL). Abaixo estão mostradas as varreduras de duas soluções (5 µg/mL) e (30 µg/mL) de nimesulida.

Figura 37 - Varredura espectral da solução da nimesulida (5 µg/mL)

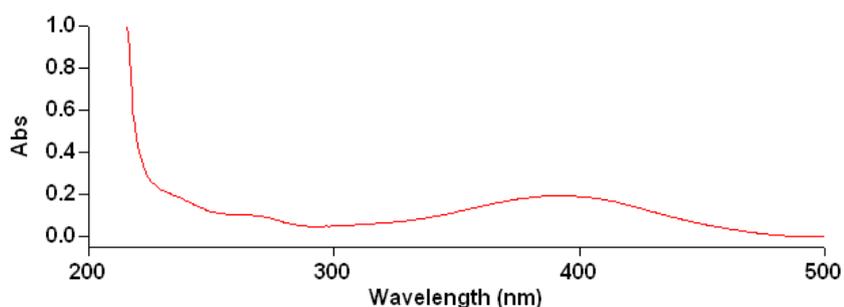
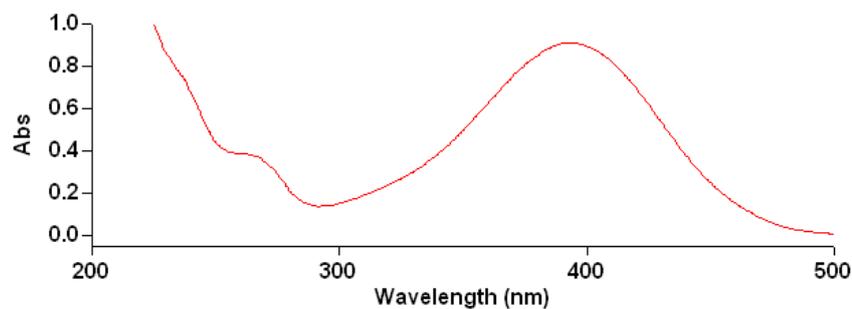


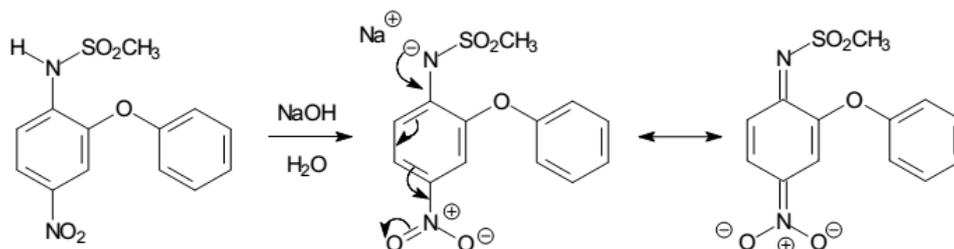
Figura 38 - Varredura espectral da solução da nimesulida (30 µg/mL)



As soluções obtidas por esse método apresentaram coloração amarelada, sendo a intensidade da cor dependente da concentração da nimesulida. Quanto mais concentrada, maior intensidade da cor amarela.

Em meio alcalino ocorre com a nimesulida em meio alcalino, que está apresentada na Figura 39.

Figura 39 - Reação da nimesulida em meio alcalino e formação do composto colorido (YAKABE, 1998)



Segundo YAKABE (1998), a alcalinização das soluções promove o deslocamento do λ_{\max} da região do UV, em torno de 300 nm, para a região próxima do visível, aproximadamente 400 nm, pela formação do composto colorido.

Validação do método analítico

Linearidade

O gráfico da regressão linear e dos resíduos da regressão está mostrado nas Figuras 40 e 41. Cada ponto dos gráficos de regressão corresponde a médias de 3 determinações e os erros referentes as mesmas foram plotados.

Figura 40 - Curva analítica do método espectrofotométrico de quantificação do nimesulida em FGSSE (pH 1,2)

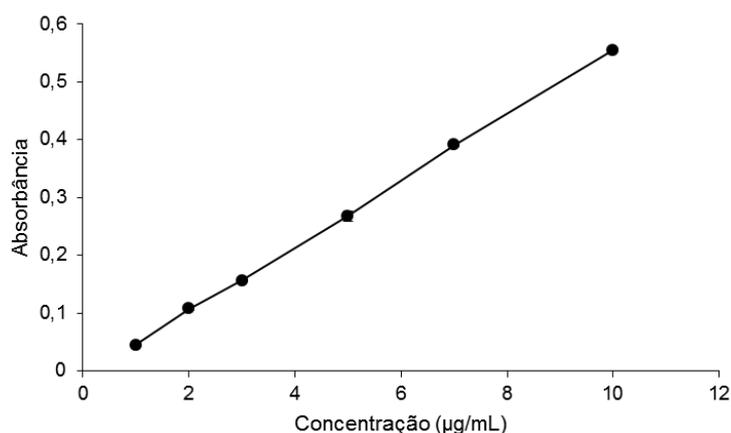
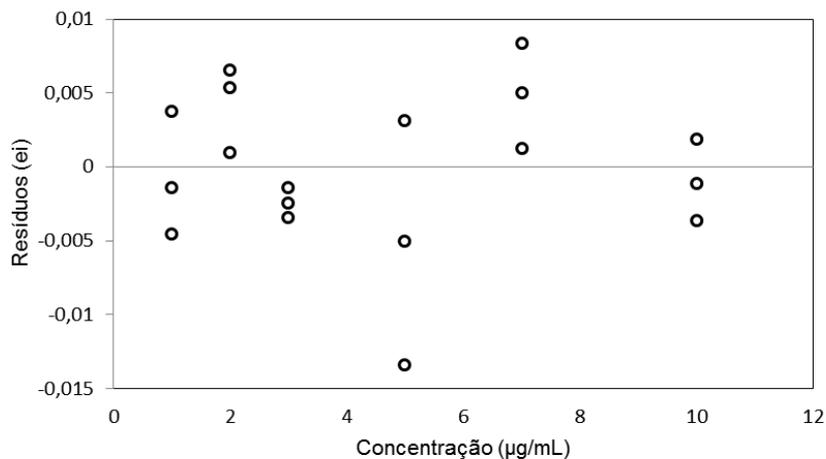


Figura 41 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do nimesulida em FGSSE (pH 1,2) (método espectrofotométrico)



Em relação às premissas dos resíduos ($\alpha = 0,05$), a normalidade, homoscedasticidade e a independência dos resíduos foram confirmadas, para a curva analíticas da nimesulida em FGSSE pH 1,2 (método espectrofotométrico), pelos testes de Ryan Joiner, Levene modificado por Brown e Forsythe e Durbin-Watson. Para cada um dos testes o p-valor foi maior que 0,05.

Para a avaliação da significância da linearidade o F calculado (19339,10) foi maior que o F crítico, para ($\alpha = 0,05$). Os dados não apresentam desvio de linearidade, pois o F calculado (3,8744) foi menor que o F crítico (4,1300).

Na Tabela 59 estão mostrados os parâmetros da regressão linear para o método para quantificação de nimesulida no FGSSE (pH 1,2).

Tabela 59 - Parâmetros da regressão linear obtidos para a quantificação espectrofotométrica da nimesulida em FGSSE (pH 1,2)

Parâmetro da regressão	Curva A
R^2	0,9989
a	32630 ± 273.7
b	-5075 ± 1517
R	0,9975

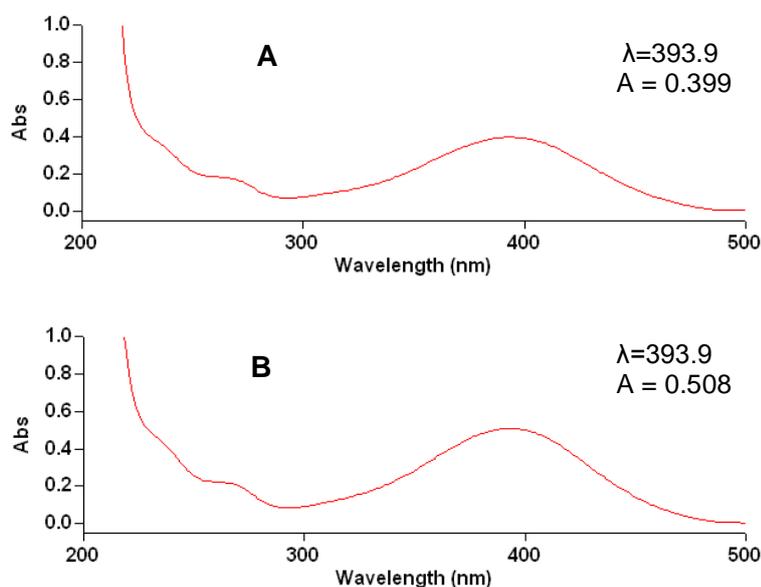
Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) e correlação (R) foram superiores a 0,99 para a quantificação da nimesulida no FGSSE (pH 1,2). Assim, o método cumpre com o requisito mínimo de linearidade preconizado pela RE 899 (BRASIL, 2003).

Seletividade

As varreduras espectrais realizadas para avaliação da seletividade do método espectrofotométrico estão na Figura 42 a seguir.

Em A, tem-se a varredura da solução da nimesulida logo após ser preparada, em FGSSE (pH 1,2). Em B, tem-se a varredura da mesma solução da nimesulida, após ser exposta ao calor seco, à temperatura de 70 °C durante 4 horas, com auxílio de uma estufa.

Figura 42 - Avaliação da seletividade do método espectrofotométrico de quantificação da nimesulida. Concentração da solução da nimesulida foi de 10 µg/mL, em FGSSE (pH 1,2)



Na Figura 42 é possível observar que o método espectrofotométrico de quantificação da nimesulida não foi seletivo. O método não foi capaz de distinguir o fármaco de seu produto de degradação, formado a partir da degradação forçada da substância.

Nas análises efetuadas neste trabalho, é indispensável que o método para quantificação da nimesulida seja seletivo, e consiga discriminar o possível produto de degradação formado.

Além disso, segundo a RE 899, (BRASIL, 2003) para testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas é necessário à comprovação da seletividade do método, para que o mesmo seja considerado validado. Diante do exposto, foi necessário desenvolver outro método para quantificação da nimesulida.