



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BRUNO AIRES DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE
ESTABILIDADE PARA COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE METILDOPA**

**RECIFE
2014**

BRUNO AIRES DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE METILDOPA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque

Co-orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho.

**RECIFE
2014**

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

S237d Santos, Bruno Aires dos.
Desenvolvimento e validação de Método indicativo de estabilidade para comprimidos revestidos de Metildopa / Bruno Aires do Santos. – Recife: O autor, 2014.
71 folhas: il. ; 30 cm.

Orientadora: Miracy Muniz de Albuquerque.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.
Inclui referências.

1. Metildopa. 2. Estabilidade de Medicamentos. 3. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. 4. Estudos de Validação. I. Albuquerque, Miracy Muniz de. (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2015-157)

BRUNO AIRES DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE METILDOPA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 30 de maio de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Coorientador)

Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador Interno)

Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Larissa Araújo Rolim (Examinador Externo)

Colegiado de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Vale do São Francisco

Aos meus filhos Breno e Gabriela pelo amor que recebo
diariamente. Para Edilene minha esposa pelo incentivo
para conclusão desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por ter me concedido a vida; e, toda sabedoria e conforto nos momentos de angústia durante esta jornada.

A minha orientadora, **Miracy Muniz de Albuquerque**, por sua disponibilidade sempre que necessário.

Ao meu co-orientador, **José Lamartine Soares Sobrinho**, pelo apoio técnico-científico, oportunidade, incentivo, compreensão, amizade e acima de tudo pelo otimismo e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha esposa, **Edilene Santos**, e aos nossos filhos, **Maria Clara Santos, Breno Aires e Gabriela Aires**, pela compreensão e apoio imensurável durante todo o período da execução deste trabalho. Muito obrigado!

A minhas avós, **Audemice Aires e Cremilda Santos**, a minha mãe, **Edilza Aires**, a meu pai, **Janilson Santos**, a meus irmãos, **Danilo Aires e Barbara Aires**, por todos os ensinamentos e contribuições. Muito Obrigado!

A minha família por todo apoio e amor em todos os momentos da minha vida. Vocês são a minha inspiração e me motivam a crescer, sempre.... Amo muito vocês!

Aos farmacêuticos e colaboradores que compõem o LAFEPE, em especial ao COP&D, e a todos os integrantes e amigos de convívio diário, pela atenção, respeito e carinho que me destinam. Muito obrigado!

Aos meus amigos **Flávia Morais, Aíla Santana, Paulo Pedrosa e Júnior Grangeiro**. Obrigado pelo carinho e amizade de sempre.

E a **todos** aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

RESUMO

A metildopa (a-metil-3, 4-dihidro-1-fenilalanina) é um agente hipotensor de ação central, é uma pró-droga, que exerce sua ação anti-hipertensiva através de um metabólito ativo. A estabilidade é um importante parâmetro para avaliar a segurança, eficácia e qualidade exigidas para o registro sanitário de produtos farmacêuticos. Vários países publicam diretrizes para estabilidade farmacêutica. No Brasil, estes estudos devem ser conduzidos segundo o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade, publicada na resolução - RE n.01 de 29 de julho de 2005 e a RDC 58 de 20 de dezembro de 2013 que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares e dá outras providências. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um método indicativo de estabilidade para comprimidos revestidos de metildopa 500mg, avaliando a especificidade e a seletividade deste método. Para avaliação da especificidade e seletividade do método foram mantidas amostras da metildopa matéria-prima, comprimido revestido 500mg e placebo nas seguintes condições de estresse: hidrólises (ácida, básica e neutra), oxidação e temperatura; as amostras também foram submetidas ao teste de fotoestabilidade. A seletividade do método também foi demonstrada após realização de testes com o padrão primário de metildopa contaminado com a impureza 3-O-metil-metildopa. Os resultados foram analisados segundo dados gerados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD). A 3-O-metildopa apresenta tempo de retenção relativo (TRR) de 1,37 frente à metildopa. A metildopa mostrou-se estável nas hidrólises neutras e ácida menos concentradas bem como na degradação térmica, oxidativa e na fotoestabilidade. Apresentou um decaimento muito acentuado nas condições básicas (NaOH 0,1 e 1,0M), sendo inadequado para o estudo de métodos indicativos de estabilidade como indica a RDC 58 de 2013. A condição mais severa da hidrólise ácida (HCl 5,0M) apresentou um teor de 77,80% para a matéria-prima e 82,99% para o comprimido revestido em comparação com o padrão de trabalho após 72 horas de estudo, ambos apresentaram um pico de degradação com TRR de aproximadamente 2,00. Na condição de hidrólise alcalina menos concentrada (NaOH 0,01M) apareceram produtos de degradação tanto na matéria-prima como para o comprimido revestido de metildopa, porém, o pico que apresenta área significativa apresenta TRR de 0,38 e o teor do fármaco foi de 73,49% para a matéria-prima e 74,48% para o comprimido revestido em comparação com o padrão de trabalho após 72 horas de estudo. Através das análises dos resultados obtidos utilizando as ferramentas de integração e de análise espectral para avaliação da similaridade e pureza dos picos, verifica-se que o método utilizado consegue

detectar os produtos de degradação que venham a surgir durante os estudos de estabilidade. O método posteriormente foi validado utilizando como referências a RE 899 de 2003 e a norma técnica da ICH Q2 R1. O método desenvolvido e validado foi utilizado no estudo de estabilidade de um comprimido revestido de metildopa 500mg similar constante no mercado brasileiro, apresentando resultados dentro da especificação exigida para o produto.

Palavras-chave: Metildopa. Estabilidade de Medicamentos. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Método Indicativo de Estabilidade. Estudos de Validação.

ABSTRACT

Methyldopa (α-methyl-3,4-dihydro-1-phenylalanine) is a centrally acting antihypertensive agent, is a prodrug, which exerts its antihypertensive action through an active metabolite. Stability is an important parameter to evaluate the safety, efficacy and quality required for sanitary registration of pharmaceutical products. Several countries publish guidelines for pharmaceutical stability. In Brazil, the stability studies should be conducted according to the guide on conducting stability studies, published in the resolution RE 01 of July 29, 2005 and RDC 58 of December 20, 2013 laying down parameters for notification, identification and qualification of degradation products in medicine with synthetic and semi synthetic active substances classified as new, generic and similar and other measures. The aim of this study was to develop a stability indicating method for coated tablets 500mg of methyldopa following and evaluating the specificity and selectivity of this method. To assess the specificity and selectivity of the method of methyldopa samples were stored raw material, coated tablet 500mg and placebo in the following stress conditions: hydrolysis (acidic, basic and neutral), oxidation, light and temperature. The selectivity of the method was demonstrated after testing with the primary pattern methyldopa contaminated with impurity 3-O-methyl-methyldopa. The results were analyzed according to data generated by high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). 3-O-methyl-methyldopa has RRT 1.37 front methyldopa. Methyldopa was stable in neutral and acidic hydrolysis less concentrated as well as thermal, oxidative degradation and photostability. Showed a dramatic decay in basic conditions (NaOH 0,1 and 1,0M) and unsuitable for the study of stability indicating methods as shown in the RDC 58/ 2013. The most severe conditions of acid hydrolysis (5,0M HCl) showed a content of 77.80 % for the raw material and 82.99 % for the coated tablet compared the standard of work after 72 hours of study, both showed a peak of degradation with TRR approximately 2,00. In the condition of less concentrated alkaline hydrolysis (0,01M NaOH) appeared both in the degradation products as raw material for the coated tablet methyldopa, however, the peak that shows significant area RRT 0,38 and shows content of the drug was 73,49% for raw and 74,48% for the coated tablet compared the standard of work after 72 hours of study. Through the analysis of the results obtained using the tools of integration and spectral analysis for assessing similarity and purity of the peaks, it is found that the method can detect possible degradation products that arise during the stability studies . The method was subsequently validated using as references to RE 899 2003

and the technical standards of the ICH Q2 R1. The developed and validated method was used on a tablet stability study coated methyldopa 500mg similar constant in the Brazilian market, presenting results within the specification required for the product.

Keywords: Methyldopa. Drug Stability. Chromatography, High Pressure Liquid. Stability Indicating Method. Validation Studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A. Estrutura química da metildopa, B. Estrutura química da 3-O-Metilmetildopa.....	25
Figura 2 – Esquema da síntese da molécula de metildopa. Fonte: DMF da Metildopa HANGZHOU TIANCHEN PHARMACEUTICAL CO. , LTD – 2008.	26
Figura 3 – Cromatograma das SQR Metildopa USP J0G237 e 3-O-Metilmetildopa H0H391.....	41
Figura 4 – Esquema de reação da metildopa ref. Yoshioka e Stella, 2000.	42
Figura 5 – a) Branco HCl 1,0M; b) Metildopa em HCl 1,0M tempo 0h (zero); c) Metildopa em HCl 1,0M após 30 dias	43
Figura 6 – Análise espectral (Pureza e Similaridade) do pico do IFA Metildopa após 30 dias de estudo da hidrólise ácida HCl 1,0M.	44
Figura 7 – a) Branco HCl 5,0M; b) Metildopa em HCl 5,0M Tempo 0 (Zero); c) Metildopa em HCl 5,0M após 72 horas.	45
Figura 8 – Percentagem do teor Metildopa e do pico do produto de degradação DEG A Por tempo de estudo nas amostras de hidrólise ácida HCl 5,0 M.....	45
Figura 9 – a) Branco HCl 5,0M; b) Metildopa comprimido revestido em HCl 5,0M Tempo 0h (Zero); c) Metildopa comprimido revestido em HCl 5,0M após 72 horas	47
Figura 10 – Percentagem do teor metildopa e do pico do produto de degradação DEGA por tempo de estudo nas amostras comprimidos revestidos em hidrólise ácida HCl 5,0M	47
Figura 11 – 1. Branco HCl 5,0M; 2. Placebo metildopa HCl 5,0M no início do estudo; 3. Placebo metildopa HCl 5,0M em 72 horas de estudo.	48
Figura 12 – a) Padrão Analítico da Metildopa; b) Branco NaOH 0,1M; c) Metildopa em NaOH 0,1M	49
Figura 13 – a) Padrão Analítico da Metildopa; b) Branco NaOH 1,0M; c) Metildopa em NaOH 1,0M	50
Figura 14 – Análise Espectral (Pureza e Similaridade) do pico do IFA Metildopa submetida à hidrólise básica: a) NaOH 0,1M e b) NaOH 1,0M.....	51
Figura 15 – a) Branco NaOH 0,01M; b) Metildopa em NaOH 0,01M tempo 0 (zero); c) Metildopa em NaOH 0,01M após 72 horas de estudo.....	52
Figura 16 – Percentagem do teor de Metildopa e do pico do produto de degradação (DEG B) por tempo de estudo nas amostras de hidrólise alcalina NaOH 0,01M	53
Figura 17 – a) Branco HCl 5,0M; b) Metildopa comprimido revestido em HCl 5,0M tempo 0 (zero); c) Metildopa comprimido revestido em HCl 5,0M após 72 horas.	54

Figura 18 – Percentagem do teor Metildopa comprimido revestido e do pico do produto de degradação por tempo de estudo nas amostras de hidrólise alcalina NaOH 0,01M.....	55
Figura 19 – 1. Branco NaOH 0,01M; 2. Placebo Metildopa NaOH 0,01M no início do estudo; 3. Placebo Metildopa NaOH 0,01M em 72 horas do estudo	56
Figura 20 – A. Metildopa em H ₂ O (zero); B. Metildopa em H ₂ O após 30 dias de estudo	57
Figura 21 – Análise espectral (Pureza e Similaridade) do pico do IFA Metildopa após 30 dias de estudo da hidrólise neutra.....	57
Figura 22 – a) Branco H ₂ O ₂ ; b) Metildopa em H ₂ O ₂ tempo 0 (zero); c) Metildopa em H ₂ O ₂ após 30 dias	58
Figura 23 – Análise espectral (Pureza e Similaridade) do pico do IFA Metildopa após 30 dias de estudo de oxidação	58
Figura 24 – a) Padrão Metildopa; b) Amostra fotoestabilidade controle; c) Amostra fotoestabilidade total.....	59
Figura 25 – a) Padrão Metildopa; b) Amostra submetida à degradação térmica.	61
Figura 26 – a) Padrão Metildopa; b) Comprimido submetido à degradação térmica.....	62
Figura 27 - Cromatograma da Metildopa concentração 320µg/mL frente cromatograma ao placebo e diluente.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites dos produtos de degradação expressos com a porcentagem de fármaco. ...	29
Tabela 2 - Parâmetros experimentais propostos para carbidopa por CLAE.....	34
Tabela 3 - Parâmetros experimentais propostos para o MIEE de metildopa por CLAE.....	41
Tabela 4 - Resultados da adequabilidade do sistema para as SQR Metildopa e 3-O-Metilmetildopa.	42
Tabela 5 - Resultados da linearidade do método indicativo para estudo de estabilidade da metildopa.	64
Tabela 6 - Resultados da precisão do método.	64
Tabela 7 - Resultados da exatidão do método.	65
Tabela 8 - Resultados da robustez para variação de temperatura.....	65
Tabela 9 - Resultados da robustez para variação de fabricante do Metanol.....	66
Tabela 10 - Resultados da robustez para variação do fluxo.	66
Tabela 11 - Teor % frente ao padrão primário de metildopa.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector Espectrofotométrico de Arranjo de Diodos
FDA	Food and Drug Administration
HCL	ÁcidoClorídico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	InternationalConferenceandHarmonization
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
%	Percentual
°	Grau
±	Mais ou menos
C	Celsius
C	Concentração
g	Gramas
min	Minuto
mg	Milígrama
mL	Milímetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.2 OBJETIVO GERAL.....	22
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)	23
3.2 METILDOPA.....	24
3.3 TESTES DE ESTABILIDADE	27
3.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MIEE DO COMPRIMIDO REVESTIDO METILDOPA.....	33
4.1.1 MATERIAL	33
4.1.2 MÉTODO	33
4.1.2.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	33
4.1.2.2 CONDIÇÕES ANALÍTICAS.....	33
4.1.2.3 VALIDAÇÃO	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 DESENVOLVIMENTO DO METODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DA METILDOPA	40
5.1.1 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS E RESULTADOS DOS TESTES DE ADEQUABILIDADE DE MÉTODO	40
5.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DA METILDOPA	42
5.2.1 HIDRÓLISE ÁCIDA.....	43
5.2.1.1 HIDRÓLISE ÁCIDA NO IFA.....	43
5.2.1.2 HIDRÓLISE ÁCIDA NO COMPRIMIDO REVESTIDO.....	46

5.2.1.3 HIDRÓLISE ÁCIDA NO PLACEBO.....	48
5.2.2 HIDRÓLISE ALCALINA.....	49
5.2.2.1 HIDRÓLISE ALCALINA NO IFA.....	49
5.2.2.2 HIDRÓLISE ALCALINA NO COMPRIMIDO REVESTIDO.....	53
5.2.2.3 HIDRÓLISE ALCALINA DO PLACEBO.....	55
5.2.3 HIDRÓLISE NEUTRA.....	56
5.2.4. OXIDAÇÃO.....	57
5.2.5. FOTOESTABILIDADE.....	58
5.2.5.1. METILDOPA IFA.....	58
5.2.5.2 AMOSTRAS DO COMPRIMIDO REVESTIDO EM EMBALAGEM PRIMÁRIA.....	59
5.2.5.3 AMOSTRAS DO PLACEBO.....	60
5.2.6. DEGRADAÇÃO TÉRMICA.....	60
5.2.6.1 METILDOPA IFA.....	60
5.2.6.2 DEGRADAÇÃO TÉRMICA NO COMPRIMIDO REVESTIDO.....	61
5.2.6.3 DEGRADAÇÃO TÉRMICA NO PLACEBO.....	62
5.3 VALIDAÇÃO.....	63
5.3.1 ESPECIFICIDADE/ SELETIVIDADE.....	63
5.3.2 LINEARIDADE.....	63
5.3.3 PRECISÃO.....	64
5.3.4 EXATIDÃO.....	65
5.3.5 ROBUSTEZ.....	65
5.4 UTILIZAÇÃO DO MIEE NA ANÁLISE DE MEDICAMENTO SIMILAR LAFEPE METILDOPA 500MG.....	67
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	68
6.1 CONCLUSÃO.....	68
6.2 PERSPECTIVAS.....	69

REFERÊNCIAS.....	69
------------------	----

1. INTRODUÇÃO

A Metildopa é um anti-hipertensivo simpatolítico de ação central, que atua como agonista dos receptores adrenérgicos centrais alfa-2, reduzindo o efluxo simpático do tronco encefálico. Trata-se de um pró-fármaco com estrutura química caracterizada por alfa-metil-3,4-dihidroxi-l-fenilalanina uma molécula análoga da DOPA, que é metabolizada pela descarboxilase nos neurônios adrenérgicos dando origem à α -metildopamina e posteriormente à α -metilnorepinefrina, que será armazenada nas vesículas neurosecretoras, substituindo assim a norepinefrina. Quando ocorre a descarga de neurotransmissores nos neurônios adrenérgicos a α -metilnorepinefrina é liberada no lugar da norepinefrina e com isso não há alteração da resposta vasoconstritora à neurotransmissão adrenérgica periférica. Diminui a resistência vascular periférica, sem causar alterações no débito cardíaco e geralmente é associada a diuréticos. É indicada no tratamento da hipertensão crônica de leve a moderada na gravidez (GOODMAN&GILMAN, 2007).

A fim de atingir alto nível de segurança e eficácia dos fármacos, os órgãos reguladores determinam os requisitos de qualidade de produtos farmacêuticos. Nesse contexto, a investigação da estabilidade de fármacos representa uma questão importante na avaliação da qualidade desses produtos, pois muitas condições ambientais tais como calor, luz, umidade, bem como a sensibilidade química das substâncias frente à hidrólise ou a oxidação podem comprometer gravemente a estabilidade desses compostos (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999; ICH, 2000).

O estudo conhecido como estudo de degradação forçada ou “stress testing” pode ajudar a identificar os prováveis produtos de degradação e a fornecer informações importantes sobre a estabilidade inerente do fármaco (BAKSI; SINGH, 2002). Conhecer os produtos da degradação de um fármaco é importante por que estes podem ser formados durante a comercialização de um produto farmacêutico e, assim, é essencial verificar se eles não causarão nenhum mal quando ingeridos, ou se caso eles forem tóxicos, é importante saber como evitar que eles apareçam no medicamento. Além disso, esse tipo de estudo, “stress testing” pode contribuir para o desenvolvimento e validação de um método analítico indicativo da estabilidade de um fármaco, o qual pode ser utilizado no monitoramento da qualidade de produtos farmacêuticos (BAKSI; SINGH, 2002). Por definição o “stress testing” é um tipo de estudo de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas.

Para isso, este estudo mimetiza algumas reações inesperadas que podem ocorrer com os fármacos quando estes são acumulados no organismo após ingestão prolongada ou quando estes são estocados para serem comercializados. As reações que podem ocorrer, por exemplo, incluem oxidações, hidrólises ácidas, básicas ou neutras (ROLIM, 2010).

Vários métodos analíticos para a determinação de metildopa têm sido relatados na literatura (M. DOLEZALOVÁ, M. TKACZYKOVÁ, 1999; M. ZECEVIC' ET AL., 2001; C. MUZZI ET AL., 2008; M. KARIMI ET AL., 2006), mas apenas um reporta método indicativo de estabilidade (M E-S METWALLY, F F BELAL, 1992). Na Farmacopéia Brasileira e Americana atuais existe a técnica para limite de 3-o-metilmetildopa (uma impureza industrial da metildopa), por cromatografia de camada delgada. Na British Pharmacopoeia existe um método para a avaliação de substâncias relacionadas. No entanto, o desenvolvimento desses estudos não incluiu uma avaliação da metildopa frente aos estudos de degradação forçada e, assim, produtos de degradação, que poderiam surgir após exposição à oxidação, hidrólise e aquecimento, por exemplo, poderiam não ser detectados por esses métodos. Um estudo sistemático sobre o comportamento da metildopa em várias das condições de estresse analisadas neste trabalho não está disponível.

A novidade deste trabalho é baseada na descrição do novo método de análise, apropriado para monitorar a pureza da substância medicamentosa, e que irá proporcionar o atendimento às recorrentes exigências por parte dos órgãos regulatórios. Além disso, as conclusões podem ser úteis no esforço de assegurar a qualidade, segurança e eficácia da farmacoterapia da metildopa.

2. OBJETIVOS

2.2. OBJETIVO GERAL

- Obter um método indicativo de estabilidade para comprimido revestido de Metildopa 500mg.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método cromatográfico, utilizando como ferramenta a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) acoplada com detector de arranjo de diodos (DAD);
- Submeter o fármaco, o placebo e o comprimido revestido à estudos de degradação forçada abrangendo hidrólise (básica, neutra e ácida), oxidação, degradação térmica e estudos de fotoestabilidade;
- Caracterizar os produtos de degradação comparando seus perfis cromatográficos com os das substâncias de referência conhecidas e verificar a pureza dos picos principais por análise espectral utilizando o software EzChrom Elite;
- Validar a metodologia para quantificação de metildopa matéria-prima e comprimido revestido seguindo RE 899/ 2003;
- Utilizar o método para a análise de comprimido similar, submetido ao estudo de estabilidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)

A Hipertensão arterial sistêmica (HAS), popularmente conhecida como "Pressão Alta", é uma doença crônica caracterizada por eventos de elevadas cifras tensionais em decorrência da distribuição do sangue pelo corpo dar-se sob uma pressão mais alta que o normal. A hipertensão é dita "arterial" porque os vasos que levam o sangue do coração para todas as partes do organismo são as artérias. As veias trazem o sangue de volta ao coração, mas sob uma pressão bem mais baixa do que aquela encontrada nas artérias.

A HAS é a mais freqüente das doenças cardiovasculares, sendo também o principal fator de risco para as complicações mais comuns como acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio, além da doença renal crônica. No Brasil são cerca de 17 milhões de portadores de hipertensão arterial, 35% da população acima de 40 anos. A alta incidência dessa doença e sua morbimortalidade tornam a HAS um problema grave de saúde pública no Brasil e no mundo. (LESSA, 2001; BRASIL, 2006; PASSOS, 2006).

A identificação de vários fatores de risco para hipertensão arterial, tais como: a hereditariedade, a idade, o gênero, o grupo étnico, o nível de escolaridade, o status sócio-econômico, a obesidade, o etilismo, o tabagismo e o uso de anticoncepcionais orais muito colaboraram para os avanços na epidemiologia cardiovascular e, conseqüentemente, nas medidas preventivas e terapêuticas dos altos índices pressóricos, que incluem os tratamentos não-farmacológicos e farmacológicos (ZAITUNE, 2006).

O objetivo do tratamento farmacológico da hipertensão arterial é a normalização das cifras tensionais com redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares. Com esse propósito, vários agentes terapêuticos anti-hipertensivos são utilizados em monoterapia ou associação como os diuréticos, betabloqueadores, bloqueadores do receptor AT1, bloqueadores dos canais de cálcio e inibidores da ECA (SBC, 2006).

3.2 METILDOPA

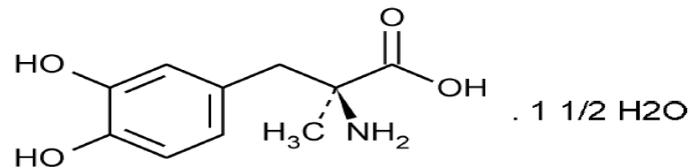
A Metildopa é um anti-hipertensivo simpatolítico de ação central, que atua como agonista dos receptores adrenérgicos centrais alfa-2, reduzindo o efluxo simpático do tronco encefálico. Trata-se de um pró-fármaco com estrutura química caracterizada por alfa-metil-3,4-dihidroxi-l-fenilalanina uma molécula análoga da DOPA, que é metabolizada pela descarboxilase nos neurônios adrenérgicos dando origem à α -metildopamina e posteriormente à α -metilnorepinefrina, que será armazenada nas vesículas neurosecretoras, substituindo assim a norepinefrina. Quando ocorre a descarga de neurotransmissores nos neurônios adrenérgicos a α -metilnorepinefrina é liberada no lugar da norepinefrina e com isso não há alteração da resposta vasoconstritora à neurotransmissão adrenérgica periférica. Diminui a resistência vascular periférica, sem causar alterações no débito cardíaco e geralmente é associada a diuréticos. É indicada no tratamento da hipertensão crônica de leve a moderada na gravidez. Pode apresentar os seguintes efeitos adversos: sedação, hipotensão postural, hepatotoxicidade, anemia hemolítica, febre e rebote na retirada. E é contra indicado a pacientes que apresentem: hipersensibilidade a metildopa e doença hepática ativa. Interage com inibidores da monoamina oxidase e pseudoefedrina podendo ocasionar em crise hipertensiva; com antidepressivos tricíclicos e fenotiazidas reduzindo a atividade da metildopa; com ferro diminuindo a absorção da metildopa, com conseqüente redução de sua eficácia (GOODMAN&GILMAN, 2007).

Sendo a Metildopa, um produto metabolizado no cérebro em sua forma ativa, sua concentração no plasma tem menos relevância para seu efeito, ao contrário do que acontece com muitas outras drogas. Quando administrada via oral, a Metildopa é absorvida por um transporte aminoácido ativa, apresentando picos de concentração plasmática de 2-3 horas. É distribuída em relativamente pequeno volume (0,4 litros/Kg), com uma meia-vida de cerca de 2 horas. No SNC, seu transporte aparentemente também é um processo ativo. Sua excreção é urinária, sendo 50-70% na forma de sulfato conjugado, 25%, na forma original, e o restante sob forma de outros metabólitos como metildopamina, metilnoradrenalina e produtos O-metilados de catecolaminas. A meia-vida da Metildopa pode chegar a 4 ou 6 horas em portadores de insuficiência renal. A discrepância entre os efeitos da Metildopa e sua concentração plasmática, está mais bem relacionada com o tempo requerido para o transporte para o SNC, conversão no metabólito ativo e remoção destes metabólitos do cérebro (LAFEPE, 2007).

As doses iniciais podem ser de 250mg duas a três vezes ao dia, sendo ajustada gradualmente, em seguida, de acordo com a resposta, havendo um pequeno efeito adicional com doses em torno de 2g/dia. A administração de dose única, ao deitar, para diminuir o efeito sedativo, pode ser tentada, porém algumas vezes, se torna necessário a divisão em duas doses (LAFEPE, 2007).

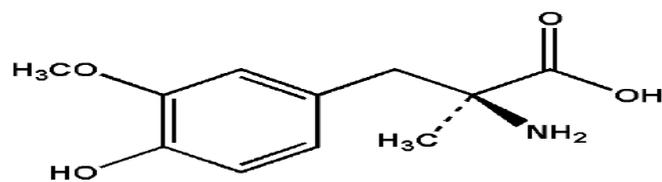
A Farmacopéia Brasileira V (2010) descreve a metildopa como um pó cristalino branco ou branco amarelado, ou cristais incolores ou quase incolores. Pouco solúvel em água, ácido acético glacial e metanol, muito pouco solúvel em etanol, praticamente insolúvel em éter etílico. Solúvel em soluções diluídas de ácidos minerais. Possui DCB 05799 para a metildopa e 09496 para a metildopa sesqui-hidratada. A 3-O-metilmetildopa é descrita como uma impureza deste IFA.

A.



Fonte: adaptado do certificado da Metildopa sesqui-hidratada USP (2014).

B.



Fonte: adaptado do certificado da 3-O-Metilmetildopa USP (2008).

Figura 1 - A. Estrutura química da metildopa, **B.** Estrutura química da 3-O-Metilmetildopa

O Drug Master File (DMF) enviado pelo fornecedor do IFA divide a síntese do fármaco descrita em cinco estágios como ilustra a figura 2.

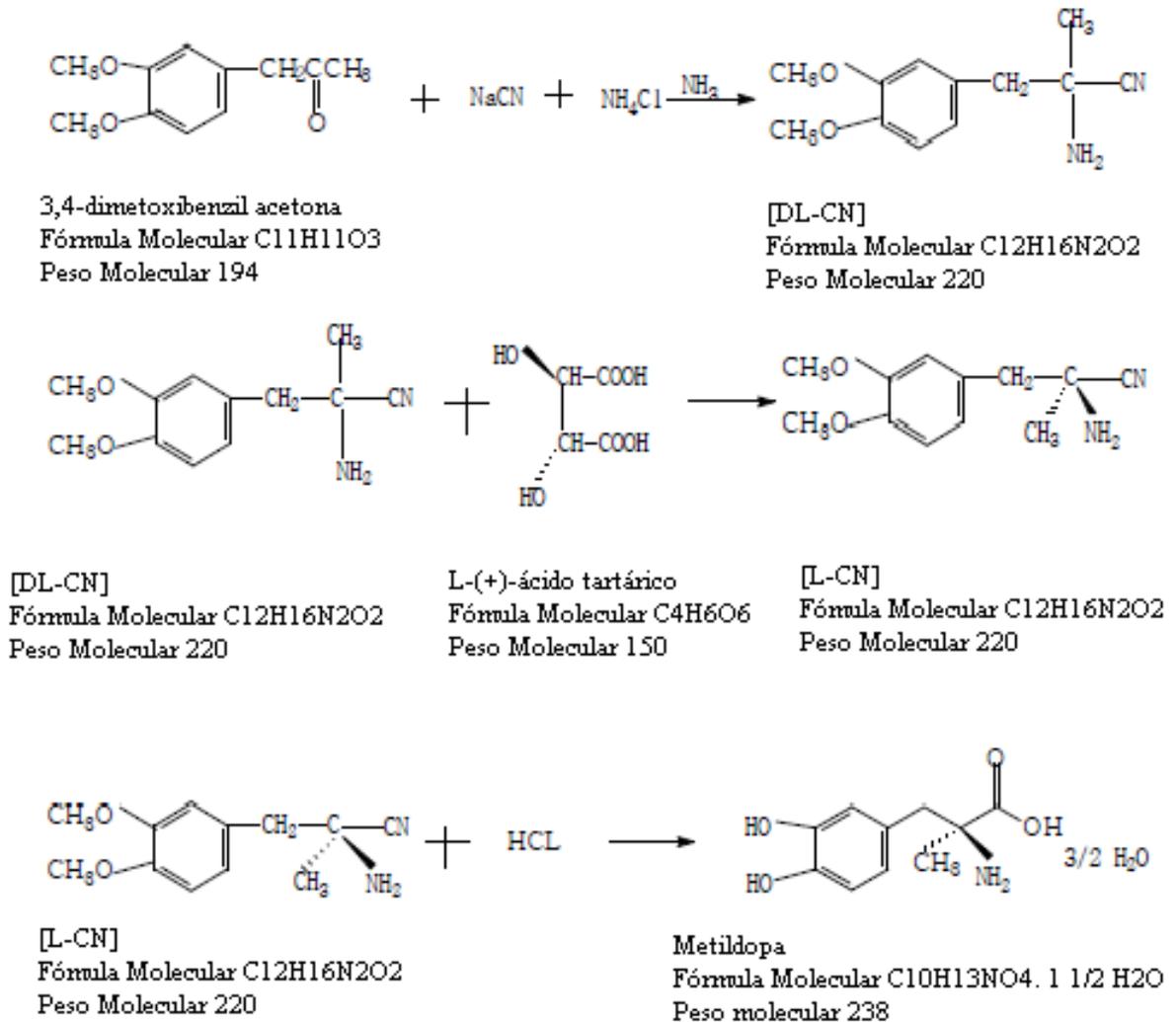


Figura 2 – Esquema da síntese da molécula de metildopa. Fonte: DMF da Metildopa HANGZHOU TIANCHEN PHARMACEUTICAL CO., LTD – 2008.

A farmacopéia brasileira relata que o comprimido deve conter, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da quantidade declarada de C₁₀H₁₃NO₄. Os comprimidos devem ser revestidos.

3.3 TESTES DE ESTABILIDADE

A avaliação da estabilidade possui uma estrutura complexa, baseada em vários estudos com objetivos de garantir a pureza, a inocuidade, a potência e a eficácia do produto, estabelecer as condições de estocagem e prever o prazo de validade. Essa avaliação depende de experimentos que fornecem evidências de como a qualidade do produto varia em relação ao tempo sob fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e ar atmosférico.

Segundo o Guia para estudo de estabilidade de medicamentos, publicado pela ANVISA na RE nº 1, em 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005), tem-se descritos diferentes estudos de estabilidade. O Estudo de Estabilidade Acelerado que é um estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte. A frequência de realização do teste incluem 0, 3 e 6 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). Para testes extras se deve apresentar estudo no final de 6 meses, comparando o resultado final com o obtido no momento zero. O Estudo de Estabilidade de Longa Duração é um estudo projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento. A frequência de realização do teste inclui 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). Assim como para o estudo de estabilidade acelerado, para testes extras se deve apresentar estudo no final de 6 meses, comparando o resultado final com o obtido no momento zero. O Estudo de Estabilidade de Acompanhamento que é um estudo realizado para verificar que o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração. A frequência de realização do teste é a cada 12 meses, quando deverão ser realizados, para todos os testes, um relatório de estudo de estabilidade, o qual deve ser disponibilizado no momento da inspeção.

Outro tipo de teste de estabilidade existente é o Teste de Estresse, também conhecido como stress testing ou estudo de degradação forçada. Este é destinado a elucidar a estabilidade intrínseca de um fármaco e faz parte da estratégia de desenvolvimento de medicamentos, sendo, normalmente, realizado em condições mais severas do que as utilizadas em estudos de estabilidade acelerada, a ICH Q3A e o RDC 58 de 2013 descrevem esses testes. A realização deste estudo permite o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar os produtos de degradação (PD) dos fármacos. Quando desenvolvido, este método pode ser utilizado para doseamento das formas farmacêuticas após estudo de estabilidade acelerada, de longa duração e de acompanhamento, a fim de avaliar a produção destes PD durante o armazenamento do produto farmacêutico (BAERTSCHI, 2005). Geralmente a técnica de HPLC é indicada para avaliar a estabilidade dos fármacos por ser uma técnica de separação, apresentando maior versatilidade, especificidade e capacidade de diferenciar o fármaco em estudo, de seus produtos de degradação (LOUGH, 2000).

Os testes de estabilidade devem ser conduzidos sob condições que permitam fornecer informações sobre a estabilidade do produto em menos tempo possível. Para isso, amostras devem ser armazenadas em condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade (TABORIANSKI, 2003; BRASIL, 2005). Deve-se ainda estar atento para essas condições não serem tão extremas que, em vez de acelerarem o envelhecimento, provoquem alterações que não ocorreriam no mercado. Por isso, é preconizado pelos órgãos regulatórios que se deve avaliar apenas degradações de 30 a 40% da quantidade inicial de fármaco (SINGH; BAKSHI, 2000).

O ICH e a ANVISA regulamentam que de acordo com a dose máxima ingerida pelos pacientes, seja analisado a necessidade de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação no decorrer dos estudos de estabilidade, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1- Limites dos produtos de degradação expressos com a porcentagem de fármaco.

Limites de Notificação	Dose máxima diária	Limites
		≤ 1g
	> 1g	0,05%
Limites de Identificação	< 1mg	1,0% ou 5µg ITD, o que for menor
	1mg – 10mg	0,5% ou 20µg ITD, o que for menor
	> 10mg – 2g	0,2% ou 2,0mg ITD, o que for menor
	> 2g	0,10%
Limites de Qualificação	< 10mg	1,0% ou 50µg ITD, o que for menor
	10mg – 100mg	0,5% ou 200µg ITD, o que for menor
	> 100mg – 2g	0,2% ou 3,0mg ITD, o que for menor
	> 2g	0,15%

Onde:

1 - Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia.

2 - Limites dos produtos de degradação são expressos como a porcentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação.

Fonte: Adaptado de Brasil (2013).

Para os produtos de degradação que, ao final do estudo de estabilidade, apresentem percentuais iguais ou superiores aos limites de qualificação, uma avaliação mínima de genotoxicidade (estudo de alteração cromossomal *in vitro*) e estudos gerais de toxicidade em modelos animais do mesmo deverão ser apresentados (ICHQ3A, 2002; ICHQ3B, 2003).

De modo característico, os estudos para identificação, notificação ou qualificação dos produtos de degradação de fármacos, incluem os efeitos sobre o fármaco da temperatura, da umidade (em diferentes pHs), da oxidação e fotólise (SINKO, 2008).

É bem conhecido que a temperatura pode apresentar enorme efeito sobre a estabilidade dos fármacos. Temperaturas elevadas, por exemplo, aceleram reações físico-químicas e químicas, ocasionando alterações na atividade dos componentes, viscosidade, aspecto, cor e odor do produto. Já baixas temperaturas geralmente aceleram possíveis alterações físicas como turvação, precipitação e cristalização. Problemas gerados em função de temperaturas elevadas ou muito baixas podem ser decorrentes também de não-conformidades no processo de fabricação, armazenamento ou transporte do produto (TABORIANSKI, 2003). A termogravimetria é uma técnica que pode ser utilizada para verificar o comportamento dos

fármacos frente à temperatura, pois através dela é possível acompanhar variações de massa envolvidas em um experimento (CONCEIÇÃO, 2004). O efeito da umidade pode ser verificado através de estudos de hidrólise. A importância de se realizar esse tipo de estudo deve-se ao fato que muitos fármacos são considerados como instáveis em meio aquoso e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que sua eficácia e estabilidade da forma farmacêutica final não sejam comprometidas. Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação (SINKO, 2008). Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente o ácido clorídrico e para a hidrólise básica utiliza-se o hidróxido de sódio, sendo que, muitas variações são observadas no tempo e na temperatura de exposição de fármacos para essa condição. Existem poucos relatos na literatura sobre a hidrólise realizada em pH neutro, onde geralmente se utiliza água como agente de hidrólise. Nessa condição, a taxa de decomposição é lenta, o que é compreensível, porque reações em pH neutro são não-catalíticas e por isso podem ser necessários períodos muito longos sob condições de temperatura extremas, para conseguir quantidades suficientes de produtos de degradação (SINGH & BAKSHI, 2000).

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que procedem lentamente sob a influência do oxigênio molecular (FLORENCE & ATTWOOD, 2003). O peróxido de hidrogênio é bastante utilizado para criar as condições de estresse empregadas para o estudo de oxidação e sua concentração nesses estudos varia geralmente entre 1% a 30% (SILVA et al., 2009).

Estudos de fotoestabilidade são conduzidos a fim de quantificar a extensão pelas quais as reações induzidas pela luz afetam as formulações dos medicamentos. Na rotina de testes de fotoestabilidade, medicamentos são iluminados com extremo cuidado em condições controladas a fim de se determinar se eles são fotoestáveis e quantificar a extensão da fotoestabilidade de medicamentos que mostram certa sensibilidade à luz (PIECHOCK & THOMA, 2007).

Enfim, o estudo de estabilidade é importante porque prevendo, determinando ou acompanhando o prazo de validade do medicamento garante-se um uso mais seguro para os

usuários de medicamentos. Avaliar a estabilidade do medicamento durante cada etapa do desenvolvimento é fundamental para a garantia da qualidade do produto final. Para um produto comercializado, a garantia da estabilidade é vital para sua segurança e eficácia durante o período de armazenamento e uso.

3.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Em um programa de garantia de qualidade bem estruturado, a validação do método constitui-se em atividade essencial e inicial, representando um fator crítico na validação do processo produtivo (Soares Sobrinho et al., 2005).

O método analítico a ser empregado em análise farmacêutica deve ser validado e o objetivo desta validação é demonstrar que este é adequado ao objetivo proposto (BRASIL, 2003). Segundo a USP 36 (2013) a validação é um processo no qual se estabelece que as características de desempenho do método atendam às exigências para a aplicação analítica pretendida. Este objetivo é alcançado demonstrando que os resultados das características obtidas durante a validação estão dentro dos critérios de aceitação, incluindo o protocolo de validação que tem que ser escrito e aprovado. De acordo com a ISO/IEC 17025 (2005) o laboratório deve validar os métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados os quais foram usados fora dos escopos para os quais foram concebidas, ampliações e modificações de métodos. Para validação tem sido utilizado o guia "International Conference on Harmonisation" (ICH) que traz procedimentos de validação analítica: texto e metodologia Q2(R1) (GALICHET, 2006; ICH, 2005). O ICH (2005) divide os métodos analíticos em quatro categorias, incluindo os testes de identificação, os testes quantitativos de impurezas, testes para controle do limite de impurezas e os ensaios para determinação quantitativa, para avaliar potência (teor) do fármaco ou para verificação do perfil de dissolução de amostras específicas. As características de validação que precisam ser consideradas são: exatidão, precisão, especificidade, faixa de medição, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez. Conforme a Resolução RE n. 899, de 29/5/2003, que regulamenta a validação de métodos analíticos e bioanalíticos no Brasil, considera-se que a determinação de teor se encontra classificado na categoria I de "Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas". Portanto, os seguintes parâmetros são exigidos pela legislação para a validação do

método desenvolvido: linearidade e intervalo, especificidade e exatidão, precisão e robustez. Em caráter de complementação, podem ser determinados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

A validação de métodos analíticos é parte integral para assegurar a qualidade dos resultados, credenciamento e a publicação (PETERS et al., 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MIEE DO COMPRIMIDO REVESTIDO METILDOPA

4.1.1 MATERIAL

Para as determinações quantitativas de metildopa (MTD) e 3-O-metilmetildopa foi utilizado o padrão primário USP (lote: JOG237) e secundarizado (lote: 17072) de MTD e padrão primário USP de (lote: HOH391) de 3-O-Metilmetildopa. Foi utilizado também o IFA Metildopa lote 17072 e o comprimido revestido lote 11121415 cedidos pelo LAFEPE[®].

Foram utilizados: metanol grau HPLC (J.T. Baker[®]), fosfato de potássio monobásico (Merck[®]), ácido fosfórico (VETEC[®]), hidróxido de sódio (Synth[®]), ácido clorídrico (Synth[®]) e peróxido de hidrogênio (Química Moderna[®]) e água ultrapura obtida pelo sistema de ultrafiltração MilliQ[®] (Millipore, Milford, EUA).

4.1.2 MÉTODO

4.1.2.1 INSTRUMENTAÇÃO

Cromatógrafo a líquido Hitachi Elite Lachrom - Merck[®] (Alemanha) equipado com bomba quaternária L-2130, auto-injetor L-2200, detector L-2400 com arranjo de diodo (DAD) L-2455 e forno para coluna L-2300; lavadora ultra-sônica Unique[®], modelo USC-1880 (Brasil); balança Shimadzu[®], modelo AW220 (Japão); pHmetro Tec-3MP; bomba a vácuo Tecnal[®], modelo TE-058; estufa de secagem Fanem[®]. Todos os equipamentos citados estavam devidamente calibrados e certificados.

4.1.2.2 CONDIÇÕES ANALÍTICAS

4.1.2.2.1 TESTES PRELIMINARES

O estudo desenvolvido foi baseado no método: *Separation examples on Purospher STAR RP-18e Separation of Carbidopa (ChromBook Merck Millipore[®])*, representado na tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros experimentais descritos no método *Separation of Carbidopa (ChromBook Merck Millipore®)*.

Características	Descrição
Fase Estacionária	Coluna Merck® Purospher StarRP18; 150 x 4,60 mm; 5µm
Fase Móvel	A) Metanol: B) Tampão KH ₂ PO ₄ 20mM pH 4,3
Gradiente	0,0-2,4 min – 1% A: 99% B; 2,5–60 min – 14% A: 86% B
Fluxo	1,0 mL/min
Comprimento de onda	282nm
Volume de injeção	5,0 µL
Tempo de corrida	Não informado
Temperatura	Ambiente
Concentração da Metildopa e 3-O-Metilmildopa	160 µg/ mL

Foram feitos testes preliminares neste método, com o objetivo de definir as melhores condições para o estudo, sendo avaliadas as mudanças citadas abaixo:

- Composição do gradiente proposto na metodologia
- Diferentes temperaturas no forno do equipamento
- Diferentes volumes de injeção e concentrações dos padrões
- Diferentes tamanhos, marcas e modelos de fase estacionária

Todos os testes foram realizados em DAD para verificação do espectro formado durante a análise cromatográfica. Antes da injeção das amostras a coluna foi acomodada com a passagem da fase móvel durante 60 minutos.

Outro teste realizado foi o do processo de diluição da amostra para injeção no HPLC, sendo testadas diferentes situações:

- Metanol
- Metanol e água, testando diferentes proporções destes componentes

- Metanol e tampão fosfato de potássio monobásico 20mM pH 4,3, testando diferentes proporções destes componentes

Os itens subseqüentes foram realizados após a realização dos testes supracitados, sendo então definidas as condições para a realização do estudo.

4.1.2.2.2 PREPARAÇÃO DO PADRÃO

Foram preparadas triplicadas do padrão primário de Metildopa. Estas foram obtidas pesando-se 25mg de metildopa, transferidas para balões volumétricos de 25 mL, solubilizando-as com 3,5 mL de metanol, seguidas de sonicação durante 15 minutos. Os balões foram aferidos com metanol obtendo-se soluções-mãe na concentração de 1000ppm. Ao término destas, foram coletadas alíquotas de 3,2 mL de cada solução mãe e transferidas para balões de 10mL (completando-os com a solução diluente Metanol: Tampão KH_2PO_4 20mM pH 4,3 14: 86) a fim de se obter concentração final de 320ppm. As amostras foram analisadas em CLAE-DAD. As soluções-mãe foram acondicionadas sob refrigeração em recipientes de vidro âmbar na temperatura máxima de 8°C durante o estudo, as alíquotas das soluções mãe eram retiradas após atingirem a temperatura de 25°C.

4.1.2.2.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE DEGRADAÇÃO

Foram preparadas soluções de hidróxido de sódio 0,01M, 0,1M e 1,0M; soluções de ácido clorídrico 1,0M e 5M e soluções de peróxido de hidrogênio 3%.

As soluções de degradação foram preparadas conforme Farmacopéia Brasileira 5ª edição, volume I.

4.1.2.2.4 DEGRADAÇÃO FORÇADA DE METILDOPA

Foram realizadas triplicadas das amostras para cada condição de degradação (meio neutro, ácido, básico e oxidativo). Estas foram obtidas pesando-se o equivalente a 160mg de metildopa transferindo para balão volumétrico de capacidade de 100 mL, adicionando 14 mL de metanol para solubilização do ativo e sonicando por 15 minutos. O volume foi completado com a solução de degradação a ser realizada (H_2O ; HCl 1,0M; HCl 5,0M; NaOH 0,1M;

NaOH 0,01M e H₂O₂ 3%). Obtendo-se soluções-mãe para cada condição de degradação, estas foram armazenadas em recipientes de vidro âmbar durante todo o estudo.

Nos tempos predefinidos do estudo, foram coletadas volumetricamente de cada solução-mãe, alíquotas de 5mL e transferidas para balões de 25mL (completado-os com a solução diluente) a fim de se obter concentração final de 320ppm. As amostras foram analisadas nos seguintes tempos de estudo: 0h, 24h, 48h, 72h, 7 dias, 15 dias e 30 dias ou até o pico principal apresentar um decaimento de aproximadamente 30%.

4.1.2.2.5 DEGRADAÇÃO TÉRMICA

Foram colocados 2g de metildopa, 30 comprimidos revestidos de Metildopa 500mg e 2g do placebo em uma estufa de secagem a 120°C, sendo armazenados nesta condição por seis horas. Amostras equivalentes a 160mg de metildopa foram coletadas em triplicata e transferidas para balão de 100mL, posteriormente adicionou-se 14 mL de metanol para solubilização do ativo. As amostras foram uniformizadas em ultrassom por 15 minutos, passando esta etapa o volume das amostras foi completado com metanol. Em seguida, foram coletados 5mL de cada amostra, transferidas para balões de 25mL (completando-os com a solução diluente) a fim de se obter concentração final de 320ppm.

Todas as segundas diluições foram filtradas e transferidas para vials para posterior corrida cromatográfica.

4.1.2.2.6 FOTOESTABILIDADE

O estudo foi realizado de acordo com condições de ensaio determinadas pelo guia de estudos de fotoestabilidade do ICH (Q1B), expondo o produto a não menos que 1,2 milhões de lux.hora, integrados a uma energia de ultravioleta próxima de não mais de 200 watt.horas/m², para permitir comparação direta entre a substância ativa e o produto acabado. As substâncias sólidas foram acondicionadas em recipiente quimicamente inerte e transparente com uma espessura normalmente de não mais que 3 milímetros (no estudo utilizou-se placa de Petri). A análise das amostras (matéria-prima, comprimido na embalagem primária, comprimido fora da embalagem primária e placebo) expostas à essa condição foi realizada concomitantemente com as amostras protegidas (com papel alumínio) utilizada como controle.

4.1.2.3 VALIDAÇÃO

O método foi validado para o comprimido revestido de metildopa, seguindo a RE 899 (2003) da ANVISA na categoria I e ICH Q2 (R1), para posterior acompanhamento dos estudos de estabilidade. Sendo avaliados os parâmetros da seguinte forma:

4.1.2.3.1 ESPECIFICIDADE

A especificidade de um método representa a sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir na sua determinação numa mistura complexa. Correspondem ao grau de interferência de espécies como outro princípio ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação garantindo que a resposta seja exclusivamente de um componente simples, não existindo eluições simultâneas (ICH,1995, SWARTZ & KRULL,1998).

A especificidade do método foi avaliada preparando-se uma solução amostra contendo as SQR metildopa lote JOG237 e 3-O-metilmetildopa lote HOH391 (ambos fornecidos pela USP), pesando-se analiticamente, 06 replicatas. A especificidade do comprimido foi determinada frente ao placebo utilizando o diluente como branco.

A especificidade do método proposto para metildopa comprimido também foi testada após as amostras serem submetidas às condições de degradação. Sendo avaliado nos cromatogramas obtidos, os picos cromatográficos e seus tempos de retenção, no comprimento de onda 282nm.

4.1.2.3.2 SELETIVIDADE

Foi verificada a determinação da pureza dos picos cromatográficos obtidos durante as análises. As condições para determinação da pureza foram checadas utilizando o detector de arranjo díodos (DAD), num intervalo de 200nm a 400nm. A pureza dos picos cromatográficos isolados para as SQR deverá ser igual ou superior a 0,9900.

4.1.2.3.3 LINEARIDADE

A linearidade é a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à

concentração do analito dentro de uma dada faixa (BARROS, 2002). Na linearidade avalia-se se os resultados de absorvâncias/áreas cromatográficas são diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada faixa de variação, sendo que, a linearidade está relacionada com a variação da inclinação da reta de regressão (BRITTAIHN, 1998).

A linearidade da resposta do detector do HPLC para este método foi determinada analisando as amostras em 07 diferentes concentrações (160/ 256/ 288/ 320/ 352/ 384/ 480ppm) originadas de três soluções-mãe autênticas. Cada solução-mãe originou uma curva de linearidade, sendo a segunda diluição aferida com o diluente (metanol - 14% e tampão fosfato de potássio monobásico 20mM pH 4,3 - 86%). As três curvas foram tratadas por regressão linear (utilizando o método dos Mínimos Quadrados) para obtenção da equação de reta. Sendo verificado se a curva é linear e também se não há falta de ajuste.

4.1.2.3.4 PRECISÃO

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Pode ser avaliada em três níveis:

- Repetitividade (precisão intra-ensaio) - consiste na determinação de uma amostra repetidas vezes sob as mesmas condições de teste em um curto intervalo de tempo.
- Precisão Intermediária (precisão intra-laboratório) – são observadas as variações em diferentes dias, analistas e/ou equipamentos.
- Reprodutibilidade - refere-se à precisão entre laboratórios.

A precisão de um método analítico deve ser expressa em desvio padrão ou desvio padrão relativa (coeficiente de variação - CV%), segundo a equação 1:

$$Precisão(CV\%) = \frac{DesvioPadrão}{Concetraçã o_{Média}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com o método empregado, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (RE n° 899/ANVISA).

A repetitividade foi realizada com 06 réplicas do analista principal e a precisão intermediária foi realizada por analistas diferentes em diferentes dias, preparadas para obtenção do ponto médio (320 ppm) em sextuplicata. Para a precisão intermediária o tratamento estatístico foi realizado t de Student com 95% de confiança.

4.1.2.3.5 EXATIDÃO

A exatidão do método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um aceito como referência (LEITE, 1989; SWARTZ & KRULL,1998). A exatidão foi preparada considerando as seguintes concentrações: 160ppm (50,00%), 320ppm (100,00%) e 480ppm (150,00%), com n=3 para cada concentração. Foi observada a capacidade de recuperação do método, para a especificação de 90 a 110%.

4.1.2.3.6 ROBUSTEZ

Robustez corresponde à capacidade do método de não ser afetado por pequenas e deliberadas modificações em seus parâmetros, indica a sua confiabilidade durante o seu uso, podendo assim, avaliar a resistência que um método analítico tem à mudança de resposta quando se introduzem essas pequenas variações (BRENDOLON, 2001; ANVISA RE, n° 899/2003). Para a robustez foram propostos os estudos de diferentes fabricantes do metanol (marcas JT Baker® e Carlo Erba®) tratados estatisticamente pelo teste t de Student e diferentes temperatura (24; 25 e 26°C) e fluxo (0,97; 1,00 e 1,03 mL/min), tratados por Análise de Variância (ANOVA).

4.1.2.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Acompanhamento do estudo de estabilidade acelerada e longa duração de um lote de Metildopa 500mg comprimido revestido, utilizando o método desenvolvido e validado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DO METODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DA METILDOPA

5.1.1 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS E RESULTADOS DOS TESTES DE ADEQUABILIDADE DE MÉTODO

Após ensaios preliminares foram alterados do método de referência:

- Fase estacionária - coluna Phenomenex[®] Gemini (C18; 250 x 4,60 mm; 5 μ).
- Diluentes utilizados – foi definido que a primeira diluição seria realizada com metanol e a segunda diluição em metanol: tampão fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 20mM com pH ajustado para 4,3 na proporção de 14: 86 (v / v).
- Temperatura do forno - 25°C.
- Volume de injeção – sendo alterado de 5 μ L para 20 μ L, após avaliação inicial de cromatogramas preliminares.

Os testes foram realizados com o objetivo de melhorar os parâmetros cromatográficos (resolução, assimetria e pratos teóricos) e aumentar a distância do pico de metildopa do volume morto da coluna estipulado em 2,1 minutos através de cálculos preliminares. Essa condição foi confirmada após o teste de adequabilidade do sistema com as SQR Metildopa USP lote J0G237 e 3-O-Metilmetildopa H0H391 ambos com concentração de 320ppm. Segue abaixo a **figura 3**, onde estão representados os picos das SQR citadas anteriormente. Na **tabela 3**, estão descritos os parâmetros experimentais propostos.

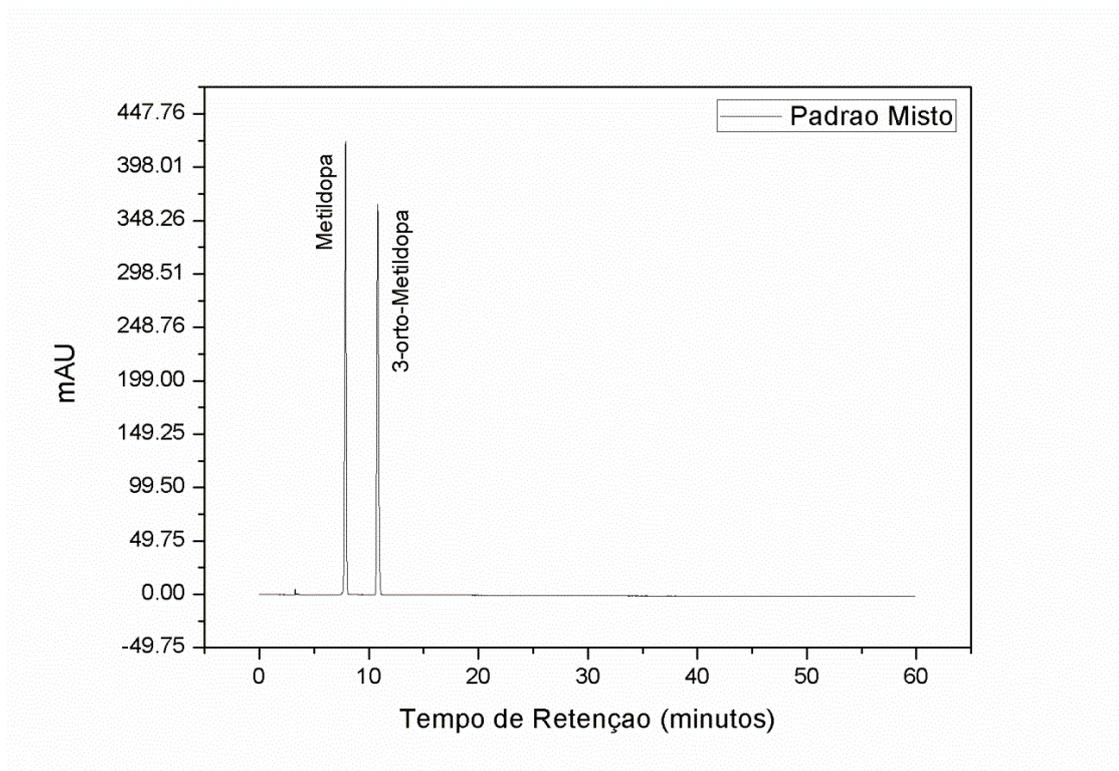


Figura 3 – Cromatograma das SQR Metildopa USP J0G237 e 3-O-Metilmetildopa H0H391.

Tabela 3 - Parâmetros experimentais propostos para o MIEE de metildopa por CLAE.

Características	Descrição
Fase Estacionária	Coluna Phenomenex® Gemini C18; 250 x 4,60 mm; 5µm
Fase Móvel	A) Metanol: B) Tampão KH ₂ PO ₄ 20mM pH 4,3
Gradiente	0,0-2,4 min – 1% A: 99% B: 2,5–60 min – 14% A: 86% B
Fluxo	1,0 mL/min
Comprimento de onda	282nm
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	60 min
Temperatura	25°C
Concentração da Metildopa e 3-O-Metilmetildopa	320 µg/ mL

Na tabela 4, estão descritos os resultados dos parâmetros cromatográficos de cada SQR ambas com concentração de 320 µg/ mL.

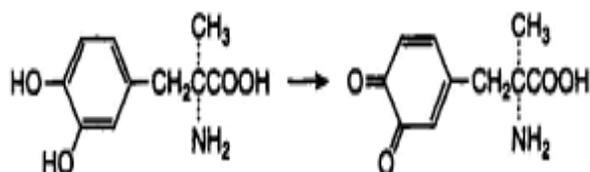
Tabela 4 - Resultados da adequabilidade do sistema para as SQR Metildopa e 3-O-Metilmetidopa.

Substância	TR	Número de pratos teóricos	Assimetria	Área
Metildopa	7,87	14718	0,96	16398190
3-O-Metilmetidopa	10,81	21677	1,08	16150952

O coeficiente de variação (CV) entre as 06 replicatas de injeção para a metildopa padrão foi de 1,60 %, e, para o mesmo número de réplicas da 3-O-Metilmetidopa foi de 0,35%. A resolução entre os picos da metildopa e da 3-O-Metilmetidopa foi 10,60.

5.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DA METILDOPA

Segundo Slates, et al. (1964) o sistema catecol presente na metildopa possui muita instabilidade no meio alcalino. “O grupo catecol em substâncias tais como metildopa e epinefrina são facilmente oxidadas para quinonas” (YOSHIOKA e STELLA, 2000). Esse esquema reacional encontra-se ilustrado na **figura 4**.

**Figura 4** – Esquema de reação da metildopa ref. Yoshioka e Stella, 2000.

Nos testes de degradação forçada, os cromatogramas obtidos das soluções de metildopa, submetidas a diferentes condições de estresse (hidrólise ácida, neutra, alcalina e oxidativa, assim como, temperatura e fotoestabilidade) analisadas no tempo zero, foram comparadas às amostras do IFA em solução diluente (padrão analítico). Essas amostras do tempo zero serviram como padrão comparativo para as amostras analisadas após os tempos de exposição pré-determinados. Após a realização dos testes com o IFA e da determinação das condições onde existe degradação (condições ótimas), foi realizado o teste de estresse no placebo e no comprimido revestido somente nas condições ótimas.

O pico da metildopa foi identificado pelo tempo de retenção e pelo espectro obtido pela análise em CLAE-DAD. O software EzChrom Elite[®] foi utilizado para a avaliação dos espectros durante as análises. O software descreve que a pureza de pico deve estar com valores próximos a 1,000 e a similaridade de ser maior que 0,999.

5.2.1 HIDRÓLISE ÁCIDA

5.2.1.1 HIDRÓLISE ÁCIDA NO IFA

A **figura 5** apresenta a solução de degradação (branco), a amostra em condição ácida (HCl 1,0M) no tempo zero (**padrão comparativo**) e após trinta dias de estudo. O IFA metildopa quando submetido à hidrólise ácida (HCl 1,0M) apresentou redução de 8,35% no tempo de 30 dias, quando comparado ao teor apresentado no padrão comparativo (96,60%). Existe um indicativo de produto de degradação, devido ao aparecimento de pico DEG A, no TR (tempo de retenção) 16,05 minutos e TRR (tempo de retenção relativa) de 1,94. Contudo, o decaimento do teor do IFA foi menor que o preconizado pela RDC 58/ 2013 que indica que o teste deve promover uma degradação superior a 10% (dez por cento). Na **figura 6**, consta a análise espectral do pico da metildopa nesta condição após 30 dias de estudo.

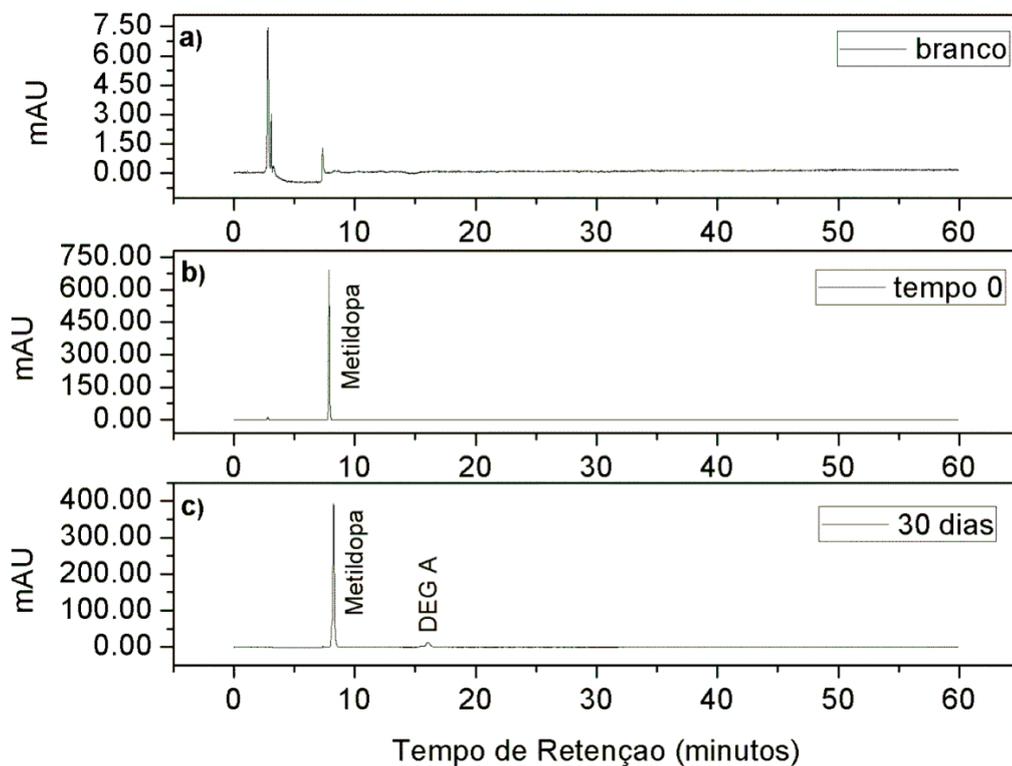


Figura 5 – a) Branco HCl 1,0M; b) Metildopa em HCl 1,0M tempo 0h (zero); c) Metildopa em HCl 1,0M após 30 dias

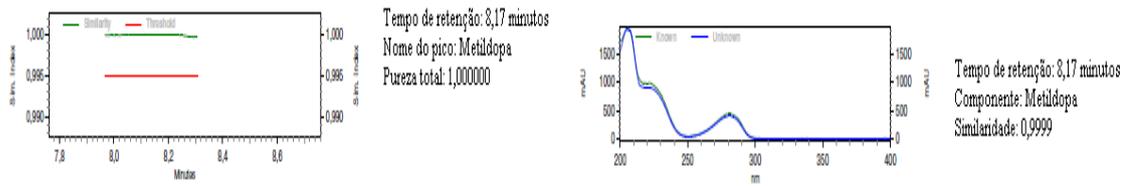


Figura 6 – Análise espectral (Pureza e Similaridade) do pico do IFA Metildopa após 30 dias de estudo da hidrólise ácida HCl 1,0M.

Para a hidrólise ácida (HCl 5,0M) houve a redução da área de metildopa de 17732777 para 14636799 o que equivale a um decaimento de 18,28% da área do pico de metildopa em 72 horas de estudo quando comparado ao teor apresentado no padrão comparativo (94,28%), atendendo assim a RDC 58/ 2013 e ao ICH Q1A – R2, 2003. As áreas dos picos da metildopa nas três amostras estudadas apresentaram CV% de 1,48%.

Foi observado o pico de degradação A (DEG A) que se apresentava com área de 529435 e passou para 3900619 (equivalente a sete vezes o valor inicial) após 72 horas de estudo, apresentando TR de 15,04 minutos de corrida e TRR de 1,99 como ilustra a **figura 7**. Foi visto ao realizar o balanço de massas (soma da área do pico de metildopa e DEG A ao final do estudo frente ao pico da metildopa no tempo inicial do estudo) que o crescimento da área do pico de DEG A foi proporcional ao decaimento do pico de metildopa como mostra a **figura 8**.

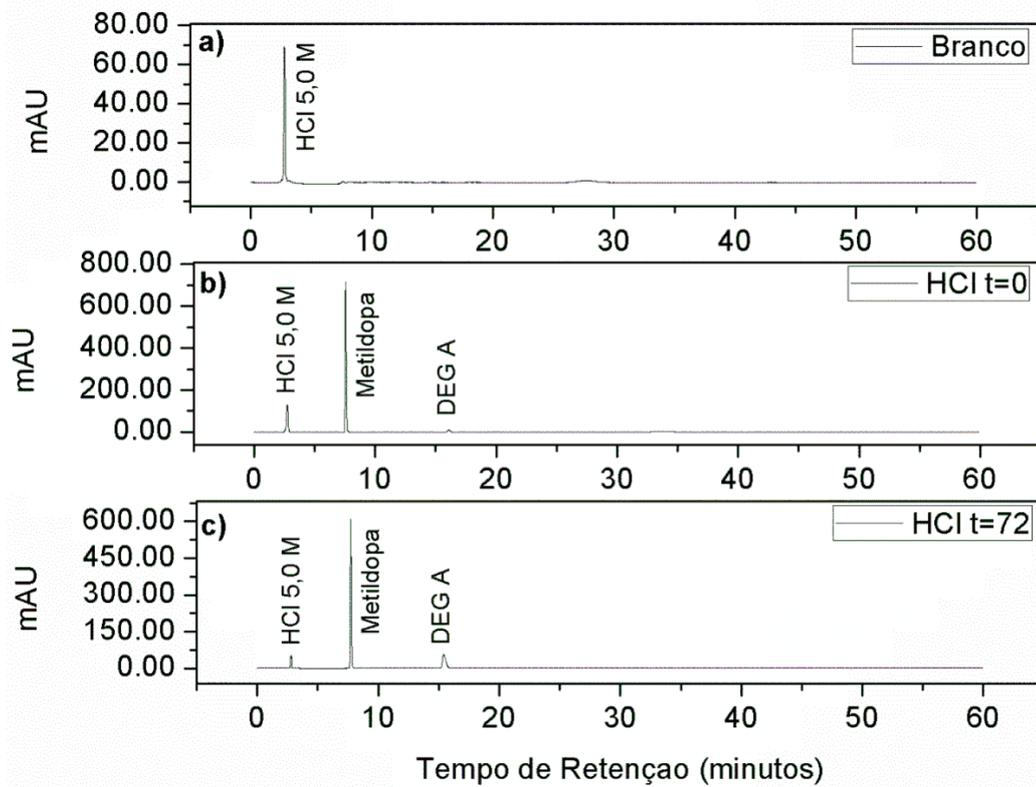


Figura 7 – a) Branco HCl 5,0M; b) Metildopa em HCl 5,0M Tempo 0 (Zero); c) Metildopa em HCl 5,0M após 72 horas.

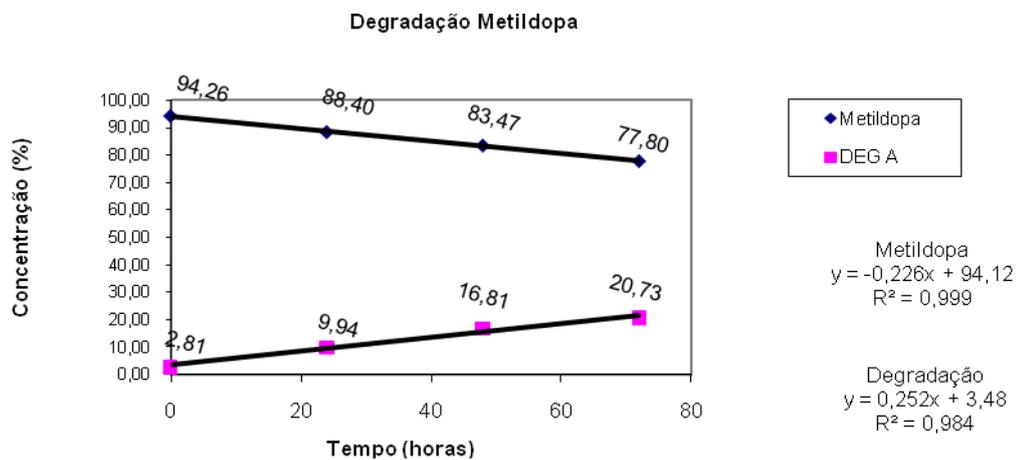


Figura 8 – Percentagem do teor Metildopa e do pico do produto de degradação DEG A Por tempo de estudo nas amostras de hidrólise ácida HCl 5,0 M.

Após a realização de 72 horas de estudo de degradação em HCl 5,0M foi realizada análise espectral da metildopa e do DEG A. A metildopa apresentou pureza de 1,000 e similaridade com o pico do padrão primário USP lote JOG237 de 0,9992; o DEG A apresentou pureza de 1,000 e não apresentou similaridade com os picos de padrões primários de metildopa e 3-O-Metilmetildopa.

5.2.1.2 HIDRÓLISE ÁCIDA NO COMPRIMIDO REVESTIDO

A condição de hidrólise ácida HCl 5,0M no IFA atende aos requisitos preconizados no ICH Q1A e a RDC 58/2013. Logo, esta condição foi testada no comprimido revestido para verificar o perfil cromatográfico do mesmo.

Na hidrólise ácida (HCl 5,0M) do comprimido revestido houve a redução da área de metildopa de 17593886 para 15612518 o que equivale a um decaimento de 11,26% da área do pico de metildopa em 72 horas de estudo quando comparado ao teor apresentado no padrão comparativo (93,52%), atendendo assim a RDC 58/ 2013. As áreas do pico da metildopa apresentaram CV% de 1,07%. Foi observado que o pico de degradação (DEG A) apresentava-se com área de 330475 e passou para 2684025 após 72 horas de estudo, apresentando TR de 15,4 minutos de corrida e TRR de 1,99 como ilustra a **figura 9**. Foi visto ao realizar o balanço de massas que o crescimento da área do pico de DEG A era proporcional ao decaimento do pico de metildopa como mostra a **figura 10**.

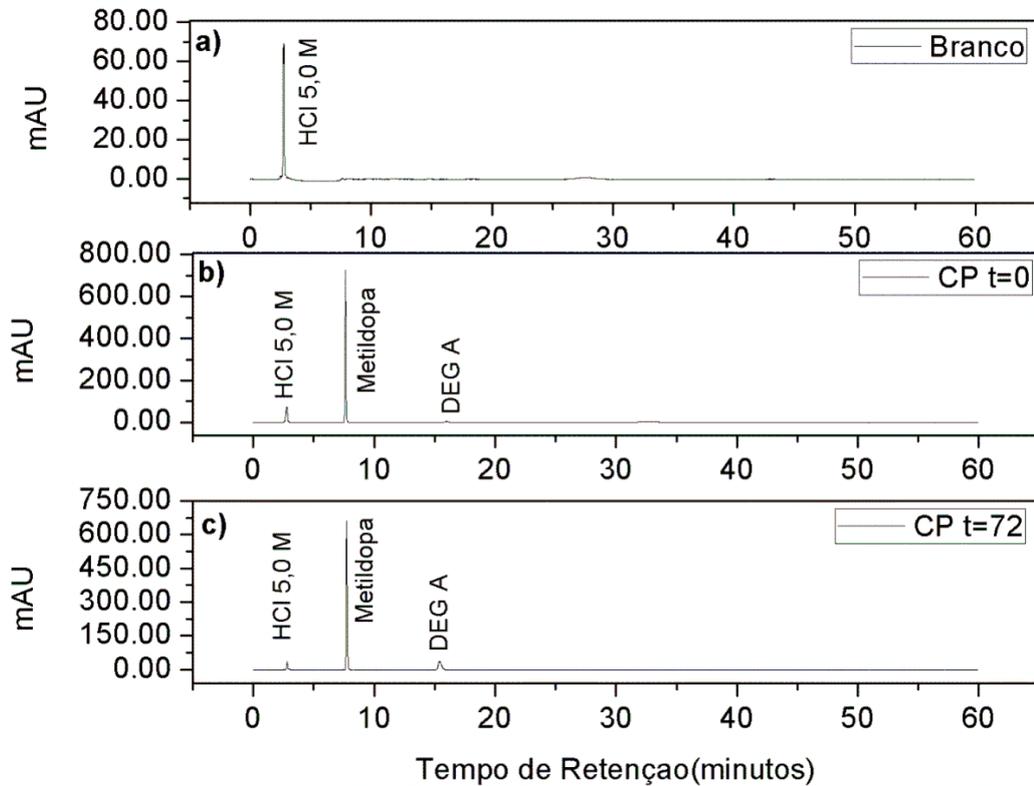


Figura 9 – a) Branco HCl 5,0M; b) Metildopa comprimido revestido em HCl 5,0M Tempo 0h (Zero); c) Metildopa comprimido revestido em HCl 5,0M após 72 horas

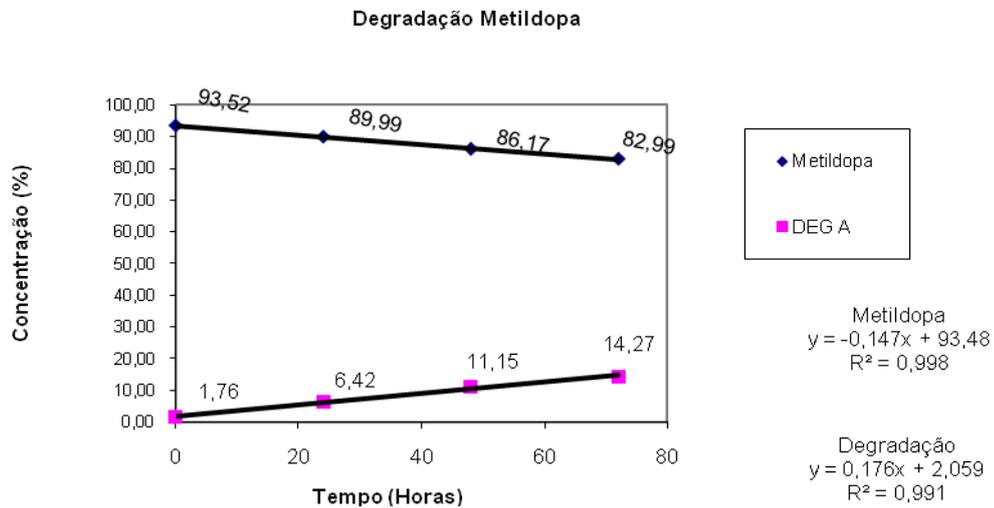


Figura 10 – Percentagem do teor metildopa e do pico do produto de degradação DEGA por tempo de estudo nas amostras comprimidos revestidos em hidrólise ácida HCl 5,0M

Após a realização 72 horas de estudo de degradação do comprimido revestido em HCl 5,0M foi realizada análise espectral da metildopa e do DEG A. A metildopa apresentou pureza de 1,000 e similaridade com o pico do padrão primário USP lote JOG237 de 0,999; o DEG A apresentou pureza de 1,000 e não apresentou similaridade com os picos de padrões primários de metildopa e 3-O-Metilmethylidopa.

5.2.1.3 HIDRÓLISE ÁCIDA NO PLACEBO

As análises dos placebos expostos à hidrólise ácida HCl 5,0M não apresentaram picos que interferissem nas análises de metildopa e dos produtos de degradação encontrados durante o estudo, os cromatogramas referentes a este estudo também não apresentaram picos que caracterizassem degradação. Não houve diferença entre os cromatogramas do tempo inicial e após 72 horas do estudo, como pode ser visualizado na **figura 11**.

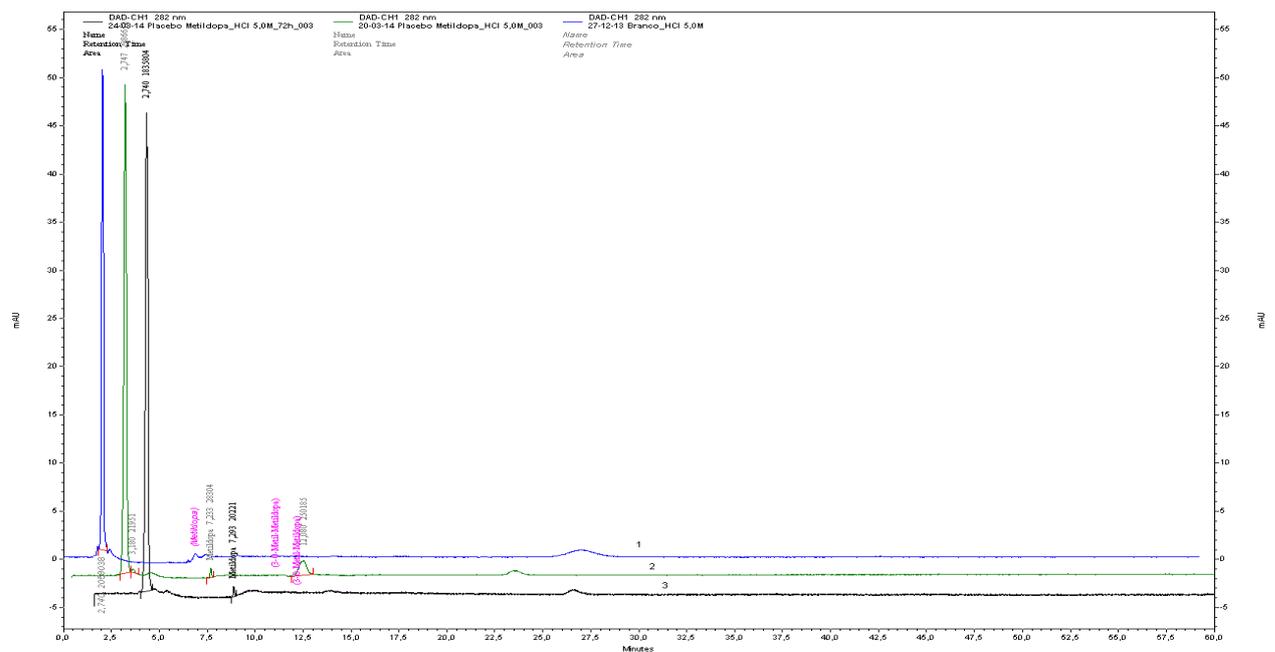


Figura 11 – 1. Branco HCl 5,0M; 2. Placebo metildopa HCl 5,0M no início do estudo; 3. Placebo metildopa HCl 5,0M em 72 horas de estudo.

5.2.2 HIDRÓLISE ALCALINA

5.2.2.1 HIDRÓLISE ALCALINA NO IFA

Outro comportamento foi verificado quando o insumo farmacêutico ativo metildopa foi submetido à hidrólise alcalina (NaOH 0,1M), fotoprotegido e à temperatura ambiente **figura 12**. Após a exposição à condição alcalina foram detectados, no tempo zero (**padrão comparativo**), picos com áreas significativas nos tempos de retenção relativa (TRR) 0,37; 2,84 e 4,69. O aparecimento dos picos foi acompanhado de um decaimento na área referente à metildopa de 29,08% em comparação ao **padrão analítico**. As amostras apresentaram cor castanha escura após a exposição a esta condição de estudo.

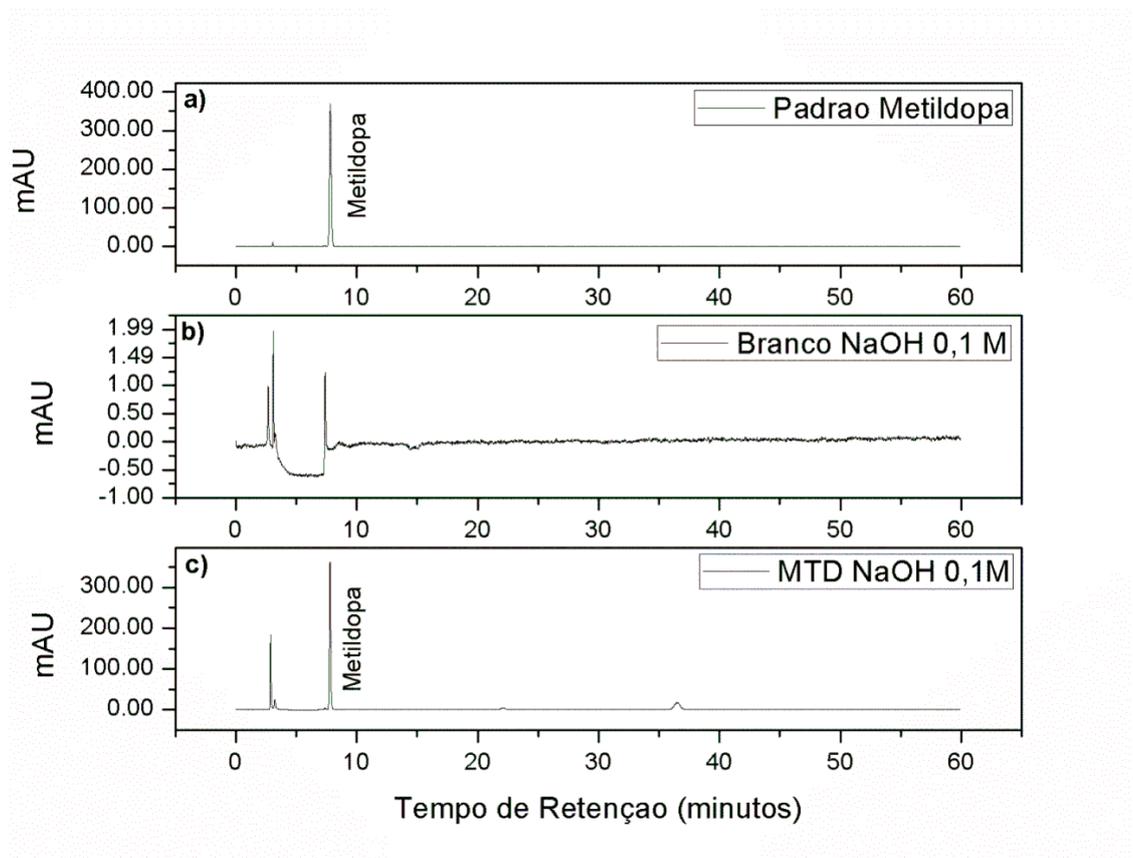


Figura 12 – a) Padrão Analítico da Metildopa; b) Branco NaOH 0,1M; c) Metildopa em NaOH 0,1M

A análise do pico da metildopa obtido após a hidrólise alcalina (NaOH 1,0M) quando comparada ao **padrão analítico**, apresentou um decaimento na área de 94,46%. A **figura 13** apresenta os picos indicativos de produtos de degradação, sendo os mais significativos os de

TRR 0,33; 0,49; 0,80; 2,21. As amostras também apresentaram cor castanha escura após a exposição a esta condição mais concentrada do NaOH.

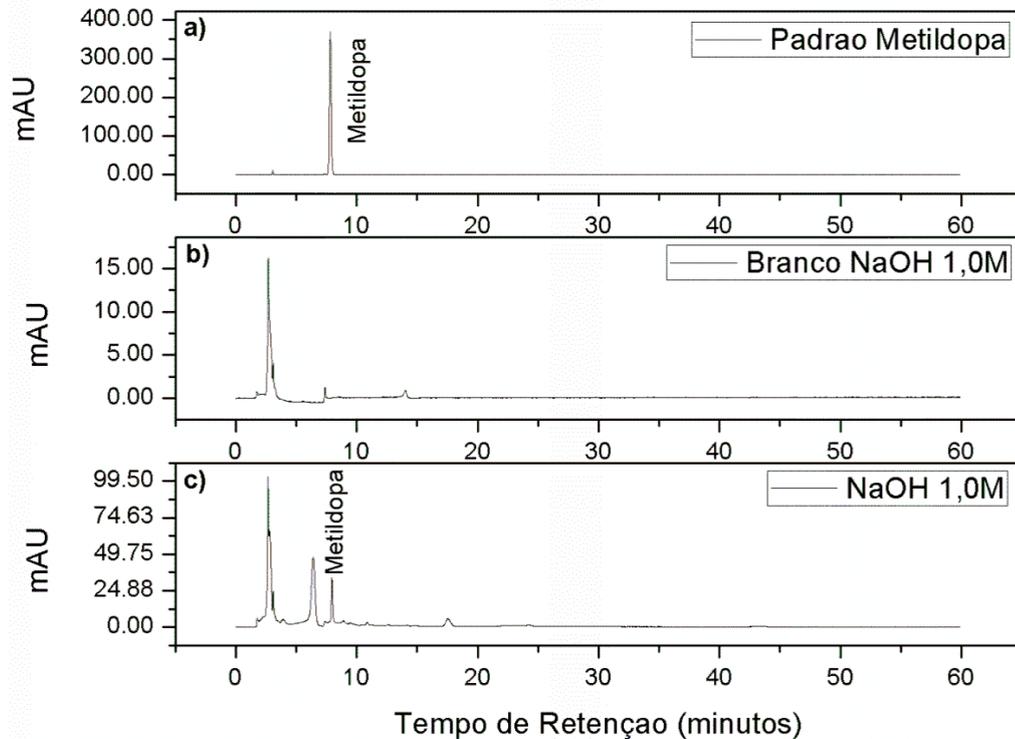
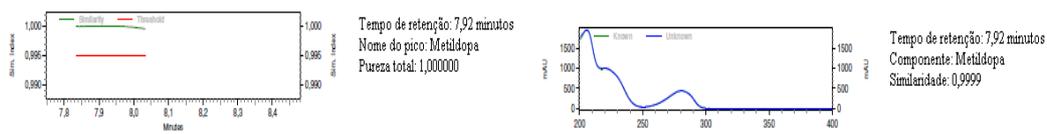


Figura 13 – a) Padrão Analítico da Metildopa; b) Branco NaOH 1,0M; c) Metildopa em NaOH 1,0M

Contudo, o decaimento apresentado nas condições anteriores não atende o artigo seis da RDC 58/ 2013, pois não seria possível a descrição de um perfil de degradação. A exposição do IFA na condição de degradação alcalina mais concentrada (NaOH 1,0M) provocou uma mudança na estrutura da molécula da metildopa, visto que, o espectro apresentado difere daquele observado no padrão. Na **figura 14**, está representada a análise espectral das degradações descritas acima.

a)



b)

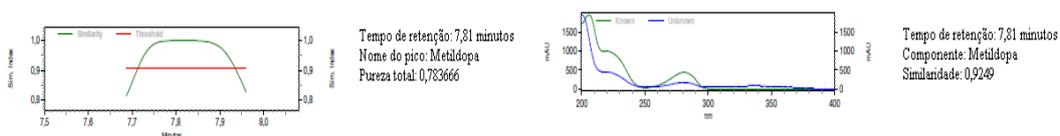


Figura 14 – Análise Espectral (Pureza e Similaridade) do pico do IFA Metildopa submetida à hidrólise básica: a) NaOH 0,1M e b) NaOH 1,0M.

O decaimento da área de metildopa na degradação alcalina (NaOH 0,01M) foi de 16451673 para 13825721 o que representa um decaimento de 15,96% em 72 horas de estudo como ilustra a figura 15. A amostra apresentou mudança de coloração.

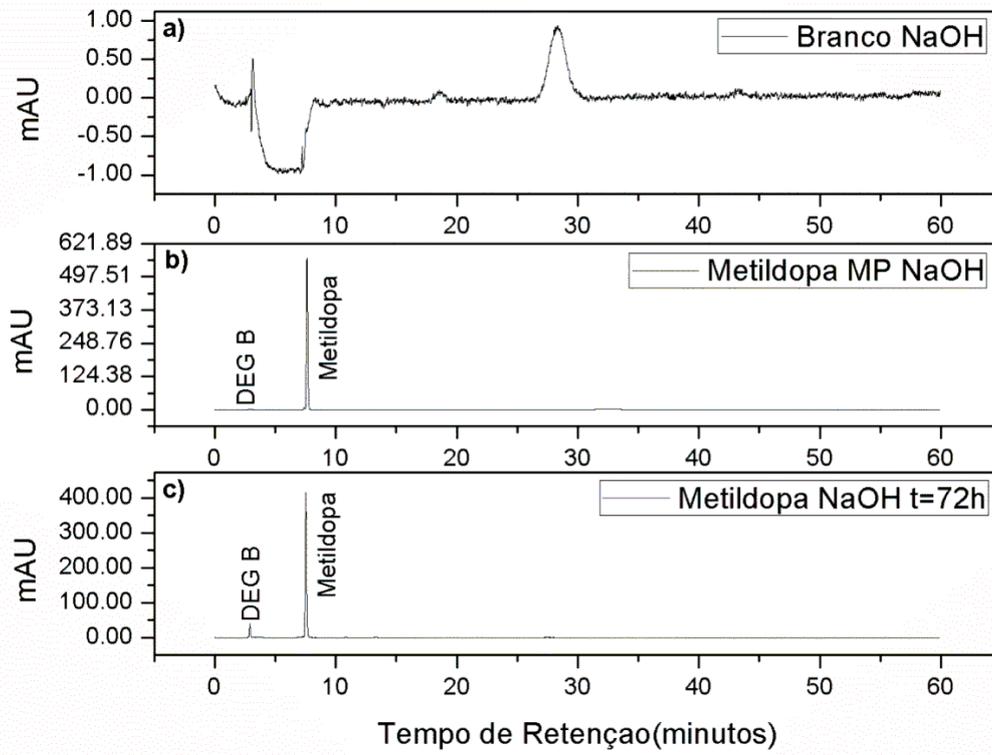


Figura 15 – a) Branco NaOH 0,01M; b) Metildopa em NaOH 0,01M tempo 0 (zero); c) Metildopa em NaOH 0,01M após 72 horas de estudo.

O pico DEG B apresentou um crescimento relevante durante o estudo, pois apresentou uma área de 63839 no tempo inicial do estudo e após 72 horas possuía área de 802339 (crescimento equivalente a aproximadamente treze vezes o valor inicial). Após a verificação do balanço de massas (soma da área do pico de metildopa e o pico DEG B ao final do estudo frente ao pico da metildopa no tempo inicial do estudo) viu-se uma recuperação de aproximadamente 80%, o que pode ter ocorrido devido a diversos fatores como, por exemplo: formação de produtos de degradação voláteis ou com ausência de um grupo cromóforo, vias complexas de degradação, reação de segunda ordem ou leituras em comprimentos de onda diferentes entre o produto de degradação formado e o IFA (a análise em DAD foi realizada de 190 a 400nm). A **figura 16** apresenta a relação entre decaimento do IFA metildopa e da formação do DEG B.

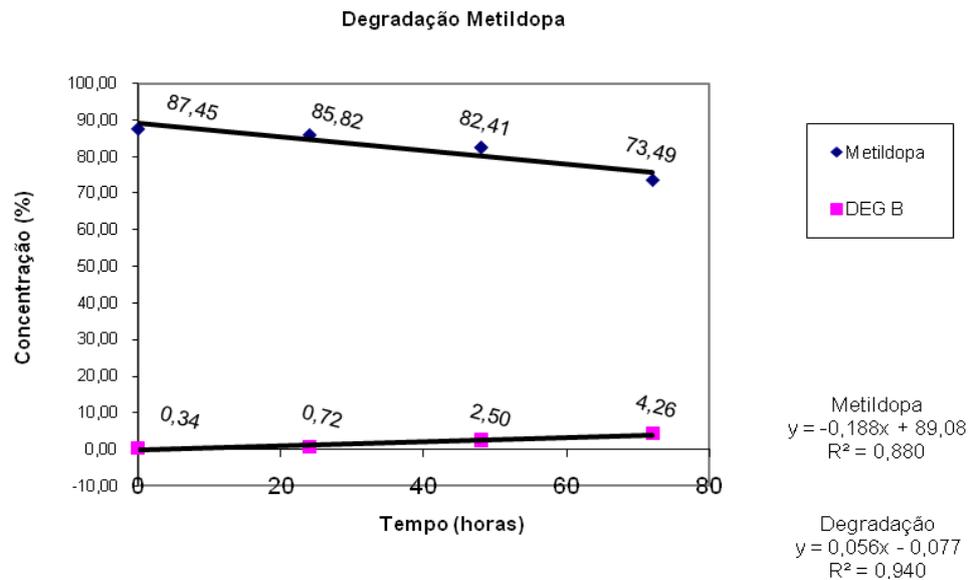


Figura 16 – Percentagem do teor de Metildopa e do pico do produto de degradação (DEG B) por tempo de estudo nas amostras de hidrólise alcalina NaOH 0,01M

Após a realização 72 horas de estudo de degradação em NaOH 0,01M foi realizada análise espectral da metildopa e do DEG B. A metildopa apresentou pureza de 1,000 e similaridade com o pico do padrão primário USP lote JOG 237 de 0,999; o DEG B apresentou pureza de 0,785 e não apresentou similaridade com os picos de padrões primários de Metildopa e 3-O-Metilmetildopa, resultado esperado pelo tempo de retenção do pico.

5.2.2.2 HIDRÓLISE ALCALINA NO COMPRIMIDO REVESTIDO

O decaimento da área de metildopa comprimido revestido na degradação alcalina (NaOH 0,01M) foi de 15776818 para 14012006 o que representa um decaimento de 15,89%, em 72 horas de estudo como ilustra o **figura 17**. As áreas do pico da metildopa apresentaram CV% de 4,16%. A amostra apresentou mudança de coloração.

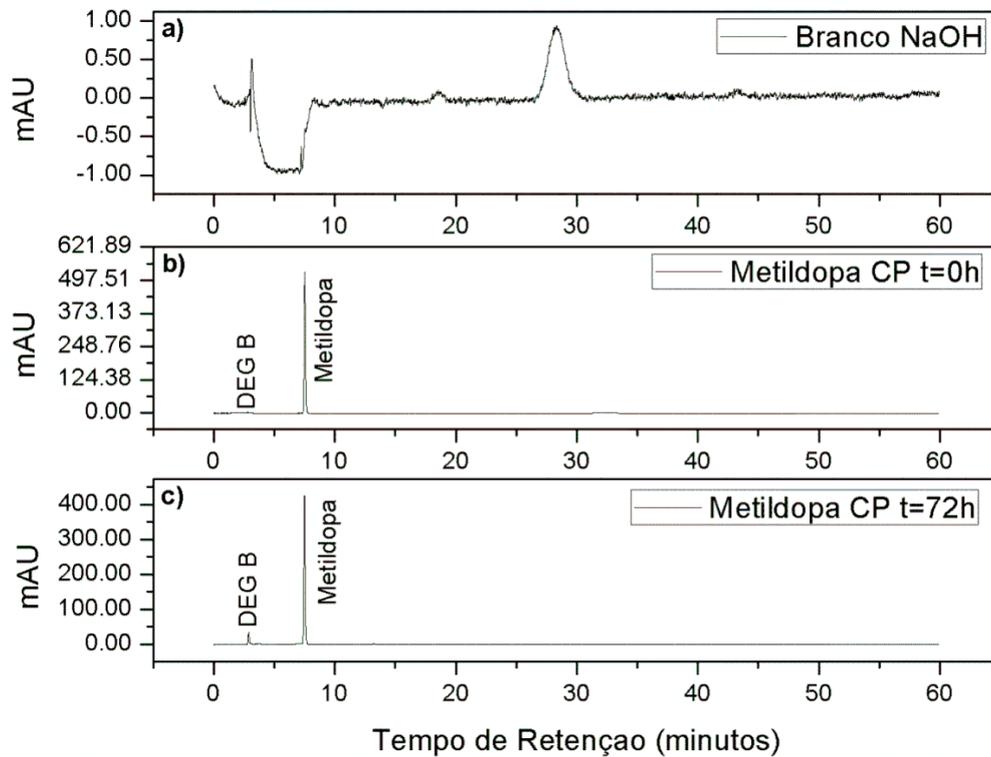


Figura 17 – a) Branco HCl 5,0M; b) Metildopa comprimido revestido em HCl 5,0M tempo 0 (zero); c) Metildopa comprimido revestido em HCl 5,0M após 72 horas.

O pico destacado **DEG B** apresentou um crescimento relevante durante o estudo, pois apresentou uma área de 83258 no tempo inicial do estudo e após 72 horas possuía área de 726361 (o equivalente a nove vezes a área do pico no início do estudo). Após a verificação do balanço de massas (soma da área do pico de metildopa e o pico DEG B ao final do estudo frente ao pico da metildopa no tempo inicial do estudo) viu-se uma recuperação de aproximadamente 80%, o que pode ter ocorrido devido aos mesmos fatores descritos anteriormente para o IFA. A **figura 18** apresenta a relação entre decaimento do IFA metildopa e da formação do DEG B.

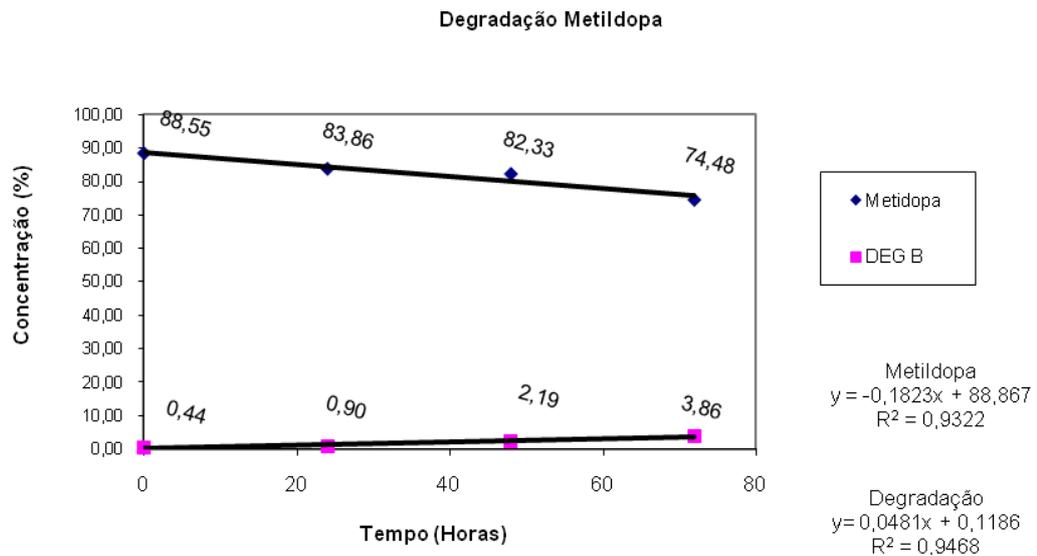


Figura 18 – Percentagem do teor Metildopa comprimido revestido e do pico do produto de degradação por tempo de estudo nas amostras de hidrólise alcalina NaOH 0,01M.

Após a realização 72 horas de estudo de degradação em NaOH 0,01M foi realizada a análise espectral da metildopa e do DEG B apresentadas no comprimido revestido. A metildopa apresentou pureza de 1,000 e similaridade com o pico do padrão primário USP lote J0G237 de 0,999; o DEG B apresentou pureza de 0,786 e não apresentou similaridade com os picos de padrões primários de metildopa e 3-O-Metilmelildopa.

5.2.2.3 HIDRÓLISE ALCALINA DO PLACEBO

As análises dos placebos expostos à hidrólise básica NaOH 0,01M não apresentaram picos que interferissem nas análises de metildopa e dos produtos de degradação encontrados durante o estudo, os cromatogramas referentes a este estudo também não apresentaram picos que caracterizassem degradação. Não houve diferença entre os cromatogramas do tempo inicial e após 72 horas do estudo, como pode ser visualizado na **figura 19**.

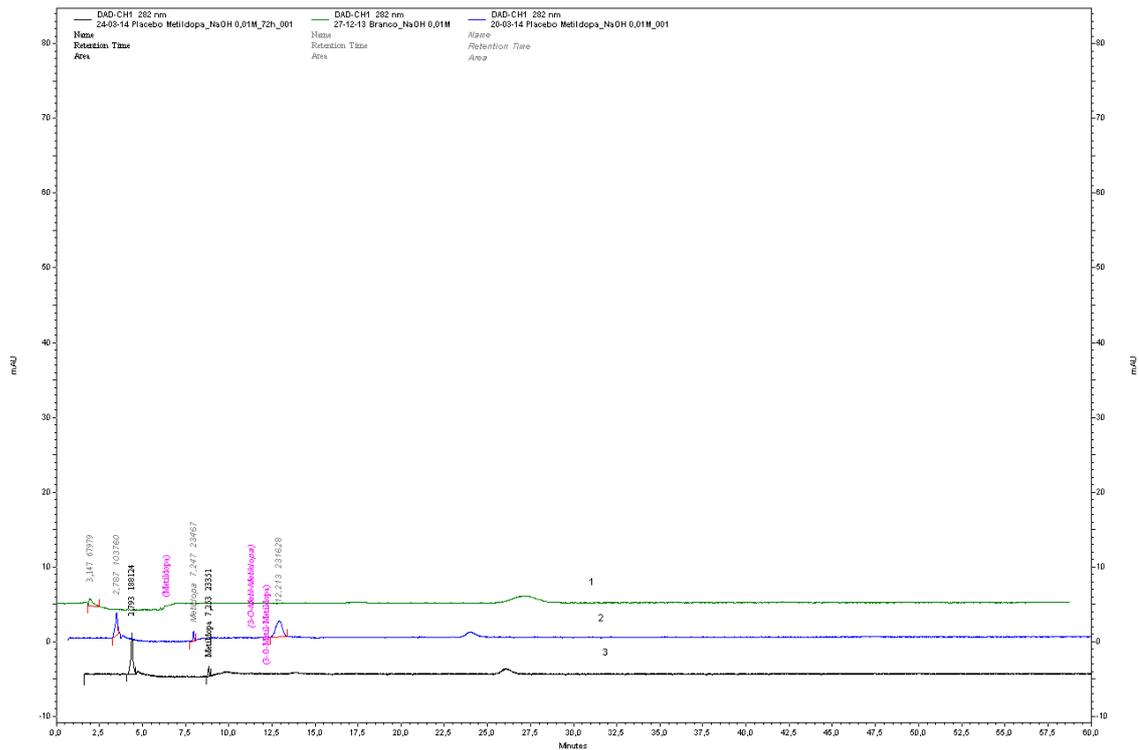


Figura 19 – 1. Branco NaOH 0,01M; 2. Placebo Metildopa NaOH 0,01M no início do estudo; 3. Placebo Metildopa NaOH 0,01M em 72 horas do estudo

5.2.3 HIDRÓLISE NEUTRA

As amostras do IFA submetidas à hidrólise neutra utilizando a H₂O ultrapura, protegida da luz e mantida à temperatura ambiente apresentou redução menor que 10% no tempo 30 dias quando comparado ao teor apresentado no padrão comparativo (96,95%), sendo observado o aparecimento de pico significativo com TRR 0,92 (**figura 20**). Devido ao baixo decaimento o IFA foi considerado estável nestas condições. Na **figura 21** está descrita a análise espectral do pico da metildopa após 30 dias de estudo em hidrólise neutra.

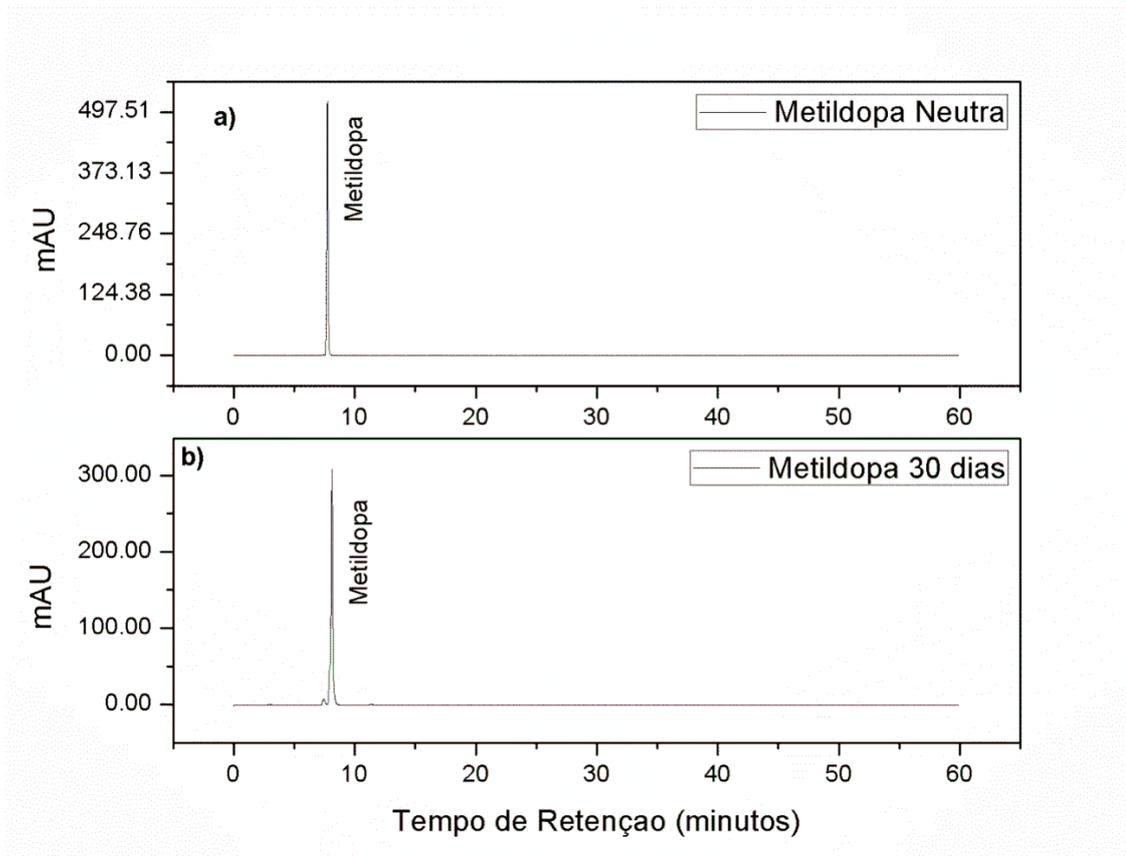


Figura 20 – A. Metildopa em H₂O (zero); B. Metildopa em H₂O após 30 dias de estudo

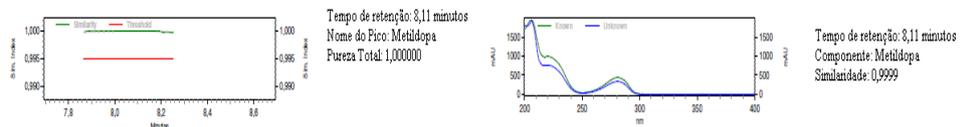


Figura 21 – Análise espectral (Pureza e Similaridade) do pico do IFA Metildopa após 30 dias de estudo da hidrólise neutra

5.2.4. OXIDAÇÃO

As amostras submetidas à oxidação da metildopa lote 17072 utilizando a solução de H₂O₂ a 3,0%, protegida da luz e mantida à temperatura ambiente apresentaram redução de 6,31% quando comparado teor apresentado no padrão comparativo (98,18%), após 30 dias, sendo observado o aparecimento de picos mais significativos nos TRR 0,36 (pico do H₂O₂) e 0,91 ao longo do cromatograma (**figura 22**). Devido ao baixo decaimento o IFA foi considerado estável nestas condições. Na **figura 23** está descrito a análise espectral do pico da metildopa após 30 dias de estudo em H₂O₂ 3,0%.

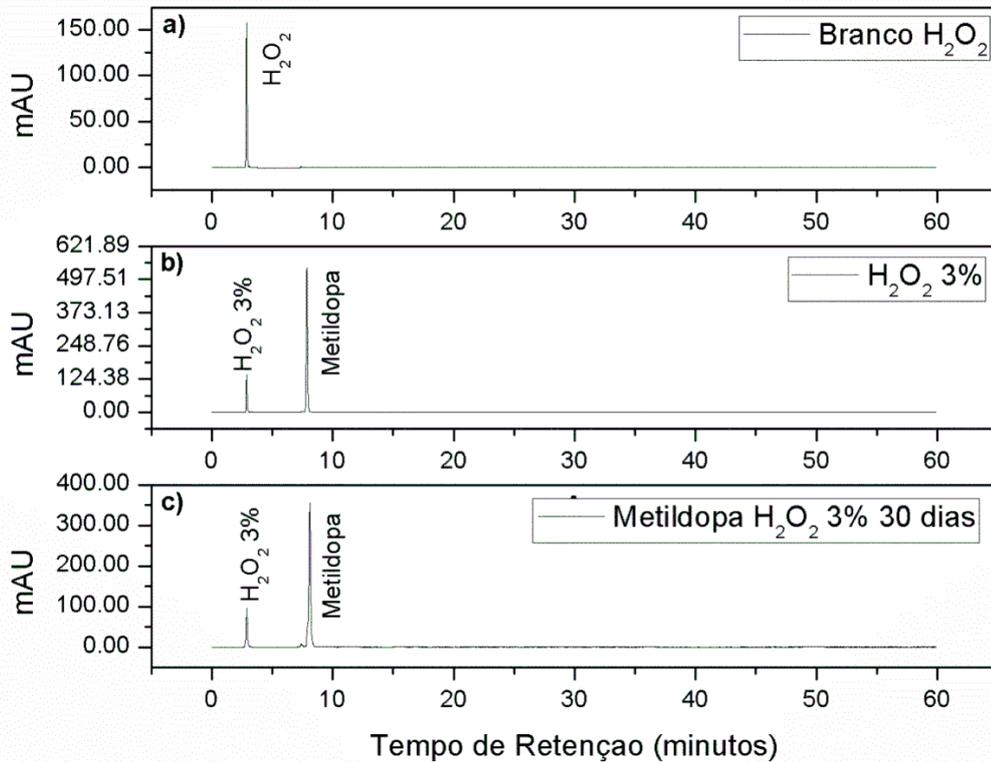


Figura 22 – a) Branco H₂O₂; b) Metildopa em H₂O₂ tempo 0 (zero); c) Metildopa em H₂O₂ após 30 dias

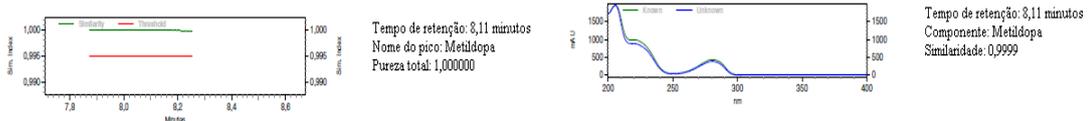


Figura 23 – Análise espectral (Pureza e Similaridade) do pico do IFA Metildopa após 30 dias de estudo de oxidação

5.2.5. FOTOESTABILIDADE

5.2.5.1. METILDOPA IFA

O estudo comparativo da amostra submetida à fotoestabilidade total (teor 99,92% e CV% 1,87) com as amostras controles protegidas com papel alumínio (teor 99,47% e CV% 1,04) mostra que não houve degradação significativa o que leva a indicação que o produto em questão não apresenta fotossensibilidade. O insumo farmacêutico ativo também se apresentou inalterado, quanto as suas características físicas de cor e aspecto, após o processo de

fotoestabilidade, quando comparada com a amostra controle e o padrão de metildopa, corroborando para a indicação de fotoestabilidade. O cromatograma apresentado não apresenta picos que caracterizem degradação quando comparada com a amostra controle e o padrão de metildopa como ilustra a **figura 24**.

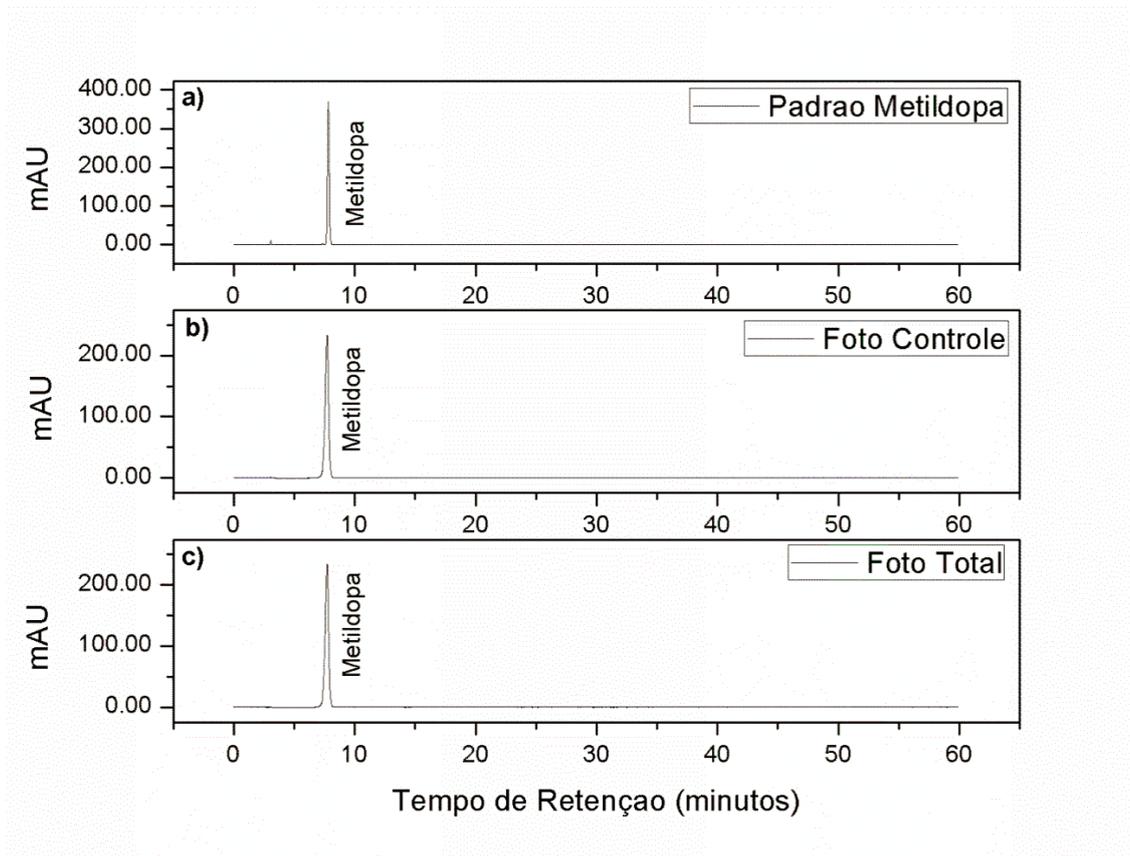


Figura 24 – a) Padrão Metildopa; b) Amostra fotoestabilidade controle; c) Amostra fotoestabilidade total

A análise espectral da metildopa exposta a fotoestabilidade total apresentou pureza de 1,000 e similaridade igual a 0,9998 quando comparada ao pico do padrão primário.

5.2.5.2 COMPRIMIDO REVESTIDO EM EMBALAGEM PRIMÁRIA

As amostras dos comprimidos revestidos já em sua embalagem primária (blíster de PVC cristal contendo 10 comprimidos) submetida à exposição fotolítica, quando comparadas às amostras controles (protegidas em papel alumínio) não apresentaram alterações nas suas características físicas e o cromatograma obtido e também não apresentaram picos nos cromatogramas obtidos que indicassem a presença de algum produto de degradação. A área

cromatográfica após a exposição também não mostrou redução no teor do ativo, o que indica que a embalagem utilizada é adequada para proteção da incidência da luz. O resultado das amostras submetidas à fotoestabilidade total foi de 98,93% e CV% de 0,86 enquanto as amostras controle apresentaram teor de 100,98% e CV% de 0,25.

5.2.5.3 AMOSTRAS DO PLACEBO

As características do placebo do comprimido revestido exposto à fotoestabilidade mantiveram-se inalteradas quando comparadas com a amostra controle, o que indica que nenhum dos excipientes utilizados no processo de fabricação do comprimido revestido de metildopa apresenta fotossensibilidade. Os cromatogramas referentes a este estudo também não apresentaram picos que caracterizassem degradação quando comparados às amostras controle e ao diluente.

5.2.6. DEGRADAÇÃO TÉRMICA

5.2.6.1 METILDOPA IFA

As amostras da matéria-prima metildopa submetidas à degradação térmica (120°C por 8 horas) utilizando estufa à vácuo Quimis[®] Q319V2, apresentou teor de 107,62% com CV% de 1,58% e não apresentou pico indicativo de degradação **figura 25**. A amostra submetida à degradação térmica apresentou pureza e similaridade iguais a 1,000. O aumento do teor pode ter sido acarretado devido à perda de água da amostra.

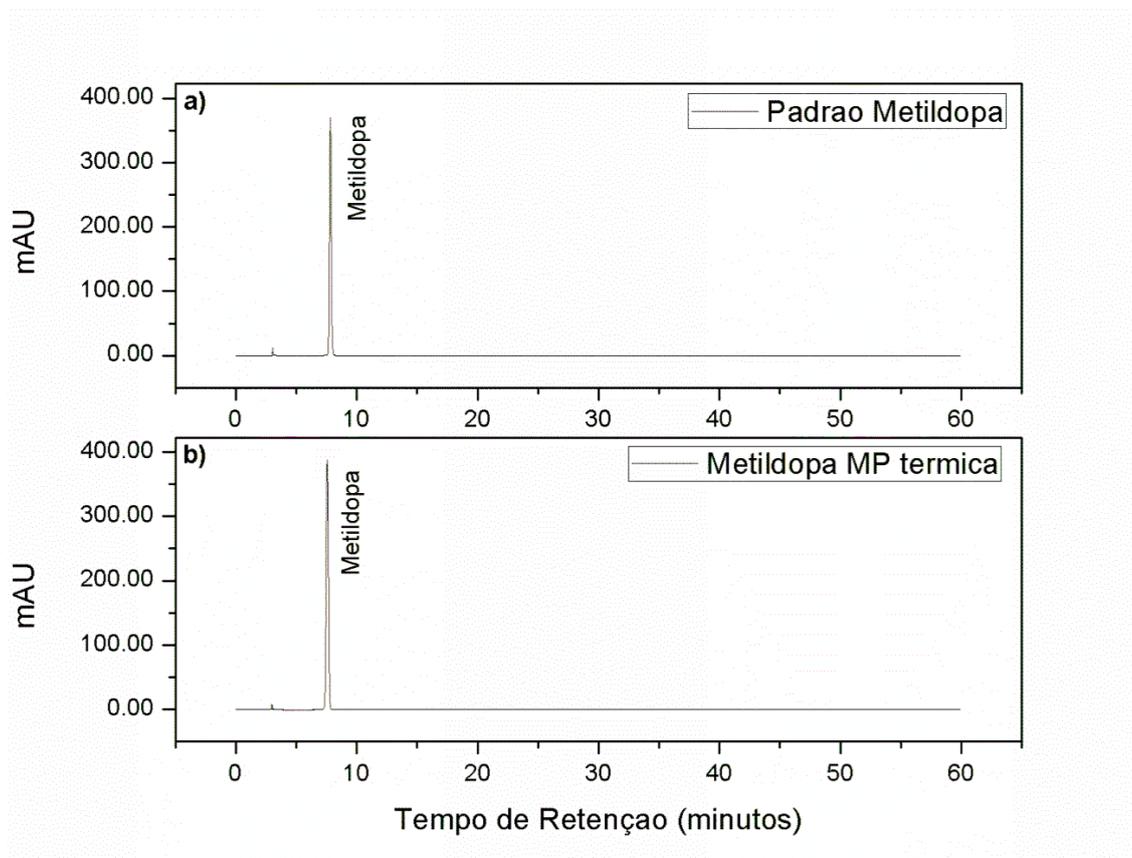


Figura 25 – a) Padrão Metildopa; b) Amostra submetida à degradação térmica.

5.2.6.2 COMPRIMIDO REVESTIDO

As amostras do comprimido revestido submetidos à degradação térmica (120°C por 8 horas) utilizando estufa à vácuo Quimis[®] Q319V2, apresentaram teor de 105,37% com CV% de 0,80% e não apresentou pico indicativo de degradação **figura 26**. Após análise espectral verificou-se que a pureza do pico e a similaridade apresentada foi de 1,000.

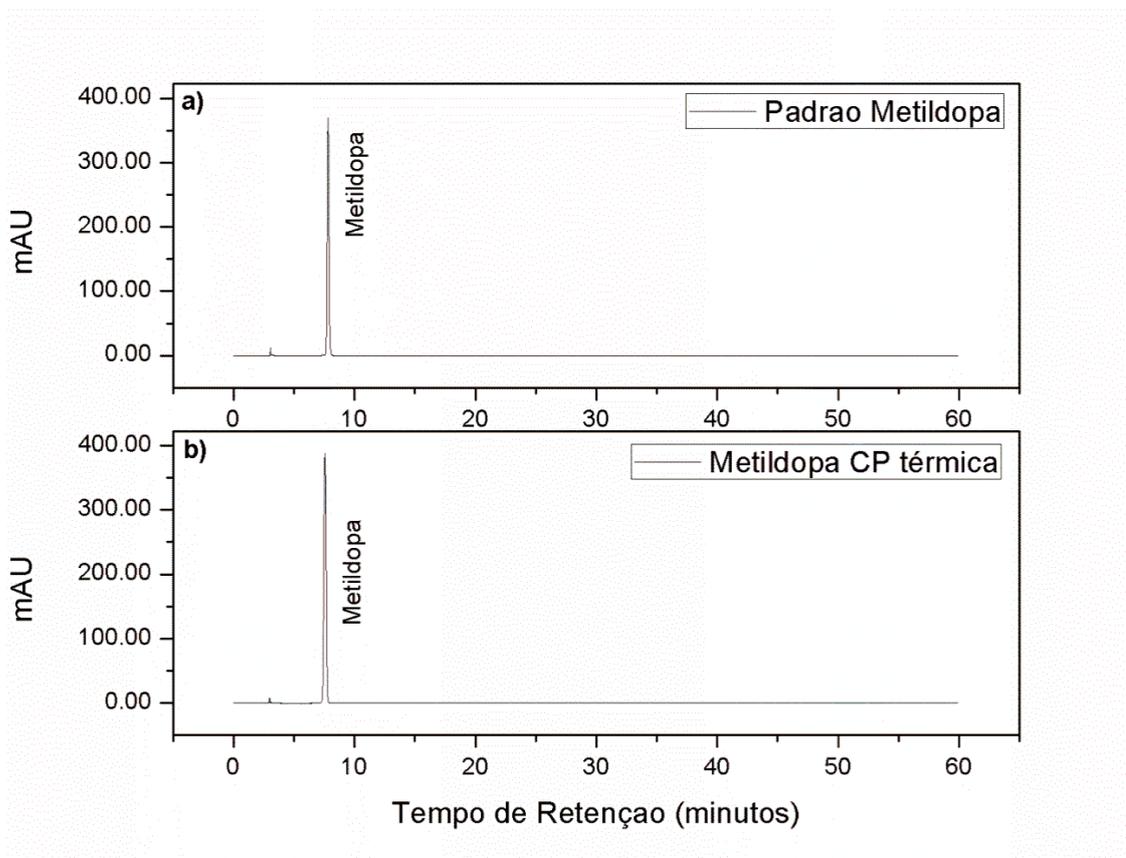


Figura 26 – a) Padrão Metildopa; b) Comprimido submetido à degradação térmica.

5.2.6.3 DEGRADAÇÃO TÉRMICA NO PLACEBO

As amostras do placebo do comprimido revestido submetidos à degradação térmica (120°C por 8 horas) utilizando estufa à vácuo Quimis[®] Q319V2 não apresentou picos de degradação que interferissem nas análises da matéria-prima e comprimidos da metildopa.

5.3 VALIDAÇÃO

5.3.1 ESPECIFICIDADE/ SELETIVIDADE

Os ensaios de especificidade e seletividade foram feitos através dos estudos de degradação forçada descritos anteriormente. Também foi realizada a comparação entre os cromatogramas do placebo frente aos cromatogramas da metildopa comprimido revestido para comprovar a especificidade do método **figura 27**.

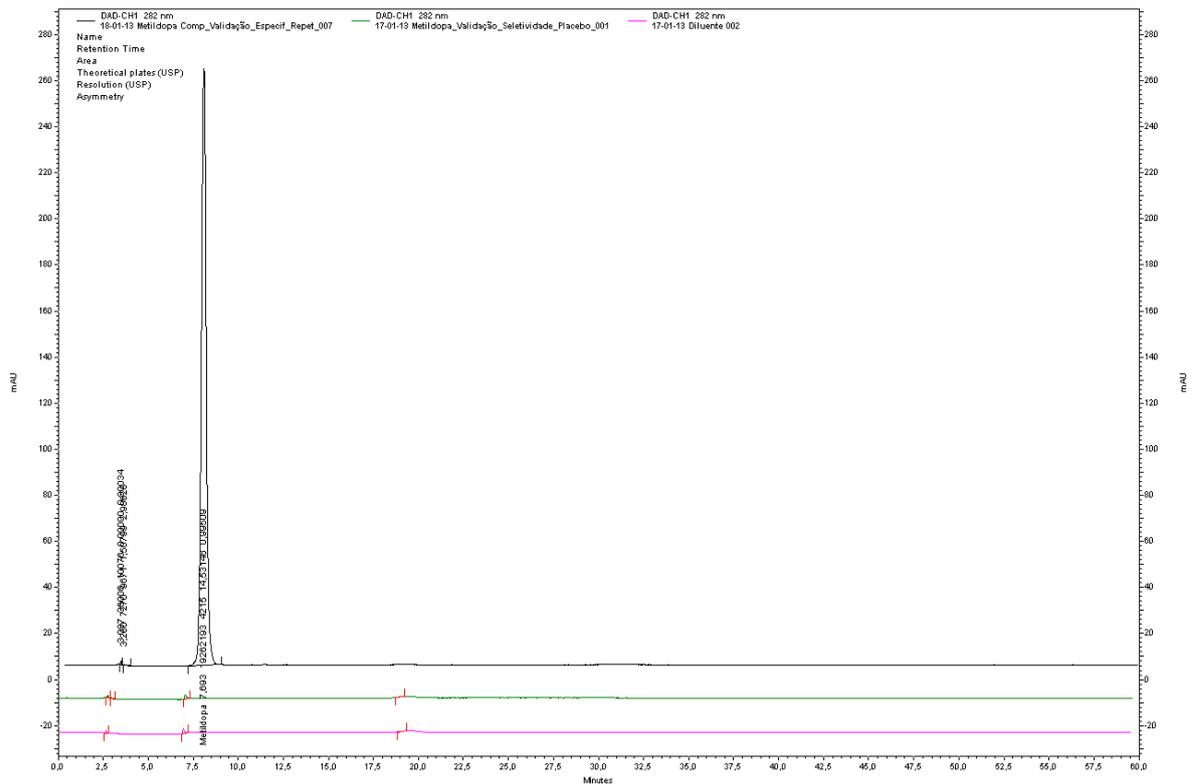


Figura 27 - Cromatograma da Metildopa concentração 320µg/mL frente cromatograma ao placebo e diluente

5.3.2 LINEARIDADE

A linearidade é a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa (BARROS NETO, 2002).

Segundo Brittain (2008), a linearidade do método corresponde à habilidade do mesmo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação, sendo que, a linearidade está relacionada com a variação

da inclinação da reta de regressão. Abaixo, segue tabela com os resultados (equação da reta, R^2 – coeficiente de regressão linear e LQ – limite de quantificação).

Tabela 5 - Resultados da linearidade do método indicativo para estudo de estabilidade da metildopa

SQR	Equação da reta	R^2	LQ (ppm)
Metildopa	$y = 52877,29 (\pm 2406,925) x + 902516,7 (\pm 493017)$	0,994	12,827

O método proposto foi linear para metildopa, quando tratado estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA), com 95% de confiança e não apresentava falta de ajuste.

5.3.3 PRECISÃO

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. Na tabela 06, seguem os resultados da repetitividade e da precisão intermediária.

Tabela 6 - Resultados da precisão do método

Amostras	Repetitividade		Precisão	
	Analista 1	Dia1/ Analista1		Dia2/ Analista2
		Concentração (ppm)		
1	320,83	307,17	318,95	
2	319,51	319,91	321,23	
3	321,16	314,50	318,97	
4	321,19	317,35	321,81	
5	321,72	322,77	320,50	
6	320,99	320,81	315,08	
Média	320,90	317,08	319,42	
CV (%)	0,23	1,78	0,76	

Estatisticamente, para a repetitividade foi apresentado como resultado um CV inferior a 5% e a precisão intermediária após aplicação do teste t Student, apresentou t calculado 1,99 e este foi menor que o t tabelado 2,36 com 95% de confiança. Portanto, pode ser concluído que o método foi preciso.

5.3.4 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). O estudo da exatidão foi conduzido analisando as amostras em triplicata para as concentrações baixa (160ppm), média (320ppm) e alta (480ppm).

A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Os resultados seguem na tabela 07.

Tabela 7 - Resultados da exatidão do método

Amostras	160 ppm(50,00%)	320 ppm(100,00%)	480 ppm(150,00%)
1	159,84	324,65	476,85
2	157,06	321,81	482,33
3	158,77	323,18	487,81
Média	158,56	323,21	482,33
CV (%)	0,88	0,44	1,14
Exatidão	99,10	101,00	100,49

Diante dos resultados apresentados, o método foi considerado exato.

5.3.5 ROBUSTEZ

Os resultados das variações testadas como: temperatura do forno foi previsto, pois o método preconiza a programação deste a 25°C, sendo, portanto, avaliada a variação de $\pm 1^\circ\text{C}$. Estes estão apresentados na tabela 08, os quais foram tratados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA).

Tabela 8 - Resultados da robustez para variação de temperatura

Temperatura	24°C	25°C	26°C
Amostras	Concentração (ppm)		
1	317,46	316,14	321,12
2	326,08	320,39	324,32
3	321,84	317,19	321,19
4	319,98	320,08	323,66
5	323,18	324,94	321,86
6	318,69	324,07	321,46
Média	321,20	320,47	322,27
CV (%)	0,98	1,10	0,43

Os resultados estatísticos demonstraram com 95% de confiança por ANOVA que o F calculado de 0,603 foi inferior ao F tabelado de 3,682. Sendo para esta deliberada e pequena variação, este considerado robusto.

Outra variação proposta que foi referente a diferentes fabricantes do metanol utilizado como parte da fase móvel do método, apresentou como resultados os valores que foram tratados por teste t Student. Segue tabela 09.

Tabela 9 - Resultados da robustez para variação de fabricante do Metanol

Fabricante	JT Baker®	Carlo Erba®
Amostras	Concentração (ppm)	
1	318,45	321,65
2	318,98	325,74
3	323,26	318,20
4	320,67	325,61
5	322,80	322,96
6	321,59	321,73
Média	320,96	322,65
CV (%)	0,61	0,88

Os resultados demonstraram com 95% de confiança, existindo 5% de possibilidade para erros, que para o teste t presumindo variâncias equivalentes, o t calculado foi 1,200 e menor que o t tabelado de 2,228, portanto o método foi considerado robusto para estes dois diferentes fabricantes de metanol.

A variação de fluxo da fase móvel também foi avaliada, considerando que o método preconiza a programação deste a 1mL/ min e que o equipamento utilizado pode apresentar variações de $\pm 3\%$ no fluxo. Estes estão apresentados na tabela 10, os quais foram tratados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA).

Tabela 10 - Resultados da robustez para variação do fluxo

Temperatura	0,97ml/ min	1,00ml/ min	1,03ml/ min
Amostras	Concentração (ppm)		
1	322,10	316,14	321,58
2	325,89	320,39	327,45
3	322,23	317,19	323,49
4	322,23	320,08	324,61
5	324,72	324,94	326,74
6	316,39	324,07	322,51
Média	322,26	320,47	324,40
CV (%)	1,02	1,10	0,72

Os resultados estatísticos demonstraram com 95% de confiança por ANOVA que o F calculado de 2,424 foi inferior ao F tabelado de 3,682. Sendo para esta deliberada e pequena variação, este considerado robusto.

5.4 UTILIZAÇÃO DO MIEE NA ANÁLISE DE MEDICAMENTO SIMILAR LAFEPE METILDOPA 500MG

Para a comprovação da eficácia do MIEE, foi realizado o estudo de estabilidade acelerado e de longa duração (3 e 6 meses) de um lote deste medicamento similar registrado frente à ANVISA. Foi quantificado o teor (%) frente ao padrão primário e a avaliação do aparecimento de algum dos produtos de degradação encontrados no estudo de degradação forçada, para cada condição e tempo do estudo. O teor preconizado pela Farmacopeia Brasileira V (2010) é de no mínimo 90% e no máximo 110% da quantidade declarada de metildopa.

Na tabela 11 estão plotados os resultados, foi realiza a análise espectral dos mesmos e todas as amostras obtiveram pureza igual a 1,000 e similaridade frente ao padrão primário superior à 0,999. Não foi visualizada a presença de nenhum dos produtos de degradação obtidos durante os estudos de degradação forçada, nem a presença da substância relacionada 3-O-Metilmetildopa.

Tabela 11 - Teor % do estudo de estabilidade da Metildopa 500mg comprimido revestido frente ao padrão primário.

Estudo de Estabilidade	3 meses		6 meses	
	Acelerada	Longa	Acelerada	Longa
Amostra 1	99,82	100,42	98,62	100,14
Amostra 2	99,86	100,54	101,60	98,58
Amostra 3	100,02	99,82	101,65	99,99
Média	99,93	100,26	100,63	99,57
CV%	0,10	0,38	1,72	0,86

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSÃO

Diante dos resultados o MIEE apresentado é específico e seletivo para o IFA e para o comprimido revestido de metildopa, e também para os produtos de degradação encontrados. O IFA apresenta-se estável em meios neutro e oxidativo nas condições testadas, também mostrou-se estável frente a fotoestabilidade e à variação de temperatura. No entanto, nas condições ácidas e alcalinas consideradas ótimas (HCl 5,0M e NaOH 0,01M) tanto o IFA quanto o comprimido revestido apresentaram produtos de degradação (DEG A e DEG B) e decaimento da área do ativo com valor acima de 10%, parâmetro tomado como referência em razão do indicado na RDC 58/ 2013 e o Q1B-ICH. Por se tratar de uma forma farmacêutica sólida, durante o processo produtivo, o fármaco em questão não é exposto às condições estudadas garantindo assim a estabilidade do produto final.

O método desenvolvido foi validado seguindo as Boas Práticas de Fabricação e Controle e a Resolução, nº 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003). Ele foi considerado robusto, linear, preciso, exato, específico e seletivo. Ao final o método foi testado no estudo de estabilidade para a quantificação do ativo em um lote de LAFEPE METILDOPA 500mg e este apresentou teor % dentro do que é preconizado pela Farmacopéia Brasileira V e não apresentou os produtos de degradação mostrados durante o estudo, bem como não apresentou a impureza 3-O-metilmetildopa.

6.2 PERSPECTIVAS

- Realizar estudo das degradações neutras e oxidativas junto à temperatura para avaliação do crescimento do pico encontrado em ambas as condições. Visto que o decaimento do ativo não passou de 10% na temperatura ambiente durante 30 dias.
- Isolamento e caracterização dos produtos de degradação DEG A e DEG B.

REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR ISO/IEC 17025: 2005 - **Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**. 2 ed., 2005.

BAKSHI, M.; SINGH, B.; SINGH, A.; SINGH, S. **The ICH guidance in practice: stress degradation studies on ornidazole and development of a validated stability- indicating assay**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 26, p. 891, 2001.

BAKSHI, M.; SINGH, S. **Development of validated stability-indicating assay Methods** — critical review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.28, p.1011-1040, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução 899, de 29 de maio de 2003. **Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 02 de jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 01, de 29 de julho de 2005. **Guia para realização de estudos de estabilidade**. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico nº 1**, 15 de jul. 2008. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 11**, 23 de jan. 2012. 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 58, de 20 de dezembro de 2013. **Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências**. Brasília: Diário Oficial da União, 2013.

CONCEIÇÃO, M. M. **Estudo da degradação térmica de adoçante com aspartame**, 2004. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2004.

FB. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed., Fiocruz: São Paulo, 2010.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3 ed. São Paulo: Edusp, p.126, 2011.

GALICHET, L.Y. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. Pharmaceutical Press, 2006, on line. Disponível em:
<<http://www.medicinescomplete.com/mc/clarke's/current>>. Acesso em: 10.03.2007.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: 2007. 10 ed.

International Conference on Harmonization, "ICH Q2A: Validation of Analytical Procedures: Methodology," Step 5 (1994).

International Conference on Harmonization, "ICH Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products," Step 5 (1996a).

International Conference on Harmonization, "ICH Q2B: Validation of Analytical Procedures: Terms and Definitions," Step 5 (1996b).

ICH, INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Guidance for industry Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products. 2003.

ICH, Impurities in new drug substances Q3A (R2), in: International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva (Switzerland), 2006.

Memento terapêutico: 2006/ LAFEPE. – Recife: Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, 2006. 152pg.

PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOF, F. **Validation of New Methods**. Forensic Science International. v. 165, p. 216-224, 2007.

PIECHOCK, J. T.; THOMA, K. **Pharmaceutical Photostability and Stabilization Technology**, Ed. Informa Healthcare USA, Inc., 2007.

ROLIM, L. A. **Estudo da degradação do fármaco benznidazol utilizado no combate a doença de chagas por hidrólise, oxidação, fotólise e termodegradação**. Dissertação de Mestrado. 2010.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. **Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica**. Rev Ciênc Farm Básica Apl., v.30, n.2, p.1808-4532, 2009.

SINGH, S.; BAKSHI, M. **Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs**. PharmTechnol. v. 24, p. 1, 2000.

SINKO, P. J. M. **Físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. Editora Artmed. 5ed, p. 411-417, 2005.

SOARES SOBRINHO, J. L.; NUNES, L. C. C.; GRANGEIRO JÚNIOR, S.; ROCA, M. F. L. A.; ROLIM NETO, P. J. **Validação de metodologias analíticas no mercado farmacêutico: caso paracetamol**. Controle de Contaminação, v.7, n. 73, p. 35-41, 2005.

TABORIANSKI, A.M. **Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas**. Dissertação de mestrado, São Paulo, 167p. 2003.

USP. **United States Pharmacopeia**. USP 36 - NF 31. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations**. WHO Technical Report s. 953, annex 2, Stability Testing of Active Pharmaceutical Ingredients and Finished Pharmaceutical Products, Geneva, Switzerland. 2009.

Site: www.merck-chemical.com/chromatography: ChromBook Merck Millipore®. Acesso em: 23 de novembro de 2012.

YOSHIOKA, Sumie; STELLA, Valentino. *Stability of drugs and dosage forms*. 1ª Edição. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 2000. 24 – 25 p.