

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**MARILENE LOPES ÂNGELO**

**ANÁLISE FARMACÊUTICA DE TIBOLONA EM  
CÁPSULAS MAGISTRAIS POR CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Alfenas/MG

2013

**MARILENE LOPES ÂNGELO**

**ANÁLISE FARMACÊUTICA DE TIBOLONA EM  
CÁPSULAS MAGISTRAIS POR CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Avaliação Físico-Química e Microbiológica de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Magali Benjamim de Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Rudy Bonfilio

Alfenas/MG

2013

Ângelo, Marilene Lopes.

Análise farmacêutica de tibolona em cápsulas magistrais por cromatografia líquida de alta eficiência / Marilene Lopes Ângelo. - 2013.

104 f. -

Orientadora: Magali Benjamim de Araújo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Terapia de Reposição Hormonal. 2. Cápsulas. 3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 4. Dissolução. 5. Controle de Qualidade. I. Araújo, Magali Benjamim de. II. Título.

CDD: 615.1

**MARILENE LOPES ÂNGELO**

**ANÁLISE FARMACÊUTICA DE TIBOLONA  
EM CÁPSULAS MAGISTRAIS POR CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Avaliação Físico-Química e Microbiológica de Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus e Nossa Senhora, que tornou possível a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dra Magali Benjamim de Araújo pela disponibilidade na orientação deste trabalho e exemplo de profissionalismo.

À minha mãe Zilda e meu pai Rosário, pelo apoio, força e incentivo em todas as minhas escolhas.

Ao Núcleo Controle de Qualidade da UNIFAL-MG, por disponibilizar a infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rudy Bonfilio pelo importante auxílio, dedicação e sempre acreditar nos resultados deste projeto.

A farmacêutica Olimpia Maria Martins Santos pelo empenho e colaboração.

Ao Prof. Álvaro José dos Santos Neto e Guilherme Miola Titato pela colaboração nas análises realizadas no Laboratório de Cromatografia da Universidade de São Paulo - São Carlos.

Ao Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF, onde foram realizadas as análises de índice de pureza das amostras submetidas ao ensaio de degradação forçada.

Ao mestrando André Ruela e a Técnica do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF Patrícia Penido Maia de Alvarenga pelo apoio nas análises de índice de pureza.

Aos funcionários do Núcleo Controle de Qualidade da UNIFAL-MG pela atenção dispensada.

À minha amiga Luzia de Fátima Silva pelos conselhos e amizade todo este tempo.

À CAPES e a UNIFAL-MG pelo apoio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A tibolona é um fármaco cuja estrutura química derivada da 19-nortestosterona e devido as suas atividades estrogênicas, androgênicas e progestogênicas é utilizada para tratamento de sintomas da menopausa relacionados a deficiência estrogênica em mulheres pós-menopausadas e também com indicação na prevenção da osteoporose. Não há monografia oficial para quantificação de tibolona na forma farmacêutica cápsulas nem teste de dissolução. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver, validar e aplicar um método rápido, seletivo, preciso e indicador de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação de tibolona em cápsulas e um teste de dissolução para quantificação *in vitro* de sua liberação no meio de dissolução. O método indicador de estabilidade foi desenvolvido baseado no ensaio de degradação forçada, submetendo o fármaco a degradação ácida, alcalina, neutra, oxidativa, térmica e luz UV. A separação foi realizada em uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (250 mm x 4,0 mm; 5 µm), com acetonitrila:água (60:40) como fase móvel, vazão de 1 mL/min e detecção UV em 205 nm. O método foi validado e todos os parâmetros ficaram dentro dos limites aceitáveis, segundo o ICH e ANVISA. O método proposto foi aplicado e apresentou resultados satisfatórios na análise quantitativa de tibolona em cápsulas. Também foi desenvolvido um método de dissolução para cápsulas de tibolona, onde o melhor perfil de dissolução obtido, foi alcançado com 0,5% de lauril sulfato de sódio (LSS) em água como meio de dissolução, aparato pá a 100 rpm e tempo de coleta de 45 minutos, na qual a percentagem de tibolona liberada foi maior 80% (Q = 75). A quantificação foi realizada por CLAE a 205 nm. Todos os parâmetros de validação foram considerados satisfatórios. Portanto, os métodos desenvolvidos são adequados para análise de controle de qualidade, estudos de estabilidade, ensaios de dissolução e perfil de dissolução de cápsulas contendo este fármaco.

Palavras-chave: Tibolona. Cápsulas. Cromatografia líquida de alta eficiência. Método indicador de estabilidade. Dissolução.

## ABSTRACT

Tibolone is a drug with chemical structure derived from 19-nortestosterone and estrogenic, androgenic and progestogenic activities. Due to these characteristics, it has been used to treat menopausal symptoms related to estrogen deficiency in postmenopausal women and it has also been indicated for osteoporosis prevention. There is no official monograph for quantification and dissolution tests of tibolone capsules. Hence, the objective of this study was to develop, validate and apply a quick, selective, precise and stability indicating method by high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of tibolone in capsules and an in vitro dissolution test for quantification of their release into the dissolution media. Three different commercial formulations were evaluated. The stability indicating assay was developed based on the drug stress study carried out under conditions like acid, alkaline, neutral, oxidative, thermal and UV light degradation. The separation was performed on a C18 reversed-phase column (250 mm x 4.0 mm; 5 µm particle size) with acetonitrile: water (60:40 v/v) as mobile phase at a flow rate of 1 mL/min with UV detection at 205 nm. The method validation presented acceptable limits for all parameters according to ICH and ANVISA. The proposed method was applied in tibolone capsules and showed satisfactory results in their quantitative analysis. In the tibolone capsules dissolution test the best profile was reached with 0,5 % sodium lauryl sulphate (SLS) in water as the dissolution media, paddle apparatus at 100 rpm and collection time at 45 minutes, where the percentage tibolone released was higher than 80% (Q = 75). The quantification was performed by HPLC at 205 nm. All validation parameters were considered satisfactory. Therefore, the developed methods are appropriate for quality control analysis, stability studies, dissolution tests and dissolution profile of capsules containing this drug.

Keywords: Tibolone. Capsules. High performance liquid chromatography. Method indicator of stability. Dissolution test.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C <sub>18</sub>	Sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilano
°C	graus Celsius
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
FDA	Food and Drug Administration
h	Horas
HPLC-MS	High-performance liquid chromatography - mass spectrometry
HSD	Desidrogenases
ICH	International Conference on Harmonization
INMETRO	Instituto Internacional de Metrologia
ISO	International Standard Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
L	Litros (s)
LSS	Lauril sulfato de sódio
mg	Miligramas
mm	Milímetros
min.	Minutos
mL	Mililitros
m/z	massa/carga
nm	Nanômetros
QqTOF	Quadrupolo por tempo de voo
r	Coefficiente de correlação linear
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotação por minuto
s	Desvio padrão
SERMs	Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio
TGI	Trato gastrointestinal
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	United States Pharmacopoeia
USP	Micrômetros
UV	Ultravioleta
VA	Valor de aceitação
v/v	Volume por volume

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Fórmula estrutural da tibolona.....	22
<b>Figura 2</b> - Tibolona e seus metabólitos.....	23
<b>Figura 3</b> - Cromatograma da solução padrão de tibolona a 10µg/mL.....	61
<b>Figura 4</b> - Cromatograma da solução padrão de trabalho 10 µg mL <sup>-1</sup> (a), solução de excipientes de cápsulas de tibolona (b) e solução de excipientes de comprimidos de tibolona.....	62
<b>Figura 5</b> - Curva de regressão linear obtida da média das três curvas de analítica.....	64
<b>Figura 6</b> - Cromatogramas das soluções de tibolona 10 µg mL <sup>-1</sup> submetidas as condições de degradação ácida, alcalina, oxidativa e cromatogramas das soluções branco.....	70
<b>Figura 7</b> - Cromatogramas obtidos por HPLC-QTOF/MS de soluções de tibolona 10 µg mL <sup>-1</sup> submetidas as condições de degradação neutra, por temperatura, fotodegradação e cromatogramas das soluções branco.....	71
<b>Figura 8</b> - Cromatogramas obtidos por HPLC-QTOF/MS de soluções de tibolona 10 µg mL <sup>-1</sup> submetidas as condições de degradação acida, alcalina, oxidativa e cromatogramas de massas das soluções branco.....	73
<b>Figura 9</b> - Cromatogramas de massas das soluções de tibolona 10 µg mL <sup>-1</sup> submetidas as condições de degradação neutra, fotodegradação, degradação por temperatura e cromatogramas de massas das soluções branco e do padrão de tiboona.....	74
<b>Figura 10</b> - Espectro de massas de alta resolução do produto de degradação gerado na degradação ácida de tibolona, onde (A) é o pico do produto de degradação gerado e (B) é o pico do padrão de tibolona.....	75
<b>Figura 11</b> - Espectro de massas do produto de degradação gerado na degradação ácida de tibolona, onde (A) é o pico do produto de	

degradação gerado e (B) é o pico de tibolona não totalmente degradado.....	76
<b>Figura 12</b> - Espectro de massas do produto de degradação gerado na fotodegradação de tibolona, onde (A) é o pico do produto de degradação gerado e (B) é o pico de tibolona não totalmente degradado.....	76
<b>Figura 13</b> - Perfil de dissolução de tibolona cápsulas empregando aparato 2, diferentes meios de dissolução (água, água + LSS 0,25% e água + LSS 0,50%) e velocidade de 100 rpm.....	79
<b>Figura 14</b> - Perfil de dissolução de tibolona cápsulas empregando aparato 1 e 2, meio de dissolução (água + LSS 0,5 %) e velocidade de 100 rpm.....	80
<b>Figura 15</b> - Perfil de dissolução de tibolona cápsulas empregando aparato 2, meio de dissolução (água + LSS 0,5%) e velocidades de agitação 50, 75 e 100 rpm.....	82
<b>Figura 16</b> - Cromatogramas da solução padrão de trabalho 5 µg/mL (a), solução da mistura de excipientes de cápsulas de tibolona (b) e solução das cápsulas vazias no meio de dissolução (c).....	83
<b>Figura 17</b> - Perfis de dissolução das formulações A, B e C, empregando aparato 2, meio de dissolução (água + LSS 0,5%) e velocidades de agitação 100 rpm.....	87
<b>Figura 18</b> - Cromatogramas obtidos por CLAE para o padrão de tibolona (A), formulação A (B), formulação B (C), formulação C (D), comprimido (E).....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Exatidão do método analítico para cápsulas e comprimidos de tibolona.....	48
<b>Tabela 2</b> - Variáveis e seus níveis usados em estudo de robustez, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner.....	49
<b>Tabela 3</b> - Condições testadas para o desenvolvimento do ensaio de dissolução de cápsulas contendo tibolona.....	53
<b>Tabela 4</b> - Variáveis e seus níveis usados em estudo de robustez do ensaio de dissolução, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner.....	57
<b>Tabela 5</b> - Índice de pureza dos picos cromatográficos correspondente ao tempo de retenção da tibolona, das amostras submetidas ao ensaio de degradação forçada.....	62
<b>Tabela 6</b> - Valores correspondentes à linearidade do método CLAE, utilizando fase móvel, com detecção em 205 nm.....	63
<b>Tabela 7</b> - Valores obtidos para avaliação da precisão do método de análise.....	65
<b>Tabela 8</b> - Valores médios de recuperação para tibolona nas amostras de cápsula, pelo método de análise.....	66
<b>Tabela 9</b> - Valores médios de recuperação para tibolona nas amostras de comprimidos, pelo método de análise.....	66
<b>Tabela 10</b> - Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner, para demonstrar robustez na análise da forma farmacêutica cápsulas.....	67
<b>Tabela 11</b> - Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner, para demonstrar robustez na análise da forma farmacêutica comprimidos.....	67
<b>Tabela 12</b> - Valores do teor de tibolona e parâmetros cromatográficos das amostras de cápsulas e comprimidos.....	69
<b>Tabela 13</b> - Valores experimentais obtidos no teste de solubilidade realizados com diferentes meios de dissolução.....	77

<b>Tabela 14</b> - Quantidade de tibolona dissolvida e desvio padrão nos ensaios de dissolução (n = 6) empregando diferentes meios (água, água + LSS 0,25% e água + LSS 0,5%), empregando aparato 2 e velocidade de 100 rpm, obtida em função do tempo.....	79
<b>Tabela 15</b> - Quantidade de tibolona dissolvida e desvio padrão nos ensaios de dissolução (n = 6) empregando meio (água + LSS 0,5%), aparato 1 e 2 e velocidade de agitação de 100 rpm, obtida em função do tempo.....	80
<b>Tabela 16</b> - Quantidade de tibolona dissolvida e desvio padrão nos ensaios de dissolução (n = 6) empregando meio (água + LSS 0,5%), aparato 2 e velocidades de agitação 50, 75 e 100 rpm, obtidas em função do tempo.....	81
<b>Tabela 17</b> - Estudo de estabilidade das soluções padrão e amostras do ensaio de dissolução.....	83
<b>Tabela 18</b> - Valores do teste de recuperação do ensaio de dissolução para cápsulas de tibolona.....	84
<b>Tabela 19</b> - Valores obtidos para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método de dissolução para cápsulas de tibolona.....	85
<b>Tabela 20</b> - Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner, para demonstrar robustez do método de dissolução da forma farmacêutica cápsulas.....	86
<b>Tabela 21</b> - Quantidade de tibolona dissolvida e desvio padrão das três formulações A, B e C, respectivamente, nos ensaios de dissolução (n = 6), empregando meio (água + LSS 0,5%), aparato 2 e velocidades de agitação 100 rpm, obtidas em função do tempo.....	87
<b>Tabela 22</b> - Valores de peso médio das cápsulas das farmácias magistrais codificadas em A, B e C, respectivamente, e dos comprimidos referência (Livial®).....	89
<b>Tabela 23</b> - Valores de teor de tibolona das amostras de cápsulas e comprimidos.	91
<b>Tabela 24</b> - Valores do teste de uniformidade para tibolona nas amostras de cápsulas das formulações A, B e C, respectivamente.....	92
<b>Tabela 25</b> - Valores do teste de uniformidade para cápsulas de tibolona da formulação B.....	93

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
3.1	Menopausa.....	19
3.2	Terapia de Reposição Hormonal.....	20
3.3	Tibolona .....	21
3.3.1	Farmacodinâmica e Farmacocinética.....	22
3.4	Estabilidade: Estudo de degradação ou teste de estresse.....	24
3.5	Metodologia analítica.....	26
3.6	Validação.....	27
3.7	Teste de dissolução.....	32
3.7.1	Fatores que interferem na dissolução, relacionados ao fármaco e formulação.....	34
3.7.2	Fatores que interferem na dissolução relacionados com o equipamento.....	35
3.7.3	Fatores que interferem na dissolução relacionados com o meio de dissolução.....	36
3.7.4	Fatores que interferem na dissolução relacionados com o meio ambiente.....	38
3.7.5	Fatores que interferem na dissolução relacionados com o método analítico.....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
4.1	Material.....	39
4.1.1	Amostras.....	39
4.1.2	Padrões.....	40
4.1.3	Reagentes.....	40
4.1.4	Equipamentos.....	40
4.2	Desenvolvimento de método cromatográfico indicador de estabilidade para quantificação de tibolona em cápsulas.....	41

4.2.1	Condições cromatográficas.....	41
4.2.2	Preparo da solução padrão.....	42
4.2.3	Preparo das soluções amostra.....	42
4.2.4	Preparo das soluções placebo.....	43
4.2.5	Estudo de degradação forçada.....	44
4.2.5.1	Identificação dos produtos de degradação.....	45
4.2.6	Validação do método.....	46
4.2.6.1	Seletividade.....	46
4.2.6.2	Linearidade.....	47
4.2.6.3	Precisão.....	47
4.2.6.4	Exatidão.....	47
4.2.6.5	Limite de quantificação e de detecção.....	48
4.2.6.6	Robustez.....	49
4.3	Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....	50
4.3.1	Preparo das soluções (ensaio de dissolução).....	50
4.3.2	Preparo dos meios de dissolução.....	50
4.3.3	Preparo das soluções padrão (ensaio de dissolução/ validação).....	51
4.3.4	Preparo das soluções amostras (ensaio de dissolução).....	51
4.3.5	Condições cromatográficas.....	52
4.3.6	Determinação das condições sink.....	52
4.3.7	Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....	53
4.3.8	Validação do ensaio de dissolução.....	54
4.3.8.1	Estabilidade.....	54
4.3.8.2	Seletividade.....	55
4.3.8.3	Linearidade.....	55
4.3.8.4	Exatidão e precisão.....	55
4.3.8.5	Limite de detecção e quantificação.....	56
4.3.8.6	Robustez.....	56
4.3.9	Ensaio de dissolução em formulações magistrais.....	58
4.4	Controle de Qualidade das cápsulas manipuladas de tibolona.....	58
4.4.1	Aspecto.....	58
4.4.2	Determinação do peso médio.....	58
4.4.3	Desintegração.....	59

4.4.4	Identificação.....	59
4.4.5	Teor do fármaco.....	59
4.4.6	Uniformidade de doses unitárias.....	60
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
5.1	Desenvolvimento de método cromatográfico indicador de estabilidade para quantificação de tibolona em cápsulas.....	61
5.1.1	Condições cromatográficas.....	61
5.1.2	Validação do método cromatográfico indicador de estabilidade.....	62
5.1.2.1	Seletividade.....	62
5.1.2.2	Linearidade.....	63
5.1.2.3	Precisão do método.....	65
5.1.2.4	Exatidão.....	65
5.1.2.5	Limite de quantificação e detecção.....	66
5.1.2.6	Robustez.....	67
5.1.3	Aplicação do método às formas farmacêuticas.....	68
5.1.4	Estudo de degradação.....	70
5.2	Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....	77
5.2.1	Condições sink.....	77
5.2.2	Otimização das condições do ensaio de dissolução.....	78
5.2.3	Validação do ensaio de dissolução.....	82
5.2.3.1	Estabilidade.....	82
5.2.3.2	Seletividade.....	83
5.2.3.3	Linearidade.....	84
5.2.3.4	Exatidão e precisão.....	84
5.2.3.5	Limite de quantificação e limite de detecção.....	85
5.2.3.6	Robustez.....	85
5.2.4	Ensaio de dissolução em formulações magistrais.....	87
5.3	Controle de Qualidade das cápsulas manipuladas de tibolona.....	89
5.3.1	Aspecto.....	89
5.3.2	Peso médio.....	89
5.3.3	Desintegração.....	90
5.3.4	Identificação.....	90

5.3.5	Teor do fármaco.....	91
5.3.6	Uniformidade de doses unitárias.....	91
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Qualidade e segurança na saúde pública formam um binômio a ser alcançado, sendo mantido independente de fatores econômicos, operacionais e/ou regionais. O medicamento se configura como um instrumento fundamental para a garantia do direito de acesso à saúde. Nesta vertente surge o medicamento manipulado em farmácias, e sua qualidade deve ser assegurada pelos estabelecimentos produtores como um direito de todos os consumidores (BERTOLLO, 2008).

No Brasil, a opção por fórmulas manipuladas vem crescendo, como alternativa aos medicamentos industrializados, uma vez que o medicamento manipulado é individualizado, de custo reduzido em relação aos medicamentos industrializados e via de regra, apresenta qualidade (BATISTUZZO, ITAYA, ETO, 2002).

O termo “controle de qualidade” abrange todos os princípios que devem ser seguidos pelos fabricantes e autoridades governamentais para garantir a qualidade dos medicamentos. Dentre os objetivos do controle de qualidade está a obtenção de medicamentos cada vez melhores, mais eficazes e seguros, menos tóxicos e mais estáveis (BERNARDES, MUELLER, GEBARA, 2010)

Para garantir a qualidade dos produtos manipulados é necessário que as farmácias cumpram as determinações propostas pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), sendo que as últimas obrigatoriedades estão definidas pela RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 87, de 21 de novembro de 2008 (BRASIL, 2008), a qual deu novas alterações a RDC nº 67 (BRASIL, 2007), referentes às Boas Práticas de Manipulação em Farmácias. Há uma preocupação dos órgãos de vigilância no sentido de estabelecer normas de qualidade para os produtos manipulados, uma vez que não são raros os casos de erros importantes, observados nos medicamentos manipulados, inclusive com óbitos (FERRAZ et al., 2008). O controle de qualidade realizado nas farmácias de manipulação e homeopáticas é, portanto, de suma importância para assegurar a qualidade microbiológica e físico-química das matérias-

primas e produtos acabados, garantindo eficácia, segurança e credibilidade dos medicamentos dispensados à população (MARTINELLI et al., 2005).

Na avaliação da qualidade de medicamentos são considerados vários parâmetros, como o conteúdo do ativo dentro dos limites experimentais; uniformidade do conteúdo de cada dose; ausência de contaminantes, manutenção da potência, eficácia terapêutica e aspecto até o momento do uso e liberação do fármaco com máxima biodisponibilidade. Os desvios da qualidade de medicamentos estão relacionados principalmente com: (1) o teor de ativo que, em excesso, pode levar a óbito e, em quantidade insuficiente, à ineficácia terapêutica, (2) a qualidade da matéria-prima, que depende do grau de pureza e de suas características físicas e físico-químicas especificadas, (3) a heterogeneidade de conteúdo, levando à acentuada divergência na quantidade de fármaco que pode ser aumentada ou diminuída dependendo de fatores como qualidade da matéria-prima, formulação e processo de fabricação do medicamento (GIANOTTO et al., 2008).

A tibolona é um fármaco amplamente utilizado em todo o mundo para o tratamento dos sintomas do climatério, para aumentar a libido, diminuir a atrofia vaginal e prevenir a perda de massa óssea. Foi registrada em 90 países para o tratamento de sintomas do climatério, e em 45 países para a prevenção da osteoporose (KENEMANS, SPEROFF, 2005).

Em compêndios oficiais não foi encontrada monografia para análise de tibolona em cápsulas. A literatura registra monografia para análise de matéria-prima e comprimidos de tibolona, e também, artigos que analisam o teor deste fármaco em cápsulas, comprimidos e em matrizes biológicas, porém nenhum apresenta estudos da tibolona frente a possíveis produtos de degradação (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011; BLOM et al., 2006; DROGE et al., 2007; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; FEKETE, FEKETE, GANZLER, 2009; JADHAV et al., 2009; GOOYER et al., 2003; PENNING et al., 2010; ROSA, TOLOTTI, 2012; STECKELBROECK et al., 2006; VERHEUL et al., 2007; VERHOEVEN, VOS, DELBRESSINE, 2002; ZACHARIA et al., 2006; ZUO et al., 2005). Face ao exposto, levanta-se o questionamento sobre a estabilidade deste fármaco, que em função de algum fator como umidade, presença de

luz, oxigênio e calor, possa apresentar-se instável e gerar produto de degradação, resultando em efeitos indesejados como a perda ou diminuição da potência do medicamento, geração de efeitos colaterais, ou mesmo tóxicos, comprometendo a qualidade e eficácia do medicamento manipulado.

Dessa forma, desenvolver e validar um método indicador de estabilidade para análise de tibolona matéria-prima e produto acabado cápsulas, quantificando este fármaco na presença de produtos de degradação é de grande relevância, para que não conformidades sejam detectadas a tempo de se tomarem medidas corretivas antes que as mesmas acarretem riscos para o paciente. Assim como, realizar o estudo do perfil de dissolução da forma farmacêutica cápsula, visando a padronização do teste de dissolução para ser aplicado na rotina em laboratórios de controle de qualidade, constituem interesse deste trabalho.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento e validação de método analítico indicador de estabilidade para determinação de tibolona em cápsulas, bem como desenvolver e validar um ensaio de dissolução, visando aplicação nas análises de rotina no controle de qualidade.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realizar análise qualitativa de tibolona cápsulas pelos métodos tradicionais de controle de qualidade como: aspecto, peso médio, desintegração, identificação, teor de fármaco e uniformidade de doses unitárias.

Desenvolver e validar método analítico indicador de estabilidade para a determinação quantitativa de tibolona na forma farmacêutica cápsulas, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência.

Submeter o fármaco à condições de degradação forçada, envolvendo hidrólise ácida, alcalina, neutra, oxidação, calor e fotólise.

Desenvolver e validar ensaio de dissolução e avaliar o comportamento do fármaco pelo perfil de dissolução de cápsulas.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Menopausa

A menopausa é um processo biológico que ocorre como parte do envelhecimento na mulher. O aumento da expectativa de vida e a diminuição da mortalidade têm contribuído para o envelhecimento global da população, havendo uma percentagem cada vez maior da população feminina que se encontra em pós-menopausa (CAVADAS et al., 2010).

Atualmente, a expectativa de vida da mulher brasileira é de 72 anos. Estima-se, assim, que as mulheres permaneçam aproximadamente um terço de suas vidas em estado de deficiência hormonal. Essas modificações, caracterizadas pela deficiência hormonal, são acompanhadas de alterações fisiológicas e comportamentais. Alterações fisiológicas como onda de calor, suores noturnos, atrofia urogenital (incontinência urinária, dispareunia), e patologias como osteoporose e doenças cardiovasculares podem interferir na qualidade de vida da mulher. Alterações comportamentais referem-se às mudanças de humor, depressão, irritabilidade e insônia (ZAHAR, 2005).

Nas varias opções terapêuticas para a pós-menopausa, a tibolona, um esteróide sintético 19-nor derivado do noretinodrel, estruturalmente diferente do estradiol e dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs), é considerada uma opção de grande valor, sendo um composto de ação tecidual específica com efeitos favoráveis em diversos órgãos, sem estimulação dos tecidos mamário e endometrial. Possui ação específica para os tecidos, distinguindo-se das terapêuticas hormonais de substituição convencionais (CARVALHO et al., 2010).

Aliando o alívio sintomatológico à estabilidade endometrial, o uso da tibolona parece representar alternativa atraente em TRH (Terapia de Reposição Hormonal) em mulheres na pós-menopausa.

### 3.2 Terapia de Reposição Hormonal

A partir de 1960, o segmento mais velho da população dos países desenvolvidos tem crescido mais rapidamente que o mais jovem. Com o aumento da expectativa de vida da população mundial, esse fenômeno não será apenas dos países ricos. À medida que a população envelhece, procuram-se criar terapias para melhoria da qualidade de vida em idades mais avançadas (CARLONI, 2007).

O Tratamento Hormonal foi instituído na primeira metade do século passado com a denominação de reposição ou substituição hormonal, ganhando a adesão de médicos e mulheres (HALBE, CUNHA, 2010). Embora a deficiência hormonal ocasionada pela menopausa seja tratável, menos de 20% das mulheres pós-menopáusicas recebem estrogênio. A TRH, embora não totalmente desprovida de riscos, surgiu com o propósito de aliviar sintomas, de agir preventivamente e reduzir assim o aparecimento de doenças, como as cardiovasculares e a osteoporose. Dois aspectos muito importantes são as profilaxias da perda óssea e a atenuação dos sintomas vasomotores, que são efeitos benéficos comprovados deste tratamento (GRINGS, 2009).

Milhões de mulheres são tratadas com terapia hormonal na menopausa para alívio da sintomatologia da menopausa, incluindo sintomas vasomotores “fogachos” com sudorese intensa, nos quais o estrógeno é indiscutivelmente a terapêutica mais eficiente (PARDINI, 2007). Um problema de saúde que ocorre durante a menopausa é a osteoporose, uma doença sistêmica caracterizada pela baixa massa óssea e deterioração da micro arquitetura do tecido ósseo. Conseqüentemente, existe um aumento na fragilidade do osso e suscetibilidade à fratura, que é considerada o efeito clínico mais importante deste processo (FROES, PEREIRA, NEGRELLI, 2002).

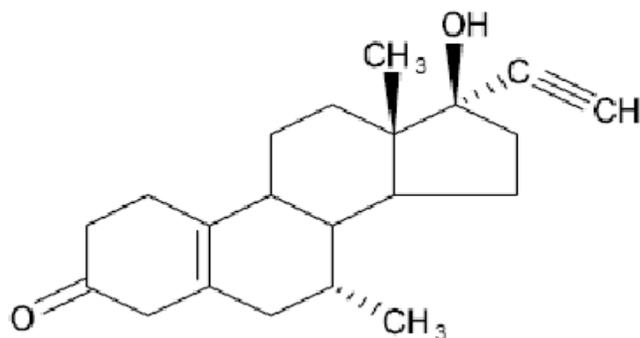
O alívio da sintomatologia na menopausa tem sido há tempos atribuído à terapêutica de reposição hormonal no climatério, propiciando melhora significativa na qualidade de vida das mulheres nesse período. Dessa forma, aliando-se o alívio sintomatológico, prevenção à osteoporose e a estabilidade endometrial, o uso da

tibolona, hormônio esteróide sintético, é uma das opções de terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa.

### 3.3 Tibolona

A tibolona, 7-alfa-metil-17-alfa-etinilestradiol (Figura 1) é um esteroide sintético utilizado na terapia de reposição hormonal com propriedades estrogênicas, progestogênicas e androgênicas. Apresenta-se na forma de pó cristalino ou cristal branco ou quase branco. Sua fórmula molecular é  $C_{21}H_{28}O_2$ . Seu peso molecular é 312,5. Praticamente insolúvel em água, solúvel em acetona e em metanol. Apresenta polimorfismo (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; BLOM, 2006). É classificado como regulador seletivo da atividade estrogênica tecidual e usado em mais de 90 países para o tratamento de sintomas da menopausa. É um composto tecido-seletivo que tem efeitos favoráveis no osso, na vagina, em sintomas do climatério, no humor e bem-estar sexual das mulheres na pós-menopausa, e não causa estimulação estrogênica no endométrio e na mama, o que sugere uma diminuição no risco de câncer de mama e câncer de endométrio, ao contrário dos outros tipos de hormônios (RENOUX, 2008; HENRIQUES et al., 2010). É indicada no tratamento dos sintomas resultantes da deficiência estrogênica em mulheres pós-menopausadas e na prevenção da osteoporose em estados de deficiência estrogênica (BRASIL, 2012b).

Este fármaco é um pró-fármaco que é metabolizado em componentes que ativam receptores nucleares de androgênios e progestogênios que, por sua vez, modificam os níveis de receptores e o metabolismo estrogênico. Estudos realizados com animais demonstraram que este fármaco possui uma atividade estrogênica quinze vezes menor que o etinilestradiol, atividade progesterônica oito vezes inferior à noretisterona e um terço da atividade androgênica desta última (CARLONI, 2007).



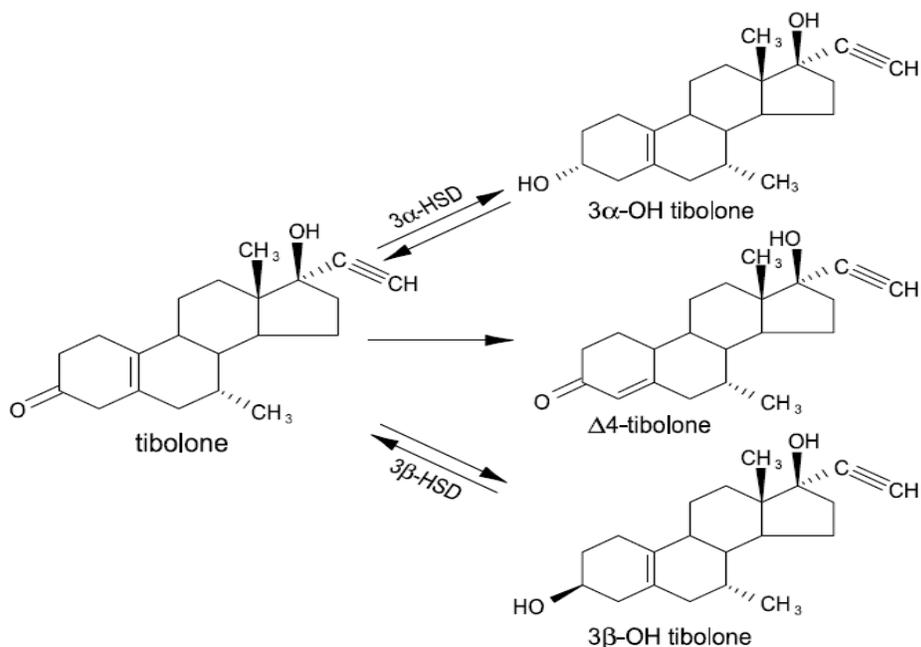
**Figura 1.** Fórmula estrutural da tibolona (ZACHARIA, 2006).

### 3.3.1 Farmacodinâmica e farmacocinética

Após a administração oral, a tibolona é rapidamente metabolizada em 3 $\alpha$  e 3 $\beta$ -hidroxitibolona, pela ação das 3 $\alpha$  e 3 $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenases (HSD) hepática e intestinal. Ambos os hidroximetabólitos da fase I têm uma meia-vida de aproximadamente sete horas e sua concentração plasmática máxima ultrapassa a tibolona em dez vezes, sendo que o metabólito 3 $\alpha$ -hidroxi apresenta uma concentração quatro vezes maior que o metabólito 3 $\beta$ . Estes dois metabólitos são responsáveis pela ação estrogênica da tibolona. Um terceiro metabólito, o isômero  $\Delta$ 4 é formado diretamente da tibolona pela atividade da 3 $\beta$ -HSD isomerase, sendo o metabólito 3 $\beta$ -hidroxi um substrato potencial. Esse isômero está presente por apenas seis horas na circulação, já que é rapidamente removido dela (SILVA et al., 2010). A Figura 2 demonstra a tibolona e seus três metabólitos.

O mecanismo de ação da tibolona no alívio dos sintomas da menopausa pode estar relacionado ao aumento secretório das betas-endorfinas e betas-lipoproteínas plasmáticas. Os níveis circulantes de ambos peptídeos são normalmente mais baixos em mulheres pós-menopausadas com relação às mulheres férteis, e os aumentos das

concentrações plasmáticas induzidas pela tibolona estão correlacionados ao alívio dos fogachos e outros sintomas menopausais. A tibolona parece tão efetiva quanto os estrogênios conjugados na restauração dos níveis circulantes de beta-endorfina e beta-lipoproteína em pacientes pós-menopausadas (BRASIL, 2012a).



**Figura 2.** Tibolona e seus metabólitos (ZACHARIA, 2006)

A conversão metabólica da tibolona ocorre principalmente no fígado e intestino. Os metabólitos ativos exercem efeito muito fraco sobre as enzimas do citocromo P<sub>450</sub>, não se observando interação do uso concomitante com outros fármacos. Os metabólitos da tibolona exercem diferentes atividades dependendo do tecido/órgão alvo envolvido. Assim, uma atividade estrogênica é observada nos ossos, vagina e cérebro, mas não no endométrio e mama. Este perfil clínico indica uma ação tecidual específica da tibolona. Diferente de outros moduladores seletivos dos receptores estrogênicos (SERMs), a tibolona ou seus metabólitos não exercem atividade anti-estrogênica, responsável esta pela piora dos sintomas vasomotores e pela incapacidade de melhorar o trofismo do epitélio vaginal, observada quando se administra um SERM (BRASIL, 2012a).

A meia-vida dos metabólitos predominantes na circulação ( $3\alpha$ -OH e  $3\beta$ -OH metabólitos) é cerca de 7 – 8 horas, enquanto que o  $\Delta$ 4-isômero é apenas detectado na circulação nas 2 primeiras horas após a ingestão do fármaco. Os metabólitos são excretados na bile e eliminados predominantemente pelas fezes. Uma pequena quantidade é excretada na urina. A sua meia-vida de eliminação é de aproximadamente 45 horas (BRASIL, 2012a).

### **3.4 Estabilidade: Estudo de degradação forçada ou teste de estresse**

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado àquele que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (SILVA et. al, 2009).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, além de fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005a).

Testes de degradação forçada ou teste de estresse são realizados para demonstrar a seletividade no desenvolvimento do método indicador de estabilidade, principalmente quando há pouca informação disponível quanto ao potencial dos possíveis produtos de degradação formados (REYNOLDS et al., 2002).

O teste de estresse é definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas. Este teste mostra-se como uma tendência

dentro do planejamento para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente melhorarão a integridade do fármaco e do produto (SILVA et al., 2009).

Estudos de degradação térmica, decomposição por hidrólise, decomposição oxidativa e fotólise estão entre os testes aos quais os fármacos e produtos farmacêuticos podem ser submetidos nos ensaios de estresse (REYNOLDS et al., 2002).

A água é considerada como um dos principais catalisadores em reações de degradação. Muitos fármacos são considerados como instáveis nesse meio e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia e sua estabilidade e 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 (SILVA et al., 2009).

A degradação oxidativa é uma das causas de instabilidade, afetando vários tipos de fármacos como os aldeídos, alcoóis, fenóis, açúcares, alcalóides, óleos e gorduras insaturadas, onde muitas modificações ocorrem espontaneamente sob influência do oxigênio atmosférico, sendo estas reações lentas, inicialmente, mas vão sendo cada vez mais rápidas ao longo do tempo (POMBAL, BARATA, OLIVEIRA, 2010).

O estudo de fotoestabilidade se propõe a observar a absorção de radiação pela substância ativa. Praticamente todas as substâncias terapeuticamente ativas, são capazes de absorver radiações eletromagnéticas. A radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo a degradação da molécula. Desta forma, é importante conhecer a fotoestabilidade dos fármacos empregados na fabricação de medicamentos e os produtos formados devido à fotólise, além de avaliar a toxicidade destes últimos (POMBAL, BARATA, OLIVEIRA, 2010; LEITE, 2005).

A análise térmica é a mais importante dentre os fatores analisados envolvidos na degradação de produtos farmacêuticos, uma vez que, na maioria dos casos, a

velocidade de degradação química aumenta com o aumento da temperatura e não existe um acondicionamento capaz de protegê-los dos efeitos do calor (LEITE, 2005).

### **3.5 Metodologia analítica**

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica. Deve-se permitir a detecção e a quantificação do fármaco – isolado ou em formulação- na presença de possíveis produtos de degradação e em produtos de interação (princípio ativo/ excipiente). Alguns fatores devem ser levados em consideração como: o tempo de análise, custo, viabilidade e facilidade de execução do método (LEITE, 2005; VALENTINI, SOMMER, MATIOLI, 2007).

Milhões de medições analíticas são efetuadas a cada dia em milhares de laboratórios ao redor do mundo. Uma forte infra-estrutura internacional de medições está sendo implementada e, verifica-se a necessidade progressiva de dados analíticos comparáveis e consistentes para a eliminação de barreiras técnicas entre os países. Para atingir esse processo de conhecimento mútuo a nível internacional, em que uma vez efetuada a medição esta é aceita em qualquer país, requisitos legais de certificação e credenciamento devem ser observados (BARROS, 2002; ICH, 2005).

Todo trabalho analítico deve ser adequadamente planejado. Um plano destes pode ser, em sua forma mais básica, simplesmente uma entrada em um caderno de anotações. Planos mais detalhados deverão ser apropriados para as tarefas maiores e mais complicadas. Para trabalho realizado segundo as Boas Práticas de Laboratórios, há um requisito específico de que o trabalho seja realizado segundo planos de estudo documentados (BRASIL, 2005).

Um método indicador de estabilidade é um método analítico validado que mede de forma precisa o princípio ativo, tanto para matéria-prima quanto para o produto

acabado, de forma seletiva em relação às impurezas, excipientes e produtos de degradação (FDA, 2000).

Métodos de análise têm certos atributos como exatidão, precisão, especificidade, sensibilidade, e todos devem ser considerados ao selecionar um que seja apropriado para uma situação específica. Nem sempre é possível ou mesmo desejável otimizar todos estes atributos simultaneamente. De forma resumida, o analista deve avaliar toda a informação disponível e decidir considerando o nível de incerteza aceitável (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010; BRASIL, 2003).

### **3.6 Validação**

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação (RIBEIRO et al., 2008).

É cada vez mais reconhecida e exigida a necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer o processo de validação (RIBANI et al., 2004).

Para assegurar a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados de um método analítico devem ser seguidas todas as etapas necessárias do processo de validação. A validação de um método desenvolvido, ou mesmo, a validação de modificações de ajuste de métodos já publicados, mesmo os oficiais, envolve uma

etapa crítica que é o julgamento do nível de validação necessário conforme o objetivo a que se destina o método analítico.

O conceito do termo validação era utilizado em análises na química analítica inorgânica, a fim de assegurar dados confiáveis de serem utilizados na descoberta, desenvolvimento e fabricação de produtos farmacêuticos. Atualmente, os dados analíticos também são usados na seleção de fármacos em potencial, no desenvolvimento de sua síntese, nos estudos de formulações, no monitoramento da estabilidade de fármacos e nos testes de produtos acabados para comercialização (VALENTINI, SOMMER, MATIOLI, 2004).

Validar um método analítico é demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica e tem recebido considerável atenção na literatura. A determinação das características de desempenho do método é somente uma parte do processo e os critérios de aceitação são baseados no uso intencional do método. É recomendado que o planejamento e a execução da validação de método siga um plano mestre de validação (BARROS, 2002).

A validação de métodos analíticos comprova, através de evidências objetivas que requisitos para uma determinada aplicação ou uso específico são atendidos. Pode ser definida como o processo que confere validade a um método analítico, instrumento ou equipamento, cujas especificações são aceitas como corretas, conferindo confiabilidade aos resultados obtidos (SILVA, ALVES, 2006).

Estabelecer um bom procedimento de validação requer a realização de um número adequado de análises, sem perder a qualidade das estimativas, o que é um desafio na rotina de um laboratório devido às restrições de tempo, custo e potencial instrumental (RIBEIRO et al., 2008).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos regulatórios do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece

às exigências regulatórias evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004; BRASIL, 2003).

A validação do método analítico deve ser documentada e os procedimentos devem ser claros, objetivos e completos. A documentação consiste do plano mestre, protocolo, planilhas de dados e relatório. O plano mestre de validação é o documento estratégico e contém o cronograma de atividades e responsabilidades pelo desempenho das tarefas inclusive elaboração, revisão e aprovação dos documentos (BARROS, 2002).

Órgãos como ICH (International Conference on Harmonization), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), ISO (International Standard Organization), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Internacional de Metrologia) e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para a qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (ICH, 2005; INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 1999; BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

Não há um procedimento normalizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação. É importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO. Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, como a Resolução RE nº 899, de 29/05/2003 da ANVISA e o documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO, (revisão 3), de fevereiro/2010 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010; RIBANI et al., 2004).

A Resolução RE nº 899, de 29/05/2003 determina que a validação deva garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e detecção e exatidão adequados à análise (BRASIL, 2003).

Os parâmetros citados anteriormente são definidos abaixo:

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

**Linearidade:** É a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

**Intervalo:** O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

**Precisão:** A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

- Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.
- Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.
- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias. Estes dados não precisam ser apresentados

para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

**Limite de Quantificação:** É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, percentagem p/p ou p/v, parte por milhão) na amostra (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

**Exatidão:** A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

**Robustez:** A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. Se um método será usado na análise qualitativa em nível de traços, por exemplo, não há necessidade de testar e validar a linearidade do método sobre toda a faixa linear dinâmica do equipamento (BRASIL, 2003; RIBANI et. al, 2004).

### 3.7 Teste de dissolução

A dissolução pode ser definida como a transferência de moléculas ou íons de um estado sólido para a solução. Os fármacos sólidos precisam ser dissolvidos para que possam ser absorvidos. Uma vez que o fármaco tenha passado com êxito para o estado de solução, encontra-se disponível para ser absorvido (AULTON, 2005).

O teste de dissolução possibilita determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas. O resultado é expresso em porcentagem da quantidade declarada no rótulo. O teste se destina a demonstrar se o produto atende às exigências constantes na monografia do medicamento em comprimidos, cápsulas e outros casos em que o teste seja requerido (BRASIL, 2013).

A solubilidade intrínseca de um fármaco desempenha importante papel na sua dissolução a partir de uma forma farmacêutica sólida. Logo, torna-se fundamental conhecer a solubilidade do mesmo em diferentes solventes, de modo a selecionar meios de dissolução adequados para as formulações que o contenham (SILVA, VOLPATO, 2002).

Testes de dissolução *in vitro* constituem um dos instrumentos essenciais para a avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações. Eles fornecem também informações úteis tanto para a Pesquisa e Desenvolvimento, como para a produção e controle de qualidade. No desenvolvimento farmacotécnico, os testes de dissolução permitem a avaliação de novas formulações, verificação da estabilidade e possibilitam estudos de correlação *in vitro* – *in vivo* (MALESUIK et al., 2006).

Durante a fase de produção e controle de qualidade os testes de dissolução permitem detectar desvios de fabricação, de uniformidade do produto e de reprodutibilidade lote a lote (MALESUIK et al., 2006).

O ensaio de dissolução nada mais é do que um teste físico de natureza destrutiva, no qual o fármaco passa para a forma solúvel a partir da forma farmacêutica

intacta ou de seus fragmentos e partículas formados durante o teste, no caso de cápsulas e comprimidos (MARCOLONGO, 2003).

Com os avanços da tecnologia e das pesquisas envolvendo liberação de fármacos, modernização dos testes e mais ênfase na previsibilidade de efeitos terapêuticos por meio de testes *in vitro*, os testes de dissolução têm ganhado cada vez mais popularidade. Apesar de terem sido introduzidos inicialmente como uma forma de caracterizar o perfil de liberação de fármacos pouco solúveis, atualmente os testes de dissolução fazem parte das monografias de quase todas as formas farmacêuticas sólidas.

No Brasil os ensaios de dissolução passaram a ser exigidos para o registro de medicamentos a partir de 1999, com a introdução dos medicamentos genéricos. Nesse sentido, torna-se interessante revisar e discutir os aspectos técnico-científicos e regulatórios relativos a esses ensaios como forma de avaliar o “estado de arte” de tão importante ensaio *in vitro* na área de Ciências Farmacêuticas (MARCOLONGO, 2003).

A taxa de dissolução de um fármaco a partir do estado sólido é definida como a quantidade do fármaco que passa para o estado de solução, por unidade de tempo, sob interface líquido/sólido, temperatura e composição do solvente padronizado. Em biofarmacotécnica, taxa de dissolução normalmente se refere à taxa pelo qual um fármaco se dissolve a partir de uma forma farmacêutica intacta ou seus fragmentos e partículas formados durante o teste. Os termos solubilização ou taxa de dissolução podem ser usados com o mesmo significado, embora a maioria dos autores prefira o último (BANAKAR, 1992).

O sistema de classificação biofarmacêutica, proposto por Gordon Amidon e colaboradores em 1995, assume que tanto a solubilidade quanto a permeabilidade são parâmetros chaves que controlam a absorção dos fármacos. Os fármacos são então subdivididos em quatro categorias:

- Classe I: fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade
- Classe II: fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade
- Classe III: fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade
- Classe IV: fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade

Utilizando essa classificação é possível identificar formulações cuja biodisponibilidade seja insensível a mudanças na formulação (MARCOLONGO, 2003).

Inúmeras são as variáveis que podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução. Todas devem ser consideradas, mas algumas devem ser rigorosamente monitoradas para obtenção de resultados confiáveis. Vários fatores mencionados a seguir são interdependentes, o que faz com que sua análise seja bastante complexa (MARCOLONGO, 2003).

### **3.7.1 Fatores que interferem na dissolução, relacionados ao fármaco e formulação**

Entre fatores que interferem na dissolução, relacionados ao fármaco e formulação tem-se a solubilidade, tamanho da partícula, natureza química, excipientes e natureza química os quais estão descritos abaixo.

**Solubilidade:** É um parâmetro termodinâmico que representa a concentração da solução de um fármaco em equilíbrio com o soluto. É o fator que mais afeta a velocidade de dissolução (MARCOLONGO, 2003).

**Tamanho de partícula:** Um fármaco dissolverá mais rapidamente quanto maior for a sua área de superfície, ou seja, quanto menor for o tamanho de suas partículas. Por essa razão muitos fármacos se encontram micronizados, de forma a facilitar sua dissolução e, conseqüentemente, sua absorção (MARCOLONGO, 2003).

**Natureza química:** Estado amorfo, cristalino e a existência de polimorfos (cristais com arranjos espaciais diferenciados que apresentam diferentes propriedades físicas). Geralmente, substâncias amorfas são mais solúveis que as cristalinas, assim como substâncias anidras são mais solúveis que as hidratadas do mesmo fármaco (GIBALDI, 1991).

**Forma farmacêutica:** Cápsulas de gelatina, de modo geral, rompem-se rapidamente expondo seus conteúdos aos líquidos do TGI, mas a tecnologia de fabricação e os diluentes presentes na formulação podem fazer com que a dissolução

não ocorra tão rapidamente quanto o esperado. A dissolução de comprimido depende, primariamente, da desintegração do comprimido e dos grânulos (GIBALDI, 1991).

Excipientes: Praticamente todos os excipientes envolvidos na formulação exercem alguma influência na dissolução, seja ela negativa ou positiva. Lubrificantes insolúveis, por exemplo, retardam o processo de dissolução, assim como a utilização de goma na granulação úmida (conforme aumenta a concentração utilizada, diminui a dissolução). A utilização de polímeros hidrossolúveis e gelatina como aglutinantes tem mostrado um aumento nas taxas de dissolução de fármacos pouco solúveis (GIBALDI, 1991). Outro fator a ser considerado é a adsorção do fármaco à componentes da formulação (BANAKAR, 1992).

Tecnologia de fabricação: O tipo de granulação utilizada, via seca ou via úmida, tem impacto significativo na dissolução. De modo geral, a granulação úmida favorece a dissolução de fármacos pouco solúveis por conferir a ele características mais hidrofílicas. A força de compressão é uma variável complexa que pode afetar a dissolução de diferentes formas. Quando as partículas tendem a se aglutinar durante o processo de compressão, a dissolução pode diminuir. Por outro lado, quando as partículas não se aglutinam, a taxa de dissolução tende a aumentar (MARCOLONGO, 2003).

### **3.7.2 Fatores que interferem na dissolução, relacionados com o equipamento**

Entre relação aos equipamentos, tem-se como fatores interferentes na dissolução a utilização dos aparatos, geometria do sistema, vibração do sistema, velocidade de agitação, posição da haste, posição e método de amostragem e dispositivos para formas farmacêuticas que flutuam os quais estão descritos abaixo.

Aparatos (pá e cesto): É reconhecido que os aparatos oferecem condições de trabalho diferentes dependendo do seu mecanismo (BANAKAR, 1992).

Geometria do sistema: O eixo do elemento de rotação (cesta ou pá) deve coincidir em todos os pontos com o eixo central da cuba, sendo permitido no máximo

um desvio de 2 mm. O ideal é que as hastes rodem sem excentricidade (MARCOLONGO, 2003).

Vibração do sistema: O ideal é que não haja nenhuma vibração, uma vez que ela pode alterar o fluxo laminar e introduzir energia dinâmica indesejável, o que, eventualmente, pode causar mudanças significativas na cinética de dissolução de alguns produtos (MARCOLONGO, 2003).

Velocidade de agitação: A taxa de dissolução é diretamente afetada pela velocidade de agitação, uma vez que a espessura da camada de difusão é inversamente proporcional à velocidade de agitação (BANAKAR, 1992).

Posição da haste: Devem ser observadas as especificações farmacopéias para posicionamento das hastes dentro da cuba, obedecendo-se os limites estabelecidos, já que o mau alinhamento pode causar distúrbios tão significativos no fluxo, que a taxa de dissolução pode variar em 25% de teste para teste (BANAKAR, 1992).

Posição e método de amostragem: a posição de amostragem pode interferir em maior ou menor grau nos resultados da dissolução dependendo do tamanho das partículas de desintegração do produto e da diferença de densidade entre as partículas e o meio de dissolução (MARCOLONGO, 2003).

Dispositivos para formas farmacêuticas que flutuam: é permitido o uso de um dispositivo para auxiliar que formas farmacêuticas que tendem a flutuar permaneçam no fundo da cuba de dissolução. Normalmente essas peças são de aço inoxidável (MARCOLONGO, 2003).

### **3.7.3 Fatores que interferem na dissolução, relacionados com o meio de dissolução**

Entre fatores que interferem na dissolução, relacionados com o meio de dissolução tem-se o volume, presença de ar ou gases, pH, evaporação do meio, temperatura, viscosidade e tensoativo os quais estão descritos abaixo.

Volume: o volume apropriado do meio de dissolução depende principalmente da solubilidade do fármaco. De forma a minimizar os efeitos de gradiente de concentração e manter as condições *sink*, a concentração do fármaco não deve exceder 10-15% da sua solubilidade máxima no meio selecionado (MARCOLONGO, 2003).

Presença de ar ou gases: pode gerar vários problemas. Podem afetar o pH e impedir o fluxo adequado do meio de dissolução, provocar mudanças no movimento das partículas e diminuir o contato entre o líquido e o sólido. O meio pode ser devidamente desaerado/desgasificado por aquecimento a 45 °C seguido por filtração a vácuo, por sonicação a 37°C, por ebulição seguida de esfriamento da água ou por borbulhamento de gás hélio no meio (MARCOLONGO, 2003).

pH: o pH no trato gastrintestinal varia entre 1,0 e 7,8. Dessa forma a escolha do pH do meio deve considerar principalmente o tipo de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica e o sítio de absorção do meio (MARCOLONGO, 2003).

Evaporação do meio: pode ser minimizada aquecendo-se o meio a 37 °C antes de introduzi-lo na cuba de dissolução (MARCOLONGO, 2003).

Temperatura: normalmente temperaturas elevadas favorecem a dissolução e a solubilidade do fármaco, dessa forma, recomenda-se que a temperatura do teste seja monitorada (MARCOLONGO, 2003).

Viscosidade: de modo geral, quanto maior for a viscosidade do meio, mais lenta será a dissolução, uma vez que as moléculas dissolvidas têm seu trânsito dificultado pela viscosidade (BANAKAR, 1992).

Tensoativo: pode ser usado quando se deseja aumentar a solubilidade para fármacos de classe II, como a tibolona. Os tensoativos diminuem a tensão superficial entre o sólido e o meio de dissolução favorecendo a dissolução, e podem ser utilizados mesmo abaixo da concentração micelar crítica (MARCOLONGO 2003).

#### **3.7.4 Fatores que interferem na dissolução, relacionados com o meio ambiente**

Um fator que influencia na dissolução e está relacionado ao meio ambiente é a condição de estocagem, pois durante a estocagem o produto pode passar por mudanças nas suas características físico-químicas que podem de alguma forma, afetar o seu desempenho *in vitro* e *in vivo*. Outro aspecto muito importante é a embalagem, que deve proteger o produto da melhor forma possível (MARCOLONGO 2003).

#### **3.7.5 Fatores que interferem na dissolução, relacionados com o método analítico**

O método de filtração e o método analítico são dois fatores que influenciam a dissolução, pois os filtros utilizados não devem adsorver o fármaco, nem liberar partículas de material para a solução e o método analítico deve estar validado para o procedimento (MARCOLONGO, 2003).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Amostras

Foram utilizadas cápsulas de tibolona 2,5 mg manipuladas, provenientes de três diferentes farmácias magistrais, denominadas formulações A, B, e C, respectivamente.

- Formulação A:  
Validade: 24/03/2013
- Formulação B:  
Validade: 24/03/2013
- Formulação C:  
Validade: 22/04/2013

Também foi utilizado o Medicamento de referência Livial 2,5 mg, na forma farmacêutica comprimidos, proveniente do Laboratório Schering-Plough, Lote: 26807, Fabricação em 06/2011 e Validade em 06/2013.

#### **4.1.2 Padrões**

Empregou-se tibolona matéria-prima como padrão de trabalho (Genix, lote 20110901B, validade 09/09/13) que foi validada a partir de padrão primário (British Pharmacopeia, lote 3053 (vigente), teor 99,2%).

#### **4.1.3 Reagentes**

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- Água ultra-pura, sistema Millipore Milli-Q;
- Acetonitrila grau cromatográfico, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e Proquimios (Bangu, RJ, Brasil);
- Metanol grau cromatográfico, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Hidróxido de sódio, ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio grau P. A., Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico, lauril sulfato de sódio, ácido acético (Vetec, RJ, Brasil); acetato de sódio (Proquimios, RJ, Brasil).

#### **4.1.4 Equipamentos**

Os equipamentos que foram utilizados nos experimentos, estão descritos a seguir:

- Aparelho de ultrassom Unique, modelo USC 2800 A (Indaiatuba, SP, Brasil);
- Balança analítica Marte, modelo AY220 (Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil);

- Bomba de vácuo Nova técnica, modelo NT 613 (Diadema, SP, Brasil);
- Câmara de fotoestabilidade que possui 100 cm de comprimento, 16 cm de altura e 16 cm de profundidade, equipada com lâmpada germicida OSRAM HNS<sup>®</sup> de 30 W G13 (Fabricada manualmente).
- Desintegrador Nova ética, modelo 3013 (Vargem Grande paulista, SP, Brasil);
- Dissolutor modelo TDT-08L (Electrolab, India), com sinkers;
- Espctrômetro de massas, model MicrotofQ-II, (MA, EUA);
- Estufa Ethiktechnology, modelo 400-2 ND (Vargem Grande Paulista, SP Brasil);
- pHmetro digital Del lab, modelo DLA-PH (Araraquara, SP, Brasil);
- Sistema de cromatografia à líquido Shimadzu série LC-10 A com sistema de integração CLASS-VP, bomba LC-Advp, degaseificador DGU, injetor manual 7725i, detector UV spd-10avp/ injetor automático/ detector DAD modelo spd-M10avp, forno CTO-10Avp e controlador SCL-10Avp (Quioto, Japão);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore, (Milford, MA, EUA);

## **4.2 Desenvolvimento de método cromatográfico indicador de estabilidade para quantificação de tibolona em cápsulas**

### **4.2.1 Condições cromatográficas**

A separação cromatográfica foi realizada à temperatura de 30 °C, empregando-se uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Thermo Scientific, de 250 mm de comprimento, 5 µm de diâmetro de partícula e 4 mm de diâmetro interno.

A fase móvel foi constituída por mistura de acetonitrila e água ultra-pura, na proporção de 60:40 (v/v), Filtrou-se em membrana filtrante de 0,45 µm (Millipore). Para degaseificar levou-se ao banho de ultrassom por vinte minutos.

A vazão utilizada foi de 1 mL/min., injetando-se 20 µL e efetuando-se a corrida a 205 nm.

#### **4.2.2 Preparo das soluções padrão**

Pesou-se, exatamente, cerca de 10 mg de tibolona e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Acrescentou-se aproximadamente 70 mL de fase móvel e levou-se ao banho de ultrassom por 5 minutos. Em seguida completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se assim uma solução estoque padrão de trabalho 100 µg/mL, a qual foi posteriormente filtrada.

A partir da solução estoque padrão de trabalho a 100 µg/mL foram preparadas as demais soluções em diferentes níveis de concentração para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência, usando fase móvel como diluente.

#### **4.2.3 Preparo das soluções amostra**

Vinte cápsulas foram pesadas individualmente e seu conteúdo foi removido segundo critérios da Farmacopeia Brasileira. O invólucro foi novamente pesado, e o peso do conteúdo de cada cápsula foi obtido subtraindo-se o peso inicial do peso das cápsulas vazias. O valor equivalente a um peso médio, foi transferido para balão volumétrico de 25 mL e adicionou-se aproximadamente 20 mL de fase móvel e levou-se ao banho de ultrassom por 5 minutos. O volume foi completado com fase móvel, obtendo-se uma solução estoque amostra 100 µg/mL.

Vinte comprimidos do medicamento de referência foram pesados individualmente e determinou-se o peso médio. Estes comprimidos foram triturados e do pó resultante, pesou-se o equivalente ao peso médio que corresponde a 2,5 mg de tibolona, o qual foi

transferido para balão volumétrico de 25 mL e adicionou-se aproximadamente 20 mL de fase móvel e levou-se ao banho de ultrassom por 5 minutos. O volume foi completado com fase móvel, obtendo-se uma solução estoque amostra 100 µg/mL.

A partir das soluções estoque amostra de 100 µg/mL foram preparadas as demais soluções em diferentes níveis de concentração para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência, usando fase móvel como diluente.

#### **4.2.4 Preparo das soluções placebo**

Foi preparada uma mistura dos placebos das formulações A, B e C na proporção 1 : 1 : 1 e transferida para balão volumétrico de 25 mL. O placebo de comprimidos foi preparado pela mistura de 10 mg de amido, 0,2 de palmitato de ascorbila, 0,5 mg de estearato de magnésio e 86,8 mg de lactose. Essa mistura foi transferida para balão volumétrico de 25 mL. Para cada preparação foram adicionados cerca de 20 mL de fase móvel e levados ao banho de ultrassom por 5 minutos. Os volumes foram completados com fase móvel e logo em seguida 1 mL de cada solução filtrada foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL e diluídas com fase móvel para posterior análise em cromatografia líquida de alta eficiência.

Os adjuvantes das formulações de cápsulas e comprimidos foram contituídos de:

**Placebo da formulação A:** estearato de magnésio, carbonato de magnésio, talco, aerosil e amido.

**Placebo da formulação B:** estearato de magnésio, celulose microcristalina, aerosil e amido.

**Placebo da formulação C:** celulose microcristalina, lactose, lauril sulfato de sódio, aerosil e amido glicolato de sódio.

**Placebo de comprimidos:** amido, estearato de magnésio, palmitato de ascorbila e lactose.

#### 4.2.5 Estudo de degradação forçada

O perfil de degradação forçada de tibolona foi estudado sob várias condições como descrito a seguir:

Todas as soluções para o estudo de degradação de tibolona foram preparadas para gerar concentração final de 100 µg/mL do fármaco. Todas as amostras foram posteriormente diluídas em fase móvel para concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup> e filtradas antes das injeções.

- Hidrólise ácida, alcalina e neutra: na degradação ácida, alcalina e neutra, primeiramente o padrão de trabalho foi dissolvido em 50 mL de metanol e acrescentados posteriormente 50 mL de HCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>, NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup> e água Mili-Q, respectivamente. Todas as soluções apresentaram concentração final de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl, NaOH e água e foram expostas à temperatura de 60 °C por 24h em estufa.
- Degradação oxidativa: a solução para o estudo de estresse oxidativo foi preparada em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3%, onde o padrão foi dissolvido em 100 mL de peróxido de hidrogênio e a solução mantida a 60 °C por 24h em estufa.
- Degradação fotolítica: uma amostra de tibolona padrão de trabalho pó foi exposta a 10 cm da luz UV em uma câmara de fotoestabilidade (temperatura de 26 ± 2 °C por 72h). Após esta condição a amostra foi dissolvida e diluída para a concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup> para análise em cromatografia líquida de alta eficiência.
- Degradação térmica: para o teste de estresse térmico, o pó da tibolona padrão de trabalho foi exposto à temperatura de 105 °C por 24h em estufa. Terminado

o período de exposição, foi preparada solução de concentração  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  em fase móvel, para análise em cromatografia líquida de alta eficiência.

Antes das análises cromatográficas as soluções ácidas e básicas foram neutralizadas e todas as soluções foram diluídas em fase móvel para concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para análise em cromatografia líquida de alta eficiência. Nas condições (temperatura e luz UV) as amostras foram dissolvidas e diluídas para a concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para análise em cromatografia líquida de alta eficiência. As amostras dos brancos correspondentes foram injetados simultaneamente.

Os brancos da hidrólise ácida, alcalina e neutra foram preparados de maneira similar às amostras, porém sem adicionar o padrão de trabalho de tibolona. O branco da fotodegradação foi a amostra de padrão de trabalho mantida na câmara de fotoestabilidade protegida da luz UV por 72 horas. O branco da degradação térmica foi a própria solução padrão de trabalho de tibolona a  $10 \mu\text{g/mL}$ .

#### **4.2.5.1 Identificação dos produtos de degradação**

A análise das soluções degradadas de tibolona foram avaliadas por HPLC-QTOF/MS para determinar os valores da razão massa/carga ( $m/z$ ) dos produtos de degradação de tibolona formados a partir do estudo de degradação forçada.

A determinação cromatográfica foi realizada em coluna Kinetex  $\text{C}_{18}$  (10,0 cm x 2,1 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), da marca Phenomenex. As condições de análise foram: temperatura da coluna de 30 °C; fase móvel composta por ACN:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) com 0,1% de ácido fórmico operando no modo de eluição isocrático; vazão da fase móvel de 0,25 mL/ min; volume de injeção de 2  $\mu\text{L}$  e o comprimento de onda monitorado foi de 205 nm.

O espectrômetro de massas utilizado foi um sistema híbrido QqTOF MS (Microtof Q-II, da Bruker Daltonics). A interface entre o HPLC e o espectrômetro de massas consistiu em uma fonte de ionização *electrospray* (operando no modo íon positivo), nas

seguintes condições de análise: temperatura da fonte de íons de 190 °C; voltagem do capilar de 4500 V; pressão do gás nebulizador de 4 bar e vazão do gás secante de 8 mL/ min. As análises foram realizadas no modo MS.

#### **4.2.6 Validação do método**

O método foi validado pela avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez, segundo critérios do ICH e ANVISA.

##### **4.2.6.1 Seletividade**

Para o estudo da seletividade do método foram comparados os cromatogramas das soluções placebo de cápsulas e comprimidos de tibolona, preparadas conforme mencionado no item 4. 2. 4 com o cromatograma da solução padrão de tibolona de 10 µg/mL, preparada conforme mencionado no item 4. 2. 2.

A seletividade de um método analítico pode ser avaliada também pela pureza da banda cromatográfica empregando o detector DAD (BRASIL, 2003). Dessa forma, para o estudo da seletividade dos produtos de degradação, foi empregado o detector DAD, para comprovar que não houve interferências de produtos de degradação na banda cromatográfica da tibolona, onde os espectros das amostras submetidas a condição de estresse foram comparados ao espectro do padrão primário de tibolona (British Pharmacopeia).

#### **4.2.6.2 Linearidade**

A avaliação da linearidade foi realizada a partir da média de 3 curvas analíticas obtidas em 3 dias consecutivos, com 5 concentrações em triplicata no intervalo de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (5, 10, 15, 20 e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A partir das três curvas obtidas, determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) pelo método dos mínimos quadrados.

#### **4.2.6.3 Precisão**

O teste de precisão foi realizado em relação a repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada por análise no mesmo dia de soluções de padrão contendo 5, 10 e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de tibolona e a precisão intermediária foi avaliada por repetição dos ensaios em dois dias diferentes. As soluções de cada concentração foram preparadas em triplicata e posteriormente analisadas. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativos (DPR). Considera-se precisão adequada quando as estimativas dos desvios padrão relativo entre as determinações forem inferiores a 2% (ICH,2005).

#### **4.2.6.4 Exatidão**

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação. Preparou-se uma solução estoque de padrão e uma solução estoque de amostra com concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , onde alíquotas destas soluções estoque foram retiradas para preparar as soluções para o teste de recuperação por CLAE. Para a exatidão, valores entre 98,0%

e 102,0% são considerados adequados (ICH, 2005). A Tabela 1 apresenta o preparo das amostras para determinação da exatidão.

**Tabela 1.** Exatidão do método analítico para cápsulas e comprimidos de tibolona.

Solução	Concentração de solução amostra (µg/mL)	Concentração de solução padrão adicionada (µg/mL)	Concentração total obtida (µg/mL)
A	5	-	5
P	-	5	5
S (80%)	5	3	8
S (100%)	5	5	10
S (120%)	5	7	12

A= Solução amostra

P= Solução padrão

S (80%), S (100%) e S (120%)= Soluções amostra adicionada de padrão

#### 4.2.6.5 Limite de quantificação e de detecção

Os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados pelas seguintes equações 1 e 2:

$$(1) LD = (DP \times 3)/IC \quad (2) LQ = (DP \times 10)/IC$$

onde DP é o desvio padrão do intercepto e IC é a inclinação média, das três curvas analíticas no estudo da linearidade.

#### 4.2.6.6 Robustez

Para determinação da robustez do método foi utilizado o teste de Youden e Steiner (YOUDEN, STEINER, 1975). Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (INMETRO, 2010).

No teste de Youden, sete parâmetros analíticos são selecionados para avaliação e oito ensaios são realizados para determinar a influência dos mesmos no resultado final. Os sete parâmetros selecionados foram temperatura da coluna, vazão da fase móvel, sonicação, exposição a luz, marca de acetonitrila, proporção de fase móvel e comprimento de onda. As condições normais das variáveis foram denotadas por letras maiúsculas A, B, C, D, E, F e G e seus valores alternativos foram denotados pelas correspondentes letras minúsculas a, b, c, d, e, f e g. Um total de 8 ensaios foram realizados, como indicado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Variáveis e seus níveis usados em estudo de robustez, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner (YOUDEN, STEINER, 1975).

Variável	Condição nominal	Condição alternativa	Condições experimentais							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura da coluna	30°C (A)	28°C (a)	A	A	A	A	a	a	a	a
Vazão da fase móvel	1 mL min <sup>-1</sup> (B)	0,9 mL min <sup>-1</sup> (b)	B	B	b	b	B	B	b	b
Sonicação	5 min (C)	Não sonicação (c)	C	c	C	c	C	c	C	c
Exposição a luz	Sim (D)	Não (d)	D	D	d	d	d	d	D	D
Marca de acetonitrila	1 (E)	2 (e)	E	e	E	e	e	E	e	E
Proporção fase móvel	60:40 (ACN/água) (F)	59:41 (ACN/água) (f)	F	f	f	F	F	f	f	F
Comprimento de onda	205 nm (G)	207 nm (g)	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados observados			s	T	u	v	w	x	y	z

\* Letras maiúsculas representam condições nominais. Letras minúsculas representam condições alternativas.

Para determinar a influência da variação de cada parâmetro no resultado final, deve-se comparar a média dos quatro valores correspondentes às letras maiúsculas com a média dos quatro valores correspondentes às letras minúsculas. Considerando o desvio padrão entre os 8 resultados, os valores de efeito maior do que o desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de dois ( $s\sqrt{2}$ ) foram considerados significantes e, portanto, alteram a resposta analítica ( INMETRO, 2010)

### **4.3 Desenvolvimento do ensaio de dissolução**

#### **4.3.1 Preparo das soluções (ensaio de dissolução)**

Os meios de dissolução utilizados neste estudo (água, ácido clorídrico (0,1 mol/L), tampão acetato (pH 4,5; 0,05 mol/L), tampão fosfato (pH 6,8), solução aquosa com lauril sulfato de sódio 0,25 % e solução aquosa com lauril sulfato de sódio 0,5 % foram degaseificados a 41 ° C e levados ao banho de ultrassom durante 20 minutos antes de serem utilizados.

#### **4.3.2 Preparo dos meios de dissolução**

A solução de ácido clorídrico (0,1 mol/L) foi preparada por adição de 8,5 mL de ácido clorídrico em balão volumétrico de 1 L e volume ajustado com água.

O tampão acetato de sódio (pH 4,5) foi preparado por adição de 5,98 g de acetato de sódio e 3,32 mL de ácido acético glacial em balão volumétrico de 2 L e volume ajustado com água.

O tampão fosfato de potássio (pH 6,8) foi preparado por adição de 13,609 g de fosfato de potássio monobásico e 22,38 mL de hidróxido de sódio 2 mol/L em balão volumétrico de 2 L e volume ajustado com água.

O meio de dissolução definido para o ensaio (solução aquosa de lauril sulfato de sódio 0,5%) foi preparado adicionando 10g de lauril sulfato de sódio em balão volumétrico de 2 L e volume ajustado com água.

#### **4.3.3 Preparo das soluções padrão (ensaio de dissolução/ validação)**

Para o preparo da solução estoque padrão de trabalho pesou-se, exatamente, cerca de 10 mg de tibolona e transferiu-se para balão volumétrico de 500 mL. Acrescentou-se cerca de 5 mL de metanol para dissolução do fármaco e completou-se o volume com o meio de dissolução (solução aquosa de lauril sulfato de sódio 0,5%). Em seguida, a solução foi filtrada e a partir da solução estoque padrão de trabalho a 20 µg/mL foi preparada as demais soluções para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência, usando como diluente o meio de dissolução.

Para o teste de exatidão e precisão pesou-se 31,25 mg de tibolona padrão de trabalho e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. A amostra foi dissolvida em metanol e neste mesmo solvente o volume do balão volumétrico foi ajustado. Em seguida, a solução foi filtrada e a partir desta solução a 1,25 µg/mL, alíquotas foram utilizadas para realização dos testes de exatidão e precisão.

#### **4.3.4 Preparo das soluções amostras (ensaio de dissolução)**

As soluções amostras foram preparadas colocando-se uma cápsula (n = 6), contendo o meio de dissolução (500 mL) a uma temperatura de 37 °C. As amostras

foram coletadas ao fim do tempo especificado e em seguida foram filtradas e levadas a análise em cromatografia líquida de alta eficiência.

#### **4.3.5 Condições cromatográficas**

A separação cromatográfica para quantificar o fármaco no ensaio de dissolução foi realizada a uma temperatura de 30°C, empregando-se coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Thermo Scientific, de 250 mm de comprimento, 5 µm de diâmetro de partícula e 4 mm de diâmetro interno.

A fase móvel foi constituída por mistura de acetonitrila e água ultra-pura, na proporção de 60:40 (v/v). Filtrou-se a fase móvel em membrana filtrante de 0,45 µm (Millipore) e para degaseificar levou-se ao banho de ultrassom por vinte minutos.

A vazão utilizada foi de 1 mL/min., com volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda empregado de 205 nm.

#### **4.3.6 Determinação das condições sink**

Para o FDA, as condições sink são desejáveis, porém não obrigatórias. Os meios de dissolução preferenciais são água, HCl 0,1M e soluções tampão de pH 1,2 a 6,8 (FDA, 1997). Sendo assim, a solubilidade da tibolona foi testada em diferentes meios como HCl 0,1 M, água, tampão acetato pH = 4,5 e tampão fosfato pH = 6,8. Foi pesado uma massa referente a três vezes o valor da solubilidade do fármaco (15 mg de tibolona padrão de trabalho), a qual foi adicionada em cubas contendo cada meio a ser analisado (500 mL), e mantidas sob agitação por 24 horas, a 37 °C. Alíquotas de 10 mL foram removidas de cada cuba, filtradas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. O estudo em cada meio foi realizado em triplicata. O valor de solubilidade teórica do fármaco foi calculado pelo ACD Lab software®.

#### 4.3.7 Desenvolvimento do ensaio de dissolução

Com a finalidade de desenvolver um método de dissolução com condições adequadas para determinação da liberação da tibolona em cápsulas, várias condições foram testadas. O perfil de dissolução de tibolona foi estudado em aparelho dissolutor de cubas (n=6) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizando 500 mL de meio, de acordo com o item 4.3.6. Os meios foram previamente desaerados em banho-maria até atingir a temperatura de  $41^{\circ}\text{C}$  e levados ao ultrassom por 20 minutos. Foram analisados inicialmente o meio de dissolução água, já que este apresentou melhor resultado no teste de solubilidade quando comparado aos resultados obtidos para os demais meios analisados. Utilizou-se para o início dos testes o aparato pá e velocidade de rotação 100 rpm em função da baixa solubilidade do fármaco (classe II) (BCS, 2012; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011). Foram variados os meios de dissolução utilizando-se somente água e água com diferentes concentrações de tensoativo (lauril sulfato de sódio), o aparato e velocidade de agitação. As condições testadas encontram-se na Tabela 3:

**Tabela 3.** Condições testadas para o desenvolvimento do ensaio de dissolução de cápsulas contendo tibolona.

Condição	Aparato	Meio (500 mL)	Velocidade (rpm)	Tempo de coleta (min.)
I	2	Água	100	5, 10, 15, 20, 45 e 60
II	2	Água + 0,25% de LSS	100	5, 10, 15, 20, 45 e 60
III	2	Água + 0,50% de LSS	100	5, 10, 15, 20, 45 e 60
IV	1	Água + 0,50% de LSS	100	5, 10, 15, 20, 45 e 60
V	2	Água + 0,50% de LSS	50	5, 10, 15, 20, 45 e 60
VI	2	Água + 0,50% de LSS	75	5, 10, 15, 20, 45 e 60

As coletas de 5 mL do meio foram realizadas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 45 e 60min., efetuando-se a reposição do mesmo volume de meio a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram filtradas e levadas para análise em CLAE.

#### **4.3.8 Validação do ensaio de dissolução**

O ensaio de dissolução é classificado como ensaio de performance (ICH, 2005; UNITED, 2011).

A validação do ensaio de dissolução inclui a avaliação da estabilidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

##### **4.3.8.1 Estabilidade**

Para avaliar a estabilidade da tibolona sob as condições do teste de dissolução, três amostras de cada formulação (A, B e C) contendo 2,5 mg de tibolona foram submetidas ao teste de dissolução, estas foram colocadas em cubas com 500 mL de meio de dissolução a 37 °C por 45 minutos a 100 rpm usando pá como aparato. Alíquotas foram coletadas, filtradas e analisadas por CLAE (tempo zero). As mesmas soluções foram mantidas a temperatura ambiente por 2 horas e avaliadas novamente. As soluções padrão do item 4.3.3. foram diluídas a 5 µg/mL e avaliadas no tempo zero e mantidas a temperatura ambiente por 24 horas e avaliadas novamente. Para cada solução analisada, os resultados obtidos após 2 horas (amostras das formulações A, B e C) e após 24 horas (soluções padrão) foram comparados com os resultados obtidos no tempo zero. O critério de aceitação é de que a resposta analítica após 2 horas esteja entre 98% a 102% da resposta obtida no tempo zero.

#### **4.3.8.2 Seletividade**

Para determinação da seletividade, uma amostra de placebo e uma amostra de cápsulas vazias foram adicionadas em cubas contendo 500 mL de meio de dissolução (água + LSS 0,5%) a 37 °C por 45 minutos a 100 rpm usando pá como aparato. Alíquotas foram coletadas e a seletividade foi analisada pela comparação dos cromatogramas obtidos das amostras acima analisadas com o cromatograma da solução padrão de trabalho preparada com o meio de dissolução.

#### **4.3.8.3 Linearidade**

A avaliação da linearidade foi realizada a partir da média de 3 curvas analíticas obtidas em 3 dias consecutivos, com 6 concentrações em triplicata no intervalo de de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 7,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas de uma solução estoque contendo 20  $\mu\text{g/ mL}$  de tibolona padrão de trabalho (preparada em meio de dissolução, com solubilização prévia do fármaco em 5 mL de metanol) foram transferidas para balões volumétricos e diluídas com o meio de dissolução para as concentrações finais de 1, 2, 3, 5, 6, e 7,5  $\mu\text{g/mL}$ . A partir das três curvas obtidas, determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) pelo método dos mínimos quadrados.

#### **4.3.8.4 Exatidão e precisão**

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação, adicionando quantidades conhecidas de tibolona padrão de trabalho ao placebo. Uma solução estoque de tibolona foi preparada em metanol na concentração de 1,25 mg/mL.

Alíquotas de 1,0, 2,0 e 3,0 mL desta solução foram adicionadas as cubas contendo o meio de dissolução para um volume total de 500 mL (as concentrações finais foram de 2,5, 5,0 e 7,5 µg/ mL, o que corresponde a 50, 100 e 150 % da concentração de trabalho). As amostras de placebo contendo a composição de excipiente igual a 2,5 mg de cápsula do produto C foram então transferidas para cada cuba. As amostras foram mantidas a  $37 \pm 0,5$  ° C, com agitação a 150 rpm durante 60 minutos. Em seguida, alíquotas de cada cuba foram coletadas e analisadas. O estudo foi realizado em triplicata em 2 dias diferentes. O critério de aceitação foi a obtenção de recuperação entre 95,0% e 105,0% (UNITED, 2011). As mesmas soluções utilizadas no ensaio de exatidão foram analisados para assegurar a precisão do método. Precisão intermediária e a repetibilidade foram estabelecidos de acordo com o DPR dos resultados. O critério de aceitação é de que DPR seja menor que 2%.

#### **4.3.8.5 Limite de detecção e quantificação**

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram obtidos a partir das equações 1 e 2:

$$(1) LD = (DP \times 3)/IC \quad (2) LQ = (DP \times 10)/IC$$

onde DP é o desvio padrão do intercepto e IC é a inclinação média, das três curvas analíticas no estudo da linearidade.

#### **4.3.8.6 Robustez**

A robustez foi avaliada através do teste de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975). Este teste consiste na análise multivariada de sete variáveis que podem influenciar no resultado analítico. As sete variáveis selecionadas foram:

velocidade de agitação dos aparatos, desaeração dos meios de dissolução, filtração das amostras após coleta, tempo do teste de dissolução, temperatura do meio de dissolução, exposição a luz e ponto de coleta nas cubas. A percentagem de liberação do fármaco foi calculada para cada condição experimental, comparando as áreas dos picos da amostra com as áreas obtidas a partir da solução padrão de trabalho de tibolona de mesma concentração.

As condições normais das variáveis foram denotadas por letras maiúsculas A, B, C, D, E, F e G e seus valores alternativos foram denotados pelas correspondentes letras minúsculas a, b, c, d, e, f e g. Um total de 8 experimentos foram conduzidos, como indicado na Tabela 4. A partir desses resultados, o efeito de cada variável foi estimado pela diferença entre a média dos resultados das 4 análises com letra maiúscula e a média dos resultados das 4 análises com letra minúscula. Considerando o desvio padrão entre os 8 resultados, os valores de efeito maior do que o desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de dois ( $s\sqrt{2}$ ) foram considerados significantes e, portanto, alteram a resposta a resposta analítica.

**Tabela 4.** Variáveis e seus níveis usados em estudo de robustez do ensaio de dissolução, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975).

Variável	Condições nominais	Condições alternativas	Condições experimentais							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Velocidade de agitação	100 rpm (A)	95 rpm (a)	A	A	A	A	a	a	a	a
Desaeração do meio	Sim (B)	Não (b)	B	B	b	b	B	B	b	b
Filtração da amostra	Sim (C)	Não (c)	C	c	C	c	C	c	C	c
Tempo do teste	45 minutos (D)	47 minutos (d)	D	D	d	d	d	d	D	D
Temperatura do meio	37 °C (E)	35 °C (e)	E	e	E	e	e	E	e	E
Exposição a luz	Sim (F)	Não (f)	F	f	f	F	F	f	f	F
Ponto de coleta	Alto (G)	Baixo (g)	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados observados			s	T	u	v	w	x	y	z

#### **4.3.9 Ensaio de dissolução em formulações magistrais**

Após a determinação das melhores condições de dissolução, bem como a validação analítica, três formulações magistrais diferentes codificadas em A, B e C foram avaliadas. As condições definidas do ensaio de dissolução foram água adicionada de lauril sulfato de sódio 0,5 % como meio de dissolução, pá como o aparato e 100 rpm de velocidade de agitação. Um volume de 5 mL de meio de dissolução (controlada a  $37,0 \pm 0,5$  ° C) foram amostrados após 5, 10, 15, 20, 45 e 60 minutos, (com reposição do volume retirado) e, em seguida, analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Seis amostras foram testadas para cada formulação.

#### **4.4 Controle de Qualidade das cápsulas manipuladas de tibolona**

##### **4.4.1 Aspecto**

As amostras dos produtos manipulados foram examinados quanto ao aspecto como cor, superfície e integridade.

##### **4.4.2 Determinação do peso médio**

A determinação de peso médio obedeceu aos critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Foi realizada a pesagem

individual de 20 unidades de cápsulas dos produtos que foram avaliados. O limite de variação aceito é de 10 % para formas farmacêuticas com peso menor que 300 mg.

#### **4.4.3 Desintegração**

O teste de desintegração deve obedecer aos critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Foram utilizadas seis unidades (cápsulas) de cada fabricante nas seguintes condições: meio aquoso, temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , tempo de 45 minutos.

#### **4.4.4 Identificação**

A identificação do princípio ativo tibolona foi realizada pela comparação do tempo de retenção da banda principal obtido com o padrão com o tempo de retenção obtida com a amostra no ensaio de doseamento.

#### **4.4.5 Teor do fármaco**

A partir do conteúdo removido das cápsulas das formulações A, B e C, respectivamente na determinação do peso médio, foi realizada uma pesagem com a massa de interesse referente a 2,5 mg de tibolona de cada formulação. Para a análise do teor de comprimidos, foi pesado a massa referente a 2,5 mg de tibolona, a partir da trituração de 20 comprimidos e obtenção do peso médio. As massas foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, respectivamente, obtendo-se a concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com posteriores diluições até a concentração apropriada para

determinação analítica do fármaco. A especificação adotada foi a da forma farmacêutica comprimidos com limite aceito de 90,0% a 105,0% do valor rotulado, de acordo com a Farmacopeia britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011).

#### 4.4.6 Uniformidade de doses unitárias

A uniformidade de doses unitárias deve ser realizada pelo método de uniformidade de conteúdo para cápsulas gelatinosas com dose do fármaco menor que 25 mg. O teste deve ser realizado utilizando-se 10 unidades e a partir do resultado de doseamento, calculando-se o conteúdo de tibolona em cada cápsula. Em seguida calcula-se o Valor de Aceitação (VA).

$VA = |M - X| + ks$ , onde:

$X$  = Média dos conteúdos individuais ( $x_1, x_2, \dots, x_n$ ), expressa como percentagem da quantidade declarada.

$M$  = valor de referência,

Se  $98,5\% \leq X \leq 101,5\%$ , então  $M = X$ ;

Se  $X < 98,5\%$ , então  $M = 98,5\%$ ;

Se  $X > 101,5\%$ , então  $M = 101,5\%$  ( $VA = X - 101,5 + Ks$ );

$K$  = Constante de aceitabilidade, para  $n = 10$ ,  $k = 2,4$ ;  $n = 30$ ,  $k = 2,0$

$s$  = Desvio padrão da amostra.

O produto cumpre o teste de uniformidade de doses unitárias se o *Valor de Aceitação* calculado para as 10 primeiras unidades testadas não for maior que  $L_1$ . Se o *Valor de Aceitação* for maior que  $L_1$ , testar mais 20 unidades e calcular novamente o *Valor de Aceitação*. O produto cumpre o teste de uniformidade de doses unitárias se o *Valor de Aceitação* final calculado para as 30 unidades testadas não for maior que  $L_1$  e a quantidade de componente ativo de nenhuma unidade individual for menor que  $(1 - L_2 \times 0,01)M$  ou maior que  $(1 + L_2 \times 0,01)M$ . A menos que indicado de maneira diferente na monografia individual,  $L_1$  é 15,0 e  $L_2$  é 25,0 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento de método cromatográfico indicador de estabilidade para quantificação de tibolona em cápsulas

#### 5.1.1 Condições cromatográficas

O uso de metodologias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando coluna de fase reversa vem sendo amplamente empregado na determinação de fármacos. Assim, para iniciar o desenvolvimento do método de quantificação de tibolona, foi utilizada uma coluna de fase reversa Thermo Scientific C18 (250 x 4.0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Foram realizados inicialmente alguns testes com diferentes composições e proporções de fase móvel com acetonitrila, metanol e água (60:10:30), observando-se tempo de retenção em cerca de 4,1 minutos e banda cromatográfica assimétrica. Posteriormente testou-se acetonitrila e água (50:50), que melhorou a simetria da banda, porém o tempo de retenção foi 9,2 minutos. Visando uma redução no tempo de análise, testou-se a proporcionalidade acetonitrila e água (60:40), que mostrou tempo de análise com cerca de 5,5 minutos (Figura 3). Com a aplicação do teste de degradação forçada, foi observada a separação de forma seletiva da tibolona dos demais produtos formados, tornando o método aplicável a análise de rotina.

A vazão de fase móvel, temperatura da coluna e o volume de injeção foram de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $20 \text{ }\mu\text{L}$ , respectivamente. O comprimento de onda foi selecionado com base no máximo de absorvância obtido para a tibolona.

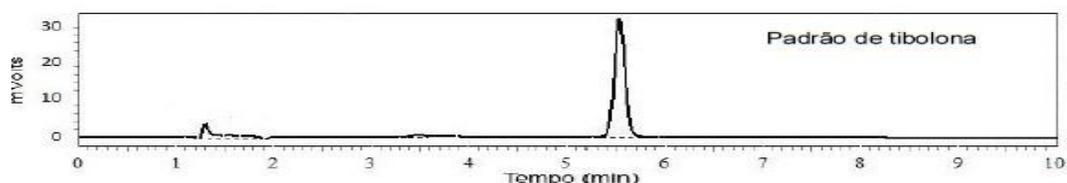
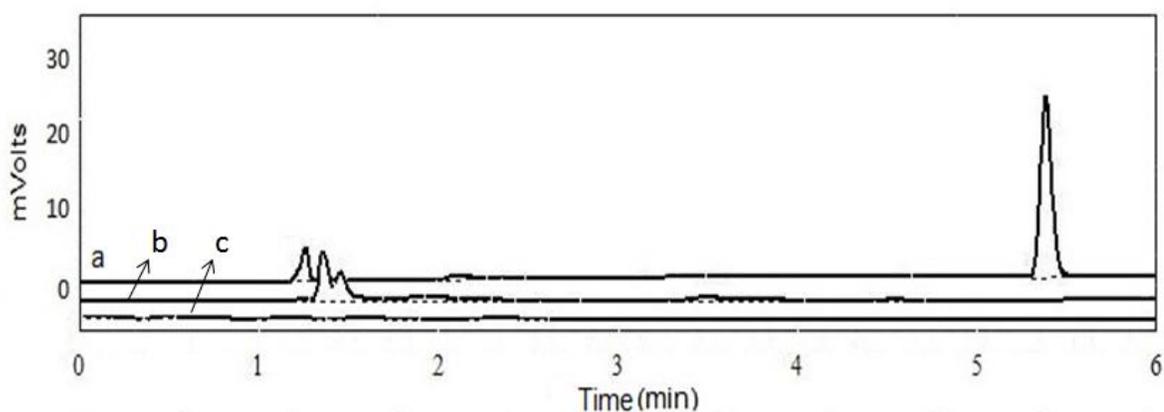


Figura 3. Cromatograma da solução padrão de tibolona a  $10 \mu\text{g/mL}$ .

### 5.1.2 Validação do método cromatográfico indicador de estabilidade

A Figura 4 e Tabela 5 demonstra a seletividade do método em relação a solução de excipientes de cápsulas e comprimidos e em relação a pureza a banda cromatográfica de tibolona após o teste de degradação forçada.

#### 5.1.2.1 Seletividade



**Figura 4.** Cromatograma da solução padrão de trabalho  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (a), solução de excipientes de cápsulas de tibolona (b) e solução de excipientes de comprimidos de tibolona (c).

**Tabela 5.** Índice de pureza das bandas cromatográficas correspondente ao tempo de retenção da tibolona, e das amostras submetidas ao ensaio de degradação forçada.

Amostras	Índice de pureza da banda
Degradação térmica	0,9992
Degradação neutra	0,9993
Fotodegradação por luz UV	0,9992

A seletividade foi verificada analisando-se a sobreposição dos cromatogramas da solução de excipientes de cápsulas e comprimidos com o cromatograma da solução padrão, onde verificou-se a não interferência dos excipientes das formulações A, B e C, respectivamente, na determinação de tibolona na forma farmacêutica cápsulas e

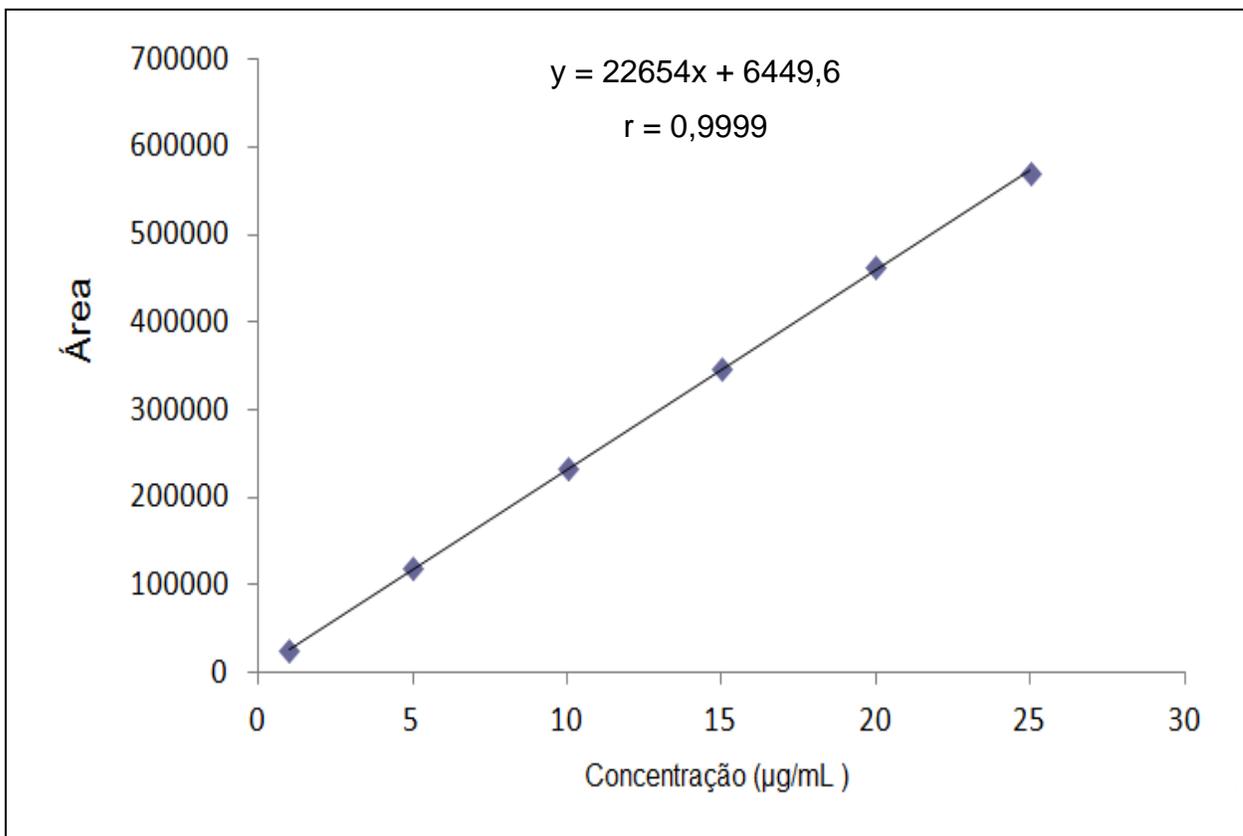
comprimidos (Figura 4). Como já comentado anteriormente, foi analisada a pureza da banda de tibolona que permaneceu após os testes de degradação forçada, por comparação com o espectro de um padrão primário, obtendo-se índices de similaridade próximos de 1,0 para todas as amostras analisadas, indicando ausência de interferentes e demonstrando seletividade do método frente aos produtos de degradação (Tabela 5).

### 5.1.2.2 Linearidade

A Tabela 6 e a Figura 5 apresenta os dados referentes a linearidade do método.

**Tabela 6.** Valores correspondentes à linearidade do método CLAE, utilizando fase móvel, com detecção em 205 nm.

<b>Concentração</b> <b>µg/mL de tibolona</b>	<b>Média/Área</b> <b>(n=9)</b>	<b>DPR%</b>
5	118151,9	1,97
10	233443,8	0,92
15	347107,2	1,81
20	462716,6	1,63
25	569859,1	1,29



**Figura 5.** Curva de regressão linear obtida da média das três curvas analíticas

A avaliação da linearidade do método por CLAE foi realizada de acordo com o item 4.2.6.2, onde a curva de analítica para tibolona padrão de trabalho mostrou-se linear no intervalo avaliado de 5 a 25 µg/mL, com  $r = 0,9999$  (coeficiente de correlação). A equação da reta obtida foi:  $y = 22654x + 6449,6$ . Os dados estão demonstrados na Tabela 6 e Figura 5, respectivamente. Ressaltando que os DPR de cada ponto da curva analisado foram menores que 2%, estando em conformidade com o critério de aceitação (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

### 5.1.2.3 Precisão do método

A Tabela 7 mostra os resultados referentes a precisão inter e intra-dias.

**Tabela 7.** Valores obtidos para avaliação da precisão do método de análise.

Concentração (µg/mL)	Precisão (DPR%)	
	Inter-dias (n=6)	Intra-dias (n=6)
5	1,88	0,89
10	0,94	0,68
25	1,22	0,84

A precisão do método analítico foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dias) e precisão intermediária (inter-dias) apresentada na tabela 7. Os valores do DPR foram menores que 0,89 % (intra-dias) e 1,88% (inter-dias), demonstrando a adequada precisão do método, já que os valores de DPR foram inferiores a 2%, que é o recomendado (ICH, 2005).

### 5.1.2.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da percentagem de recuperação da tibolona, nas concentrações 80, 100 e 120% da concentração de trabalho. A recuperação para cápsulas variou entre 98,5 e 101,5%, com média de 98,63%, demonstrando a exatidão do método (Tabela 8). As recuperações realizadas para a amostra de comprimidos variou entre 97,63% a 100,89% com média de 99,39 % (Tabela 9), mostrando que o valor de recuperação médio encontrou-se dentro da faixa de valores aceitáveis.

**Tabela 8.** Valores médios de recuperação para tibolona nas amostras de cápsula, pelo método de análise.

Amostra*	Concentração µg/mL			Recuperação (%)	D.P.R	Média de recuperação (%)
	Adição	Teórico	Experimental			
5	3	8	7,86	98,68	0,76	98,63
5	5	10	9,81	98,13	0,79	
5	7	12	11,84	99,09	0,96	

\*n=3

**Tabela 9.** Valores médios de recuperação para tibolona nas amostras de comprimidos, pelo método de análise.

Amostra*	Concentração µg/mL			Recuperação (%)	D.P.R	Média de recuperação (%)
	Adição	Teórico	Experimental			
5	3	8	7,91	99,65	0,46	99,39
5	5	10	9,80	97,63	1,34	
5	7	12	11,98	100,89	0,43	

\*n=3

#### 5.1.2.5 Limite de quantificação e detecção

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos a partir da curva analítica, com valores de 0,12 µg/mL e 0,4 µg/mL, respectivamente. Concluindo-se que o intervalo de trabalho do método (5-25 µg mL<sup>-1</sup>) está acima do limite de quantificação e de detecção, demonstrando que o método é adequado para o objetivo proposto.

### 5.1.2.6 Robustez

Como observado nas Tabelas 10 e 11, pode-se concluir que nenhum efeito foi maior do que o critério  $s\sqrt{2}$ , demonstrando que nenhuma das variáveis analisadas como variação da marca da acetonitrila utilizada na fase móvel, proporção da fase móvel, vazão, sonicação da amostra, exposição à luz, temperatura da coluna e comprimento de onda influenciou na resposta analítica, mostrando que o método é robusto para as variáveis avaliadas tanto na amostra de cápsula quanto na amostra de comprimido.

**Tabela 10.** Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner, para demonstrar robustez na análise da forma farmacêutica cápsulas (YOU DEN, STEINER, 1975).

Variável	Efeito
Temperatura da coluna	0,42
Vazão da fase móvel	0,23
Ultrassom	-0,32
Exposição a luz	2,63
Marca de acetonitrila	0,81
Proporção fase móvel	1,17
Comprimento de onda	-3,27
D.P.x $\sqrt{2}$ *	3,38

\* Desvio padrão das 8 condições experimentais multiplicado pela raiz quadrada de 2.

**Tabela 11.** Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner, para demonstrar robustez na análise da forma farmacêutica comprimidos (YOU DEN, STEINER, 1975).

<b>Variável</b>	<b>Efeito</b>
Temperatura da coluna	3,30
Vazão da fase móvel	-0,68
Ultrassom	2,21
Exposição a luz	-0,45
Marca de acetonitrila	-2,37
Proporção fase móvel	-0,81
Comprimento de onda	-1,31
D.P.x $\sqrt{2}$ *	3,74

\* Desvio padrão das 8 condições experimentais multiplicado pela raiz quadrada de 2.

### 5.1.3 Aplicação do método às formas farmacêuticas

Considerando a especificação para o doseamento de 90,0 a 105,0 % do valor rotulado, todas as amostras cumpriram o teste, como observado na Tabela 12. Parâmetros da conformidade do sistema cromatográfico como assimetria, fator de retenção e número de pratos teóricos foram avaliados. Estes foram calculados pelo software CLASS-VP 5.02 e todos se apresentaram de acordo as especificações do FDA, garantindo desta forma que as condições estão adequadas para a aplicação do método, de acordo com a Tabela 12.

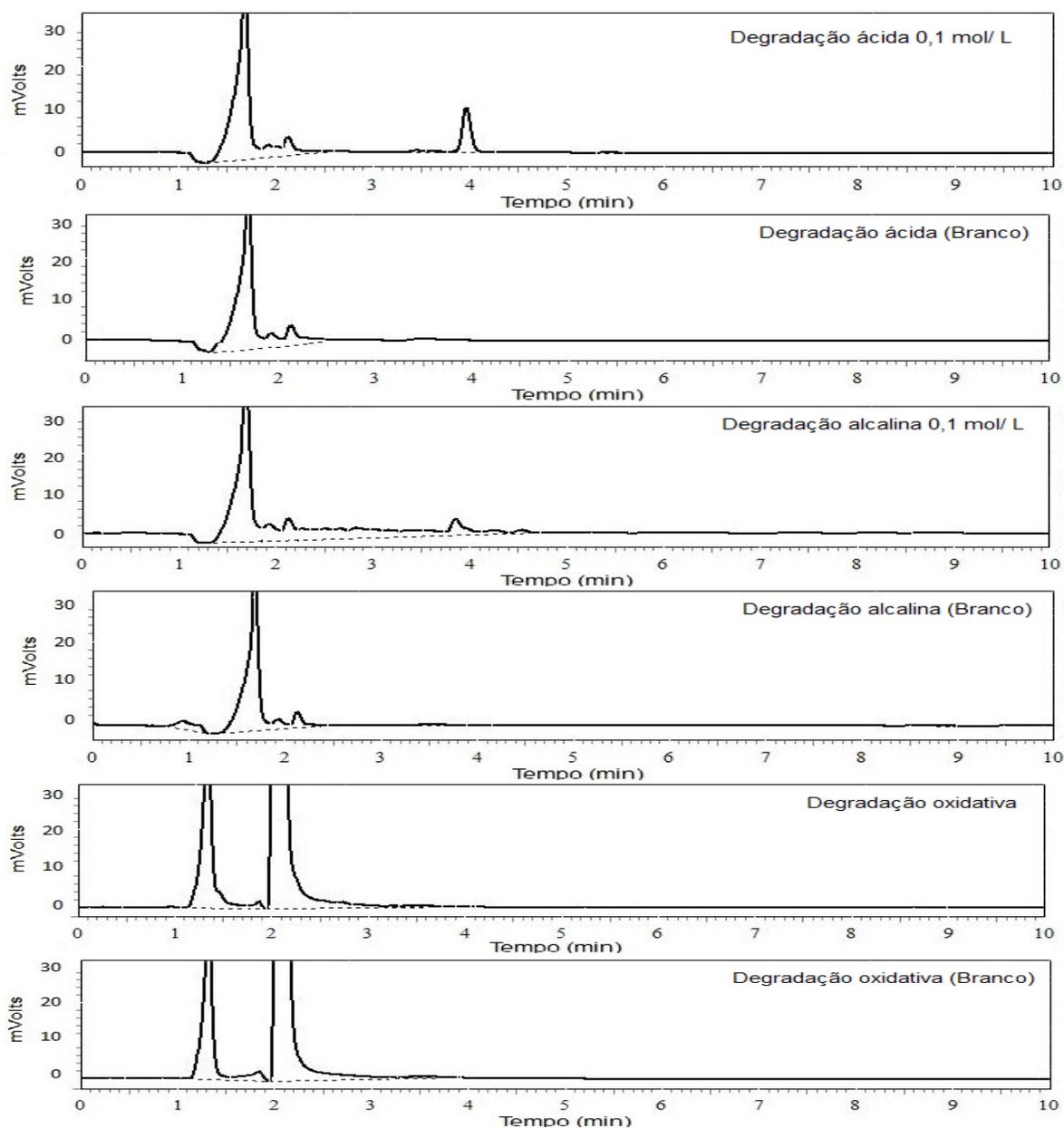
**Tabela 12.** Valores do teor de tibolona e parâmetros cromatográficos das amostras de cápsulas e comprimidos.

	<b>Teor (%)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Assimetria* (&lt;2)</b>	<b>Fator de retenção* (&gt;2)</b>	<b>Pratos teóricos* (&gt;2000)</b>
<b>Formulação A</b>	98,77	1,36	1,18	4,20	11672
<b>Formulação B</b>	93,76	0,37	1,19	4,06	11679
<b>Formulação C</b>	94,92	0,96	1,22	4,05	11375
<b>Comprimidos</b>	95,95	1,04	1,18	4,20	12272

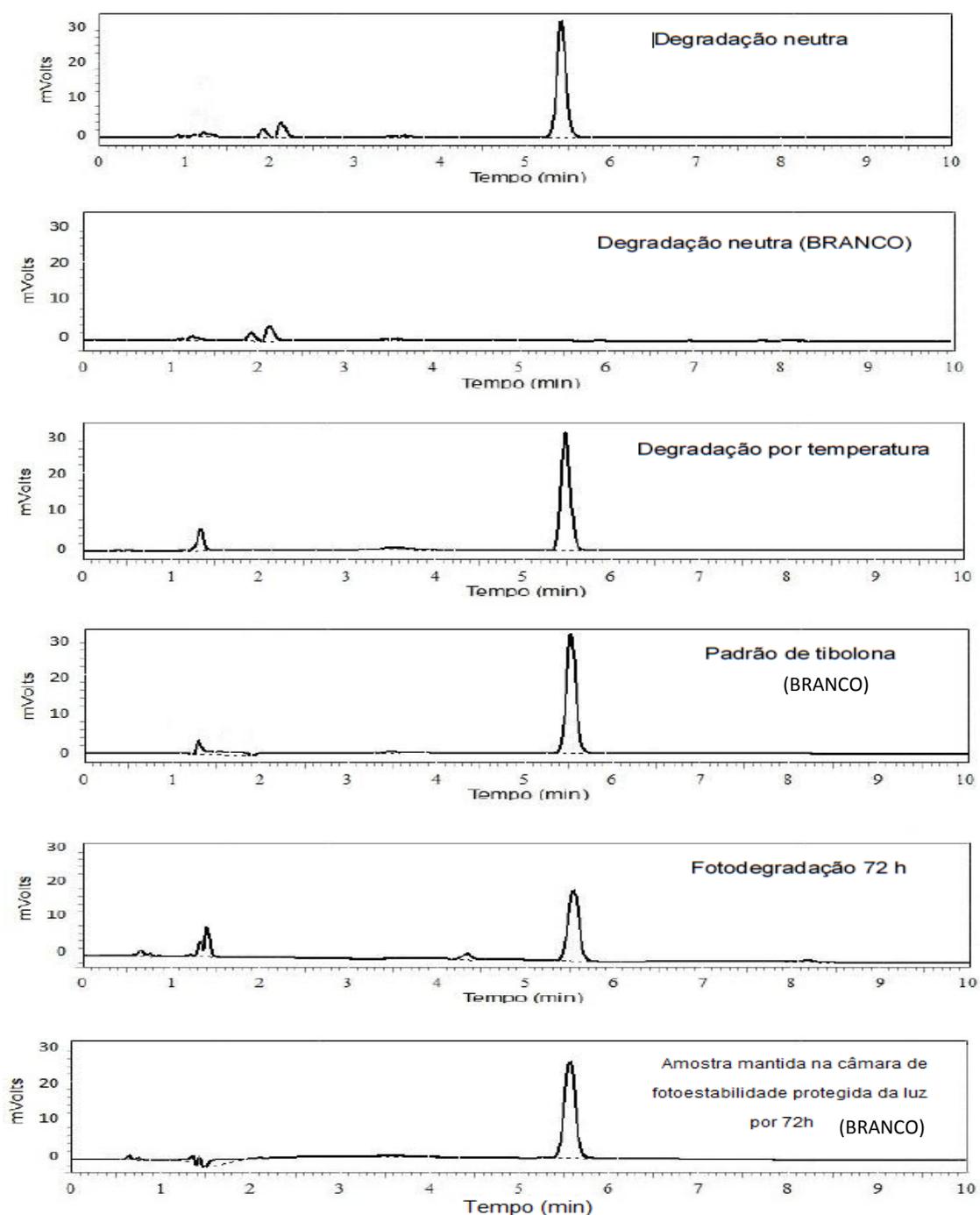
\* Especificações do FDA (2000).

### 5.1.4 Estudo de degradação

O resultado do estudo de degradação da tibolona estão apresentados nas figuras 6 e 7, respectivamente:



**Figura 6.** Cromatogramas das soluções de tibolona  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  submetidas as condições de degradação ácida, alcalina, oxidativa e cromatogramas das soluções branco.



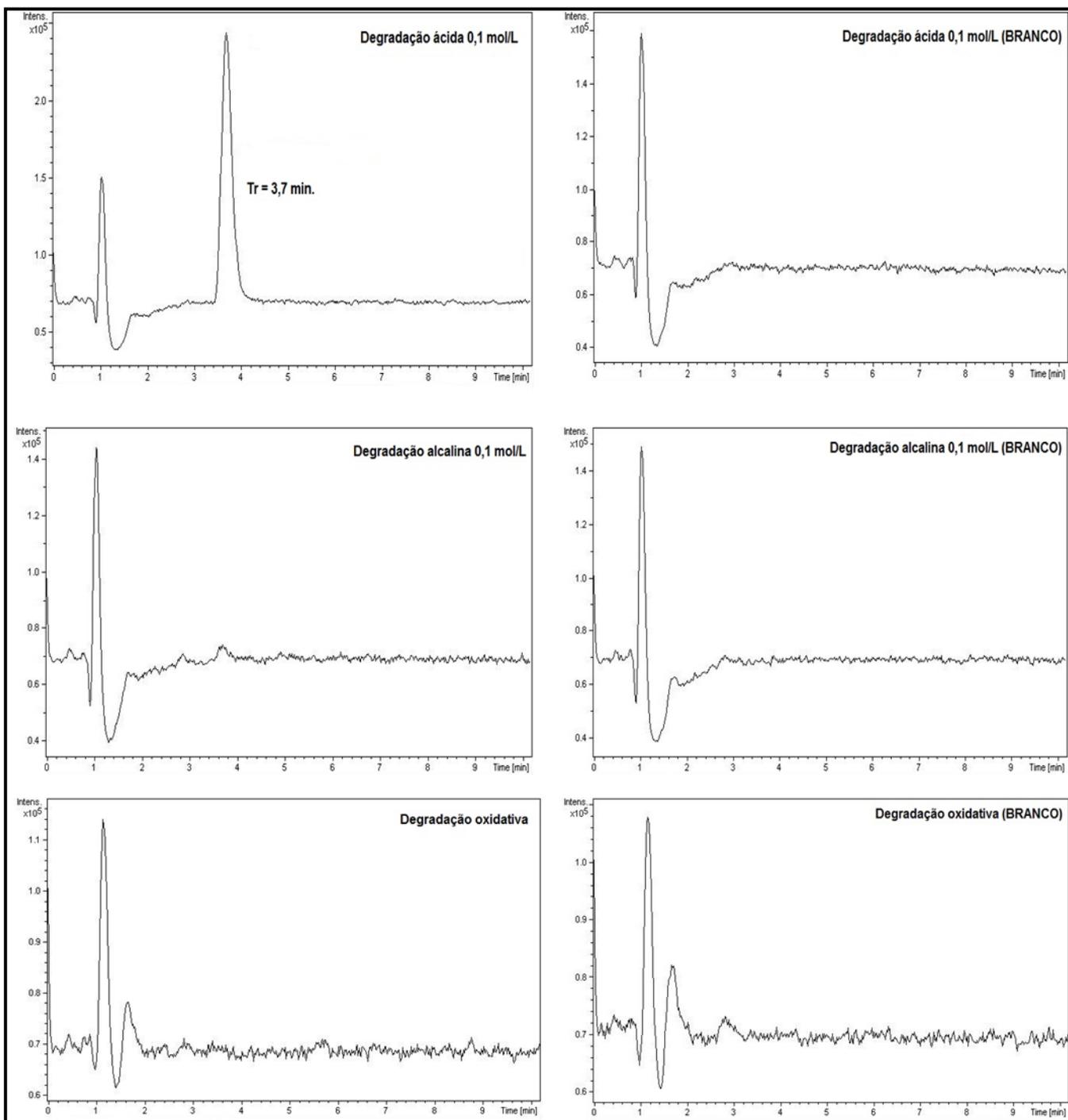
**Figura 7.** Cromatogramas das soluções de tibolona  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  submetidas as condições de degradação neutra, por temperatura, fotodegradação e cromatogramas das soluções branco.

Em relação ao estudo de degradação forçada foram empregadas as condições de estresse por hidrólise ácida, alcalina, oxidação, neutra, luz UV e

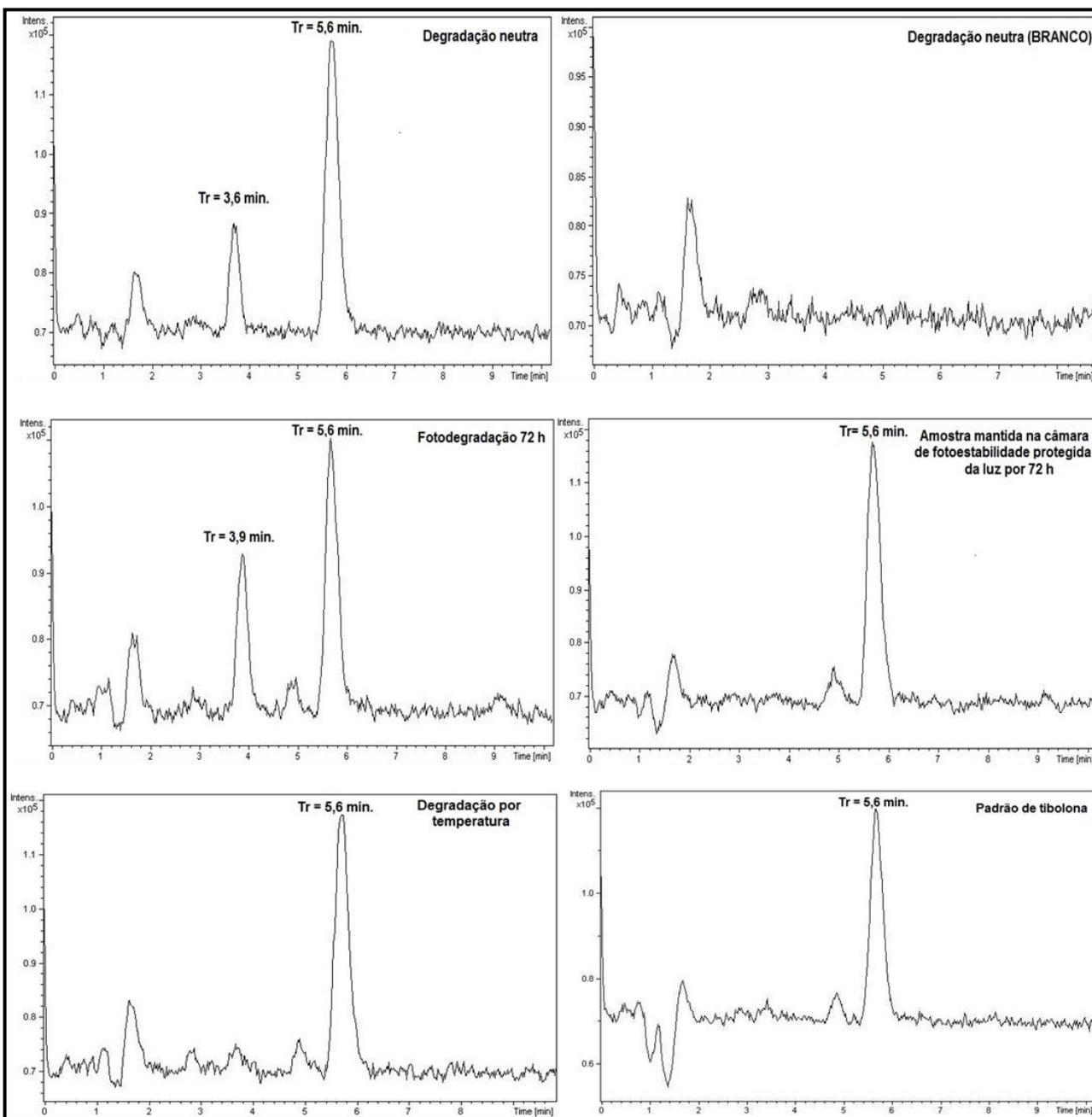
temperatura. Os cromatogramas das figuras 6 e 7, respectivamente, permitem a observação de bandas correspondentes a produtos de degradação com diferentes tempos de retenção. Pode-se observar que após a hidrólise ácida com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> a 60 °C por 24 h, foi gerado um produto de degradação no tempo de retenção de 3,9 minutos com total degradação do fármaco. Na hidrólise alcalina com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> a 60 °C por 24 h, observou-se a eluição de algumas pequenas bandas adicionais anteriores ao tempo de retenção da tibolona, onde ocorreu degradação total do fármaco. Para o teste com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3 % em 60 °C por 24 h, notou-se a total degradação da tibolona e a possível co-eluição de produtos gerados com o banda do peróxido de hidrogênio. Pode-se observar que a tibolona se mostrou estável, quando submetida a condições neutras a 60 °C e em estufa a 105°C por 24 h. Porém foi realizada uma análise em HPLC-QTOF/MS para identificar esses possíveis produtos formados e confirmar estes dados já obtidos. E por fim, após 72 horas de exposição a luz UV em temperatura de 26 ± 2°C, notou-se uma modificação na cor do fármaco de branco para amarelo e uma queda de 23,4% no teor. Além da queda do teor, houve formação de um produto de degradação antes do tempo de retenção da tibolona. Para as amostras do estudo de fotodegradação, de degradação neutra e degradação térmica, foi avaliada a pureza da banda cromatográfica da tibolona, que permaneceu após o estudo de degradação, empregando-se o detector de arranjo de diodos (DAD), e constatou-se que não houve presença de possíveis interferentes na banda cromatográfica da tibolona. Não foi realizada a análise da pureza da banda cromatográfica de tibolona para as amostras de hidrólise ácida, alcalina e oxidação, porque o fármaco foi completamente degradado e o tempo de retenção foi de 5,5 minutos.

Cabe ressaltar que as soluções degradadas mantiveram as características de aspecto límpido e incolor, e que os brancos correspondentes aos testes foram injetados simultaneamente.

Os produtos de degradação observados nas soluções obtidas do estudo de degradação forçada foram analisados por HPLC-QTOF/MS para determinação dos valores da razão massa/carga ( $m/z$ ) (Figuras 8-12).



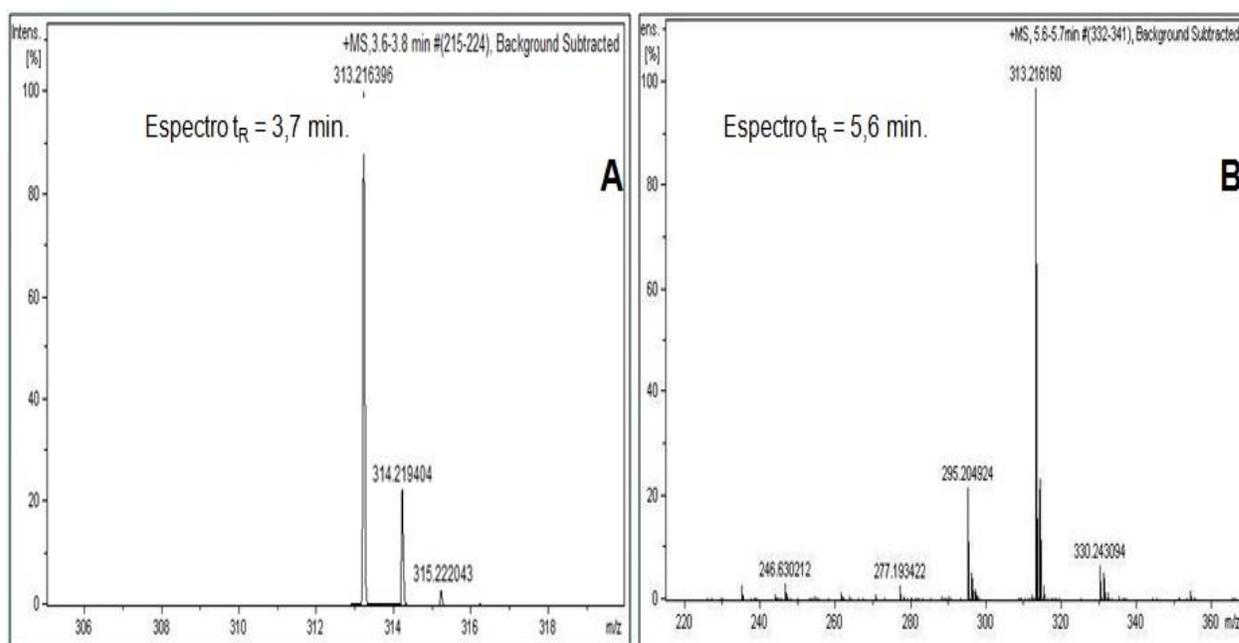
**Figura 8.** Cromatogramas obtidos por HPLC-QTOF/MS de soluções de tibolona  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  submetidas as condições de degradação ácida, alcalina, oxidativa e soluções branco.



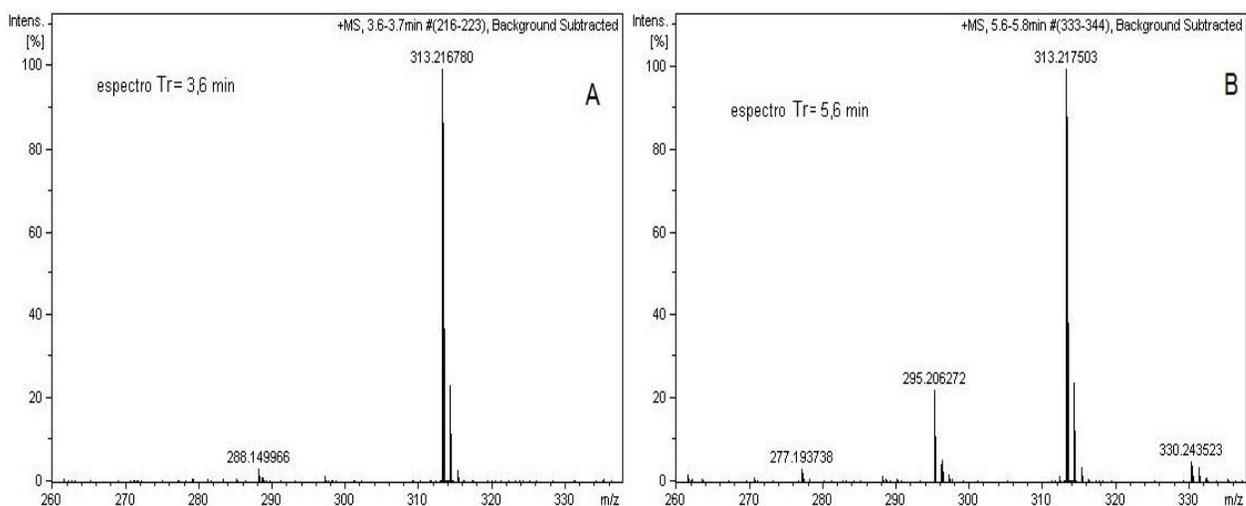
**Figura 9.** Cromatogramas obtidos por HPLC-QTOF/MS de soluções de tibolona  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  submetidas as condições de degradação neutra, fotodegradação, degradação por temperatura, soluções branco e do padrão de tiboona.

As figuras 8 e 9, respectivamente, mostram os cromatogramas obtidos por HPLC-QTOF/MS, para as soluções de tibolona submetidas às condições de degradação ácida, alcalina, oxidativa neutra, térmica e fotodegradação, as quais

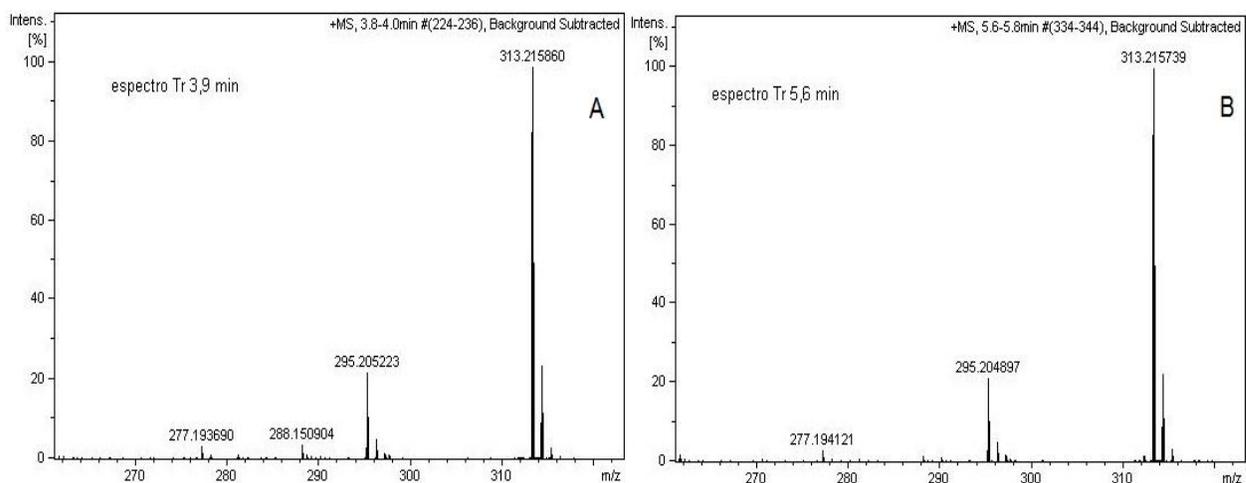
permitem observar que houve formação de produto de degradação na hidrólise ácida, neutra e na fotodegradação. Observou-se diferença no cromatograma de massas em relação ao cromatograma obtido por UV/DAD da amostra submetida à degradação neutra, pois no cromatograma UV/DAD não havia sido observada a formação de nenhum produto de degradação. Para as amostras de degradação alcalina e oxidativa, não foram encontrados picos do analito original e do produto de degradação formado, pois provavelmente houve a mineralização da amostra, com a formação de espécies de massas muito pequenas, que não se ionizaram. No entanto para a amostra de degradação térmica observou-se a permanência do pico do analito original sem formação de produto de degradação, sendo estável as condições que foram submetidas.



**Figura 10.** Espectro de massas de alta resolução do produto de degradação gerado na degradação ácida de tibolona, onde (A) é o pico do produto de degradação gerado e (B) é o pico do padrão de tibolona.



**Figura 11.** Espectro de massas de alta resolução do produto de degradação gerado na degradação neutra de tibolona, onde (A) é o pico do produto de degradação gerado e (B) é o pico de tibolona não totalmente degradado.



**Figura 12.** Espectro de massas de alta resolução do produto de degradação gerado na fotodegradação de tibolona, onde (A) é o pico do produto de degradação gerado e (B) é o pico de tibolona não totalmente degradado.

As figuras 10, 11 e 12, respectivamente, mostram os espectros de massas de alta resolução, onde os produtos de degradação formados com  $m/z$  313,2 foram observadas durante a hidrólise ácida, neutra e fotodegradação com tempo de retenção de 3,7, 3,6 e 3,9 min, respectivamente, e mostraram o mesmo perfil do espectro do produto original (tibolona). A variação nos tempos de retenção (3,7, 3,6 e 3,9) pode ter ocorrido devido a variações de temperatura ou taxa de fluxo da fase móvel durante as

análises, assim, os três picos provavelmente são o mesmo composto. Nesse caso, pode ter ocorrido dois fatos: um deles é a oxidação do grupo OH da molécula ou uma hidroxilação do oxigênio com dupla ligação, ligado ao anel. Em ambas as situações, não há modificação da massa molecular em relação a tibolona, e por isso o espectro de massas é o mesmo. Para amostras de degradação oxidativa e alcalina, não foram encontrados picos do analito original e nem de produtos de degradação formados. Provavelmente houve a mineralização da amostra com formação de espécies de massas muito pequenas e não ionizáveis.

## 5.2 Desenvolvimento do ensaio de dissolução

### 5.2.1 Condições sink

Os testes de solubilidade mostraram que a tibolona foi degradada no meio de HCl 0,1 M testado e apresentou baixa solubilidade nos meios tampão acetato pH=4,5 e tampão fosfato pH= 6,8 quando comparada com a solubilidade obtida com água como meio. Os dados estão expressos na Tabela 13:

**Tabela 13.** Valores experimentais obtidos no teste de solubilidade realizados com diferentes meios de dissolução.

<b>Ensaio de solubilidade</b>		
	Média da solubilidade ( $\mu\text{g/mL}$ )	D.P.R (%)
Água	11,43	3,14
HCl 0,1 M	1,41	105,05
Tampão fosfato pH= 6,8	7,87	12,19
Tampão acetato pH= 4,5	7,18	6,74

### 5.2.2 Otimização das condições do ensaio de dissolução

Em função de não haver nenhum produto de referência na forma farmacêutica cápsulas, as condições experimentais de dissolução foram estabelecidas com apenas um dos três produtos utilizados neste trabalho (formulação C). As cápsulas da formulação C foram selecionadas porque apresentaram homogeneidade de dose do fármaco entre as unidades, resultado este observado no teste de uniformidade de doses unitárias.

Para selecionar as condições de ensaio de dissolução é ideal que se trabalhe com um poder discriminativo máximo e que seja capaz de detectar eventuais desvios dos padrões de qualidade para os quais são propostos (MALESUIK, 2006).

Para definir as condições mais adequadas para avaliar a dissolução de cápsulas de tibolona, diferentes meios de dissolução (incluindo adição de agente tensoativo), utilização dos aparatos pá (Tipo 2) e cesta (Tipo 1) e velocidades de agitação do meio variando em 50, 75 e 100 rpm foram testadas. Quanto ao meio de dissolução, o fármaco apresentou maior solubilidade em água entre os meios testados conforme tabela 13 e o meio de HCl 0,1 mol/L não foi considerado ideal em função do fármaco ter apresentado hidrólise ácida, sendo assim, iniciou-se o estudo com água como meio de dissolução, e a utilização de aparato 2 (pá) e velocidade de agitação de 100 rpm, em função da baixa solubilidade do fármaco. Foi utilizado um volume de 500 mL de meio de dissolução para quantificação da baixa dosagem do fármaco (2,5 mg).

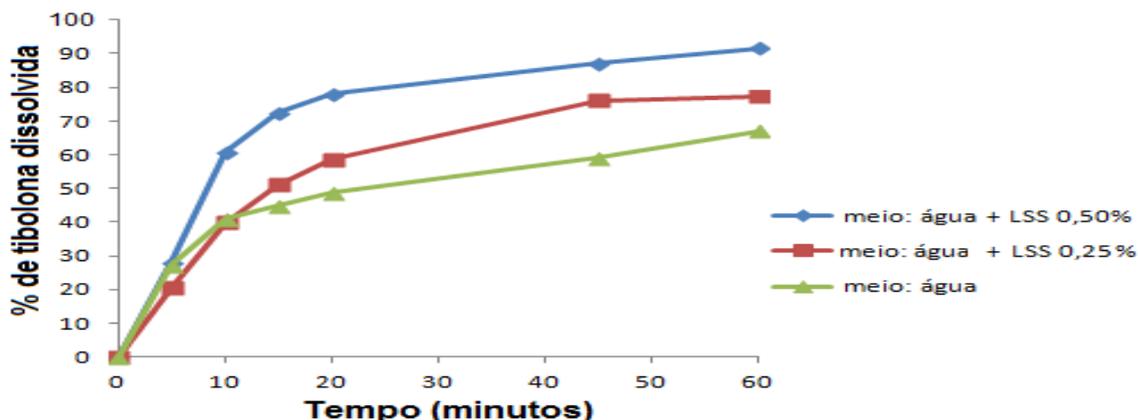
Foi estabelecido para este estudo, o critério de aceitação de 80% (Q = 75) em 45 minutos, tendo por base a monografia da forma farmacêutica comprimidos (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011). No ensaio testado com meio de dissolução água, aparato 2 e velocidade de agitação de 100 rpm, conforme observado na figura 13 e tabela 14, respectivamente, esta condição não atende a especificação estabelecida, uma vez que houve uma percentagem de liberação em até 60 minutos de ensaio inferior a 80 %.

De forma a definir o meio de dissolução, foi então adicionado na água um tensoativo com o objetivo de facilitar a liberação do fármaco. O tensoativo adicionado

foi lauril sulfato de sódio (0,25 %), com a mesma concentração que foi utilizada na monografia de comprimidos, observando-se uma melhora na liberação do fármaco a partir de 15 minutos, porém os resultados mostraram um percentual de liberação do fármaco abaixo de 80 % nos 60 minutos de ensaio. Foi dessa forma, aumentada a concentração de lauril sulfato de sódio no meio de dissolução para 0,5 %, onde pode-se observar que houve uma maior liberação do fármaco a partir de 10 minutos de teste e a percentagem de tibolona dissolvida apresentou-se acima de 80 % a partir de 45 minutos de ensaio, conforme observado na figura 13 e Tabela 14.

**Tabela 14.** Quantidade de tibolona dissolvida e desvio padrão nos ensaios de dissolução (n = 6) empregando diferentes meios (água, água + LSS 0,25% e água + LSS 0,5%), empregando aparato 2 e velocidade de 100 rpm, obtida em função do tempo.

Meios de dissolução/ DPR	% de tibolona dissolvida/ DP					
	5 min.	10 min.	15min.	20 min.	45 min.	60 min.
<b>Meio:</b> água	27,17	41,18	45,00	48,97	59,29	67,10
<b>DP</b> (água)	2,24	1,91	4,92	4,06	2,00	2,71
<b>Meio:</b> água + LSS 0,25%	20,50	39,85	51,02	58,56	76,05	77,32
<b>DP</b> (água+ LSS 0,25%)	2,10	2,58	4,52	3,73	4,03	4,73
<b>Meio:</b> água + LSS 0,50%	28,03	60,96	72,59	77,98	87,13	91,59
<b>DP</b> (água+ LSS 0,50%)	3,64	3,22	7,81	4,55	2,61	2,55

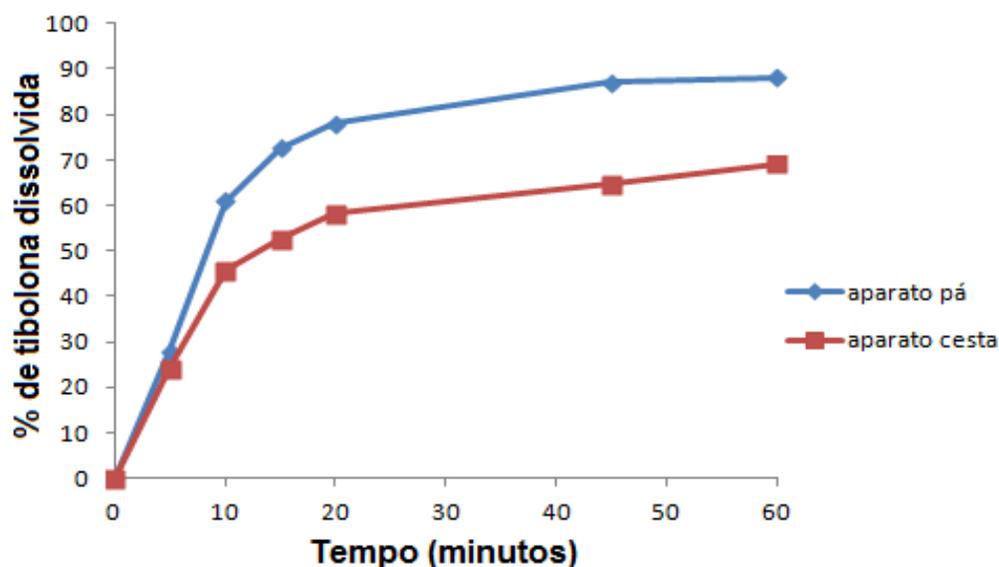


**Figura 13.** Perfil de dissolução de tibolona cápsulas empregando aparato 2, diferentes meios de dissolução (água, água + LSS 0,25% e água + LSS 0,50%) e velocidade de 100 rpm

Testou-se o aparato cesta, com o meio de dissolução já definido (solução aquosa de lauril sulfato de sódio 0,5 %) e velocidade de agitação 100 rpm. Conforme a tabela 15 e a figura 14, respectivamente, observou-se que o aparato pá apresenta vantagem quando comparado ao aparato cesta, pois os resultados obtidos mostram que neste último a percentagem de tibolona dissolvida não ultrapassou 70 % de liberação do fármaco até o último ponto de amostragem (60 minutos) do ensaio.

**Tabela 15.** Quantidade de tibolona dissolvida e desvio padrão nos ensaios de dissolução (n = 6) empregando meio (água + LSS 0,5%), aparato 1 e 2 e velocidade de agitação de 100 rpm, obtida em função do tempo.

Meios de dissolução/ DPR	% de tibolona dissolvida/ DP					
	5 min.	10 min.	15min.	20 min.	45 min.	60 min.
<b>Aparato:</b> 2 (Pá)	28,03	60,96	72,59	77,98	87,13	91,59
<b>DP</b> (Aparato: 2)	3,64	3,22	7,81	4,55	2,61	2,55
<b>Aparato:</b> 1 (Cesta)	24,12	45,92	52,78	58,47	64,70	69,26
<b>DP</b> (Aparato: 1)	3,75	1,72	7,89	7,24	2,95	3,48

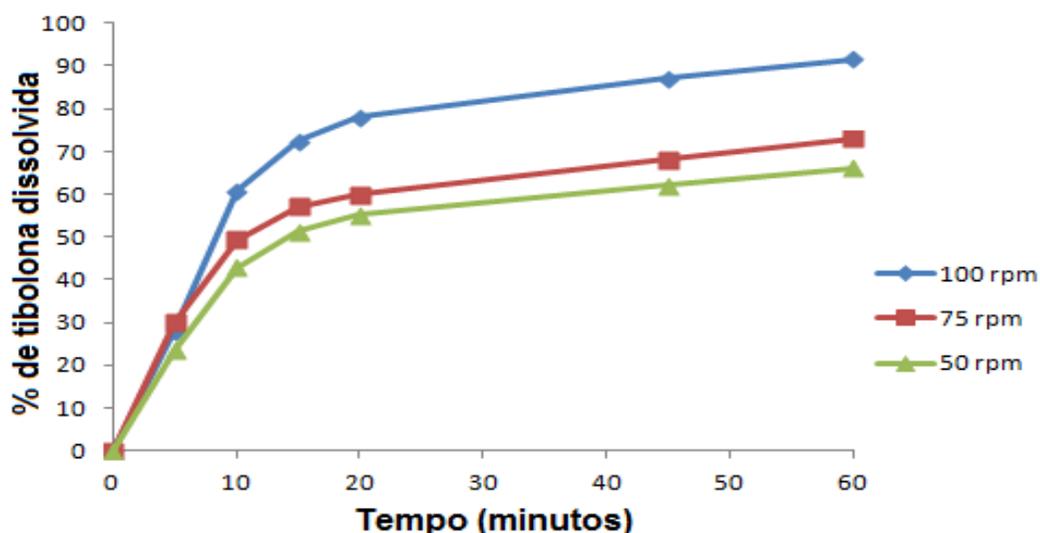


**Figura 14.** Perfil de dissolução de tibolona cápsulas empregando aparato 1 e 2, meio de dissolução (água + LSS 0,5 %) e velocidade de 100 rpm.

Realizou-se o teste com as diferentes velocidade de agitação 50, 75 e 100 rpm, com o meio de dissolução ( água + LSS 0,5%) e aparato pá, onde foi observado a influência da velocidade de agitação na liberação do fármaco. Na velocidade de 50 rpm a percentagem de tibolona dissolvida não ultrapassou 70 % até o último ponto de amostragem (60 minutos) e apresentou-se com um DP elevado para cada ponto de amostragem analisado, quando comparado aos demais ensaios. Na velocidade de 75 rpm, também não foi atingida a percentagem de tibolona dissolvida, a qual deveria apresentar-se acima de 80% a partir de 45 minutos de ensaio, dessa forma a velocidade de 100 rpm permaneceu como parâmetro de velocidade de agitação, já que está apresentou percentagem mais elevada de liberação do fármaco a partir do segundo ponto de amostragem, conforme a figura 15 e tabela 16, respectivamente.

**Tabela 16.** Quantidade de tibolona dissolvida e desvio padrão nos ensaios de dissolução (n = 6) empregando meio (água + LSS 0,5%), aparato 2 e velocidades de agitação 50, 75 e 100 rpm, obtidas em função do tempo.

Meios de dissolução/ DPR	% de tibolona dissolvida/ DP					
	5 min.	10 min.	15min.	20 min.	45 min.	60 min.
<b>Velocidade:</b> 100 rpm	28,03	60,96	72,59	77,98	87,13	91,59
<b>DP</b> (100 rpm)	3,64	3,22	7,81	4,55	2,61	2,55
<b>Velocidade:</b> 75 rpm	30,02	49,38	57,12	60,09	68,29	73,07
<b>DP</b> (75 rpm)	3,86	2,31	2,44	2,68	3,01	1,17
<b>Velocidade:</b> 50 rpm	23,42	42,88	51,39	55,28	62,14	66,10
<b>DP</b> (50 rpm)	4,28	8,06	7,16	9,16	10,30	9,60



**Figura 15.** Perfil de dissolução de tibolona cápsulas empregando aparato 2, meio de dissolução (água + LSS 0,5%) e velocidades de agitação 50, 75 e 100 rpm.

As condições de dissolução estabelecidos para a avaliação das cápsulas de tibolona foram utilização de volume do meio de dissolução de 500 ml de água adicionada de tensoativo (lauril sulfato de sódio) a 0,5 % em uma temperatura de 37 °C, aparato 2 e velocidade de agitação a 100 rpm.

### 5.2.3 Validação do ensaio de dissolução

#### 5.2.3.1 Estabilidade

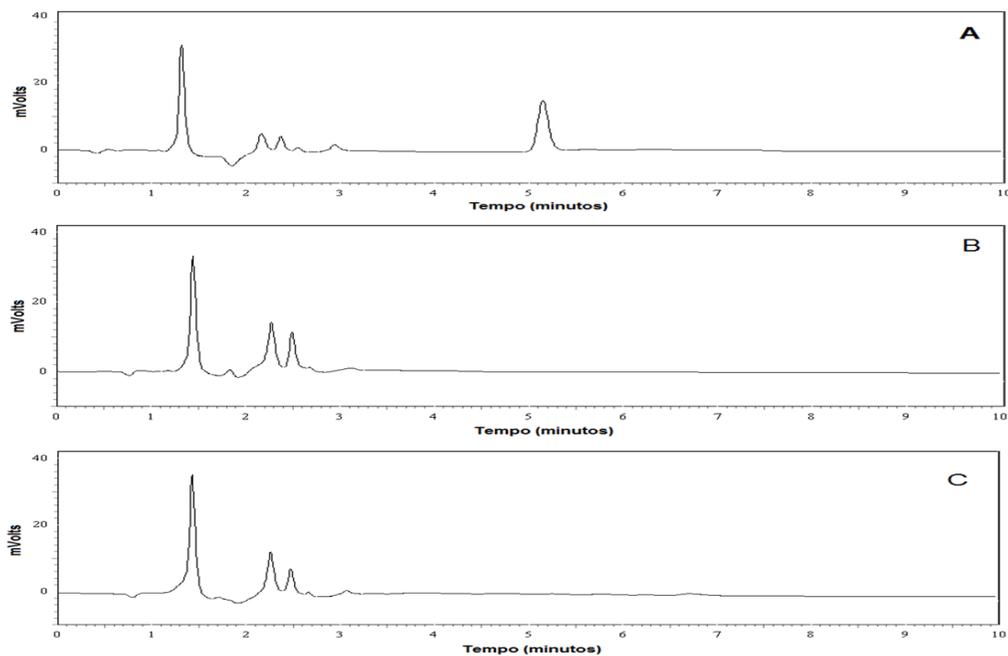
De acordo com os critérios de aceitação as soluções padrão mantiveram-se estáveis à temperatura ambiente durante 24 h e as soluções das amostras (formulações A, B e C) mantiveram-se estáveis à temperatura ambiente durante 2 h após o teste de dissolução, conforme observado na tabela 17.

**Tabela 17.** Estudo de estabilidade das soluções padrão e amostras do ensaio de dissolução.

Análise inicial (100%)	% de recuperação (após 2 h)	% de recuperação (após 24 h)
Padrão	-	100,1
Amostra A	99,85	-
Amostra B	99,81	-
Amostra C	99,89	-

### 5.2.3.2 Seletividade

No método por CLAE, nenhum pico do placebo e das cápsulas vazias foram observados no tempo de retenção da tibolona, demonstrando a seletividade do método, conforme demonstrado na Figura 16.



**Figura 16.** Cromatogramas da solução padrão de trabalho 5 µg/mL (a), solução da mistura de excipientes de cápsulas de tibolona (b) e solução das cápsulas vazias no meio de dissolução (c).

### 5.2.3.3 Linearidade

A avaliação da linearidade do método por CLAE para o ensaio de dissolução foi realizada de acordo com o item 4.3.8.3, onde a curva analítica para tibolona padrão de trabalho mostrou-se linear no intervalo avaliado de 1 a 7,5 µg/mL, com  $r = 0,9998$  (coeficiente de correlação). A equação da reta obtida foi:  $y = 25031x + 239,92$ , o DPR de cada ponto ( $n=9$ ) foram menores que 2%, estando em conformidade com o critério de aceitação (ICH, 2005).

### 5.2.3.4 Exatidão e precisão

A exatidão foi determinada pela percentagem de recuperação de quantidades conhecidas de tibolona. Recuperações entre 95 a 105 % são recomendáveis (UNITED, 2011). Os resultados encontrados para o teste de recuperação foram satisfatórios e estão apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Valores do teste de recuperação do ensaio de dissolução para cápsulas de tibolona.

Concentração adicionada (µg/mL)	Dia	Média da concentração obtida (µg/mL)	Recuperação (%)
2,5	1	2,54	101,63
2,5	2	2,53	101,20
5,0	1	4,92	98,40
5,0	2	4,99	99,93
7,5	1	7,58	101,02
7,5	2	7,56	100,84

A Tabela 19 apresenta os resultados referentes ao teste de precisão por repetibilidade precisão intermediária.

**Tabela 19.** Valores obtidos para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método de dissolução para cápsulas de tibolona.

Concentração adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Repetibilidade D.P.R. (%) (n=3)	Precisão intermediária D.P.R. (%) (n=6)
2,5	1,75	1,72
5,0	0,16	1,07
7,5	0,31	0,39

Os valores do teste de recuperação de tibolona estão entre 95,0-105,0%, mostrando exatidão aceitável. Os resultados da repetibilidade e precisão intermediária do ensaio de dissolução são apresentados na Tabela 19. Os desvios padrão relativos não excederam 2,0%, demonstrando adequada precisão para o ensaio de dissolução.

#### 5.2.3.5 Limite de quantificação e limite de detecção

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos a partir da curva analítica, com valores de 0,02  $\mu\text{g/mL}$  e 0,06  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Concluindo-se que o intervalo de trabalho do método ( $1\text{-}7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) está acima do limite de quantificação e de detecção, e que o método pode ser aplicado a cápsulas contendo 2,5 mg de princípio ativo.

#### 5.2.3.6 Robustez

Os resultados obtidos no teste de Youden e Steiner para demonstrar a robustez estão apresentados na Tabela 20. Valores de efeitos para os fatores foram menores do

que o SD critério  $\sqrt{2}$ . O método, dessa forma foi robusto para todos os fatores considerados neste estudo.

**Tabela 20.** Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner, para demonstrar robustez do método de dissolução da forma farmacêutica cápsulas (YOU DEN, STEINER, 1975).

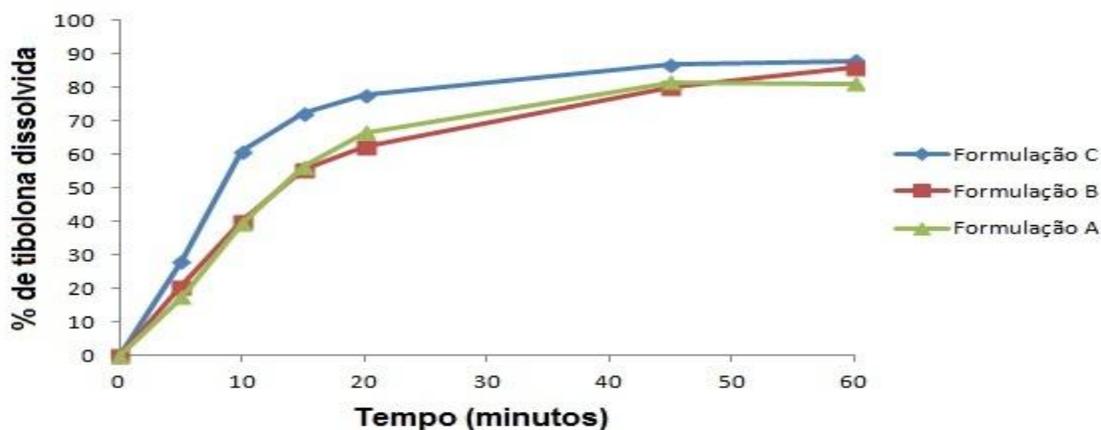
Variável	Efeito
Velocidade de agitação	2,66
Desaeração do meio	0,36
filtração da amostra	0,89
Tempo do teste de dissolução	0,72
Temperatura do meio	-2,89
Exposição a luz	-1,67
Ponto de coleta	-3,06
D.P.x $\sqrt{2}$ *	4,07

## 5.2.4 Ensaio de dissolução em formulações magistrais

O ensaio de dissolução foi validado e aplicado na avaliação de três formulações comerciais diferentes (A, B e C) com dose de 2,5 mg de tibolona. Os perfis de dissolução dos produtos analisados são apresentados na Tabela 21 e na Figura 17.

**Tabela 21.** Quantidade de tibolona dissolvida e desvio padrão das três formulações A, B e C, respectivamente, nos ensaios de dissolução (n = 6), empregando meio (água + LSS 0,5%), aparato 2 e velocidades de agitação 100 rpm, obtidas em função do tempo.

Meios de dissolução/ DPR	% de tibolona dissolvida/ DP					
	5 min.	10 min.	15min.	20 min.	45 min.	60 min.
<b>Formulação A:</b>	17,45	39,30	56,38	66,66	81,50	81,10
<b>DP</b> (Formulação A)	2,71	6,36	7,13	4,38	2,39	3,60
<b>Formulação B:</b>	20,83	40,13	55,54	62,28	80,09	85,93
<b>DP</b> (Formulação B)	6,85	9,83	13,25	10,22	10,60	5,08
<b>Formulação C:</b>	28,03	60,96	72,59	77,98	87,13	91,59
<b>DP</b> (Formulação C)	3,64	3,22	7,81	4,55	2,61	2,55



**Figura 17.** Perfis de dissolução das formulações A, B e C, empregando aparato 2, meio de dissolução (água + LSS 0,5%) e velocidades de agitação 100 rpm.

Os resultados dos perfis de dissolução obtidos, estão expressos como porcentagem de liberação do fármaco em função do tempo em minutos. A formulação C

apresentou resultados satisfatórios na liberação do fármaco, enquanto que as formulações A e B apresentaram percentagem adequada no ponto de coleta definido (45 minutos), porém estas formulações apresentaram 2 e 3 unidades, respectivamente, com liberação abaixo de 80% (valor considerado como critério de aceitação  $Q = 75\%$ , (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011) . E na observação da percentagem de liberação de cada ponto de amostragem das cápsulas da formulação B, pode-se observar um maior desvio padrão entre as replicatas analisadas, corroborando com problemas de uniformidade de conteúdo apresentados nos resultados do teste descrito no item 5.3.6.

Pode-se sugerir pela observação dos dados apresentados que o método tem a capacidade de discriminar diferentes formulações em função das três formulações comerciais analisadas (A, B e C), já que o produto C apresenta dissolução mais rápida a partir de 10 minutos quando comparado aos produtos A e B testados.

Não foi possível realizar a comparação de perfis de dissolução entre as formulações com o medicamento referência, pois não há produto referência para a forma farmacêutica cápsulas.

Uma vez que há monografia para tibolona na forma farmacêutica comprimidos, onde o meio de dissolução apresenta o tensoativo (lauril sulfato de sódio) na concentração de 0,25 %, equivalente a metade da concentração utilizada para cápsulas neste estudo e utiliza aparato pá a 50 rpm, fica demonstrado a importância de desenvolver um método de dissolução também para a forma farmacêutica cápsula, pois não se pode aplicar a metodologia de da forma farmacêutica comprimido para cápsulas em função de comportamentos diferentes, que no caso de cápsula pode-se ter influência na utilização de excipientes variados e de sua quantidade, sendo este fato de grande relevância, já que é sabido que os excipientes podem alterar a dissolução dos fármacos. Assim outros fatores podem influenciar na liberação do fármaco como diferentes técnicas de manipulação e fatores ligados a própria matéria-prima, como tamanho de partícula e polimorfismo.

Dessa forma, o ensaio de dissolução desenvolvido e validado para cápsulas de tibolona foi considerado apropriado para quantificação *in vitro* deste fármaco nesta forma farmacêutica, obtendo-se parâmetros adequados de validação.

### 5.3 Controle de Qualidade das cápsulas manipuladas de tibolona

#### 5.3.1 Aspecto

As cápsulas gelatinosas das farmácias magistrais A, B e C se apresentaram duras, bicolores ou de uma única cor, todas as três com superfície lisa e contendo pó homogêneo branco. Quanto aos ensaios de qualidade, observou-se que o aspecto das cápsulas das formulações A, B e C, respectivamente, são do tipo gelatinosas e apresentaram superfície lisa. Embora padronizadas com cores diferentes, há homogeneidade quanto à cor e ao aspecto para cada formulação.

#### 5.3.2 Peso médio

Analisando os dados apresentados da Tabela 22, nenhuma cápsula analisada ficou fora dos limites especificados pela Farmacopeia Brasileira, demonstrando homogeneidade de peso.

**Tabela 22.** Valores de peso médio das cápsulas das farmácias magistrais codificadas em A, B e C, respectivamente, e dos comprimidos referência (Livial®).

	<b>Formulação A</b>	<b>Formulação B</b>	<b>Formulação C</b>	<b>Referência</b>
<b>Cápsulas</b>	<b>Conteúdo (mg)</b>	<b>Conteúdo (mg)</b>	<b>Conteúdo (mg)</b>	<b>Conteúdo (mg)</b>
<b>Média</b>	105,43	117,79	135,64	99,58
<b>Limite*</b>	94,89 - 115,97	106,0 - 129,57	122,08 – 149,2	89,6 - 109,5
<b>Resultado</b>	102,5 – 107,6	113,7 – 122,1	129,9 – 140,0	98,7 – 100,3

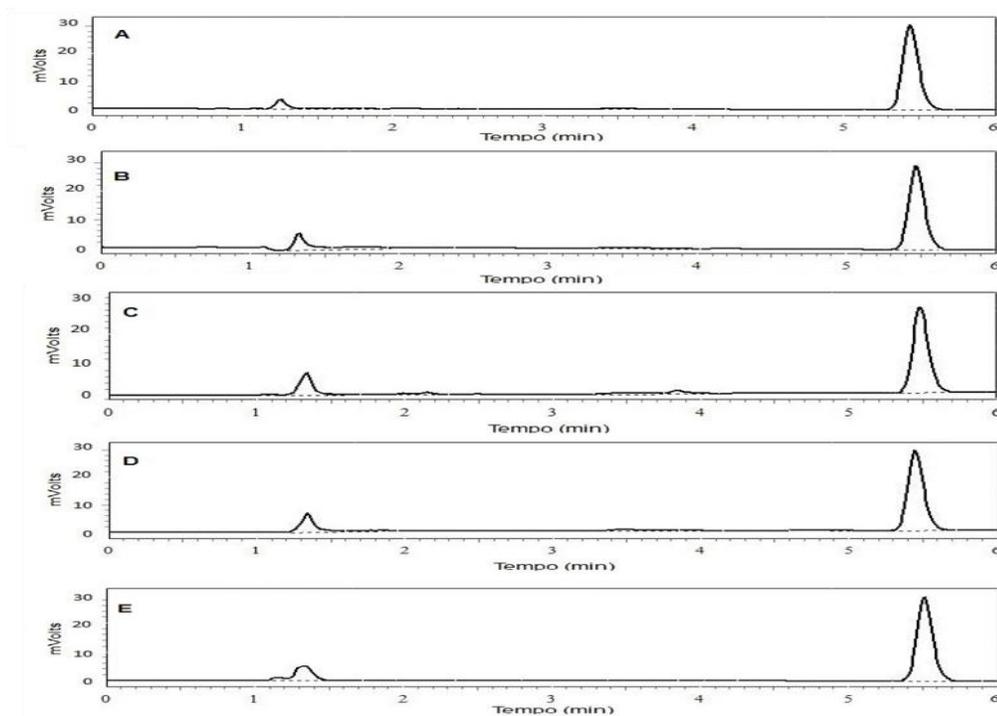
\* Farmacopeia Brasileira 2010: cápsulas ( $\pm 10\%$ ) e comprimidos ( $\pm 7,5\%$ )

### 5.3.3 Desintegração

Todas as amostras das farmácias atenderam às especificações estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira 2010, onde as cápsulas foram completamente desintegradas ao final de 45 minutos. A desintegração das cápsulas das formulações A, B e C, ocorreu em 2 minutos.

### 5.3.4 Identificação

A identificação da tibolona, observada na Figura 18, foi confirmada pela comparação do cromatograma da solução padrão com os cromatogramas obtidos das análises de cada formulação (A, B e C), respectivamente, e do cromatograma da amostra de comprimidos:



**Figura 18.** Cromatogramas obtidos por CLAE para o padrão de tibolona (A), formulação A (B), formulação B (C), formulação C (D), comprimido (E).

### 5.3.5 Teor do fármaco

Considerando a especificação para o doseamento de 90,0 a 105,0 % do valor rotulado, todas as amostras cumpriram o teste, como observado na Tabela 23.

**Tabela 23.** Valores de teor de tibolona das amostras de cápsulas e comprimidos.

	Teor (%)*	DPR (%)
<b>Formulação A</b>	98,77	1,36
<b>Formulação B</b>	93,76	0,37
<b>Formulação C</b>	94,92	0,96
<b>Comprimidos</b>	95,95	1,04

\* Especificações British Pharmacopoeia (2011).

### 5.3.6 Uniformidade de doses unitárias

A uniformidade de conteúdo foi realizada para as formulações A, B e C, conforme Tabela 24, onde as formulações A e C foram aprovadas, porém para a formulação B o valor de aceitação mostrou-se acima do especificado pela Farmacopeia Brasileira 2010, sendo necessária uma segunda análise com mais 20 cápsulas (Tabela 25), para posterior reprovação desta formulação no teste de uniformidade. Com este primeiro teste, já pode-se verificar que algumas unidades estão com o teor um pouco distante da dose declarada no rótulo, indicando que os processos envolvidos na manipulação das cápsulas não foram conduzidos de forma adequada.

**Tabela 24.** Valores do teste de uniformidade para tibolona nas amostras de cápsulas das formulações A, B e C, respectivamente.

<b>Cápsulas</b>	<b>Formulação A</b>	<b>Formulação B</b>	<b>Formulação C</b>
	<b>Resultado (%)</b>	<b>Resultado (%)</b>	<b>Resultado (%)</b>
<b>1</b>	91,84	91,21	96,23
<b>2</b>	98,32	86,70	99,99
<b>3</b>	92,30	139,24	96,60
<b>4</b>	97,79	95,32	96,19
<b>5</b>	91,02	115,04	98,25
<b>6</b>	92,18	83,07	96,62
<b>7</b>	89,58	131,00	96,90
<b>8</b>	93,03	82,60	95,92
<b>9</b>	93,09	101,23	96,23
<b>10</b>	92,21	115,31	98,52
<b>Média</b>	93,14	104,07	97,15
<b>Desvio Padrão</b>	2,79	20,17	1,33
<b>Valor de aceitação</b>	12,06	50,98	4,54

Como a formulação B não cumpriu o teste para análise de 10 cápsulas, foi necessário refazer o teste com mais 20 cápsulas e calcular novamente o valor de aceitação, onde L1 deve ser menor que 15.

**Tabela 25.** Valores do teste de uniformidade para cápsulas de tibolona referente a formulação B.

% de tibolona em cada cápsula		
Formulação B		
91,21	64,53	107,07
86,70	138,86	68,88
139,24	71,69	79,91
95,32	106,75	143,09
115,04	123,36	74,68
83,07	96,17	95,41
131,00	195,94	102,02
82,60	62,20	95,80
101,23	62,25	120,45
115,31	180,37	102,10
<b>Média (30 Unidades):</b> 104, 74		
<b>Desvio Padrão (30 unidades):</b> 32,20		
<b>Valor de aceitação:</b> 64,4		

Com o valor de aceitação e a análise da quantidade de componente ativo obtida apresentou valores menores que  $(1 - L2 \times 0,01)M = 76,13$  e valores maiores que  $(1 + L2 \times 0,01)M = 126,88$ , pode-se chegar a conclusão que a formulação B realmente não cumpriu o teste de uniformidade de doses unitárias. Este fato vem mostrar a importância deste ensaio no auxílio a todas as farmácias magistrais para corrigirem eventuais falhas no preparo das mesmas e evitar a dispensação de medicamentos inadequados para o consumo.

## 6 CONCLUSÕES

O método analítico proposto como indicador de estabilidade empregando CLAE por fase reversa apresentou-se adequado para a análise quantitativa de tibolona em cápsulas e também em comprimidos, e demonstrou seletividade em relação aos produtos gerados no teste de degradação forçada.

Em relação às condições de estresse, houve degradação total do fármaco frente às condições ácida, alcalina e oxidativa. Foi observada a formação de produto de degradação na condição ácida, neutra e por fotodegradação com mesma massa em relação ao analito original. E o fármaco mostrou-se estável sob a condição de degradação térmica.

Os parâmetros de validação do método indicador de estabilidade como seletividade (incluindo análise da pureza das bandas geradas a partir do ensaio de degradação, empregando detector de DAD), linearidade, LD, LQ, precisão, exatidão e robustez foram avaliados e apresentaram-se conformes, segundo recomendações estabelecidas pelos órgãos oficiais.

As condições para realização do ensaio de dissolução de tibolona, na forma farmacêutica cápsulas, consistem na utilização de água adicionada de LSS 0,50%, aparato pá e velocidade de agitação do meio de 100 rpm, com tempo de coleta da amostra em 45 minutos e tolerância de, no mínimo, 80 % de liberação.

O ensaio de dissolução foi validado e mostrou-se apropriado para quantificação da liberação *in vitro* de tibolona, na forma farmacêutica cápsulas, mostrando resultados adequados para todos os parâmetros analisados.

Os testes de qualidade para as cápsulas das formulações A, B e C, respectivamente, foram considerados satisfatórios em relação ao peso médio, desintegração, identificação e teor de tibolona. Já a uniformidade de conteúdo mostrou-se não conforme para a formulação B, demonstrando a importância desta análise para os testes de controle de qualidade, já que comprova a homogeneidade do enchimento e qualidade do medicamento oferecido ao consumidor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIDON, G. L.; LENNERNÃS. H.; SHAR, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n.3, p. 413-420, 1995.

AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2005.

BANAKAR, U.V. **Pharmaceutical dissolution testing**. New York: Marcel Dekker, p. 437, 1992.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ETO, Y. **Formulário Médico Farmacêutico**, 2ª edição, São Paulo, Tecnopress, 2002.

BERNARDES, M. L. P.; MUELLER, A.; GEBARA, K. S. Desenvolvimento e controle de qualidade de cápsulas contendo captopril 25 mg. **Interbio**. v.4 n.1 - ISSN 1981-3775, 2010.

BERTOLLO, G. M. **O processo magistral em farmácias do estado do ESPÍRITO SANTO**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

Biopharmaceutics Classification System (BCS). Therapeutic Systems Research laboratories. < <http://69.20.123.154/services/bcs/search.cfm> > Acesso em 10 de dezembro de 2012.

BLOM, M. J. et al. Metabolism of tibolone and its metabolites in uterine and vaginal tissue of rat and human origin. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. v. 101, p.46-49, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para qualidade em química analítica: assistência à acreditação. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho 2003.

BRASIL. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 01 de agosto de 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº. 67, de 8 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos para Uso Humanos em Farmácias. **Diário Oficial da União**, Brasília, 9 de outubro 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº. 87, de 21 de novembro de 2008. Altera o Regulamento Técnico sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos para Uso Humanos em Farmácias. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de novembro 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Guia para a qualidade em química analítica*. Uma assistência para a habilitação. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/laboratorios.pdf>>. Acesso em 15 de janeiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Bulário eletrônico da ANVISA (Libian®)**. Disponível em: < <http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/>> Acesso em 10 de julho de 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Bulário eletrônico da ANVISA (Livial®)**. Disponível em: < <http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/>> Acesso em 10 de julho de 2012b.

BRITISH PHARMACOPOEIA. **The Stationery Office**, London, vol. 2, p. 2137- 2138; 3264-3266, 2011.

CARLONI, M. B. **Densidade mamográfica antes e após o uso de tibolona**: Auxílio da informática. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CARVALHO, A. C. B. et al. Histomorfometria do tecido ósseo em ratas castradas tratadas com tibolona . **J Bras Patol Med Lab**. v. 46, n. 3, p. 235-243, 2010.

CAVADAS, L. F. et al. ABORDAGEM DA MENOPAUSA nos Cuidados de Saúde Primários. **Acta Med Port**. v. 23, p. 227-236, 2010.

DROGE, M. J. et al. 7 $\alpha$ -Methyl-ethinyl estradiol is not a metabolite of tibolone but a chemical stress artifact. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**. v. 14, n. 3, p. 474-480, 2007.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **Council of Europe**, Strasbourg Cedex. France, 6. ed., v. 2, p. 3074, 3075, 2008.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FEKETE, S.; FEKETE, J.; GANZLER, K. Characterization of new types of stationary phases for fast liquid chromatographic applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 50, p.703-709, 2009.

FERRAZ, C. C et al . Avaliação do controle de qualidade em farmácias com manipulação na cidade de SOROCABA, SP. **Revista de Estudos Universitários**. Sorocaba, SP. v.34, p.135-148, 2008.

FDA. **Food and Drug Administration**. Guidance for industry. Dissolution testing of immediate released solid oral dosage forms. Rockville: FDA, 1997.

FDA. **Food and Drug Administration**, Technical Review Guide; Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, Chemistry Manufacturing and Controls Documentation, Draft Guidance, 2000.

FROES, N. D. T. C.; PEREIRA, E. S.; NEGRELLI, W. F. Fatores de risco da osteoporose: prevenção e detecção através do monitoramento clínico e genético. **ACTA ORTOP BRAS**. v. 10, n. 1, 2002.

GIANOTTO, E. A. S, et al. Qualidade de cápsulas de cloridrato de fluoxetina manipuladas em farmácias. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.5, p.727-733, 2008.

GOOYER, M. E. et al. Tibolone is not converted by human aromatase to 7 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -ethynylestradiol (7 $\alpha$ -MEE): Analyses with sensitive bioassays for estrogens and androgens and with LC-MSMS. **Steroids**. v. 68, p.235-243, 2003.

GRINGS, A. C. et al. Riscos e Benefícios da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) em mulheres na menopausa. **RBAC**, v. 41. n. p. 229-233, 2009.

HALBE, H. W.; CUNHA, D. C. Tratamento hormonal dos distúrbios menopausais. **Diagn Tratamento**. v. 15, n.4, p. 162-9, 2010.

HENRIQUES, H. N. et al. Efeito de doses elevadas de tibolona sobre o peso corporal e perfil lipídico de ratas ooforectomizadas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 32, n.2, p. 88-93, 2010.

GIBALDI, M. **Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 406, 1991.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008 de fevereiro de 2010 (revisão), 2010.

ICH. **International Conference on Harmonization** (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use Topic Q2 (R1); Validation of Analytical procedures: Text and Methodology, Geneva, 2005.

International Standard Organization. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025, 1999.

JADHAV, V. et al. Validation of high performance liquid chromatographic method for the determination of Tibolone in bulk and pharmaceutical dosage form. **Journal of Pharmacy Research**. v. 2, n.4, p. 694-697, 2009.

KENEMANS, P.; SPEROFF, L. Tibolone: clinical recommendations and practical guidelines. A report of the International Tibolone Consensus Group. **Maturitas**. v.16, n.1, p. 21-8, 2005.

LEITE, E. G. **ESTABILIDADE**: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005.

MALESUIK, M. D. et al. Desenvolvimento de teste de dissolução e estudo comparativo de comprimidos e cápsulas magistrais contendo anlodipino. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 27, n.1, p.37-49, 2006.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2003.

MARTINELLI, H. K. et al. Avaliação do controle de qualidade realizado nas farmácias de manipulação e homeopáticas de Maringá, Estado do Paraná. *Maringá*, v. 27, n. 2, p. 137-143, 2005.

PARDINI, D. Terapia Hormonal da Menopausa. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 51, n.6, p. 938-942, 2007.

PENNING, T. M. et al. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) of steroid hormone metabolites and its applications. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. v. 121, p. 546-555, 2010.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. 3 ed. São Paulo, p. 7, 43, 45, 48, 2010.

POMBAL, R.; BARATA, P.; OLIVEIRA, R. Estabilidade dos medicamentos manipulados. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. n.7, p- 330-341, 2010.

- RENOUX, C. et al. Hormone replacement therapy use and the risk of stroke. **Maturitas**. v. 61, p. 305-309, 2008.
- REYNOLDS, D. W. et al. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology, Iselin**, p. 48-56, 2002.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.
- RIBEIRO, F. A. L. et. al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quím. nova**. v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008
- ROSA, H. B.; TOLOTTI, R.C. Desenvolvimento e validação de método para o doseamento de tibolona em cápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím. nova**. v. 35, n. 5, p. 1030-1335, 2012.
- SILVA, R. L.; VOLPATO, N. M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.2, p.16-172, 2002.
- SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. **EQUALAB - Congresso e Feira de Qualidade em Metrologia**. p. 8-15, 2006.
- SILVA, K. E. R. et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**. v. 2, n. 30, p. 129-135, 2009.
- SILVA, M. A. G. et al. Ação da tibolona sobre o parênquima mamário. **FEMINA**. v. 38, n. 1, p. 47-52, 2010.
- STECKELBROECK, S. et al. Tibolone Metabolism in Human Liver Is Catalyzed by  $3\alpha/3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activities of the Four Isoforms of the Aldo-Keto Reductase (AKR)1C Subfamily. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v. 316, n. 3, p. 1300-1309, 2006.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 34. ed. The United States Pharmacopeial Convention. Rockville, 2011.
- VALENTINI, S.R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de captopril - comparação de metodologias para um programa de garantia de qualidade. **Acta Sci. Health Sc. Maringá**, v. 26, n. 2, p. 357-364, 2004.

VALENTINI, S.R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arq Mudi**. Maringá, v.11, n. 2, p. 26-31, 2007.

VERHEUL, H. A. M. et. al. Pharmacokinetic Parameters of Tibolone and Metabolites in Plasma, Urine, Feces, and Bile from Ovariectomized Cynomolgus Monkeys after a Single Dose or Multiple Doses of Tibolone. **Drug metabolism and disposition**. v. 35, n. 7, p.1112-1118, 2007.

VERHOEVEN, C. H. J.; VOS, R. M. E.; DELBRESSINE, L. P. C. The in vivo metabolism of tibolone in animal species. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**. v. 27, n. 1, p.1-10, 2002.

YOU DEN, W. J; STEINER, E. H. Statistical Manual of the AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, TX, 1975.

ZAHAR, S. E. V. Qualidade de vida em usuárias e não usuárias de terapia de reposição hormonal. **Rev Assoc Med Bras**. v. 51, n. 3, p. 133-138, 2005.

ZACHARIA, L. C. et al. Conversion of tibolone to 7 $\alpha$  -methyl-ethinyl estradiol using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry: interpretation and clinical implications. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**. v. 13, n. 6, p. 926-934, 2006.

## APÊNDICE A – Proposta de monografia

### CÁPSULAS DE TIBOLONA

Contém, no mínimo, 90, % e, no máximo, 105,0 % da quantidade declarada de  $C_{21}H_{28}O_2$ .

### IDENTIFICAÇÃO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia líquida de alta eficiência* (V.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector de ultravioleta a 205 nm, coluna de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (C18) com partículas de 5  $\mu$ m mantida à temperatura de 30 °C e com vazão de fase móvel de 1,0 mL/min.

*Solução (1)*: Pesar 20 cápsulas, remover o conteúdo e pesá-las novamente. A partir do peso médio, pesar a quantidade equivalente a 10 mg de tibolona e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 70 mL de solvente , levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de 10  $\mu$ g/mL.

*Solução (2)*: Pesar quantidade equivalente a 10 mg de tibolona e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 70 mL de solvente e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de 10  $\mu$ g/mL.

*Fase móvel*: acetonitrila e água (60:40 v/v).

*Procedimento:* Injetar, separadamente, 20 µL das soluções (1) e (2). O cromatograma obtido com a *solução (1)* deve ser semelhante ao obtido com a *solução (2)*.

## CARACTERÍSTICAS

**Determinação de peso** (V.1.1). Cumpre o teste.

**Teste de desintegração** (V.1.4.1). Cumpre o teste.

**Uniformidade de doses unitárias** (V.1.6). Cumpre o teste.

## TESTE DE DISSOLUÇÃO (V.1.5)

*Meio de dissolução:* Solução aquosa de lauril sulfato de sódio 0,5 % (500 mL)

*Aparelhagem:* pá

*Velocidade de agitação:* 100 rpm

*Tempo:* 45 minutos

Imediatamente após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução e filtrar. Preparar solução padrão na mesma concentração, utilizando metanol para dissolver o fármaco e solução aquosa de lauril sulfato de sódio 0,5 % como solvente. Proceder conforme os seguintes métodos.

Proceder conforme descrito em *Cromatografia Líquida de alta eficiência* (V.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector de ultravioleta a 205nm, coluna de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (C18) com partículas de 5 µm mantida à temperatura de 30 °C e com vazão de fase móvel de 1 mL/min.

*Fase móvel:* acetonitrila e água (60:40, v/v).

Injetar, separadamente, 20 µL das soluções padrão e amostra. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> dissolvida no meio a partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

*Tolerância:* não menos que 80% (Q=75%) da quantidade declarada de C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> se dissolvem em 45 minutos.

## ENSAIOS DE PUREZA

**Substâncias relacionadas.** Proceder conforme descrito no Doseamento. Injetar, 20µL da *solução amostra*. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de cada impureza a partir da fórmula:

$$100 \times (A_i/A_s)$$

em que: A<sub>i</sub> é a área de cada impureza e A<sub>s</sub> é a soma das áreas de todos os picos. O limite é de 0,2% para cada impureza e de 0,5% para o total de impurezas.

## DOSEAMENTO

*Por cromatografia líquida de alta eficiência (V.2.17.4).* Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 205 nm, coluna de 25,0 cm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18) com partículas de 5 µm, mantida à temperatura de 30 °C e com vazão de fase móvel de 1 mL/min.

*Fase móvel:* acetonitrila e água (60:40, v/v).

*Solução amostra:* pesar 20 cápsulas. Remover o conteúdo e pesá-las novamente. Transferir quantidade de pó equivalente a 10 mg de tibolona e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com fase móvel homogeneizar e filtrar. Diluir pra concentração final de 10 µg/mL.

*Solução padrão:* Pesar quantidade equivalente a 10 mg de tibolona e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com fase móvel homogeneizar e filtrar. Diluir pra concentração final de 10 µg/mL.

*Procedimento:* Injetar, separadamente, 20 µL das soluções padrão e amostra. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> à partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

## ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.