

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**OLIMPIA MARIA MARTINS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
ANÁLISE DE FINASTERIDA CÁPSULAS**

*Alfenas/MG*  
2011

**OLIMPIA MARIA MARTINS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
ANÁLISE DE FINASTERIDA CÁPSULAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Avaliação físico-química e microbiológica de fármacos e medicamentos. Orientadora: Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo.

Co-orientador: Dr. Rudy Bonfilio.

Alfenas/MG

2011

Santos, Olimpia Maria Martins.  
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise de  
finasterida cápsulas . / Olimpia Maria Martins Santos . - 2011.

96 f. -

Orientadora: Magali Benjamim de Araújo.

Co-orientador: Rudy Bonfilio.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011.

1. Finasterida. 2. Cápsulas. 3. Cromatografia líquida de alta  
eficiência. 4. Dissolução. 5. Controle de qualidade. I. Araújo,  
Magali Benjamim de. II. Bonfilio, Rudy. III. Título.

CDD: 615.1

**OLIMPIA MARIA MARTINS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
ANÁLISE DE FINASTERIDA CÁPSULAS**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a 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<sup>ª</sup>. Magali Benjamim de Araújo

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof<sup>º</sup>. Humberto Gomes Ferraz

Instituição: USP-SP

Assinatura:

Prof<sup>ª</sup>. Gislaine Ribeiro Pereira

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Dedico a Deus, à minha mãe Maria do Carmo, minha irmã Águeda e André pela dedicação e apoio no trabalho realizado.

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

À minha chefe e orientadora, Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo, pela confiança depositada, incentivo e exemplo a ser seguido.

Ao meu co-orientador Dr. Rudy Bonfilio por sua dedicação e empenho na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos-Neto por se mostrar sempre solícito e pela colaboração nas análises realizadas no Laboratório de Cromatografia da Universidade de São Paulo- São Carlos.

Ao André Luiz Machado Viana, amor da minha vida, pelo amor, compreensão e companheirismo.

Aos colegas do Núcleo Controle de Qualidade da Universidade Federal de Alfenas, em especial à Audrei Nunes Fernandes Matinatti pela grande amizade.

Aos colegas da turma 2010 do mestrado em Ciências Farmacêuticas, Antônio Felipe Feliccione Oliveira, Mariane Gonçalves Santos, Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho e Talita Antunes Guimarães pelos bons momentos vividos.

À secretaria da pós-graduação, Thiago Bueno Pereira e Fabiana da Silva pela paciência e prontidão em atendimento.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho e não foram aqui citados, minha eterna gratidão.

## RESUMO

A finasterida (FNS) é um fármaco sintético 4-azasteróide (azaandrost-1-eno-17-carboxamida, N-(1,1-dimetil)-3-oxo-, (5 $\alpha$ , 17 $\beta$ ), inibidor específico do esteróide tipo II, 5 $\alpha$ - redutase, uma enzima intracelular que converte a testosterona ao mais potente andrógeno 5 $\alpha$ -diidrotestosterona. É classificada como fármaco da classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). A FNS é indicada no tratamento e controle de homens com hiperplasia prostática benigna (HPB), prevenção e tratamento de câncer de próstata, alopecia androgênica e em alguns casos de hirsutismo. Apesar de o medicamento manipulado oferecer vantagens em relação à facilidade posológica e preço mais acessível, são inúmeros obstáculos que dificultam o avanço do setor de manipulação. O maior destes obstáculos é a falta de credibilidade do produto manipulado pela suposta ausência de um controle de qualidade rígido das matérias-primas e produtos acabados, ausência de controle do processo de produção e sua reprodutibilidade. Para se atingir um objetivo terapêutico esperado, deve-se constatar que o fármaco esteja na concentração indicada pelo fabricante, que libere o princípio ativo na quantidade e velocidade adequadas ao efeito terapêutico. Não há monografia oficial para quantificação de FNS na forma farmacêutica cápsulas nem teste de dissolução. Com isso, desenvolver uma metodologia analítica para quantificação da FNS em cápsulas manipuladas, que seja rápida, precisa e seletiva é de grande importância a fim de que possíveis não-conformidades sejam detectadas a tempo de se tornarem medidas corretivas antes que as mesmas acarretem riscos para o paciente, os quais podem se traduzir em ineficácia, toxicidade, eventualmente, em morte. Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método rápido, preciso, seletivo, indicador de estabilidade para a quantificação da FNS na forma de cápsulas e um teste de dissolução para a quantificação *in vitro* de sua liberação no meio de dissolução para fins de avaliação da qualidade desses produtos em análise de rotina em laboratórios de controle de qualidade.

Palavras-chave: Finasterida. Cápsulas. Cromatografia líquida de alta eficiência. Método indicador de estabilidade. Dissolução. Controle de qualidade.

## ABSTRACT

Finasteride (FNS) is a synthetic drug 4-azasteróide (azaandrost-1-ene-17-carboxamide, N-(1,1-dimethyl)-3-oxo-, (5 $\alpha$ , 17 $\beta$ ), specific inhibitor of steroid Type II, 5 $\alpha$ -reductase, an intracellular enzyme that converts testosterone to the more potent androgen 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone. FNS is classified as Class II (low solubility and high permeability) Biopharmaceutical Classification System (BCS). FNS is indicated for the treatment and control men with benign prostatic hyperplasia (BPH), prevention and treatment of prostate cancer and androgenetic alopecia some cases of hirsutism. Although the compounded drugs offer advantages with respect to ease dosage and more affordable, there are many obstacles that hinder the advancement of industry manipulation. The largest of these obstacles is the lack of credibility of the product handled by the supposed absence of a strict quality control of raw materials and finished products, lack of control of the production process and its reproducibility. To achieve a therapeutic goal expected, it must be noted that the drug concentration is indicated by the manufacturer to release the principle active in adequate amount and speed the therapeutic effect. There is no official monograph for quantification of FNS as pharmaceutical capsules or dissolution test. Therefore, to develop an analytical methodology for quantification of FNS in compounded capsules, which is quick, precise and selective is of great importance to ensure that potential non conformities are detected in time to make corrective measures before they can entail risks for the patient, which can translate into inefficiency, toxicity, eventually, death. This work was developed and validated a rapid, precise, selective, stability indicator for the quantification of NSF in the form of capsules and a dissolution test for in vitro quantification of their release into the dissolution medium for the purpose of assessing the quality of these products in routine analysis laboratory quality control.

Keywords: Finasteride. Capsules. High performance liquid chromatography. Stability-indicator method. Dissolution test. Quality control.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da finasterida.....	13
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Excipientes utilizados na produção do medicamento referência da finasterida 5 mg (Proscar®) e na manipulação de cápsulas de finasterida na região de Alfenas-MG e suas funções.....	14
Tabela 2 - Critérios de aceitação para o teste de dissolução de formas farmacêuticas de liberação imediata.....	23

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Finasterida</b> .....	13
2.1.1	<i>Características físico-químicas</i> .....	13
2.1.2	<i>Mecanismo de ação</i> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Desenvolvimento de metodologia analítica para ensaios de doseamento</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Desenvolvimento de metodologia analítica para ensaios de dissolução</b> .....	18
<b>2.4</b>	<b>Validação</b> .....	24
2.4.1	<i>Seletividade</i> .....	26
2.4.2	<i>Linearidade</i> .....	28
2.4.3	<i>Intervalo</i> .....	28
2.4.4	<i>Precisão</i> .....	29
2.4.5	<i>Exatidão</i> .....	30
2.4.6	<i>Limite de Detecção (LD)</i> .....	32
2.4.7	<i>Limite de Quantificação (LQ)</i> .....	33
2.4.8	<i>Robustez</i> .....	34
<b>2.5</b>	<b>Aplicação do método e avaliação da qualidade das cápsulas</b> .....	35
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	36
3.1	<i>Artigo I</i> .....	36
3.2	<i>Artigo II</i> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88

## 1 INTRODUÇÃO

Muitas transformações importantes no setor de saúde do país estão ocorrendo, em legislações, tecnologia e na busca constante pela qualidade dos serviços prestados e dos produtos farmacêuticos disponibilizados aos usuários de medicamentos. A implantação de sistema de qualidade no segmento magistral tem sido exigida cada vez mais, principalmente devido a qualidade dos medicamentos estar diretamente envolvida com a saúde pública (FERREIRA, 2008).

Desta forma, a avaliação da qualidade de medicamentos manipulados em farmácias é de vital importância a fim de que possíveis não-conformidades sejam detectadas a tempo de se tornarem medidas corretivas antes que as mesmas acarretem riscos para o paciente, os quais podem se traduzir em ineficácia, toxicidade, eventualmente, em morte (NUNAN et al., 2003).

A farmácia magistral brasileira passou nos últimos anos por profundas transformações, adequando-se aos novos parâmetros de qualidade, mais exigentes e à novas legislações, mais rigorosas (FERREIRA, 2008). Sabe-se que existem aproximadamente sete mil farmácias magistrais em todo o país (CFF, 2011). 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).

Apesar de o medicamento manipulado oferecer vantagens em relação à facilidade posológica e preço mais acessível, são inúmeros obstáculos que dificultam o avanço do setor de manipulação. O maior destes obstáculos é a falta de credibilidade do produto manipulado pela suposta ausência de um controle de qualidade rígido das matérias-primas e produtos acabados, ausência de controle do processo de produção e sua reprodutibilidade (FERREIRA, 2008). A falta de informação a respeito do controle de qualidade dos medicamentos manipulados levou a Sociedade Brasileira de Cardiologia a não recomendar o uso dos anti-hipertensivos manipulados (SBC, 2006).

Qualidade é a palavra de ordem e deve ser inerente a qualquer produto ou prestação de serviço na atualidade e, para a farmácia magistral fundamental para sua sobrevivência (FERREIRA, 2008).

A farmácia tem por obrigação submeter todas as matérias primas, e por amostragem, os produtos acabados aos testes exigidos, sendo que a farmácia pode decidir por realizar ou terceirizar os testes de teor de princípio ativo e pureza microbiológica. A empresa responsável por terceirizá-los deve estar tecnicamente capacitada para esse fim (BRASIL, 2008; MARTINELLI et al., 2005).

Em 2007, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC 067/07, uma revisão da RDC-33/00, estabelecendo critérios mais rígidos para a manipulação de medicamentos no Brasil. A partir de 21 de novembro de 2008 a RDC 67/07 passou a ser substituída pela RDC 87/08, vigente até o momento (BRASIL, 2011).

Para se atingir um objetivo terapêutico esperado, deve-se constatar que o fármaco esteja na concentração indicada pelo fabricante, que libere o princípio ativo na quantidade e velocidade adequadas ao efeito terapêutico, sendo bioequivalente ao produto de referência e, além disso, possua estabilidade físico-química dentro do prazo de validade (AULTON, 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 ativo 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 ativo 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 finasterida foi desenvolvida na década de 70 por um grupo de pesquisadores da Merck® liderados por P. Roy Vagelos após ver uma conferência de medicina sobre crianças hermafroditas no Canadá. Essas crianças apresentavam uma deficiência genética na enzima 5  $\alpha$ -

redutase, que converte a testosterona a diidrotestosterona, sua forma mais potente. Foi observado ainda que, quando adultos, apresentavam a próstata subdesenvolvida e não apresentavam perda de cabelo. Assim, o chefe de pesquisa da Merck na época teve a ideia de desenvolver um fármaco que diminuiria o aumento da próstata, algo que a Merck, e quase todas as outras indústrias farmacêuticas, queria desenvolver. Se os níveis de diidrotestosterona, poderiam ser reduzidos com um medicamento que inibesse a ação da enzima, o fármaco teria um mercado entre 15 milhões de homens americanos atormentados por aumento da próstata, uma condição constrangedora e muitas vezes dolorosa, que pode bloquear o fluxo de urina, interromper o sono e causar infecções graves (FREUDENHEIM, 1992).

Em 1992 a finasterida foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso na hiperplasia benigna de próstata, diminuindo o volume da próstata e melhorando os sintomas de incontinência urinária. Em 1995, o FDA também aprovou seu uso no tratamento de alopecia de origem androgênica. Começou a ser comercializada no Brasil no ano de 1998 e dados da ANVISA apontam cinquenta laboratórios com licença para fabricação da finasterida no Brasil (REMÉDIO, 2011).

Por sua grande utilização também na forma de cápsulas, é de suma importância desenvolver e validar uma metodologia analítica precisa e viável, que possa ser aplicada para a análise de finasterida nesta forma farmacêutica, levando em consideração a sua estrutura química, propriedades físico-químicas e comportamento do fármaco quando submetido às condições de análise. Bem como o estudo da liberação do ativo da forma farmacêutica cápsula visando à padronização do teste de dissolução para que possa ser aplicado na rotina em laboratórios de controle de qualidade.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Finasterida

#### 2.1.1 Características físico-químicas da finasterida

A finasterida (FNS) é um fármaco sintetizado a partir da progesterona. Possui fórmula molecular igual  $C_{23}H_{36}N_2O_2$  e peso molecular de 372,6. Sua fórmula estrutural é vista na Figura 1. Praticamente insolúvel em água, livremente solúvel em etanol e clorofórmio. Apresenta polimorfismo (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009). Sua hidrofobicidade é demonstrada por seu LogP (octanol/água) igual a 3,03 (MACEK, 2001). De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a FNS é pertencente a Classe II (fármacos pouco solúveis e altamente permeáveis) (ALMEIDA; MARQUES, 2011). A FNS é um pó cristalino branco ou quase branco com ponto de fusão próximo a  $250^{\circ}C$  (FDA, 2010).

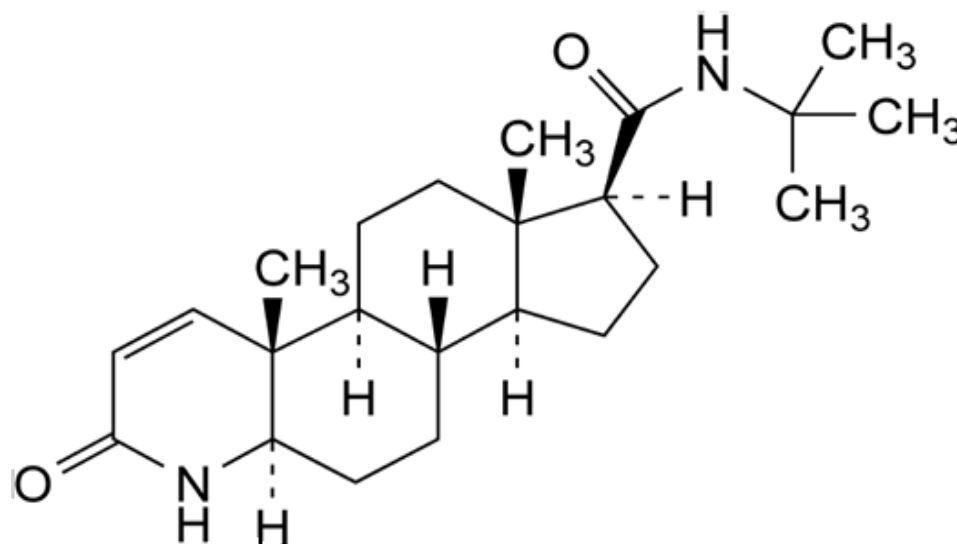


Figura 1- Estrutura química da finasterida.

Fonte: EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008.

Devido a baixa solubilidade da FNS em água (0,04 mg/mL), vários autores estudaram métodos de complexação da FNS com polímeros e ciclodextrinas para aumentar sua solubilidade, taxa de dissolução e, conseqüentemente sua biodisponibilidade (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON (2005, 2007); ASBAHR et al., 2009; ALMEIDA; MARQUES, 2011).

A solubilidade da FNS também pode ser melhorada de acordo com os excipientes utilizados em sua fabricação/manipulação, pois o medicamento referência (Proscar® 5mg), o qual tem eficácia comprovada, apresenta uma boa liberação *in vitro* em água, pois a metodologia oficial apresenta água como o meio de dissolução para os comprimidos de FNS (UNITED, 2011).

Os excipientes utilizados na produção do Proscar® 5mg e os excipientes mais utilizados na manipulação de cápsulas de FNS na região de Alfenas- MG, bem como suas funções na formulação são vistos na Tabela 1.

Tabela 1- Excipientes utilizados na produção do medicamento referência da finasterida 5 mg (Proscar® ) e na manipulação de cápsulas de finasterida na região de Alfenas-MG e suas funções.

Medicamento	Excipientes	Função na formulação <sup>(*)</sup>
Proscar®	Lactose	Diluyente
	Amido	Desintegrante/ aglutinate úmido/ antiaderente
	Óxido férrico amarelo	Pigmento
	Docusato sódico	Lubrificante/ agente molhante
	Celulose	Diluyente/ aglutinante seco/ antiaderente/ desintegrante
	Estearato de magnésio	Lubrificante/ deslizante/ antiaderente
	Metilhidropropilcelulose	Material de revestimento
	Hidroxipropilcelulose	Material de revestimento
	Dióxido de titânio	Lubrificante/pigmento
	Talco	Deslizante/ antiaderente
	FD&C azul 2 aluminum lake	Pigmento
Cápsulas manipuladas	Amido	Desintegrante/ aglutinate úmido/ Antiaderente
	Talco	Antiaderente/ deslizante
	Lactose	Diluyente
	Lauril sulfato de sódico	Lubrificante/ agente molhante
	Estearato de magnésio	Lubrificante/ deslizante/ antiaderente
	Aerosil	Lubrificante/ corante

<sup>(\*)</sup>Fonte: AULTON, 2005.



### 2.1.2 Mecanismo de ação da FNS

A ativação do receptor androgênico pela testosterona e diidrotestosterona tem diversas ações em diferentes tecidos. Uma das explicações seria a maior afinidade da diidrotestosterona para se ligar e ativar o receptor comparado à testosterona. Na genitália externa a ativação do receptor é responsável pela diferenciação durante a gestação, a maturação durante a puberdade e doenças de próstata nos adultos. No folículo capilar a ativação do receptor é responsável pelo aumento do crescimento dos folículos capilares durante a puberdade (SNYDER, 2011).

A FNS é um fármaco sintético 4-azasteróide (azaandrost-1-eno-17-carboxamida, N-(1,1-dimetil)-3-oxo-, (5 $\alpha$ , 17 $\beta$ )), inibidor da 5 $\alpha$ - redutase especialmente do tipo II, uma enzima intracelular que converte a testosterona ao mais potente andrógeno 5 $\alpha$ -diidrotestosterona (DHT) (FDA, 2010; BRUN et al., 2010).

Desde modo, a FNS bloqueia seletivamente a ação androgênica, diminuindo os níveis de diidrotestosterona (DHT) em órgãos alvo tais como a próstata e o couro cabeludo sem afetar os níveis de testosterona circulante, preservando, portanto os desejados efeitos andrógenos na força muscular, densidade óssea e função sexual (GORMLEY, 1995). A redução dos níveis de diidrotestosterona, no couro cabeludo, pode inibir o processo responsável pela redução do tamanho dos folículos capilares, levando à reversão do processo de calvície. Não afeta os pêlos de outras partes do corpo (KOROLKOVAS, 2009).

Portanto, a FNS é indicada no tratamento e controle de homens com hiperplasia prostática benigna (HPB) acompanhada de melhoras no fluxo urinário e diminuição do tamanho da próstata, prevenção e tratamento de câncer de próstata por melhorar os sintomas e reduzir a necessidade de cirurgia incluindo a retirada parcial ou total da próstata (SCHIMIDT; TINDALL, 2011; CHA; SHARIAT, 2011).

Também é indicada no tratamento de homens com alopecia androgênica para aumentar o crescimento capilar e prevenir a queda de cabelo e como fármaco de segunda escolha no tratamento de hirsutismo em mulheres fora do período fértil (LUCAS, 1995; MELLA et al., 2010; TULLY; SCHWARTZENBERGER; STUDDIFORD, 2010).

A FNS possui dose posológica de 5 miligramas, uma vez ao dia para hiperplasia benigna de próstata e 1 miligrama para alopecia androgenética. Em geral é necessário um uso diário durante 3 meses antes que se possa observar um aumento no crescimento capilar e/ou prevenção da queda de cabelo adicional. Recomenda-se, portanto, uso continuado para obtenção do benefício máximo. Para prevenção e tratamento de câncer de próstata e hirsutismo a dose deve ser avaliada clinicamente (KOROLKOVAS, 2009).

## **2.2 Desenvolvimento de metodologia analítica para ensaios de doseamento**

Durante o desenvolvimento de um novo método analítico devem ser considerados diversos fatores, tais como: detecção e separação de todos os compostos de interesse, rapidez de análise, reduzida necessidade de pré-tratamento da amostra e baixo custo (WÄTZIG, 2008). Além disso, um método deve ser confiável, ou seja, garantir que os resultados estejam exatos, reprodutíveis e que possa ser aplicado em qualquer laboratório, desde que este esteja apto e possua a instrumentação adequada (VOGT; KORD, 2011).

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).

O ensaio de doseamento visa quantificar o fármaco na forma farmacêutica. Para cápsulas é realizado em função do peso médio obtido com, pelo menos, 20 unidades. E é expresso como porcentagem do teor declarado no rótulo.

Vários métodos têm sido descritos para determinação da FNS na forma farmacêutica comprimidos. Esses métodos utilizam técnicas como a cromatografia em camada delgada (MEYYANATHAN; RAMASRAMA; SURESH, 2001), cromatografia gasosa (SAĞLIK; ULU, 2006) cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (TRAPANI et al, 2002),

cromatografia líquida de alta eficiência (SYED, 2001; SEGALL et al., 2002, DEMIR et.al, 2005; BASAVIAIAH; SOMASSHEKAR, 2007), espectrofotometria (ILANGO; VALENTINA; LAKSHMI, (2002, 2003); ULU, 2007), cromatografia líquida de ultra performance (FEKETE; FEKETE; GANZLER, 2009a, 2009b); método bromatométrico (BASAVIAIAH et al, 2006) e redução voltamétrica (eletrodo de mercúrio) (ÁLVAREZ-LUEJE, 2008). Para cápsulas foi relatado, até o momento, apenas um método por detecção eletroquímica (eletrodo de mercúrio) (AMER, 2003).

Nas metodologias oficiais, os ensaios para matéria-prima e comprimidos utilizam o HPLC para quantificação da FNS em diferentes condições de análise como comprimentos de onda e composição da fase móvel. Uma corrida cromatográfica para matéria-prima chega a mais de 40 minutos (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2002), ou utilizam equipamentos com custo mais elevado, como a cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC) (UNITED, 2011).

Assim, desenvolver e validar um método que seja aplicado à análise de FNS matéria-prima e produto acabado cápsulas e que quantifique a FNS na presença de seus produtos de degradação é de suma importância e de interesse visando à redução de tempo da análise, custo, viabilidade e facilidade de execução do método analítico.

As análises são desenvolvidas para fornecer informações confiáveis quanto à natureza e composição dos materiais à elas submetidas. A sua variabilidade aumenta quando as medidas são feitas por diferentes analistas no mesmo laboratório, e mais ainda quando os analistas estão em laboratórios diferentes (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

A importância da fase de amostragem não pode deixar de ser enfatizada. Se a porção ensaiada (amostra) não for representativa do material original, não será possível relacionar o resultado analítico medido àquele no material original, não importando a qualidade do método analítico, nem o cuidado na condução da análise (BRASIL, 2007).

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).

### 2.3 Desenvolvimento de metodologia analítica para ensaios 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). A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação, da dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal. Devido à natureza crítica dos dois primeiros, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo*. Com base nestas considerações, os ensaios de dissolução *in vitro* para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI), tais como comprimidos e cápsulas, são utilizados para garantir a qualidade lote-a-lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento após determinadas alterações (BRASIL, 2003b).

Os testes de dissolução *in vitro* constituem um dos instrumentos essenciais para a avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações. Fornecem ainda informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento, como para a produção e controle de qualidade de medicamentos. No desenvolvimento farmacotécnico permite a avaliação de novas formulações, verificação da estabilidade e possibilitam estudos de correlação *in vitro* – *in vivo* (MALESUIK et al., 2006).

Até alguns anos atrás o teste realizado para verificar a liberação do fármaco da sua forma farmacêutica foi o teste de desintegração, o primeiro teste *in vitro* utilizado amplamente pela indústria farmacêutica, devido ao seu baixo custo, rapidez e facilidade de execução (KHAN, 1996). Os testes de dissolução para formas farmacêuticas sólidas foram inicialmente incluídos na Farmacopeia Americana na década de 1960 (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

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).

Nos estudos de estabilidade, os ensaios de dissolução podem indicar mudanças que ocorrem após a fabricação de um produto farmacêutico, tais como: cristalinidade, temperatura de transição vítrea, estrutura polimérica de excipientes, polimorfismo, interação de invólucros de cápsulas gelatinosas e conteúdo de misturas (GRAY et al., 2009).

Para o estabelecimento de correlações *in vitro-in vivo* (CIVIV), os testes de dissolução são utilizados para prever o desempenho de um medicamento *in vivo*. Os melhores candidatos para se estabelecer CIVIV são produtos em que a dissolução é a etapa determinante na absorção de fármacos (JANTRATID et al., 2009). Esses produtos são classificados como classe II no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB). Neste sistema, os fármacos são 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 e classe IV: fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

Esta classificação considera a solubilidade do fármaco dissolvendo-se a maior dose posológica disponível desse fármaco em 250 mL de meio aquoso ajustando-se o pH entre 1,2 a 6,8 em uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . São considerados altamente solúvel se sua maior dose posológica for solúvel em 250 mL de meio aquoso na faixa de pH fisiológico (BRASIL, 2010). Fármacos de alta permeabilidade são aqueles com biodisponibilidade maior que 90%, na ausência de instabilidade documentada no trato gastrointestinal (FDA, 1997).

Os ensaios de dissolução devem ser realizados em condições tais como: método da cesta a 50 ou 100 rpm ou pá 50, 75 e 100 rpm. Para gerar um perfil de dissolução, deve-se obter, no mínimo, cinco pontos de amostragem dos quais, no mínimo três correspondam a valores de porcentagem de fármaco dissolvido menores que 65% e o último ponto seja relativo a um tempo de coleta igual a, pelo menos, o dobro do tempo anterior (BRASIL, 2003b).

Para medicamentos com fármacos altamente solúveis que apresentam dissolução rápida (casos I e III do SCB), um teste de dissolução de um único ponto (60 minutos ou menos) que demonstre dissolução de, no mínimo, 85% é suficiente para controle da uniformidade lote-a-lote. Para medicamentos contendo fármacos pouco solúveis em água, que se dissolvem lentamente, classe II como por exemplo a FNS, recomenda-se um ensaio de dissolução de dois pontos, ou seja, um a 15 minutos e outro a 30, 45 ou 60 minutos, para assegurar 85% de dissolução (BRASIL, 2003b).

Para fármacos de classe II, a dissolução pode ser o passo limitante da velocidade de absorção e uma CIVIV pode ser esperada. Perfis de dissolução obtidos em meios de dissolução diferentes são recomendados para medicamentos que contém fármacos desta categoria

A importância de CIVIV se deve ao fato de que esta correlação pode ser utilizada para reduzir o número de estudos em humanos durante o desenvolvimento de determinada formulação (EMAMI, 2006). Além disso, sob certas condições, os ensaios de dissolução podem ser utilizados como substitutos de ensaios de bioequivalência (COSTA; LOBO, 2001).

No controle de qualidade de medicamentos, os ensaios de dissolução são utilizados para avaliar a qualidade de todos os lotes produzidos em indústrias, com a finalidade de distinguir entre lotes aceitáveis e não aceitáveis. Neste caso, o ensaio de dissolução deve ser sensível as variáveis de fabricação críticas, que podem influenciar na dissolução da forma farmacêutica (GRAY et al., 2009).

Em estudos de equivalência farmacêutica, os perfis de dissolução são utilizados para comparação entre o medicamento referência e medicamentos testes (similares ou genéricos). Este estudo é útil nos casos em que se deseja conhecer o comportamento de dois medicamentos antes de submetê-los a estudo de bioequivalência, para isenção de menores dosagens desses estudos e para alterações pós-registro.

Na avaliação de efeitos de mudanças em formulações, em estudos de estabilidade. E, em estudos de equivalência farmacêutica são construídos perfis de dissolução para posterior comparação. Os métodos utilizados em comparação de perfis são classificados em várias categorias, tais como:

- Métodos estatísticos: podem ser distinguidos em métodos que acessam a diferença entre as médias de dados de dissolução de dois fármacos em um único ponto de dissolução: análise de variância com uma fonte de variação (ANOVA) ou teste *t* de *student*, ou métodos que acessam a diferença entre as médias de dados de dissolução de dois fármacos em múltiplos pontos de dissolução: análise de variância multivariada (MANOVA) (COSTA; LOBO, 2001).
- Métodos modelo independente: comparam diretamente a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvida em uma unidade de tempo para os produtos teste e referência. Podem ser calculados a partir de uma simples taxa de percentual do fármaco dissolvido ( $t_{x\%}$ ), a partir de uma área sob a curva (ASC) ou a partir de uma taxa de dissolução média (TDM). Porém, os mais

utilizados são os testes combinados, ou métodos modelo independente simples, que empregam um fator de diferença (F1) e um fator de semelhança (F2) (COSTA; LOBO, 2001). Estes modelos são definidos a partir das equações 1 e 2:

$$F1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|]\} / \{[\sum_{t=1}^n R_t]\} \times 100 \quad (1)$$

$$F2 = 50 \times \log \{[(1 + 1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \times 100\} \quad (2)$$

em que:  $R_t$  é a porcentagem do fármaco referência dissolvido em cada ponto,  $T_t$  é a porcentagem de produto teste dissolvido em cada ponto e  $n$  é o número de pontos de amostragem (COSTA; LOBO, 2001).

- Métodos modelo dependente: são baseados em funções matemáticas distintas que, após seleção de uma função adequada, permitem a avaliação dos perfis em relação aos parâmetros derivados dos modelos aplicados. Os exemplos mais comuns encontrados na literatura são: ordem zero, primeira ordem, Hixon-Crowell, Higushi, quadrático, Weibull, entre outros (SERRA; STORPIRTS, 2007).

Existem outros parâmetros que se fundamentam em estudos de dissolução e que possibilitam conclusões a respeito do processo de dissolução de uma determinada formulação: constante de velocidade de dissolução ( $k$ ); meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ); e quantidade dissolvida em determinado tempo ( $Q_t$ ). Estes parâmetros são obtidos em função dos perfis de dissolução de formulações e permitem conhecer: a velocidade do processo; a quantidade máxima dissolvida e pontos nos quais podem ocorrer mudanças significativas da dissolução. Além destes, a eficiência de dissolução (ED%) pode ser incluída como um importante parâmetro de cinética de dissolução. Este termo pode ser definido como a área sob a curva de dissolução em um determinado intervalo de tempo. A ED% permite a comparação mais fidedigna entre dois produtos (SERRA; STORPIRTIS, 2007).

As variáveis que mostram significativa influência no ensaio de dissolução são: composição qualitativa e quantitativa de excipientes e do(s) fármaco(s), tamanho de partícula de excipientes e do(s) fármaco(s), higroscopicidade de excipientes e do(s) fármaco(s), método de incorporação de desintegrantes, processo de granulação, força de compressão, polimorfismo, tipo de embalagem e condições de estoque (temperatura e umidade) (GRAY et al., 2010).

Para o desenvolvimento de um ensaio de dissolução é, de acordo com a RDC N° 31 de 11 de agosto de 2010 (BRASIL, 2010), no mínimo, necessário:

- Avaliação quantitativa da solubilidade da substância ativa na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), considerando a temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , conforme, por exemplo, o método de diagrama de fase para análise de solubilidade. A avaliação requer que quantidades crescentes da substância ativa sejam testadas em volume fixo, de pelo menos, três diferentes meios como, por exemplo, em pH 1,2; 4,5 e 6,8, considerando a temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- Demonstração de que o aparato, a rotação e os filtros utilizados no procedimento de coleta de amostra são mais adequados à substância ativa e à forma farmacêutica em estudo;
- Justificativa da necessidade da utilização de âncoras, quando aplicável;
- Comprovação da necessidade de uso de tensoativos, bem como da quantidade empregada, quando aplicável;
- Demonstração e justificativa da escolha do valor Q (quantidade de substância ativa dissolvida expressa como porcentagem do valor rotulado da dose unitária);
- Justificativa da necessidade da aplicação de método de desaeração, quando aplicável.

O pH do meio de dissolução deve contemplar a faixa fisiológica (1,2 a 6,8). Caso seja necessária a utilização de outra faixa de pH, essa deve ser justificada no relatório de desenvolvimento de método de dissolução.

Além dos fatores como solubilidade, permeabilidade e características farmacocinéticas do fármaco, aparato (cesto ou pá) e meio de dissolução (pH 1,2 a 6,8), devem ser consideradas outras variáveis que podem influenciar no ensaio: geometria do sistema; vibração do sistema; posição da haste; posição e método de amostragem; dispositivos para formas farmacêuticas que flutuam; presença de ar ou gases; temperatura; viscosidade; filtros utilizados, surfactantes e método analítico para quantificação. A seleção criteriosa das condições de ensaio deve ser



orientada no sentido de obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade propostos (MARCOLONGO, 2003).

São consideradas formas farmacêuticas de liberação imediata, a forma farmacêutica em que a dose total da substância ativa é disponibilizada rapidamente após sua administração. Em ensaios *in vitro* apresenta, em geral, dissolução média de no mínimo 75% da substância ativa em até 45 minutos. Tal forma farmacêutica pode ainda apresentar tipos de dissoluções diferenciadas em rápida e muito rápida (BRASIL, 2010).

Para fórmulas de liberação imediata, a duração do procedimento é tipicamente 30 a 60 minutos. Para fins industriais e regulatórios de comparação e performance de produtos pode ser requerido mais de um tempo de coleta, assim como para a aprovação no controle de qualidade e no registro de produtos. Um número suficiente de tempo de coleta deve ser selecionado para caracterizar a ascensão e a fase de platô da curva de dissolução (UNITED, 2011).

De acordo com o SCB, fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis não necessitam ser submetidos a um perfil de comparação se demonstram uma liberação de 85% ou mais da substância ativa com 15 minutos. Para esses produtos, apenas um tempo de coleta é suficiente. Entretanto a maioria dos fármacos não se encaixa nessa categoria (UNITED, 2011).

Os perfis de dissolução de produtos de liberação imediata geralmente demonstram um aumento gradual de liberação de 85 a 100% entre 30 a 45 minutos. Assim, tempos de coleta do ensaio na faixa de 15, 20, 30, 45 e 60 minutos são utilizados para a maioria dos produtos de liberação imediata. Tempos de coleta para testes farmacopéicos são, geralmente, estabelecidos com base na avaliação dos dados do perfil de dissolução (UNITED, 2011).

Os produtos de liberação imediata cumprem o teste se os resultados atenderem as exigências descritas na Tabela 2, salvo especificações em contrário na monografia individual.

Tabela 2 – Critérios de aceitação para o teste de dissolução de formas farmacêuticas de liberação imediata\*.

Estágios	Nº Amostras Testadas	Critério de Aceitação
E1	06	Cada unidade apresenta resultados maiores ou iguais a $Q + 5\%$
E2	06	Média de 12 unidades (E1+E2) é igual ou maior do que Q e nenhuma unidade apresenta resultados inferiores a $Q - 15\%$
E3	12	Média de 24 unidades (E1+E2+E3) é igual ou maior do que Q e não mais que 2 unidades apresentam resultados inferiores a $Q - 15\%$ e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 25\%$

\*Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2010.

Os testes de dissolução para análises de controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata são especificados em monografias específicas, descritas em farmacopeias (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2002; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED, 2011). Estes testes de dissolução são realizados através de um único ponto de amostragem.

Não existe até o momento, monografia oficial para o ensaio de dissolução para a FNS na forma farmacêutica cápsula. Portanto faz-se necessário desenvolver um ensaio de dissolução que possa prever o comportamento *in vivo* da mesma. A avaliação do perfil de dissolução do fármaco (percentagem de fármaco dissolvido versus tempo) em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos testes de dissolução (MALESUIK et al., 2006).

## 2.4 Validação

Após o desenvolvimento do método, uma atividade fundamental que tradicionalmente deve ser realizada é a validação analítica. O exercício de validação é uma atividade tipicamente separada e contínua, que difere do desenvolvimento que ocorre apenas uma vez (VOGT; KORD, 2011). Antes da análise de rotina, a validação é um passo obrigatório em todos os laboratórios de química, farmacêuticos e nas indústrias agrícolas e alimentares (BOUABIDI et al., 2010).

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 passar pelo processo de validação (RIBANI et al., 2004). 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 (RATH et al., 2008).

É essencial que estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostra sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços (RIBANI et al., 2004).

A validação é um passo altamente regulador do ciclo de vida de um método analítico quantitativo. No entanto, a falta de orientações claras de qual metodologia seguir para decidir se o método é válido ou não, levou à disponibilidade de vários guias de validação, e é de responsabilidade do analista decidir o melhor a seguir (BOUABIDI et al., 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).

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 Q2 (R1), 1996; INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 1999; BRASIL, 2003a; INMETRO, 2010).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). 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, 2003a; INMETRO, 2010).

A resolução número 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, no qual informa que o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003a).

Essa 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 (seletividade), linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e detecção e exatidão adequados à análise (BRASIL, 2003a).

#### *2.4.1 Seletividade*

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação, solventes e componentes da matriz (BRASIL, 2003a; WATZIG, 2008). A definição especificidade é erroneamente utilizada como equivalente à seletividade, pois especificidade significa que não existe nenhum interferente que possa ocorrer. A seletividade, portanto, pode ser classificada como alta, baixa, parcial, etc. Já o termo específico se refere sempre a um método que apresenta 100% de seletividade (ARAÚJO, 2009).

As principais impurezas são derivadas do processo de síntese, sendo assim, de origens intrínsecas às rotas sintéticas propostas por cada fabricante de forma que um determinado insumo farmacêutico ativo poderá apresentar perfil de impurezas completamente distinto para diferentes fornecedores, e que em tese, demandaria abordagens e metodologias analíticas também distintas para que seja possível sua avaliação.

É importante ressaltar que além destas impurezas, as oriundas dos processos de síntese dos insumos farmacêuticos ativos, outro importante processo de transformação, também é fonte de contaminação de fármacos e de medicamentos, que se trata das impurezas geradas durante o período de estocagem.

Para procedimentos cromatográficos, cromatogramas representativos devem ser usados para demonstrarem seletividade. Para separações críticas em cromatografia, a seletividade pode ser demonstrada pela resolução de dois componentes que eluam mais próximos uns dos outros. Nos casos em que um ensaio não-seletivo é utilizado, outros procedimentos de apoio analítico

devem ser utilizados para demonstrar a seletividade geral. Por exemplo, quando uma titulação é adotada para quantificar o fármaco na liberação, a combinação do ensaio de doseamento e um teste adequado para as impurezas podem ser utilizados (ICH, 2005).

Um modo adicional de obter a seletividade de métodos cromatográficos é pela medida da pureza do sinal analítico usando detector de arranjo de diodos ou o detector de massas (TIWARI; TIWARI, 2010).

Se as impurezas estão disponíveis, o doseamento deve envolver demonstração da discriminação do analito na presença de impurezas e / ou excipientes; na prática, isso pode ser feito pela adição de substâncias puras (fármaco ou medicamento), com níveis conhecidos de impurezas e / ou excipientes, demonstrando que o resultado do ensaio não é afetado pela presença desses materiais (por comparação com o resultado obtido com amostras não adicionadas de impurezas) (ICH, 2005).

Se os padrões de impureza ou produtos de degradação não estiverem disponíveis, a seletividade pode ser demonstrada pela comparação dos resultados dos testes das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação por um segundo procedimento bem caracterizado, por exemplo: método farmacopeico ou outro procedimento validado de análise (procedimento independente). Para gerar os produtos de degradação, o fármaco deve ser exposto à várias condições de estresse (luz, calor, umidade, hidrólise ácida / básica e oxidação) (ICH, 2005; CHANDRAN; SINGH, 2007).

Quando o método não demonstra seletividade adequada, isto frequentemente indica que o método não foi adequadamente desenvolvido. Como consequência, é provável que os critérios estabelecidos para precisão, linearidade e exatidão não sejam preenchidos (JIMIDAR; HELEY; SMET, 2007).

Para a determinação de seletividade de ensaios de dissolução, a USP (UNITED, 2011) recomenda que qualquer interferência não deva exceder 2,0%.

### 2.4.2 Linearidade

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

Frequentemente, a linearidade é medida pelo coeficiente de correlação linear (Pearson ( $r$ )) e pelo intercepto da equação produzida, quando se correlaciona a resposta em função da concentração. Os pontos se ajustam bem a linha de regressão quando obtemos um alto coeficiente de correlação, sendo aceitável para métodos de análises farmacêuticas, um coeficiente de correlação maior que 0,999 (FDA, 2000). Já para a ANVISA, um coeficiente de correlação de 0,99 é considerado aceito (BRASIL, 2003a).

Na prática, a linearidade é avaliada através do preparo de soluções do padrão de referência em diversas concentrações, abrangendo a faixa de trabalho. Os guias de validação mais utilizados recomendam um mínimo de cinco concentrações, abrangendo de 80 a 120% da concentração utilizada na análise (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; UNITED, 2011).

### 2.4.3 Intervalo

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 aplicado a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003a). Há vários termos na literatura que se referem a este parâmetro: intervalo (ou faixa) linear, intervalo (ou faixa) analítico (a), intervalo (ou faixa) de calibração, intervalo (ou faixa) dinâmico (a) e intervalo (ou faixa) de trabalho (ARAÚJO, 2009).

#### 2.4.4 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: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2003a). É expressa através do desvio padrão relativo (D.P.R.) ou coeficiente de variação (C.V) entre as respostas analíticas (JIMIDAR; HEYLEN; SMET, 2007).

- Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Subdivide-se em repetitividade do sistema e repetitividade das análises:

*Repetibilidade do sistema:* avaliada através de múltiplas análises de uma mesma solução.

*Repetibilidade das análises:* 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 (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

- Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003a). Não menos que seis soluções independentes devem ser preparadas nas concentrações próximas à concentração utilizada no ensaio a ser validado (ÉPSHTEIN, 2004).

- 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.

Os critérios de aceitação de precisão de métodos utilizados em análises farmacêuticas variam de acordo com a referência. Segundo a RE nº 899, o valor máximo de desvio padrão relativo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores

a 5% (BRASIL, 2003a). Segundo Épshtein (2004), o desvio padrão relativo entre os resultados deve ser inferior a 1,0% para matérias-primas, inferior a 2,0% para produtos acabados e inferior a 10% para impurezas.

Para a determinação da precisão de ensaios de dissolução, a USP (UNITED, 2011) recomenda um desvio padrão relativo inferior a 10,0% nos pontos de amostragem com menos de 85,0% de dissolução e um desvio padrão relativo inferior a 5,0% nos pontos de amostragem com mais de 85,0% de dissolução. Porém, especifica que o critério de aceitação pode ser produto-específico e outros testes estatísticos e limites devem ser utilizados (UNITED, 2011).

#### *2.4.5 Exatidão*

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003a; ICH, 2005). A exatidão deve ser determinada por toda a faixa do procedimento analítico (ICH, 2005) e é expressa em termos de porcentagem de recuperação, erro relativo ou desvio em relação ao valor teórico (WHITMIRE et al., 2010).

Existem vários modos de determinar a exatidão de um método analítico. Quando o material de referência certificado é disponível, a exatidão deve ser determinada pela comparação do valor medido com o valor declarado pelo material de referência (RAVICHANDRAN et al., 2010). Neste caso, a exatidão deve ser expressa como a diferença entre a média obtida e o valor declarado, juntamente com o intervalo de confiança (ICH, 2005). Quando um material de referência certificado ou um método referência não é disponível, um estudo de recuperação deve ser realizado. Esse procedimento é realizado pela adição de quantidade conhecida do analito (por peso ou volume) no branco (matriz) (RAVICHANDRAN et al., 2010). A recuperação é então calculada pela divisão da quantidade encontrada pelo método pela quantidade teórica adicionada e multiplicando-se o valor por 100. Quando a matriz não é disponível, o analito é então adicionado na amostra (RAVICHANDRAN et al., 2010), e a recuperação é calculada utilizando a Equação 3:



$$R (\%) = \frac{(C1 - C2)}{(C3)} \times 100\% \quad (3)$$

em que:  $C1$  = concentração do analito na amostra fortificada,  $C2$  = concentração do analito na amostra não fortificada e  $C3$  = concentração do analito adicionada à amostra fortificada (INMETRO, 2010).

Para a ICH (ICH, 2005), a exatidão deve ser estimada por meio de nove medidas em pelo menos três diferentes concentrações (três réplicas de uma concentração baixa, três réplicas de uma concentração média e três réplicas de uma concentração alta). Entretanto, o FDA (FDA, 2000) recomenda que a exatidão deva ser determinada em três níveis de concentração em cinco réplicas de cada nível. Os limites de porcentagem de recuperação aceitáveis dependem da faixa de concentração da amostra a ser medida, do tipo de matriz e do nível de qualidade requerido pelo método. Epshtein (ÉPSHTEIN, 2004) referencia os seguintes limites aceitáveis: 99,0 a 101,0% para análise quantitativa de matérias-primas ou medicamentos com uma alta quantidade de componente ativo (acima de 98%); de 98,0 a 102,0% para análise de medicamentos contendo menos de 98% de substância ativa; 90,0 a 110,0% para determinação de impurezas presentes acima de 1% na amostra; de 75,0 a 125,0% para determinação quantitativa de impurezas presentes de 0,1 a 1% na amostra e de 50,0 a 150,0% para determinação quantitativa de impurezas presentes a uma porcentagem inferior a 0,1% em relação à amostra.

Para determinação de exatidão de ensaios de dissolução, a USP 2011 recomenda valores entre 95,0% e 105,0% (UNITED, 2011).

#### 2.4.6 Limite de Detecção (LD)

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

Várias abordagens para determinação do limite de detecção são possíveis. Para métodos analíticos que exibem ruído, pode-se determinar o limite de detecção pela relação sinal/ruído. Essa abordagem é realizada pela comparação do sinal medido a partir do branco com baixas concentrações conhecidas do analito. De acordo com Ravichadran e colaboradores (RAVICHANDRAN et al., 2010), uma relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1 é geralmente considerada adequada para se estabelecer o limite de detecção.

Entretanto, o modo mais comum de se determinar o limite de detecção é baseado na inclinação e no desvio padrão da resposta analítica ao nível de concentração zero. A inclinação pode ser estimada a partir da curva analítica obtida no estudo de linearidade. Entretanto, é recomendado determinar a inclinação utilizando uma curva analítica construída em concentrações próximas ao limite de detecção (ÉPSHTEIN, 2004). O valor do desvio padrão pode ser determinado utilizando-se dez análises sequenciais do analito em concentrações correspondendo a 0,01% a 0,05% da concentração teórica do teste (ÉPSHTEIN, 2004). Uma alternativa é construir várias curvas analíticas em concentrações próximas ao limite de detecção e determinar o desvio padrão entre as interseções das curvas. O limite de detecção é então expresso pela Equação 4:

$$LD = \frac{3\sigma}{S} \quad (4)$$

em que:  $\sigma$  é o desvio padrão das respostas e  $S$  é a inclinação da curva analítica, os quais podem ser calculados de acordo com o parágrafo acima.

Outro modo de se determinar o limite de detecção é a partir da concentração mínima em que o desvio padrão relativo entre cinco determinações analíticas sequenciais não exceda 20% (ÉPSTHEIN, 2004).

#### 2.4.7 Limite de Quantificação (LQ)

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, 2003a; ICH, 2005).

O limite de quantificação pode ser calculado baseado na relação sinal/ruído. De acordo com esse método, é encontrada uma solução referência inicial do composto analisado que produza uma relação sinal/ruído próxima de 30. Essa solução é então sequencialmente diluída até que se obtenha uma relação sinal/ruído de 10. Essa concentração é então considerada o limite de quantificação (ÉPSTHEIN, 2004).

No entanto, o limite de quantificação também pode ser determinado baseado no desvio padrão das respostas e na inclinação, pela Equação 5:

$$LQ = \frac{10\sigma}{S} \tag{5}$$

em que:  $\sigma$  é o desvio padrão das respostas e  $S$  é a inclinação da curva analítica.

O desvio padrão das respostas e a inclinação das curvas analíticas podem ser calculados do mesmo modo como apresentado no cálculo do limite de detecção, usando a curva analítica do estudo de linearidade ou uma curva construída em concentrações próximas ao limite de quantificação (ICH, 2005).

#### 2.4.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

A robustez é usualmente estudada por meio de variações de parâmetros típicos que são capazes de influenciar os resultados da análise. Segundo a RE nº 899 (BRASIL, 2003a) os fatores que devem ser levados em consideração na determinação de robustez de um método cromatográfico são: conteúdo de solvente orgânico na fase móvel ( $\pm 2\%$ ), quantidade de aditivos utilizados na fase móvel (sais, reagentes de par iônico, etc) ( $\pm 10\%$ ), pH do tampão utilizado na fase móvel ( $\pm 0,5$ ), temperatura da coluna cromatográfica ( $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ ), tempo de extração do composto ( $\pm 20\%$ ), composição da solução utilizada na extração ( $\pm 5\%$ ), proporção do gradiente da fase móvel ( $\pm 2\%$ ), vazão da fase móvel e tipo e/ou fabricante da coluna cromatográfica (ÉPSHTEIN, 2004). Para ensaios de dissolução, além dos parâmetros que devem ser variados no método usado para quantificação, a robustez deve ser ensaiada variando-se a composição do meio (concentração de tampão e/ou surfactante), pH, volume e temperatura do meio de dissolução e velocidade de agitação dos aparatos (UNITED, 2011).

Uma alternativa para avaliação de robustez é a abordagem multivariada. Youden e Steiner (YOU DEN; STEINER, 1975) propuseram um teste no qual a ideia básica é introduzir várias mudanças simultaneamente de tal forma que os efeitos individuais possam ser avaliados. Este teste consiste na avaliação de sete variáveis que podem influenciar no resultado, se os seus valores nominais forem levemente alterados. O efeito de cada variável é investigado em dois níveis: o nível alto, representado por letras maiúsculas (A, B, C, D, E, F e G), e o nível mais

baixo, representado por letras minúsculas (a, b, c, d, e, f e g). Uma matriz proposta pelos autores indica a combinação dos sete níveis em um total de oito experimentos. A partir dos resultados de cada experimento, é possível estimar o efeito de cada variável pela diferença entre a média dos resultados obtidos com as quatro análises realizadas no nível mais alto e a média dos resultados obtidos com as quatro análises realizadas no nível mais baixo. Se a diferença for maior do que o critério desvio padrão multiplicado por raiz quadrada de dois, a variável tem um efeito significativo e, portanto, influencia no método analítico, devendo desta forma ser controlada. Apesar de ter sido proposta em 1975, vários trabalhos publicados recentemente empregaram esta metodologia na determinação da robustez (GEHRING et al., 2011; IAMMARINO et al., 2011; GUARINO et al., 2011; DUSI et al., 2011; JANDRIĆ et al., 2011; LUTEROTTI; KORDIĆ; DODIG, 2011).

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, 2003a; RIBANI et al., 2004).

A chave determinante da confiabilidade dos resultados para testes de dissolução a fim de determinar o fármaco nas amostras-teste é obtida com a validação da metodologia analítica (TAZANAVARAS et al., 2008).

## **2.5 Aplicação do método e avaliação da qualidade das cápsulas**

As cápsulas manipulados pelas Farmácias A, B e C, contendo 5 mg de finasterida devem ser submetidas à todos ensaios de qualidade exigidos: peso médio, identificação do fármaco, doseamento, uniformidade e teste de dissolução (BRASIL, 2008).

### 3 RESULTADOS

Conforme descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, artigo 22, a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma revisão de literatura, 1 artigo científico (número mínimo), tendo o mestrando como primeiro autor, representativo dos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa proposta no programa.

No presente trabalho, os resultados serão apresentados a seguir, na forma de artigos submetidos para publicação em periódicos da área de Farmácia.

#### *3.1 Artigo I*

O artigo I consiste de um método indicador de estabilidade para análise de finasterida na forma farmacêutica cápsula e foi submetido à uma revista *qualis* A1, encontrando-se em fase de análise pelos revisores.

## Development and validation of a rapid stability-indicating method for the determination of finasteride in capsules

**Olimpia Maria Martins Santos <sup>a\*</sup>, Álvaro José dos Santos-Neto <sup>b</sup>, Fernando Mauro Lanças <sup>b</sup>, Antonio Felipe Felicioni Oliveira <sup>a</sup>, Rudy Bonfilio <sup>c</sup>, Magali Benjamim de Araújo <sup>a</sup>.**

<sup>a</sup> *Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNIFAL/MG- Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000. Alfenas-MG, Brazil.*

<sup>b</sup> *Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-Carlense, 400, 13560-970. São Carlos-SP, Brazil.*

\* Corresponding author. Tel/Fax+55 35 3299 1350

E-mail address: *olimpia\_martins@yahoo.com.br*

## ABSTRACT

Finasteride (FNS) is drug widely used for the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia, prostate cancer and male pattern hair loss. The objective of this work was to develop and to validate a simple, fast, and cheap stability-indicating HPLC method for the determination of FNS in capsules. The method was developed based on forced degradation products, which were obtained under neutral, acid, alkaline and oxidative hydrolysis conditions. The separation was achieved at 30 °C on a reversed-phase C8 (150 × 4.6 mm) column using acetonitrile and water in the ratio 70:30 as mobile phase at flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The method was fully validated according to the ICH guidelines, showing accuracy, precision, robustness and linearity. The limits of detection and quantification were 0.40 and 1.350 µg mL<sup>-1</sup>, respectively. The selectivity of the method was assessed by LC-MS/MS analysis and these studies revealed that no degradation products co-eluted with the FNS peak. The developed HPLC method can, therefore, serve as a cheap and easy tool for the evaluation of FNS in the presence of its degradation products and its main advantages over previously reports are shorter analysis time, simple extraction procedure, good accuracy and reproducibility and adequate separation efficiency for degradation products.

*Keywords:* Finasteride, stability-indicating method; reversed-phase chromatography; liquid chromatography coupled with mass spectrometry, validation.



## 1 Introduction

Finasteride (FNS) is a synthetic drug that is a specific competitive inhibitor of steroid type-II 5 $\alpha$ -reductase, which allows selective androgen deprivation affecting dihydrotestosterone (DHT) levels in target organs such as the prostate and scalp hair without effecting circulating levels of testosterone preserving the androgen effects on muscle strength, bone density and sexual function [1]. Because FNS reduces prostatic and circulating DHT levels by blocker the conversion the testosterone to dihydrotestosterone, reducing the androgenic effects of DHT, this drug is widely used for the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia, prostate cancer and androgenetic alopecia (male pattern hair loss) [2-5].

Chemically, FNS is *N*-(1,1-Dimethylethyl)-3-oxo-4-aza-5 $\alpha$ -androst-1-ene-17 $\beta$ -carboxamide. Its molecular formula is C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and its molecular weight is 372.6. FNS is a white crystalline powder with a melting point near 250°C. It is practically insoluble in water and freely soluble in ethanol and in chloroform and it shows polymorphism [5-7].

The literature describes several methods for the quantitative determination of FNS in biological samples. These include high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet spectrophotometric detection [8-12], HPLC coupled to mass spectrometry using either electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [13-21] ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) [22, 23] and isotope-dilution mass spectrometry [24]. Most of these methods involve multistep sample preparations such as solid-phase extraction [8, 9, 11, 13, 19, 24] and liquid-liquid extraction [12, 18, 22].

In pharmaceutical preparations, multiple analytical procedures have been reported for the analysis of FNS, when it is present as a single active principle or in combined dosage forms, using visible spectrophotometry [25], UV-spectrophotometry [26, 27], high-performance thin-layer chromatography [28, 29], infrared spectrophotometry [30], polarography [31], voltammetry [32], gas chromatography [33], HPLC [29, 34-38] and UHPLC [34, 35].

The United States Pharmacopoeia [7], the European Pharmacopoeia [36] and the British Pharmacopoeia [6] describe different methods for analysis of FNS in raw material and in tablets. However, some these methods take longer than 40 minutes of chromatographic run and the

published separation techniques are either expensive as UHPLC methods (requiring high cost equipments) or time-consuming. Moreover, no study describes a stability-indicating method for the determination of FNS in capsules.

In light of these considerations, this work aims to develop and to validate a simple, fast, and cheap new stability-indicating HPLC method for the determination of FNS in capsules, which can be applied in routine laboratories for quality control. Different chromatographic conditions were tested in order to ensure that the compound of interest is well separated from the degradation products in a faster elution time compared to previous reports.

## **2 Experimental**

### *2.1 Chemical and reagents*

Sodium hydroxide, hydrogen peroxide, hydrochloride acid and formic acid were of analytical grade and were purchased from Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brazil). Acetonitrile was of HPLC grade and was acquired from both Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brazil) and Burdick & Jackson<sup>®</sup> (Michigan, USA). HPLC water was prepared by using a Millipore Milli-Q<sup>®</sup> apparatus (Millipore, Milford, MA, USA) and meets USA Pharmacopoeia requirements. A Finasteride reference substance (assigned purity 99.7%) was acquired by USP<sup>®</sup> (Maryland, USA). Finasteride capsules, which were alleged to contain 5 mg of the active component, were supplied from local compounding pharmacies. In addition, a placebo mixture containing the same quantitative composition as the capsules was obtained from one of the local compounding pharmacies. The placebo mixture was described as containing the following inactive excipients: magnesium stearate (0.5%), aerosil (1.0%), sodium dodecyl sulphate (1.5%), talc (25%), starch (67%), lactose hydrous (5%).

## 2.2 Apparatus and chromatographic conditions

Chromatographic separations were carried out using a Shimadzu<sup>®</sup> HPLC system (Kyoto, Japan) series LC-10A, consisting of a LC-10 ADVP pump, a CLASS-VP 5.02 integration system software, a DGU-14 A degasser, a 7725i manual injector with a 20  $\mu$ L loop (Rheodyne<sup>®</sup>, California, USA), a SPD-10AVP integrated UV detector, a LC-10AVP low pressure gradient valve, a CTO-10AVP column oven and a SCL-10 AVP controller. LC-MS experiments were carried out on a Micromass Platform LC system (Micromass, Manchester, UK) controlled with MassLynx Software version 4.0 SP2 (Micromass, a division of Waters Corp., Beverly, MA) and using a pneumatically assisted ESI interface for coupling with a Shimadzu Prominence HPLC series containing two LC-20AD pumps, a DGU-20A<sub>5</sub> degasser, a SPD-20A UV detector, a SIL-20AC autosampler, a CTO-20AC column oven, controlled by a CBM-20A and LCSolutions software (Kyoto, Japan). The following equipments were also used: Sartorius<sup>®</sup> AG analytical balance model CP 225D (Santo André, Brazil), Acculab<sup>®</sup> analytical balance model ALC-210.4 (Arvada, USA), digital pH meter PA 200 (Marconi<sup>®</sup> S.A., Piracicaba, Brazil); ultrasonic bath model USC2800 (Unique<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil).

The chromatographic separation was achieved at 30 °C on a reversed-phase C8 (150  $\times$  4.6 mm) column using acetonitrile and water in the ratio 70:30 as mobile phase at flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The mobile phases were prepared daily, filtered through a 0.45  $\mu$ m membrane filter (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA) and degassed using the degasser of the chromatographic system prior to use. The detector wavelength was set at 210 nm, and the injection volume was 20  $\mu$ L. For MS analysis the chromatographic flow was split after the UV detector, diverting a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup> to the ESI interface.

## 2.3 Preparation of solutions

### 2.3.1 Stock and working standard solutions of finasteride

Stock standard solution of  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  of FNS was prepared by accurately weighing 25 mg of Finasteride reference substance (99.7% purity) into a 250 mL volumetric flask and diluting to volume with mobile phase.

Working standard solutions were prepared immediately before use by suitable dilutions of the corresponding stock solutions to appropriate concentration levels, using mobile phase as the diluent. All standards were filtered through a  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  PTFE-membrane filter (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA) prior to injection into the HPLC system.

### 2.3.2 Sample capsules solution

Twenty capsules were used. The capsules were individually weighed and the content of the capsules was removed. The emptied shells were weighed, and the average weight of the contents was obtained by subtracting the weight of the shells from the weight of the full capsules, as recommended by the United States Pharmacopeia [7]. The weight equivalent to 2 average dosage unit of each product was transferred into a 100 mL volumetric flask, 80 mL of mobile phase was added, and the flask was sonicated for 5 min. The volume of flask was made up with mobile phase and filtered using a quantitative VETEC filter. The first few milliliters of the filtrate were discarded, and the filtrate was diluted immediately before use to appropriate concentration levels, using mobile phase. All solutions were filtered through a  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  PTFE-membrane filter (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA) prior to injection into the HPLC system.

### *2.3.3 Finasteride excipient solutions*

Excipients solution was prepared by transferring 290 mg of the placebo mixture (amount contained in two capsules) into a 100 mL volumetric flask, 80 mL of mobile phase was added, and the flask was sonicated for 5 min. The volume of flask was made up with mobile phase and filtered using a quantitative VETEC filter. The first few milliliters of the filtrate were discarded and 5 mL was transferred to a 10-mL calibrated flask and diluted to the mark with mobile phase. This solution was filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  PTFE-membrane filter (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA) prior to injection into the HPLC system.

### *2.4 Degradation studies*

Drug at a concentration of 100.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was used in all degradation studies. The samples were subjected to stress conditions in water, 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl, 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH and 3% hydrogen peroxide at 60 °C for 24 h. These solutions were neutralized, diluted with mobile phase to obtain a solution with a concentration of 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of FNS and filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  PTFE-membrane filter (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA) prior to injection into the HPLC system. Corresponding blanks were simultaneously injected.

### *2.5 Validation of the method*

Method validation was performed following ICH and FDA specifications [37, 38] for selectivity, linearity, precision, accuracy, detection limit, quantification limit and robustness.

### 2.5.1 Selectivity

Selectivity of the method was evaluated by observing the chromatograms of finasteride excipient solutions (Section 2.3.3) and finasteride work standard solution at  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Section 2.3.1)

In order to evaluate selectivity of the method for degradation products, selectivity studies were also performed on a HPLC-QTOF-MS system (section 2.2). Following are the conditions that were used. The column was a LiChroSpher RP-8 (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Germany) packed column ( $150 \times 4.6 \text{ mm i.d.}$ ,  $5 \mu\text{m}$  particle size). The mobile phase was acetonitrile and 0.01% formic acid in the ratio 70:30 at a flow rate of  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , splitting  $0.2 \text{ mL min}^{-1}$  to the ESI-MS interface after the UV detector. The injection volume was  $20 \mu\text{L}$  and column temperature was set at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Selectivity of the method for degradation products was assessed by comparing full scan LC-MS/MS spectra obtained from FNS peaks of stressed solutions (HCl, water, NaOH and  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) with the full scan LC-MS/MS spectrum obtained from FNS peak of the working standard solution. Extracted ion chromatograms were also reconstructed for each ion of the MS spectra of the interesting peaks and for the main ions appearing at the background, providing additional confidence for the peak purity regarding the ESI-MS chromatograms.

All mass spectra of degradation products, which were formed under described stress conditions, were confirmed by an HPLC-QTOF-MS equipment. Their structures will be elucidated posteriorly.

### 2.5.2 Linearity

Linearity was evaluated by regression analysis of the FNS working standard solutions) at six concentrations in triplicate ranging from 5 to  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (5, 10, 25, 50, 75 and  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ )

prepared on three consecutive days ( $n = 3$ ). The calibration equations and the correlation coefficient obtained were calculated.

### *2.5.3 Precision*

Precision was evaluated with respect to both repeatability and intermediate precision. Repeatability was evaluated by analyzing work standard solutions containing 10, 50 and 90  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of FNS. Three replicates of each solution in mobile phase were prepared and assayed. Intermediate precision was studied by repetition of the assays on three different days. The percentages of relative standard deviation (R.S.D.) of the analytical responses were calculated.

### *2.5.4 Accuracy*

The method accuracy was determined by measuring the reference standard recovery in triplicate at three levels. Recovery of the method was determined by spiking the samples solutions with standard solutions to obtain solutions containing 60, 70 and 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of FNS. These mixtures were analyzed by the proposed method. The percent recoveries by each concentration level were determined.

### 2.5.5 Detection and quantification limits

The detection limit (DL) and quantification limit (QL) of the methods were obtained from Equation (1) and Equation (2):

$$DL = 3(SD/a) \quad (1)$$

$$QL = 10(SD/a) \quad (2)$$

where SD is the intersection standard deviation and  $a$  is the average slope obtained from calibration curves of the linearity study.

### 2.5.6 Robustness

The robustness of the method was evaluated by analyzing the data after varying seven factors according to Youden and Steiner's robustness test [39]. The percentage of drug related to label claim was calculated for each experiment by comparing the sample peak areas with those obtained from a FNS standard solution at the same concentration level. The factors selected were column temperature, mobile-phase flow rate, sonication, exposure to light, acetonitrile brand, mobile-phase proportion and wavelength detection. The nominal values of factors are denoted by A, B, C, D, E, F and G and their alternative values are denoted by the corresponding lower-case letters a, b, c, d, e, f and g. Eight experiments were conducted, as indicated in Table 1. From these results, the effect of each factor was estimated by obtaining the difference of the averages of the four analyses that have the nominal value (upper-case letter) and the four analyses with the alternative value (lower-case letter). Considering the standard deviation of the eight results, effect



values higher than the  $s\sqrt{2}$  criterion (standard deviation multiplied by the square root of two) were considered significant, and the method is sensitive to the changes in the factor concerned.

**Table 1-** Factors and their levels for robustness studies and experimental conditions according to Youden and Steiner's robustness test [39].

Selected factor	Nominal Conditions	Alternative conditions	Experimental condition							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Column temperature	30 °C (A)	28 °C (a)	A	A	A	A	a	a	a	a
Mobile-phase flow rate	1 mL min <sup>-1</sup> (B)	0.90 mL min <sup>-1</sup> (b)	B	B	b	b	B	B	b	b
Sonication	5 min (C)	No sonication (c)	C	C	C	c	C	c	C	c
Exposure to light	Yes (D)	No (d)	D	D	d	d	d	d	D	D
Acetonitrile brand (AcN)	1 (E)	2 (e)	E	E	E	e	e	e	E	E
Mobile-phase proportion	70:30 (AcN/water) (F)	69:31 (AcN/water) (f)	F	F	f	F	F	f	f	F
Wavelength detection	210 nm (G)	209 nm (g)	G	G	g	G	g	G	G	g
Observed results			s	T	u	v	w	x	y	z

Upper case letters (from A to G) represent nominal conditions.

Lower case letters (from a to g) represent alternative conditions.

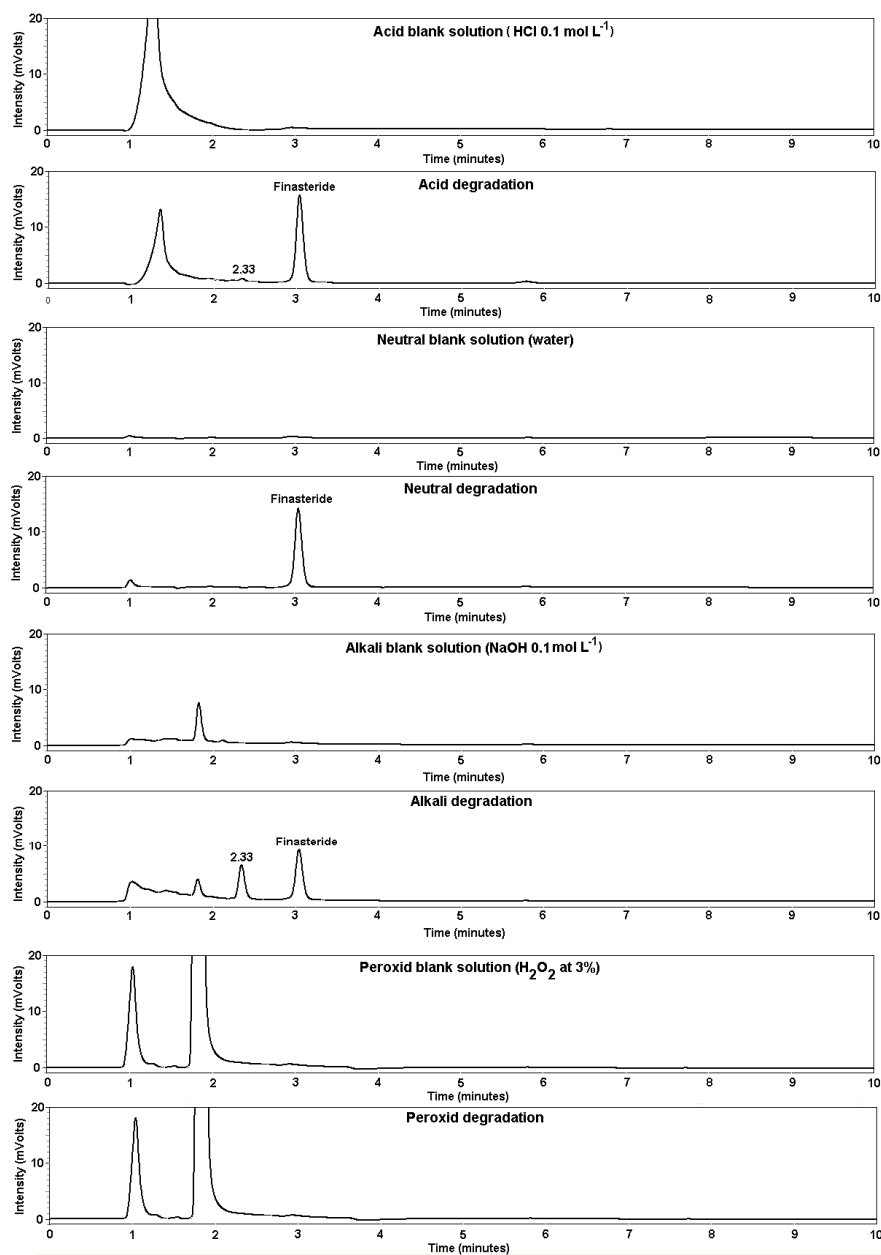
## 2.6 Application of the validated method for the determination of finasteride in capsules

The above described HPLC method was applied to quantify the amount of FNS in three different commercial capsules. Capsules content were obtained by comparison of the sample peak areas (n=5) with those obtained from the finasteride standard solutions (n=3) at the same concentration levels.

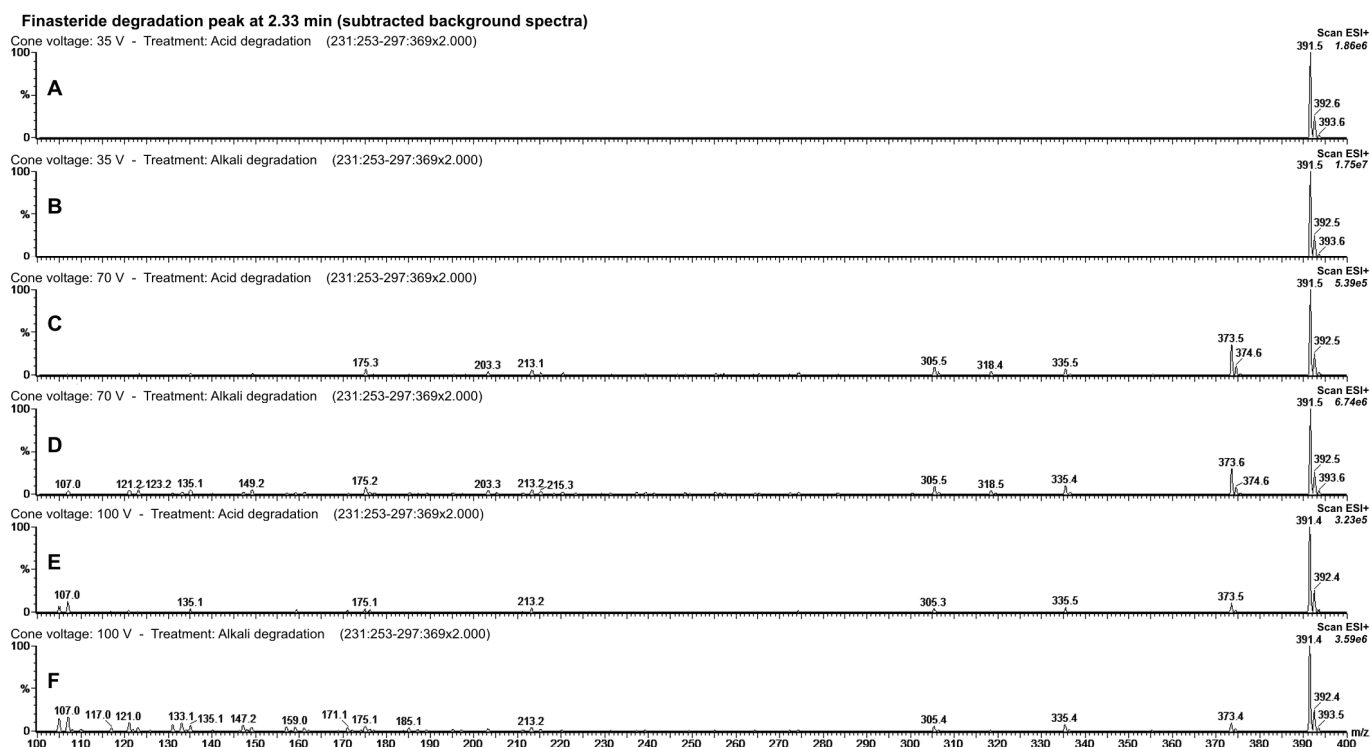
### 3 Results and discussion

#### 3.1 Degradation behavior

The results of degradation studies of FNS at  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  are shown in Fig. 1. After stress in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 24 h, a minor degradation product at retention time 2.33 min was observed. Under alkaline conditions ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH) at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 24 h, the drug was found to be higher labile and a degradation product at retention time 2.33 was also observed. The results from the MS analysis revealed that very probably the same compound was formed under both acid and alkaline hydrolysis stress. The same spectrum (regarding detected ions and isotopic proportion) was observed under different in-source CID energies produced at cone voltages of 35, 70, and 100 V for the acid and the alkaline stress condition (Fig. 2). Additionally, the peaks at 2.33 min under both kinds of stress conditions were chromatographically pure according with the assessment of the MS data. A complete degradation of the drug was observed in 3% hydrogen peroxide at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 24 h, and no additional retained peaks were observed under these conditions, probably because the degradation product(s) co-eluted with the hydrogen peroxide peak. The drug was stable at neutral conditions.



**Fig. 1.** The HPLC chromatograms of blank solutions and FNS at  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  submitted to stress conditions ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl, water,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH and 3% hydrogen peroxide) at  $60^\circ\text{C}$  for 24 h



**Fig. 2.** Full scan LC-MS spectra (with background subtraction) of finasteride degradation product peak at retention time of 2.33 min. (A) Acid degradation and in-source CID at cone of 35 V, (B) Alkali degradation and in-source CID at cone of 35 V, (C) Acid degradation and in-source CID at cone of 70 V, (D) Alkali degradation and in-source CID at cone of 70 V, (E) Acid degradation and in-source CID at cone of 100 V, and (F) Alkali degradation and in-source CID at cone of 100 V.

### 3.2 Optimization of the stability-indicating method

The method was optimized to separate FNS from its possible degradation products formed under various conditions. After several preliminary experiments, a mobile phase consisting of acetonitrile and water in the ratio 70:30 was selected. This mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> and a LiChrospher RP-8 column (150 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) endcapped as stationary phase yielded a retention time for FNS of 3.05 min. Under these described experimental conditions the analyte peak was well defined and free from tailing (Fig. 1).

Table 2 shows chromatographic methods described in the literature for determination of FNS in pharmaceutical preparations. As observed in Table 2, the method developed in this study showed lower analysis time than all previously HPLC techniques. Given that the speed of analysis is essential to reducing costs and waste generation, this method shows an important advantage over described HPLC methods. Regarding UHPLC methods, the proposed method has a higher chromatographic run. However, the advantage of HPLC over UHPLC is that the first one does not require expensive instrumentation such as high pressure pumps and small particle columns.

**Table 2-** Chromatographic methods described for determination of FNS in pharmaceutical preparations.

Method	Pharmaceutical preparation	Condition	Analysis time	Ref.
HPLC	Raw material	Acetonitrile/tetrahydrofuran/water (10:10:80, v/v) as mobile phase at 1.5 ml/min and C18 column (5 $\mu$ m, 25.0 cm x 4.0 mm) as stationary phase. Detection at 210 nm.	About 56 min	[6]
HPLC	Tablet	Acetonitrile/phosphoric acid 2.5 mMol L <sup>-1</sup> (50:50,v/v) as mobile phase at 1.5 ml/min and C18 column (5.0 $\mu$ m, 10.0 cm x 4.6 mm) as stationary phase. Detection at 240 nm.	-	[6]
UHPLC	Raw material	Water/tetrahydrofuran (4:1, v/v) as mobile phase at 3 ml/min and C8 column (3 $\mu$ m, 3.0 cm x 3.0 mm) as stationary phase. Detection at 215 nm.	-	[7]
HPLC	Tablet	Acetonitrile/phosphoric acid 2.5 mmol L <sup>-1</sup> (50:50,v/v) as mobile phase at 1.5 ml/min and C18 column (1.5 to 10.0 $\mu$ m, 10.0 cm x 4.6 mm) as stationary phase. Detection at 240 nm.	-	[7]
HPLC	Bulk drug and tablet	Methanol/0.02 mol L <sup>-1</sup> ammonium acetate buffer/triethylamine (79.9:20:0.1, v/v/v) (pH 9.2) as mobile phase at 1 ml/min and Phenomenex <sup>®</sup> C18 column (250 mm x 4.6 mm id, 5 $\mu$ m particle size) as stationary phase. Detection at 235 nm.	4.8 min	[29]
GC	Tablet	Method based on the derivatization of finasteride with <i>N,O</i> bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide–1% trimethylchlorosilane at 60 °C for 30 min. 100% dimethylpolysiloxane column (15m x 0.25 mm i.d., 0.25 $\mu$ m film thickness) and nitrogen as the makeup gas. Flame ionization detector.	20 min	[33]
UHPLC	Reference material	Acetonitrile/water in gradient elution (35–60% acetonitrile) at 0.5 ml/min and Ascentis Express <sup>®</sup> C18 column (2.7 $\mu$ m, 5.0 cm x 2.1 mm) as stationary phase. Detection at 220 nm.	0.8 min	[34]
UHPLC	Reference material and tablets	Acetonitrile/water in gradient elution (10–80% acetonitrile) at 0.5 ml/min and several C18 columns (2.7 $\mu$ m, 5.0 cm x 2.1 mm) as stationary phases. Detection at 210 nm.	1.0 min	[35]
HPLC	Raw material	Acetonitrile/tetrahydrofuran/water (10:10:80,	About 56	[36]

		v/v) as mobile phase at 1.5 ml/min and C18 column (5 µm, 25.0 cm x 4.0 mm) as stationary phase. Detection at 210 nm.	min	
HPLC	Bulk drug and tablet	Methanol/water (80:20 v/v) as mobile phase at 1 ml/min and ODS C18 (250 × 4.6 mm) as stationary phase. Detection at 225 nm.	6.1 min	[40]
HPLC	Bulk drug and tablet	Tetrahydrofuran/Methanol/Trifluoric acetic acid/H <sub>2</sub> O (30:5:0.025:65, v/v/v/v); pH=3.0 as mobile phase at 1 ml/min and Supelcosil <sup>®</sup> LC-18 DB column (250 x 4.6 mm ID) as stationary phase. Detection at 210 nm.	20 min	[41]
HPLC	Tablet	Water/acetonitrile/tetrahydrofuran (80:10:10, v/v/v) as mobile phase at 2 ml/min and Nova Pak <sup>®</sup> C18 column at 60 °C (4 µm, 250 mm × 4.6 mm) as stationary phase. Detection at 210 nm.	48.9 min	[42]
HPLC	Tablet	Methanol/water (70:30 v/v) as mobile phase at 1 ml/min and LiChroCART <sup>®</sup> Cartridge LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18 (5 µm, 250 mm × 4.0 mm) as stationary phase. Detection at 210 nm.	6.0 min	[43]
HPLC	Tablet	Acetonitrile/water (95:05,v/v) as mobile phase at 0.7 ml/min and Shimpac <sup>®</sup> C8 column (5 µm, 15.0 cm x 4.6 mm) as stationary phase. Detection at 210 nm.	4.2 min	[44]

HPLC = High Performance Liquid Chromatography, GC = Gas Chromatography, UHPLC = Ultra-High Performance Liquid Chromatography.

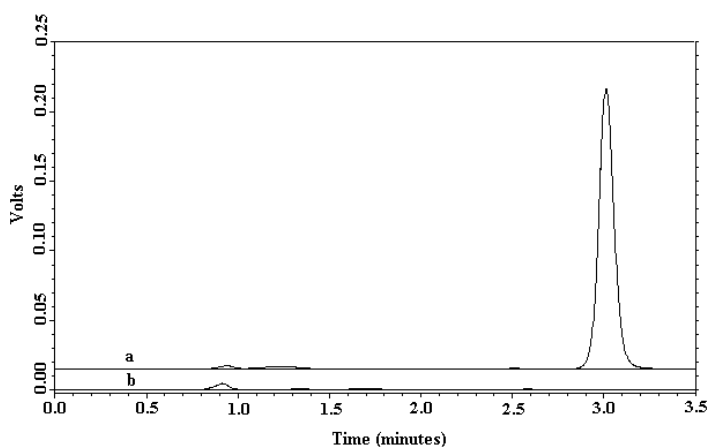
The MS optimization was performed by direct injection of FNS into the mass spectrometer. The mass parameters were optimized to obtain better ionization of FNS molecule. After optimization, HPLC-MS analyses were carried out by replacing the water in the mobile phase to 0.01% formic acid, which provided an increased analytical response in the ESI-MS without changing the retention factor of the analyte.

### 3.3 Validation of developed stability-indicating method

#### 3.3.1 Selectivity

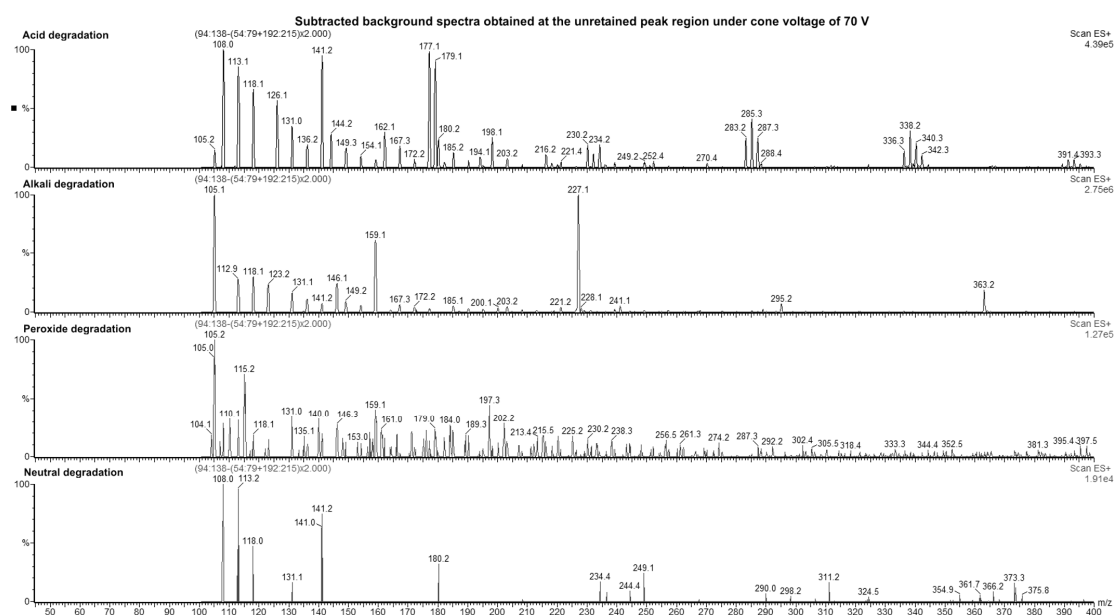
The chromatograms depicted in Figure 3 show that the excipients have negligible contribution to the FNS peak. This separation confirmed the method selectivity for capsule excipients.

The full scan LC-MS spectra obtained from FNS peaks of stressed solutions (HCl, water, NaOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were similar to that obtained from FNS peak of the working standard solution (Fig. 4), which ensured the selectivity of the chromatographic separation for degradation products. All the main peaks in the spectra are common for all the stress conditions and no interfering peak was observed. The mass spectrum of peroxide degradation shows only one significant peak for the protonated molecule of finasteride ([M+H<sup>+</sup>]) because at this condition the finasteride peak is almost completely degraded and only its base peak appears. Moreover, the resolution among FNS and their degradation product at 2.33 min was higher than 2.0, indicating adequate chromatographic separation.



**Fig. 3.** Chromatograms of FNS work standard solution at 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (a) and FNS excipient solution (b).

Figure 4 shows that some other products of degradation may be eluted as unretained compounds. A subtracted background spectrum was obtained at the time of the unretained compounds and different profiles were observed under each degradation condition. It is not possible to infer the number and structures for the eventual degradation products eluting in this region, but the observed MS peaks are really related with chromatographic bands eluting at  $t_0$ .



**Fig. 4.** Full scan LC-MS spectra at the elution region of the unretained compounds observed in degradation tests of finasteride. Subtracted background spectra were extracted at cone voltage of 70 V by averaging the region of elution of the unretained peaks and subtracting from the two averaged adjacent baselines (immediately before and after that peak region).

Finally, all the inferred degradation MS peaks and important background peaks were tested for peak purity / coelution with finasteride peak, and no interferences were observed. The peak purity of finasteride was confirmed by testing as mentioned before, by means of the extraction of the spectrum at different segments of the chromatographic peak, and by means of the reconstruction of the chromatographic peak (extracted ion chromatogram) with each ion of finasteride observed in its spectrum.



### 3.3.2. Linearity

The calibration equations and the correlation coefficient (r) obtained were  $y = 24121x + 13400$  and 0.9999, respectively. The relative standard deviations for each point (n=5) were smaller than 2.0%. Therefore, the response for the drug was linear in the studied concentration range.

### 3.3.3. Precision

The values of the precision studies are shown in Table 3. The % RSD results of precision and intermediate precision were within 2.0%, confirming adequate precision of the developed analytical method.

**Table 3-** Precision studies.

Parameter	Concentration level (mg L <sup>-1</sup> )	R. S. D. (%)
Repeatability	10	1.03 (n = 3)
	50	1.34 (n = 3)
	90	0.62 (n = 3)
Intermediate precision	10	1.82 (n = 3)
	50	1.91 (n = 3)
	90	1.41 (n = 3)

### 3.3.4. Accuracy

As shown in Table 4, the mean percentage recoveries were in accordance with fixed limits of 98.0 up to 102.0, indicating the suitability of the developed method in quantifying FNS in pharmaceutical capsules.

**Table 4-** Accuracy studies

Sample	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )			Recovery (%)	Mean recovery (%)
	Added	Theoretical	Found		
50.0	10.0	60.0	59.3	98.8	<b>100.1</b>
50.0	20.0	70.0	70.2	100.3	
50.0	30.0	80.0	81.0	101.3	

### 3.3.5. Detection and quantification limits

The DL and QL values were found to be 0.40 and 1.35 µg mL<sup>-1</sup>, which demonstrate that the analyses were performed in a region above the quantification limit.

### 3.3.6. Robustness

The results obtained in Youden and Steiner's robustness test are shown in Table 5. Effect values for all factors were smaller than the criterion  $s\sqrt{2}$ . Therefore, the method was fairly robust to all factors considered in this study.

**Table 5-** Robustness test results.

Factor	Effect (%)
Column temperature	1.45
Mobile-phase flow rate	-0.35
Sonication	-0.05
Exposure to light	-0.70
Acetonitrile brand (AcN)	0.35
Mobile-phase proportion	1.40
Wavelength detection	-0.20
$s\sqrt{2}$	1.67

### 3.4. Application of the validated method for the determination of finasteride in capsules

The amounts of FNS in three commercial capsules (a, b and c), expressed as percentage drug related to label claim, are shown in Table 6. In all cases, the results for the assayed drug were in good agreement with the label claims. In addition, the chromatographic parameters were calculated using CLASS-VP 5.02 software. The results are shown in Table 6. According to the FDA [38], the retention factor ( $k$ ) must be higher than 2.0, tailing factor less than 2.0 and plate number higher than 2,000.

**Table 6.** Assay of FNS in pharmaceutical capsules.

	Amount founded (%)	Retention factor ( $k$ )	Column efficiency (plates)	Tailing factor	RSD (%) for replicate injections
Product a	96.0	3.23	> 3900	< 1.12	0.46
Product b	98.7	3.21	> 3900	< 1.12	0.58
Product c	95.8	3.22	> 3900	< 1.12	0.50

Therefore, all parameters are in accordance with FDA recommendations, confirming that this method can be used for routine analysis quality control of capsules containing FNS. Peak purity was also confirmed regarding MS data for those samples, as performed before in the evaluation of the method selectivity.

#### **4. Conclusion**

The proposed RP-HPLC method for determination of FNS in capsules under described conditions met the required parameters for analytical validation. The proposed method can thus be used for routine analysis quality control of capsules containing this drug.

The main advantages of this method over previously reports are shorter analysis time, simple extraction procedure, good accuracy and reproducibility and adequate separation efficiency for degradation products. The developed HPLC method can, therefore, serve as a cheap and easy tool for the evaluation of FNS in the presence of its degradation products.

## References

- [1] G. J. Gormley, *Biomed. Pharmacother.*, 49 (1995) 319-324.
- [2] E. K. Cha and S. F. Shariat, *Eur. Urol.*, 59 (2011) 515-517.
- [3] L. J. Schmidt and D. J. Tindall, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 125 (2011) 32-38.
- [4] M. Yamazaki, T. Miyakura, M. Uchiyama, A. Hobo, R. Irisawa and R. Tsuboi, *J. Dermatol.*, 38 (2011) 773-777.
- [5] J. Macek, *J. Chromatogr. B.*, 764 (2001) 207-215.
- [6] The British Pharmacopoeia vol. I, The Stationary Office Ltd, London, 2009.
- [7] The United States Pharmacopoeia, 34 ed., United States Pharmacopoeial Convection, Rockville, MD, 2011.
- [8] J. R. Carlin, P. Christofalo and W. J. A. Vandenheuvell, *J. Chromatogr. B.*, 427 (1988) 79-91.
- [9] M. L. Constanzer, B. K. Matuszewski and W. F. Bayne, *J. Chromatogr. B.*, 566 (1991) 127-134.
- [10] T. Takano and S. Hata, *J. Chromatogr. B.*, 676 (1996) 141-146.
- [11] G. Carlucci and P. Mazzeo, *J. Chromatogr. B.*, 693 (1997) 245-248.
- [12] P. Ptáček, J. Macek and J. Klíma, *J. Chromatogr. B.*, 738 (2000) 305-310.
- [13] M. L. Constanzer, C. M. Chavez and B. K. Matuszewski, *J. Chromatogr. B.*, 658 (1994) 281-287.
- [14] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer and C. M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 882-889.
- [15] F. G. Menezes, W. Ribeiro, D. R. Ifa, M. E. Amaral de Moraes, M. O. Amaral de Moraes and G. De Nucci, *Arzneim.-Forsch.*, 51 (2001) 145-150.
- [16] A. Almeida, S. Almeida, A. Filipe, S. Gagnon, A. Mirapeix, B. Girard and M. Tanguay, *Arzneim.-Forsch.*, 55 (2005) 218-222.
- [17] F.-Q. Guo, L.-F. Huang, K. P. Wong, Y.-H. Dai, Y.-W. Li, Y.-Z. Liang, K.-L. Huang, K.-J. Zhong and M.-J. Wu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43 (2007) 1507-1513.
- [18] L. Chen, X. Jiang, L. Huang, K. Lan, H. Wang, L. Hu, J. Ren, X. Li and Q. Zou, *Clin. Ther.*, 31 (2009) 2242-2248.
- [19] I. Marchi, S. Rudaz and J.-L. Veuthey, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49 (2009) 459-467.
- [20] X. Chen, E. R. Gardner, D. K. Price and W. D. Figg, *J. Chromatogr. Sci.*, 46 (2008) 356-361.
- [21] L. Yuan, M. Ding, J. Ma, J. Xu, X. Wu, J. Feng, F. Shen and X. Zhou, *Eur. J. Drug Metab. Ph.*, 35 (2011) 137-146.
- [22] F. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, S. Rudaz and J. L. Veuthey, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 4109-4119.
- [23] P. B. Phapale, H. W. Lee, M.-s. Lim, E.-H. Kim, S.-D. Kim, J. Park, M. Lee, S.-K. Hwang and Y.-R. Yoon, *J. Chromatogr. B.*, 878 (2010) 1718-1723.
- [24] A. Guarna, G. Danza, G. Bartolucci, A. Marrucci, S. Dini and M. Serio, *J. Chromatogr. B.*, 674 (1995) 197-204.
- [25] U. Sevgi Tatar, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 67 (2007) 778-783.
- [26] K. Ilango, P. Valentina and S. Lakshmi K, *Indian drugs*, 40 (2003) 122-123.
- [27] K. Ilango, P. Valentina and S. Lakshmi K, *Indian J. Pharm. Sci.*, 64 (2002) 174-175.

- [28] S. N. Meyyanathan, G. V. S. Ramasarma and B. Suresh, *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, 14 (2001) 188-190.
- [29] D. Patel and N. Patel, *Acta Pharm.*, 60 (2010) 197-205.
- [30] J. A. Ryan, S. V. Compton, M. A. Brooks and D. A. C. Compton, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9 (1991) 303-310.
- [31] A. Sawsan M, *Il Farmaco*, 58 (2003) 159-163.
- [32] A. Álvarez-Lueje, S. Brain-Isasi, L. J. Núñez-Vergara and J. A. Squella, *Talanta*, 75 (2008) 691-696.
- [33] S. Saglic and S. Tatar Ulu, *Anal. Biochem.*, 352 (2006) 260-264.
- [34] S. Fekete, J. Fekete and K. Ganzler, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49 (2009) 64-71.
- [35] S. Fekete, J. Fekete and K. Ganzler, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 50 (2009) 703-709.
- [36] *European Pharmacopeia*, 6 ed., Council of Europe, Strasbourg, 2008.
- [37] *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, ICH, 2005.
- [38] FDA, *Guidance for industry: bioanalytical method validation*, FDA Center for drug evaluation and research, Rockville, 2001.
- [39] W. J. Youden and E. H. Steiner, *Statistical Manual of the AOAC Association of Official Analytical Chemists* Arlington, TX, 1975.
- [40] K. Basavaiah and B. C. Somashekar, *E-J. Chem.* 4(2007) 109-116.
- [41] I. Cendrowska and B. Buszewski, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 22 (1999) 2259-2270.
- [42] H. Demir, A. Cucu and S. Sakarya, *Anal. Chim. Acta*, 557 (2006) 252-255.
- [43] A. I. Segall, M. F. Vitale, V. L. Perez, M. L. Palacios and M. T. Pizzorno, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 25 (2002) 3167-3176.
- [44] A. A. Syed and M. K. Amshumali, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (2001) 1015-1019.

### 3.2 *Artigo II*

O artigo II consiste do desenvolvimento e validação de um teste de dissolução para análise de finasterida na forma farmacêutica cápsula e foi submetido à uma revista *qualis A2* na área de farmácia.

## **A dissolution test for finasteride in immediate release capsules**

**Olimpia Maria Martins Santos\*, Ana Laura Araújo Santos, Gislaine Ribeiro Pereira, Rudy Bonfilio and Magali Benjamim de Araújo.**

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil.*

\* Corresponding author e-mail: [olimpia\\_martins@yahoo.com.br](mailto:olimpia_martins@yahoo.com.br)



## **A dissolution test for finasteride in immediate release capsules**

### **ABSTRACT**

*In vitro* dissolution tests for solid oral dosage forms are extremely important to ensure the quality of these products. However, no dissolution test has been reported for finasteride (FNS) in immediate release capsules. The aims of this work were to optimize a dissolution method for FNS capsules, to validate the analytical method, and to evaluate three different commercial products. The best *in vitro* dissolution profile was achieved using water as the dissolution medium with a basket stirrer at 100 rpm. The quantitative determination was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) at 210 nm. All validation parameters were found to be satisfactory. The application of the method to commercial products showed that no dissolution profile obtained from the commercial capsules was similar to the profile obtained from the reference product. These experimental results illustrated the discriminatory power of the analytical method and showed that acceptance criteria of 70% (Q = 65) in 15 min and of 85% (Q = 80) in 45 min can be considered satisfactory for routine quality control tests for FNS in capsules. Because there is no monograph for FNS in capsules and all capsule products were reproved in the proposed dissolution test, this study illustrates the importance of an official dissolution test for FNS in capsules and the need to standardize the composition of the excipients contained in these commercial products.

*Keywords:* Dissolution test; high performance liquid chromatography; finasteride; capsules.

## 1. INTRODUCTION

*In vitro* dissolution tests for immediate release solid oral dosage forms, such as tablets and capsules, are extremely important because these tests are essential to evaluate the lot-to-lot quality of a drug product, to guide the development of new formulations and to ensure continuing product quality and performance after certain changes, such as changes in the formulation, the manufacturing process, the site of manufacture, and the scaling-up of the manufacturing process [1]. For these reasons, in recent years, progressively more emphasis has been placed on dissolution testing within the pharmaceutical industry and by regulatory authorities [2].

Despite the importance of dissolution tests to ensure the quality of medicines, several drug products that are widely commercialized throughout the world lack descriptions of dissolution tests. Finasteride (FNS) is a relevant example because no dissolution test is reported in the literature or in pharmacopeias for immediate release capsules of this medication. Capsules containing FNS are produced by compounding pharmacies worldwide. These FNS capsules are prepared by mixing the drug with excipients. A compounding pharmacist then encloses this mixture of the drug with excipients in a hard soluble container, usually in the form of gelatin. This compounding may be performed for medical reasons such as to avoid an excipient to which the patient is allergic or to obtain a dosage level that is not marketed.

FNS (Figure 1) is *N*-(1,1-dimethylethyl)-3-oxo-4-aza-5 $\alpha$ -androst-1-ene-17 $\beta$ -carboxamide, a specific competitive inhibitor of steroid type-II 5 $\alpha$ -reductase, an intracellular enzyme that converts testosterone to dihydrotestosterone (DHT) and is widely used for the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH) [3], prostate cancer [4] and androgenetic alopecia [5,6,7,8]. The daily dose of 5 mg has been used for the treatment of BPH and prostate cancer, and a 1 mg dose has been used for the treatment of androgenetic alopecia. The molecular formula of FNS is C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, its molecular weight is 372.6 and, its log P (o/w) is 3.03. FNS is a white crystalline powder with a melting point near 250°C. FNS is practically insoluble in water, is freely soluble in ethanol and in chloroform and shows polymorphism [9].

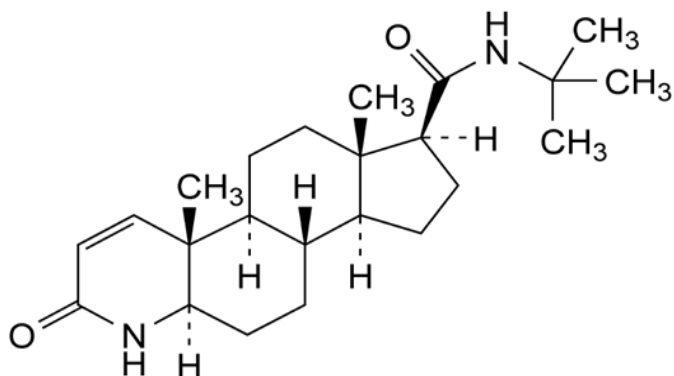


Figure 1. Chemical structure of finasteride (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008).

In pharmaceutical preparations, multiple analytical procedures have been reported for the analysis of FNS when it is present as a single active principle or in combined dosage forms, using spectrophotometry [10,11,12], thin-layer chromatography [13,14], infrared spectrophotometry [15] polarography [16], voltammetry [17], gas chromatography [18], gas chromatography – mass spectrometry [19], high performance liquid chromatography (HPLC) [20,21,22,23] and ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) [24,25].

Due to the importance of *in vitro* dissolution tests for immediate release solid oral dosage forms and the lack of a dissolution test for FNS compounded capsules, the aims of this work are to optimize a dissolution method for FNS capsules, to validate the analytical method used for the quantification of the samples and to demonstrate the applicability of the dissolution test by evaluating three different commercial products.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Chemical and reagents

All reagents were of analytical grade. Potassium dihydrogenphosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), phosphoric acid, sodium hydroxide, sodium acetate and hydrochloric acid were purchased from

Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brazil). FNS reference substance (assigned purity 99.7%) was acquired from USP<sup>®</sup> (Maryland, USA). Acetonitrile was of HPLC grade and was acquired from both Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brazil) and Burdick & Jackson<sup>®</sup> (Michigan, USA). Reverse osmosis water was obtained using a water purifier OS 10 LTH (Gehaka<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil) and was used to prepare dissolution media. HPLC grade water used in the mobile phase was prepared with a Milli-Q<sup>®</sup> system (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA).

FNS capsules that were alleged to contain 5 mg of the active component were used in this study and were supplied from three compounding pharmacies, codified as A, B and C. In addition, a placebo mixture containing the same quantitative composition as the capsules was obtained from the compounding pharmacies. The placebo mixture was described as containing the following inactive excipients: aerosil, sodium lauryl sulfate, talc, starch, lactose hydrous powder (Product A); talc, starch, lactose hydrous powder (Product B); and magnesium stearate, aerosil, sodium lauryl sulfate, talc, starch, lactose hydrous powder (Product C).

The FNS 5 mg reference drug product Proscar<sup>®</sup> (5 mg tablets, lot 300060) was purchased from Merck Sharp & Dohme (Whitehouse Station, NJ, USA).

## 2.2. Instrumentation

Dissolution tests were performed in an Electrolab<sup>®</sup> TDT-08L multi bath (n=8) dissolution test system (Mumbai, India), in accordance with the United States Pharmacopeia (USP) general method [26].

The HPLC equipment used was a Shimadzu<sup>®</sup> series LC-10A (Kyoto, Japan), consisting of LC-10ADVP pump, CLASS-VP 5.02 integration system software, DGU-14A degasser, 7725i manual injector with a 20  $\mu$ L loop (Rheodyne<sup>®</sup>, California, USA), SPD-10AVP integrated UV detector, LC-10AVP low pressure gradient valve, CTO-10AVP column oven and SCL-10AVP controller.

The following equipment was also used: digital pH meter model PA 200 (Marconi<sup>®</sup> S.A., Piracicaba, Brazil), ultrasonic bath model USC 2800A (Unique<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil), analytical

balance model 410 (Kern<sup>®</sup>, Kern, Germany), and vacuum filtration system (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, United States).

### 2.3. Solutions

All dissolution media used in this study (water, hydrochloric acid (0.1 mol L<sup>-1</sup>), acetate buffer (pH 4.5; 0.05 mol L<sup>-1</sup>) and phosphate buffer (pH 6.8)) were degassed at 41 °C in an ultrasonic bath for 20 min prior to use.

The hydrochloric acid (0.1 mol L<sup>-1</sup>) solution was prepared by adding 8.5 mL of hydrochloric acid in 1.0 L of water.

The sodium acetate buffer (pH 4.5; 0.05 mol L<sup>-1</sup>) was prepared by adding 5.98 g of sodium acetate trihydrate and 3.32 mL of glacial acetic acid to 2.0 L of water.

The potassium phosphate buffer (pH 6.8; 0.072 mol L<sup>-1</sup>) was prepared by adding 13.609 g of potassium dihydrogenphosphate and 22.38 mL of 2 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide to 2.0 L of water.

The stock standard solution of FNS at 100 µg mL<sup>-1</sup> was prepared in a 100 mL volumetric flask by dissolving an accurately weighed amount (10.0 mg) of FNS standard (99.7% purity) in the mobile phase. Working standard solutions were prepared immediately before use by suitable dilutions of the corresponding stock solutions to appropriate concentration levels, using potassium phosphate buffer, sodium acetate buffer, hydrochloric acid or purified water.

Sample solutions were prepared by putting one capsule in each vessel (n = 6) containing the dissolution medium (500 mL) at a temperature of 37 ± 0.5 °C. Samples were collected at the end of the specified time and filtered through quantitative VETEC<sup>®</sup> filter paper. For the HPLC analysis, standard and samples were filtered through a 0.45-µm PTFE-membrane filter (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA) prior to injection into the HPLC system.

#### 2.4. *Chromatographic conditions*

The chromatographic separation was achieved at 30 °C on a Lichrospher reversed-phase C8 (150 × 4.6 mm, 5 µm) endcapped column (MetaChem Technologies Inc., California, USA) using acetonitrile-water (70:30,v/v) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The mobile phases were prepared daily, filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore®, Bedford, USA) and degassed using the degasser of the chromatographic system prior to use. The detector wavelength was set at 210 nm, and the injection volume was 20 µL.

#### 2.5. *Sink conditions*

To establish sink conditions, the solubility of the drug was visually tested adding 5 mg of FNS in 166.7 mL of HCl (0.1 mol L<sup>-1</sup>), acetate buffer (pH 4.5; 0.05 mol L<sup>-1</sup>), phosphate buffer (pH 6.8; 0.072 mol L<sup>-1</sup>) and water.

#### 2.6. *Dissolution test optimization*

Because there is no reference product in capsule form, the dissolution experimental conditions were established with only one of the three products used in this work (capsule C). Initially, water, HCl (0.1 mol L<sup>-1</sup>), acetate buffer (pH 4.5; 0.05 mol L<sup>-1</sup>) and potassium phosphate buffer (pH 6.8; 0.072 mol L<sup>-1</sup>) were tested as dissolution media using a basket stirrer as the apparatus at a stirring speed of 50 rpm. After using water as the dissolution medium, we checked the influence of the rotation speed of the basket stirrer (at 50, 75 and 100 rpm) on the FNS capsule release. Finally, we compared the performance of the basket stirrer (at 100 rpm) versus the paddle stirrer (at 100 rpm) on the FNS release in water. When the paddle stirrer was tested, a

wire helix (sinker) was used around the capsules to avoid floating of the capsules, as recommended by the United States Pharmacopeia [26]. A volume of 500 mL was used in cubes and the stabilization temperature in the test was  $37.0 \pm 0.5$  °C. Samples (2 mL) were withdrawn from the dissolution medium at 3, 9, 15, 20, 30, 45 and 60 min, followed by immediate replacement. The samples were analyzed by HPLC and the analytical results were employed for the acquisition of dissolution profiles. Six samples were assayed.

### *2.7. Method validation*

After optimization of the dissolution test, the analytical method was validated according to The United States Pharmacopeia (USP) and the International Conference on Harmonization (ICH) requirements [26,27]. To demonstrate whether the method was adequate for dissolution test purposes, the method was validated by the determination of stability, selectivity, linearity, precision, accuracy, detection limit, quantitation limit and robustness parameters.

#### *2.7.1. Stability*

Working standard solutions in water at the concentration of  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  of FNS were prepared in triplicate, filtered and immediately injected into HPLC system (time zero). The same solutions were maintained at room temperature for 24 h and evaluated again. Then the results obtained after 24 h were compared with those obtained at time zero. The acceptable range is an analytical response after 24 h between 98% and 102% of the value obtained at time zero.

To evaluate the FNS stability under dissolution test conditions, three samples of each product (A, B and C) containing 5 mg of FNS were transferred to separate vessels containing 500 mL of water at  $37 \pm 0.5$  °C and stirred for 45 minutes at 100 rpm using the basket stirrer as the apparatus. Aliquots were collected, filtered and immediately injected into the HPLC analysis

(time zero). The same solutions were maintained at room temperature for 2 h and evaluated again. For each solution, the results obtained after 2 h were compared with the results obtained at time zero. An analytical response after 2 h between 98% and 102% of the response obtained at time zero is acceptable.

### 2.7.2. *Selectivity*

For determination of selectivity, the placebo sample and capsule shell were transferred to separate vessels containing 500 mL of the dissolution medium water at  $37 \pm 0.5$  °C and stirred for 45 min at 100 rpm using the basket stirrer as the apparatus. Aliquots were collected and the interference of the placebo mixture of each formulation was evaluated by HPLC.

### 2.7.3. *Linearity*

Linearity was evaluated by regression analysis of the FNS working standard solutions at six concentrations in triplicate ranging from 0.5 to 15.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0.5, 1.0, 5.0, 8.0, 10.0, 15.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) prepared in water on three consecutive days ( $n = 3$ ). The calibration equations and the correlation coefficient obtained were calculated. The acceptance criteria were a correlation coefficient of 0.999 or greater and a relative standard deviation (R.S.D) of each point ( $n=9$ ) smaller than 2% [26].

### 2.7.4. *Accuracy and precision*

The accuracy was evaluated through a recovery test using known amounts of FNS



reference substance added to the placebo. A stock solution containing  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  of FNS was prepared in the mobile phase. Aliquots of 0.5, 1.0 and 1.5 mL of this solution were added to vessels containing the dissolution medium for a total volume of 500 mL (final concentrations were 5, 10 and  $15 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , which correspond to 50, 100 and 150 % of the target concentration). Placebo samples containing the same excipient composition as the 5 mg capsule products (A, B and C) were then transferred to each vessel. The samples were maintained at  $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  and stirred at 150 rpm for 1 h. Subsequently, aliquots from each vessel were collected and analyzed. These studies were performed in triplicate on three different days. The percent recoveries were calculated according to Eq. (1):

$$R(\%) = \frac{(C_{\text{measured}})}{(C_{\text{added}})} \times 100\% \quad (1)$$

where  $C_{\text{measured}}$  is the sample concentration obtained from the HPLC method at each concentration level, and  $C_{\text{added}}$  is the theoretical concentration at each concentration level. The acceptance criterion was recovery between 95.0% and 105.0% [26].

The same solutions used in the accuracy test were analyzed to ensure the precision of the method. Intra- and inter-day precision were established based on R.S.D. of the results [27]. The acceptance criterion was R.S.D. less than 5.0% [26].

#### *Detection and quantitation limits*

The detection limit (DL) and quantitation limit (QL) were obtained from Eq. (2) and Eq. (3):

$$DL = 3(S.D/a) \quad (2)$$

$$QL = 10(S.D/a) \quad (3)$$

where S.D. is the intersection standard deviation and  $a$  is the slope of the calibration curves obtained in the linearity study [27].

#### 2.7.6. Robustness

The robustness was evaluated by analyzing the data after varying seven factors according to Youden and Steiner's robustness test [29]. The percentage of drug release was calculated for each experiment by comparing the sample peak areas with those obtained from the FNS standard solution at the same concentration level. The following factors were probed: stirring speed, degassing of the dissolution medium, sample filtration, time of dissolution test, temperature of the dissolution medium, exposure to light and sampling point. The nominal values of the factors are denoted by A, B, C, D, E, F and G, and their alternative values are denoted by the corresponding lower-case letters a, b, c, d, e, f and g. Eight experiments were conducted, as indicated in Table 1.

**Table 1.** Factors and their levels for robustness studies and experimental conditions according to Youden and Steiner's robustness test [29].

Selected factor	Nominal Conditions	Alternative conditions	Experimental condition							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Stirring speed	100 rpm (A)	95 rpm (a)	A	A	A	A	a	a	a	a
Dissolution medium degassing	Yes (B)	No (b)	B	B	b	b	B	B	b	b
Sample filtration	Yes (C)	No (c)	C	c	C	c	C	c	C	c
Time of dissolution test	45 minutes (D)	47 minutes (d)	D	D	d	d	d	d	D	D
Temperature of dissolution medium	37°C (E)	35°C (e)	E	e	E	e	e	E	e	E
Exposure to light	Yes (F)	No (f)	F	f	f	F	F	f	f	F
Sampling point	upper (G)	down (g)	G	g	g	G	g	G	G	g
Observed results			s	t	u	v	w	x	y	z

Upper case letters (from A to G) represent nominal conditions

Lower case letters (from a to g) represent alternative conditions

From these results, the effect of each factor was estimated by obtaining the difference of the averages of the four analyses that have the nominal value (upper-case letter) and the four analyses with the alternative value (lower-case letter). Considering the standard deviation of the eight results, effect values higher than the  $SD\sqrt{2}$  criterion (standard deviation multiplied by the square root of two) were considered significant, and the method is sensitive to the changes in the specific factor.

## 2.8. Assay of pharmaceutical products

After determination of the best dissolution conditions as well as method analytical validation, three different commercial products (A, B and C) were evaluated. The dissolution experimental conditions were water as the dissolution medium and a basket stirrer as the apparatus, stirring at a rate of 100 rpm. Two milliliters of dissolution medium (controlled at  $37.0 \pm 0.5$  °C) were sampled after 3, 9, 15, 20, 30, 45 and 60 min, followed by immediate replacement and then analyzed by HPLC. In these tests, the last sampling point was 60 min because the USP [26] recommends a procedure duration of 30 to 60 minutes for immediate release dosage forms.

The same methodology was applied to reference product Proscar<sup>®</sup> in 5 mg tablets. Comparisons between the dissolution profiles of the commercial products and the dissolution profile obtained from the reference product (reference x A, reference x B and reference x C) were carried out. The similarity of the dissolution profiles was determined by a difference factor ( $F_1$ ) and a similarity factor ( $F_2$ ), calculated from Eq. (4) and Eq. (5) as follows:

$$F1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|]\} / \{[\sum_{t=1}^n R_t]\} \times 100 \quad (4)$$

$$F2 = 50 \times \log \{[(1 + 1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \times 100\} \quad (5)$$

Where:  $R_t$  is the percentage of reference drug dissolved at each point,  $T_t$  is the percentage of test product dissolved in each point and  $n$  is the number of sampling points.

For curves to be considered similar,  $F_1$  values should be close to 0, and  $F_2$  values should be close to 100. Generally,  $F_1$  values up to 15 (0-15) and  $F_2$  values greater than 50 (50-100) ensures equivalence of the two curves [1].

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Sink conditions

The sink condition tests showed precipitation of FNS reference substance in 0.1 and HCl (0.01 mol L<sup>-1</sup>), acetate buffer (pH 4.5), phosphate buffer (pH 6.8) and water. However, the sink conditions are desirable but not mandatory for Food and Drug Administration (FDA) approval

[1]. Although these media do not ensure sink conditions for the reference substance, we performed dissolution test optimizations using all of these media, to check if commercial drug products would present good *in vitro* release due to presence of excipients.

### 3.2. Optimization of HPLC conditions

The chromatographic conditions were previously optimized to yield an adequate analytical performance in a low run time. After several preliminary experiments, the following parameters were considered adequate for our purpose: acetonitrile-water (70:30, v/v) as the mobile phase, a flow rate of  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$  with a column temperature of  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a reversed phase C8 (150 x 4,6 mm,  $5 \text{ }\mu\text{m}$ ) endcapped column, a UV detection wavelength at 210 nm and an injection volume of  $20 \text{ }\mu\text{L}$ .

To confirm whether the chromatographic parameters were consistent with the literature, a system suitability test was carried out by injecting six replicates of a working standard solution containing  $10.0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  of FNS in water. The following results were found: retention time of 3.09 min, theoretical plates higher than 5800, a retention factor of 3.29 and a FNS peak asymmetry of 1.12. The relative standard deviation of the peak area was 0.68%. All parameters were therefore consistent with The United States Pharmacopeia recommendations [26].

### 3.3. Dissolution test optimization

Because there is no reference product in capsule form, the dissolution experimental conditions were established by submitting only one of the three capsule products that were used in this work. We selected the product C because it had an excipient composition more similar to the reference product.

In general, mild conditions should be maintained during dissolution testing to allow maximum discriminating power [30]. In this study, the dissolution test was optimized in terms of the dissolution medium, the rotation speed, and the basket (type I)/paddle (type II) stirring apparatus to obtain a slow dissolution of the products at the first sampling points, which certainly will result in a test suitably discriminative. In addition, we seek a dissolution test that can produce a satisfactory release of the products at the last sampling points according to FDA specifications [1] and that states that only one measurement should be considered after 85% dissolution for comparison of dissolution profiles using the simple model independent approach. The last sampling point may be used in routine tests performed in quality control laboratories.

Regarding the dissolution medium, 500 mL was used because this volume is sufficient to dissolve the capsule product C. A volume of 500 mL is an appropriate volume for analysis of capsules containing 1 mg of active principle. In the optimization of the composition of the dissolution medium (using the basket stirrer as the apparatus with a stirring speed of 50 rpm), hydrochloric acid (HCl)(0.1 mol L<sup>-1</sup>) and acetate buffer (pH 4.5; 0.05 mol L<sup>-1</sup>) were not considered as “ideal” dissolution media because the FNS capsules were experimentally demonstrated to have a low and constant dissolution profile in these media without reaching a maximum in up to 60 min (Figure 2). However, the phosphate buffer (pH 6.8; 0.072 mol L<sup>-1</sup>) and the basket stirrer as the apparatus at a stirring speed of 50 rpm allow a slow FNS release at the first sampling points and a high drug release at 60 min of assay. Phosphate buffer (pH 6.8; 0.072 mol L<sup>-1</sup>) as the dissolution medium will probably result in a test suitably discriminative (Figure 2).

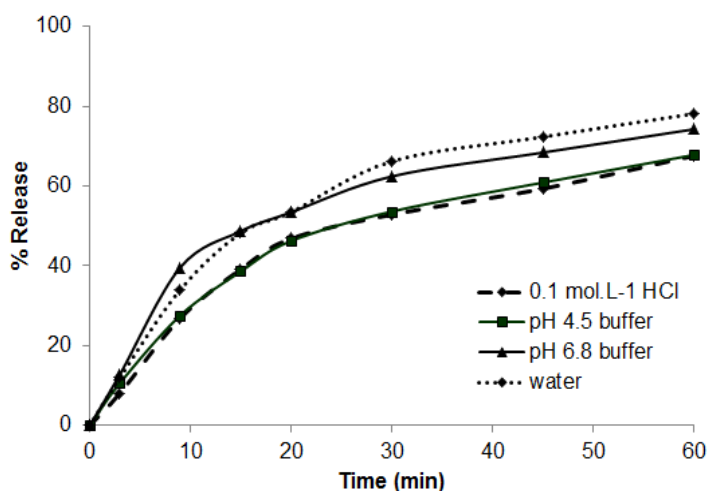


Figure 2. Dissolution profiles of 5 mg FNS capsules using 0.1 mol.L<sup>-1</sup> hydrochloric acid (HCl), acetate buffer (pH 4.5), phosphate buffer (pH 6.8) and water as the dissolution medium. A paddle stirrer was used as the apparatus at 50 rpm. Samples were analyzed by HPLC.

The use of water as a dissolution medium is discouraged because test conditions such as pH and surface tension can vary depending on the water source and day and may change during the dissolution test itself. However, the aqueous solubility of FNS was observed to be almost constant between pH 1 to 13 (Figure 3). The phosphate buffer was therefore replaced by water because water is cheaper, readily available, easily disposed of, environmentally friendly and suitable for products with a release rate independent of pH value of the medium. Therefore, the water was chosen as the best dissolution medium because results similar to the results observed with phosphate buffer (pH 6.8) were obtained.

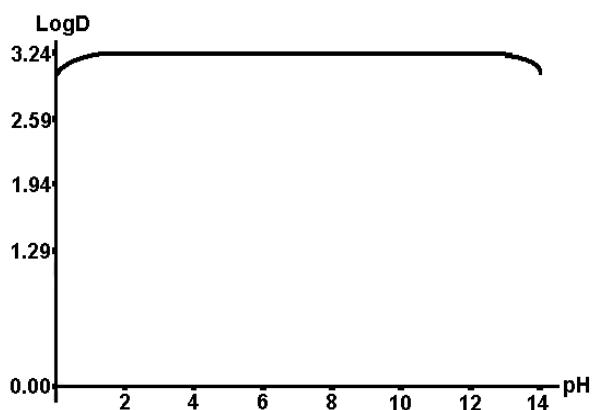


Figure 3. Log D for FNS calculated by ACD Lab software<sup>®</sup>. The experimentally determined partition coefficient using pH conditions providing for uncharged compound in the aqueous and octanol phases is called Log P (for partition). If a given pH is used, the resulting partition coefficient is called Log D (for distribution).

Using water as the dissolution medium, we checked the influence of the rotation speed of the basket stirrer (at 50, 75 and 100 rpm) on the FNS capsules release. The experimental results showed the best dissolution rate at the last sampling points at 100 rpm rotation speed (Figure 4). This result is expected because normally an increase of the apparatus stirring speed will produce an improved drug transfer from the dosage form to the dissolution medium.

Because a best dissolution rate at the last sampling points was obtained at 100 rpm for the basket stirrer, we compared the performance of the basket stirrer (at 100 rpm) versus the paddle stirrer (at 100 rpm) for the FNS release. The experimental results showed that the basket stirrer as the apparatus produced a higher dissolution percentage of the capsules than the paddle stirrer at the last sampling points (Figure 4). The basket stirrer was then selected and it was not necessary to test the paddle stirrer at 75 rpm and 50 rpm because these conditions will probably result in lower drug releases than at a level of 100 rpm. The use of the basket stirrer for the dissolution test of FNS capsules is in agreement with The United States Pharmacopoeia [26], which usually recommends basket stirrers as the apparatus for capsules.



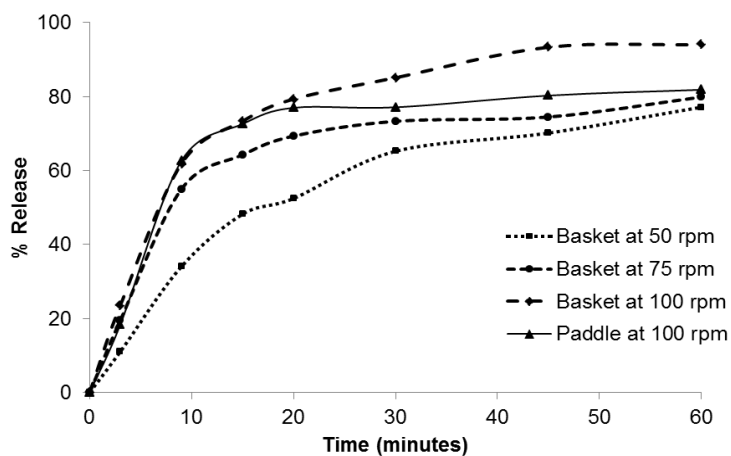


Figure 4. Optimization of rotation speed and stirring apparatus. Water was used as the dissolution medium and the samples were analyzed by HPLC.

The established dissolution conditions for the assessment of FNS immediate release capsules were 500 mL of water at 37 °C as the dissolution medium and the basket stirrer as the apparatus at a stirring speed of 100 rpm. As observed in Figure 4, these conditions produced slow drug dissolution at the first sampling points and a satisfactory dissolution at the last sampling point.

### 3.4. Method validation

#### 3.4.1. Stability

Standard solutions remained stable at room temperature for 24 h and sample solutions remained stable at room temperature for 2 h after the dissolution test (Table 2).

**Table 2.** Stability studies.

Initial (100.0%)	% Recovery (after 2 hours)	% Recovery (after 24 hours)
Standard	-	99.2
Sample A	99.5	-
Sample B	99.8	-
Sample C	99.4	-

### 3.4.2 Selectivity

In the HPLC method, no additional chromatographic peaks from the placebo formulation and empty capsules were observed at the same retention time as FNS, demonstrating the selectivity of this method (Figure 5).

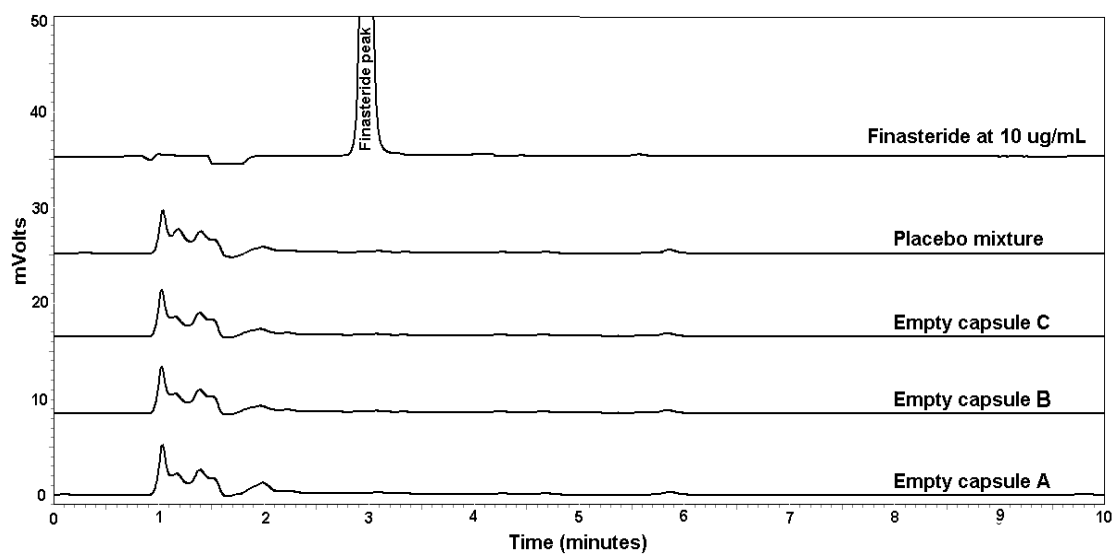


Figure 5. Chromatogram of FNS at 10.0 mg L<sup>-1</sup> in water, chromatogram of placebo mixture and empty capsules of products A, B and C under dissolution conditions described in the selectivity studies.

### 3.4.3 Linearity

The calibration equation obtained was  $y = 40790x + 3803.1$ . The least squares regression showed satisfactory correlation coefficients ( $r=0.9999$ ). The relative standard deviation of each point ( $n=9$ ) was less than 2%. These results meet the acceptance criteria [26].

### 3.4.4 Accuracy and precision

The values of the recoveries for FNS in all drug products shown in Table 3 are between 95.0-105.0%, showing acceptable accuracy according to the literature [26].

**Table 3.** Accuracy studies for FNS.

Concentration added ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Day	Concentration found ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Recovery rate (%)
5	1	4.96	99.21
	2	4.99	99.77
	3	4.94	98.84
10	1	10.03	100.28
	2	9.91	99.12
	3	9.90	98.95
15	1	14.91	99.37
	2	14.85	98.99
	3	14.80	98.65

The results of the repeatability (intra-assay) and intermediate precision (inter-assay) of the dissolution procedure are shown in Table 4. The relative standard deviations did not exceed 2.0%, demonstrating suitable precision for the dissolution test [26].

**Table 4.** Precision studies for FNS.

Concentration added ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Intra-day precision (R.S.D. (%) (n= 3))	Intermediate precision (R.S.D. (%) (n=9))
5	0.91	1.82
10	0.55	1.22
15	1.29	1.95

#### 3.4.5 Detection and quantitation limits

The detection limit for the method was found to be  $0.096 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The quantitation limit was found to be  $0.32 \mu\text{g mL}^{-1}$ . These results demonstrated that the analyses were being performed in a region above these values and that the method can also be applied to capsules containing 1 mg of the active principle.

#### 3.4.6 Robustness

The results obtained in Youden and Steiner's robustness test are shown in Table 5. Effect values for all factors were smaller than the criterion  $SD\sqrt{2}$ . The method was therefore fairly robust for all factors considered in this study.

**Table 5.** Robustness test results.

Factor	% Recuperation	Effect (%)
Stirring speed	94.2	2.30
Dissolution medium degassing	97.1	1.25
Sample filtration	95.1	-2.65
Time of dissolution test	93.8	-0.90
Temperature of dissolution medium	96.7	1.00
Exposure to light	89.9	-0.25
Sampling point	94.3	-1.00
$SD\sqrt{2}$		3.09

### 3.4. Assay of pharmaceutical products

The validated dissolution test was applied to the assessment of three different commercial products (A, B and C) alleged to contain 5 mg of FNS. Although commercial FNS capsules may contain 1 or 5 mg of active principle and we have studied only the high dosage form, the HPLC method is also able to quantify capsules containing 1 mg of FNS after dissolution tests, as demonstrated in the validation studies. To compare the quality of analyzed products with the reference product, the same method was applied to the commercial product Proscar<sup>®</sup> (5 mg tablets). The dissolution profile obtained with the reference product was used to guide the specifications for the quality control analyses.

Dissolution profiles of the analyzed products are presented in Figure 6. The results are expressed as drug release percentage versus time (min). A comparison study between the commercial products and the reference product was carried out using the difference ( $F_1$ ) and the similarity ( $F_2$ ) factors (Table 6). The results showed that no dissolution profile obtained from the capsule products was similar to the dissolution profile obtained from the reference product. This result indicates the discriminatory power of the proposed method and the necessity to establish an official dissolution method for quality control of FNS capsules because we showed that there are commercial products that do not demonstrate quality compatible with the reference product where quality, safety, and efficacy were clinically proven.

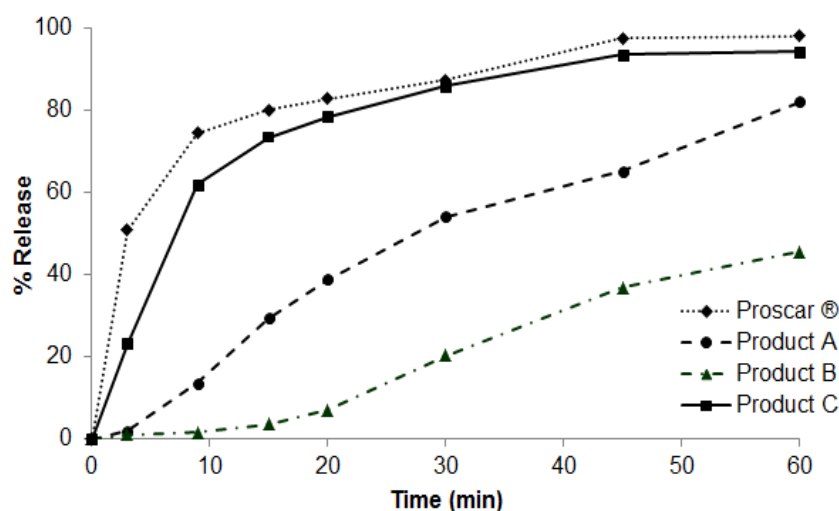


Figure 6. Dissolution profile of 5 mg capsules of FNS products codified as A, B and C and the reference drug (Proscar<sup>®</sup>) under optimal dissolution conditions.

**Table 6.** Difference and similarity factors between the reference product and similar products A, B and C.

Products	Difference factor ( $F_1$ )	Similarity factor ( $F_2$ )
Reference vs. A	50.08	-4.51
Reference vs. B	79.61	-13.67
Reference vs. C	10.56	23.18

According to the FDA [1], for slowly dissolving or poorly water-soluble drugs (BCS class 2), a two-point dissolution specification, one at 15 minutes to include a dissolution range (a dissolution window) and the other at a later point (30, 45, or 60 minutes) to ensure 85% dissolution, is recommended to characterize the quality of these products. Based on these specifications and on the results obtained in this work, illustrated in Figure 6, we established an acceptance criterion of 75% ( $Q = 70$ ) in 15 min and of 85% ( $Q = 80$ ) in 45 min. This acceptance criterion, therefore, is as discriminatory as the model independent approach using difference and similarity factors because in both approaches all products analyzed in this study showed different dissolution characteristics from the reference product. Because the reference product contains a

surfactant in its formulation, and all tests of clinical efficacy and safety were performed with this product, we propose that all compounded capsules should contain a surfactant to improve release, primarily because FNS is a drug in case 2 of the biopharmaceutical classification system (low solubility/high permeability drug), where drug dissolution may be the rate limiting step for drug absorption.

#### **4. CONCLUSION**

In this work, a dissolution test for FNS in capsules was optimized. The established dissolution conditions were 500 mL of water at  $37 \pm 0.5$  °C as the dissolution medium (readily available, easily disposed of, environmentally friendly) and a basket stirrer as the apparatus at a stirring speed of 100 rpm. The validation results demonstrated that all the data met the acceptance criteria. An assessment of commercial pharmaceutical products shows that an acceptance criterion of 75% (Q = 70) in 15 min and of 85% (Q = 80) in 45 min can be considered satisfactory as a routine quality control test for FNS in capsules. A comparison with the three commercial products suggested the ability of the method to differentiate among the tested pharmaceutical formulations. Since there is no monograph for FNS in capsules, this study illustrates the importance of an official method for the dissolution test of FNS capsules. Because all capsule products were reproved in the proposed dissolution test, we point to the need for standardization of excipients, so that marketed capsules provide the same quality as the reference product, which was subjected to rigorous tests.

#### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the Center of Pharmaceutical Equivalence - Nucleus Quality Control for technical support.

## References

- [1] FDA. US Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, 1997.
- [2] L. C. Vaucher; C. S. Paim; A. D. Lange; E. E. S. Schapoval. Development and validation of a dissolution test for telithromycin in coated tablets, *Quím. Nova*, 32 (2009) 1329-1333.
- [3] L. J. Schmidt and D. J. Tindall, Steroid 5  $\alpha$ -reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer, *Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 125 (2011) 32-38.
- [4] E. K. Cha and S. F. Shariat, The Use of 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitors for the Prevention and Treatment of Prostate Cancer, *Eur. Urol.*, 59 (2011) 515-517.
- [5] J. K. Lucas, Finasteride in the Treatment of Hirsutism, *J Womens Health*, 4 (1995) 655 -661.
- [6] J. M. Mella, M. C. Perret, M. Manzotti, H. N. Catalano, G. Guyatt, Efficacy and Safety of Finasteride Therapy for Androgenetic Alopecia, *Arch. Dermatol.*, 146 (2010) 1141-1150.
- [7] A. S. Tully; J. Schwartzberger; J. Studdiford. Androgenic Alopecia, *J. Mens Health Gen.*, 7 (2010) 270-277.
- [8] M. Yamazaki, T. Miyakura, M. Uchiyama, A. Hobo, R. Irisawa, R. Tsuboi, Oral finasteride improved the quality of life of androgenetic alopecia. *J. Dermatol.*, 38 (2011) 773-777.
- [9] The British Pharmacopoeia vol. I, The Stationary Office Ltd, London, 2009.
- [10] K. Ilango, P. Valentina and S. Lakshmi K, Spectrophotometric method for the estimation of finasteride in tablets, *Indian J. Pharm. Sci.*, 64 (2002) 174-175.
- [11] K. Ilango, P. Valentina and S. Lakshmi K, Spectrophotometric determination of Finasteride in tablet formulation, *Indian drugs*, 40 (2003) 122-123.
- [12] S.T.Ulu, A new spectrophotometric method for the determination of finasteride in tablets, *Spectrochim. Acta A.*, 67 (2007) 778-783.
- [13] S. N. Meyyanathan, G. V. S. Ramasarma and B. Suresh, Analysis of finasteride in pharmaceutical preparations by high performance thin layer chromatography, *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, 14 (2001) 188-190.
- [14] D. Patel and N. Patel, Validated RP-HPLC and TLC methods for simultaneous estimation of tamsulosin hydrochloride and finasteride in combined dosage forms, *Acta Pharm.*, 60 (2010) 197-205.
- [15] J. A. Ryan, S. V. Compton, M. A. Brooks and D. A. C. Compton, Rapid verification of identity and content of drug formulations using mid-infrared spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9 (1991) 303-310.
- [16] S. M. Amer, Polarographic behavior and determination of finasteride, *IL FARMACO*, 58 (2003) 159-163.
- [17] A. Álvarez-Lueje, S. Brain-Isasi, L. J. Núñez-Vergara and J. A. Squella, Voltammetric reduction of finasteride at mercury electrode and its determination in tablets, *Talanta*, 75 (2008) 691-696.
- [18] S. Sağlıç and S. Tatar Ulu, Development and validation of a new gas flame ionization detector method for the determination of finasteride in tablets *Anal. Biochem.*, 352 (2006) 260-264.
- [19] G. Trapani, L. Dazzi, M. G. Pisu, A. Reho, E. Seu, G. Biggio, A rapid method for obtaining finasteride, a 5 $\alpha$ - reductase inhibitor, from commercial tablets, *Brain Res Protocol*, 9 (2002) 130-134.
- [20] A. A. Syed and M. K. Amshumali, LC determination of finasteride and its application to



- storage stability studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (2001) 1015-1019.
- [21] A. I. Segall, M. F. Vitale, V. L. Perez, M. L. Palacios and M. T. Pizzorno, A stability-indicating HPLC method to determine finasteride in a tablet formulation, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 25 (2002) 3167-3176.
- [22] H. Demir, A. Cucu and S. Sakarya, Determination of finasteride in the tablet form by liquid chromatography and its analytical method validation, *Anal. Chim. Acta*, 557 (2006) 252-255.
- [23] K. Basavaiah and B. C. Somashekar, Determination of Finasteride in Tablets by High Performance Liquid Chromatography, *E-J. Chem.* 4 (2007) 109-116.
- [24] S. Fekete, J. Fekete and K. Ganzler, Shell and small particles: Evaluation of new column technology, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49 (2009) 64-71.
- [25] S. Fekete, J. Fekete and K. Ganzler, Characterization of new types of stationary phases for fast liquid chromatographic applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 50 (2009) 703-709.
- [26] The United States Pharmacopoeia, 34 ed., United States Pharmacopoeial Convection, Rockville, MD, 2011.
- [27] International Conference on Harmonization (ICH); Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1), 2005.
- [28] E. M. Donato, L. A. Martins, P. E. Fröhlich, A. M. Bergold, Development and validation of dissolution test for lopinavir, a poorly water-soluble drug, in soft gel capsules, based on in vivo data, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47 (2008) 547-552.
- [29] W. J. Youden and E. H. Steiner, *Statistical Manual of the AOAC Association of Official Analytical Chemists* Arlington, TX, 1975.
- [30] J. Menegola, M. Steppe, E.E.S. Schapoval. Dissolution test for citalopram in tablets and comparison of in vitro dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 67 (2007) 524–530.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, H.M; MARQUES, H.M.C. Physicochemical characterization of finasteride: PEG 6000 and finasteride: Kollidon K25 solid dispersions, and finasteride:  $\beta$ - cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 70, p. 397-406, 2011.
- ÁLVAREZ-LUEJE, A. et.al. Voltammetric reduction of finasteride at mercury electrode and its determination in tablets. **Talanta**, v. 75, p. 691-696, 2008.
- AMARAL, M.P.H.; VILELA, M.A.P. Controle de qualidade na Farmácia de Manipulação. Juiz de Fora, MG: UFJF, 2002.
- AMER, S.M. Polarographic behavior and determination of finasteride. **IL FARMACO**, v. 58, p.159-163, 2003.
- ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224 – 2234, 2009.
- ASBAHR, A.C.C. Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HP $\beta$ CD and polymers: Preparation and characterization. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2718-2723, 2009.
- AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed.Rio de janeiro: Artmed, 2005.
- BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n.2, p.175-177, 2002.
- BASABAI AH, K. et al. Sensitive bromatometric assay methods for finasteride in pharmaceuticals. **Ecletica Química**, v. 31, n. 3, p. 31-38, 2006.
- BASABAI AH, K.; SOMASHEKAR, B. C. Determination of Finasteride in Tablets by High Performance Liquid Chromatography. **E- Journal of Chemistry**, v.4, n.1, p.109-116, 2007.

BOUABIDI, A. et.al. Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. **Journal of Chromatography A**, V.1217, p. 3180-3192, 2010.

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 jun. 2003a.

BRASIL. Resolução RE nº 901, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI)". **Diário Oficial da União**, Brasília, de 02 de jun. de 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO - RDC nº. 67, de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos para Uso Humano em Farmácias. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 de out. de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO - RDC Nº 87, DE 21 DE NOVEMBRO DE 2008. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos para Uso Humano em Farmácias. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 228, Seção 1, p. 58-59 de 24 de nov. de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO - RDC Nº 31, DE 11 DE AGOSTO DE 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 154, Seção 1, p. 36-38 de 12 de ago. de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/legislacao>. Acesso em 18 de out. 2011.

BRITO, N. M.; JUNIOR O. P. A; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **R. Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRITISH PHARMACOPEIA. 2009. London : The Stationery Office, v.1., p. 852-853, 2009.

BRUM, E. M. et.al. Enzyme-linked immunosorbent assays for doping control of 5 $\alpha$ - reductase inhibitors finasteride and dutasteride. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, 70-79, 2010.

CHA, E.K.; SHARIAT, S.F. The Use of 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitors for the Prevention and Treatment of Prostate Cancer. **European Urology**, v. 59, p. 515 – 517, 2011.

CHANDRAN, S.; SINGH, R.S.P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. **Pharmazie**, v. 62, p. 4-14, 2007.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA (CFF). Estatísticas: Estabelecimentos Farmacêuticos no Brasil. Disponível em < <http://www.cff.org.br/pagina.php?id=138&menu=16&titulo=Estabelecimentos+farmac%C3%AAuticos+no+Brasil>> Acesso em: 5 de ago. 2011.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modelling and comparison of dissolution profiles. **European Journal. Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

DEMIR, H; CUCU, A.; SAKARYA, S. Determination of finasteride in the tablet form by chromatography and its analytical method validation. **Analytica Chimica Acta**. Editora Elsevier, 2005.

DUSI et. al. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of nine corticosteroid residues in bovine liver samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 700, p. 49– 57, 2011.

EMAMI, J. In vitro-In vivo correlation: From theory to applications. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 169-189, 2006.

ÉPSHTEIN, N.A. Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 38, p. 212 -228, 2004.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **Council of Europe**, Strasbourg Cedex, France, 6 ed., v. 2, p. 1891, 2008.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. 524p.

FARMACOPEIA PORTUGUESA. Ministério da Saúde, Lisboa, Portugal, VII ed., p.118-120, 2002.

FDA. **Food and Drug Administration**. Finasteride Official Information, 2010. Disponível em <<http://www.drugs.com/pro/finasteride.html>>. Acesso em 28 jul. 2011.

FDA. US Food and Drug Administration, 2000. **Analytical procedures and methods validation**, 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 30 jun. 2011.

FDA. US Food and Drug Administration, 1997. **Guidance for Industry, Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms**. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2011.

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

\_\_\_\_\_. Shell and small particles; Evaluation of new column technology. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 64-71, 2009b.

FERREIRA, A.O. O Guia prático de Farmácia Magistral. Juiz de Fora. Ed. Pharmabooks, 3. ed, 2008.

FREUDENHEIM, M. Keeping the Pipeline Filled at Merck. **The New York Times**. Nova York, 16 fev. 1992. Disponível em: <<http://www.nytimes.com/1992/02/16/business/keeping-the-pipeline-filled-at-merck.html?src=pm>> Acesso em 20 out. 2011.

GEHRING, P.A.F. Establishment of dissolution test conditions for cinnarizine in pharmaceutical capsules using factorial design. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 455-461, 2011.

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.

GORMLEY, G.J. Finasteride: a clinical review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 49 (1995), p. 319-324.

GUARINO et al. Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination

of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1294–1299, 2011.

GRAY et al. The Science of USP 1 and 2 Dissolution: Present Challenges and Future Relevance. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 6, p. 1289-1302, 2009.

IAMMARINO et al. Optimization and Validation of a Confirmatory Method for Determination of Ten Sulfonamides in Feeds by LC and UV-Diode Array Detection. **Chromatographia**, v. 73 (Suppl 1): S75–S82, 2011.

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.

ILANGO, K.; VALENTINA, P.; LAKSHMI, K.S. Spectrophotometric method for the estimation of finasteride in tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.64, p.174-175, 2002.

\_\_\_\_\_. Spectrophotometric determination of Finasteride in tablet formulation. **Indian Drugs**, v.40, p.122-123, 2003.

INMETRO. Instituto Internacional de Metrologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ- CGCRE- 008 de fev. 2010 (revisão 3), 2010.

JANDRIĆ et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of tropane alkaloids and glycoalkaloids in crops. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 28, n. 9, p. 1205-1219, 2011.

JANTRATID, E. et al. Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of in vivo performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3-4, p.434-441, 2009.

JIMIDAR, M.ILIAS; HEYLEN, P.; SMET, M. Method validation. **HPLC Method Development for Pharmaceuticals**. Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, A Division of Janssen Pharmaceutica N.V., Turnhoutseweg 30, B- 2340 Beerse, Belgium, 2007.

KHAN, M.A.; DIB, J.; REDDY, I.K. Statistical optimization of ketoprofen-Eudragit® S100 coprecipitates to obtain controlled-release tablets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 22, n. 2, p. 135-141, 1996.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, p. 16.1- 16.4, 2008/2009.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, p. 18–28, 2005.

\_\_\_\_\_. The complexation efficiency. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 57, p. 545–552, 2007.

LUCAS, J. K. et al. Finasteride in the Treatment of Hirsutism. **Journal of womens´ health**, v. 4, n.6, p.655 -661, 1995.

LUTEROTTI, S.; KORDIĆ, T.V.; DODIG, S. Simultaneous determination of iron and copper in children´s sera by FAAS. **Acta Pharmaceutica**, v. 61, p. 93–102, 2011.

MALESUIK, M.D. et al. Development of dissolution teste and comparative study of tablets and compounded capsules cointaining amlodipine. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 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.

MARQUES, M. R. C, BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Rev. Analytica**, v.1, n. 1, p. 48-51, 2002.

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.

MELLA, J.M. et al. Efficacy and Safety of Finasteride Therapy for Androgenetic Alopecia. A systematic review. **Archives of Dermatology**, v.146, p.1141-1150, 2010.

MEYYANATHAN, S.N., RAMASARMA, G.V.S., SURESH, B. Analysis of finasteride in pharmaceutical preparations by high performance thin layer chromatography. **Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**, v. 14, n. 3, p.188-190, 2001.

NUNAN, E.A; GOMES, M.J.V.M.; REIS, A.M.M. Controle de qualidade de produtos farmacêuticos. In: GOMES, M.J.V.M. **Ciências Farmacêuticas: uma abordagem em farmácia hospitalar**. 1. ed. São Paulo, Atheneu Editora São Paulo, 2003, p. 251-271.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, São Paulo, p. 5,7, 43, 45, 48, 2010.

RATH, S. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

RAVICHANDRAN, V. et al. Validation of analytical methods – Strategies & importance. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 18-22, 2010.

REMÉDIO de baixo custo é alternativa para tratamento da calvície. **Diário de Pernambuco**. Pernambuco, 15 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.diariodepernambuco.com.br/nota.asp?materia=20110815200353>> . Acesso em: 25 out. 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

SAĞLIK, S., ULU, S.T. Development and validation of a new gas flame ionization detector method for the determination of finasteride in tablets. **Analytical Biochemistry** v. 352, p. 260–264, 2006.



SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2006/VDiretriz-HA.pdf>. Acesso em: 29 maio 2008.

SCHMIDT L. J.; TINDALL; D.J. Steroid 5  $\alpha$ -reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.125, p. 32-38, 2011.

SEGALL, A.I. et al. A stability-indicating HPLC method to determine finasteride in a tablet formulation. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 25, n. 20, p. 3167-3176, 2002.

SERRA, C.H.R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 79-88, 2007.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. In vitro models for the determination of drug absorption and a prediction of dissolution/absorption relationships. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, p.515-527, 2007.

SNYDER, P. J. Androgens. In: Goodman & Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12 ed., McGraw-Hill companies, 2011. cap. 41, p. 1195- 1207.

SYED, A.A; AMSHUMALI,M.K. LC determination of finasteride and its application to storage stability studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. v. 25, n. 5, p.1015-1019, 2001.

TAZANAVARAS et al. Optimization and validation of a dissolution test for seleginine hydrochloride tablets by a novel rapid HPLC assay using a monolithic stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.46, p. 670-675, 2008.

THE BRITISH PHARMACOPOEIA, vol. I, The Stationary Office Ltd, London, 2009.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. **Pharmaceutical methods**, v. 1, n. 1, p. 25-38, 2010.

TRAPANI, G. et.al. A rapid method for obtaining finasteride, a 5 $\alpha$ - reductase inhibitor, from commercial tablets. **Brain research protocols**, v. 9, p.130-134, 2002.

TULLY, A.S.; SCHWARTZENBERGER, J.; STUDDIFORD, J. Androgenic Alopecia. **Journal of men's health**, v.7, p.270-277, 2010.

ULU, S.T. A new spectrophotometric method for the determination of finasteride in tablets. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 67, p. 778–783, 2007.

UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 34. NF 29. The United States Pharmacopial Convention, Rockville, MD, 2011. v.3 p. 2167.

VOGT, F.G.; KORD, A.S. Development of Quality-By-Design Analytical Methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p.797-812, 2011

WÄTZIG, H. Validation of analytical methods using capillary electrophoresis. **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**, v. 9, p. 225-244, 2008.

WHITMIRE, M. L. et al. NonClinical dose formulation analysis method validation and sample analysis. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 12, p. 628-634, 2010.

YOUTEN, W.J., STEINER, E.H. Statistical Manual of the AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, TX, 1975.