



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE FARMÁCIA**

**LUCAS FERREIRA DE ALMEIDA**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ESPECTROFOMÉTRICO PARA ANÁLISE E  
COMPARAÇÃO DE PERFIS DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS DE ÁCIDO  
LIPÓICO**

**CAMPINA GRANDE  
2016**

LUCAS FERREIRA DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ESPECTROFOMÉTRICO PARA ANÁLISE E  
COMPARAÇÃO DE PERFIS DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS DE ÁCIDO  
LIPÓICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Estadual da Paraíba como  
requisito para obtenção do título de Bacharel  
em Farmácia.

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Oliveira da  
Silva Simões

Coorientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francinalva  
Dantas de Medeiros

**CAMPINA GRANDE  
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

A447d Almeida, Lucas Ferreira de.

Desenvolvimento de método espectrofotométrico para análise e comparação de perfis de dissolução de cápsulas de ácido lipóico [manuscrito] / Lucas Ferreira de Almeida. - 2016.

53 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Mônica Oliveira da Silva Simões, Departamento de Farmácia".

"Co-Orientação: Profa. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia".

1. Ácido lipóico. 2. Cápsulas. 3. Ensaio de dissolução. 4. Validação. I. Título.

21. ed. CDD 615.1


LUCAS FERREIRA DE ALMEIDA


DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA ANÁLISE E  
COMPARAÇÃO DE PERFIS DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS DE ÁCIDO LIPÓICO


Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Estadual da Paraíba como  
requisito para obtenção do título de Bacharel  
em Farmácia.

Aprovado em: 25/05/2016

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Oliveira da Silva Simões (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Dantas de Medeiros  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lidiane Pinto Correia  
Faculdade Maurício de Nassau (FMN)

“O resultado do que fazemos nos espera mais  
adiante.”

Allan Kardec

## RESUMO

O Ácido Lipóico (AL) trata-se de um antioxidante comercializado em farmácias magistrais na forma de cápsulas, formas farmacêuticas sólidas que geralmente apresentam problemas relacionados à biodisponibilidade. O ensaio de dissolução é um ensaio farmacopéico indispensável para o controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas. Porém, a Farmacopéia Brasileira não apresenta método analítico para quantificar o AL em cápsulas dissolvidas durante este ensaio, enquanto que a Farmacopéia Americana apresenta como único método a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Considerando a ausência de metodologia no compêndio oficial brasileiro para quantificação do AL em cápsulas, o objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria de UV/Vis para sua quantificação. A validação do método foi realizada com base nos critérios estabelecidos pela Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o *Official Methods of Analysis of AOAC International* (AOAC INTERNATIONAL, 1995) e a *International Conference on Harmonization* (ICH, 1995), através da determinação dos parâmetros de linearidade, especificidade/seletividade, precisão, exatidão e robustez por espectrofotometria UV/Vis. Além disso, um estudo de dissolução foi realizado comparando cápsulas de AL desenvolvidas a partir de estudo de pré-formulação realizado por este grupo de pesquisa e cápsulas de AL obtidas no mercado, aplicando-se o método de quantificação anteriormente validado. Como resultado, a metodologia para quantificação das amostras de dissolução por espectrofotometria UV/Vis se enquadrou em todos os parâmetros de validação estabelecidos, demonstrando-se linear, específica/seletiva, precisa, exata e robusta. Quanto à comparação dos perfis de dissolução, as cápsulas de AL provenientes da formulação desenvolvida por este grupo de pesquisa (DP) demonstraram melhor desempenho frente às cápsulas de AL industrializadas e as de farmácias de manipulação. As cápsulas de melhor desempenho (DP, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e M<sub>5</sub>) apresentaram percentual de teor dissolvido acima de 70%, estando de acordo com os compêndios oficiais. Em contrapartida, as amostras I, M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub> não atenderam às exigências. Conclui-se, portanto, que a metodologia analítica desenvolvida é segura e eficaz para o objetivo pretendido e que a formulação desenvolvida contendo AL obteve dissolução considerável do ingrediente farmacêutico ativo.

Palavras-chave: Ácido Lipóico. Cápsulas. Ensaio de Dissolução. Validação

## ABSTRACT

The Lipoic Acid (LA) is an antioxidant sold in pharmacies at capsules form, solid pharmaceutical form that usually presents bioavailability problems. The dissolution is an indispensable pharmacopoeic test for the quality control of solid pharmaceutical forms. However, the Brazilian Pharmacopeia does not present analytical method to quantify the AL capsule dissolved during this test, while the United States Pharmacopeia presents as the only method the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Considering the absence of methodology in the Brazilian official compendium to quantify the AL in capsules, the objective of this work was the development of an analytical method by UV/Vis for its quantification. The method validation was based on criteria established from Resolution N°. 899 of 29 May 2003 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA), from the Official Methods of Analysis of AOAC International (AOAC INTERNATIONAL, 1995) and from the International Conference on Harmonization (ICH 1995) by determining parameters of linearity, specificity / selectivity, precision, accuracy and robustness by UV/Vis. In addition, a dissolution study was conducted comparing AL capsules developed from preformulation study performed by this research group, and AL capsules obtained on the market, by applying the previously validated method of quantitation. As a result, the methodology for quantification of the dissolution samples by spectrophotometry UV/Vis was framed on all established validation parameters, demonstrating itself linear, specific/selective, precise, accurate and robust. About comparison of the dissolution profiles, the AL capsules from formulation developed by this research group (DP) showed better performance against industrialized AL capsules and those from drugstores. The capsules that presented better performance (SD, M1, M2 and M5) exhibited content of dissolved percentage above 70%, being in accordance with the official compendia. In contrast, samples I, M3 and M4 did not meet the requirements. It follows therefore that the developed analytical method is safe and effective for the intended purpose and that the developed formulation containing LA has obtained considerable dissolution of the active pharmaceutical ingredient.

Keywords: Lipoic Acid. Capsules. Dissolution Test. Validation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Estrutura química do AL e da sua forma reduzida.....	14
FIGURA 2 - Atuações do AL segundo a literatura. ....	16
FIGURA 3 - Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro.....	22
FIGURA 4 - Espectro de absorção do AL na região UV. ....	34
FIGURA 5 - Espectro de absorção do AL e dos excipientes na região UV.....	35
FIGURA 6 - Curva analítica do AL nas concentrações de 30, 75, 150, 300, 450, 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtida por espectrofotômetro UV/Vis. ....	37
FIGURA 7 - Perfis de dissolução a partir das cápsulas de AL (300 mg) por espectrofotometria UV/Vis.....	41
FIGURA 8 - Cápsula M <sub>4</sub> não dissolvida ao término do teste de dissolução. ....	44



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Faixas de comprimento de onda utilizados na espectrofotometria.....	21
TABELA 2 - Componentes utilizados na formulação de AL em cápsulas .....	27
TABELA 3 - Descrição das cápsulas de AL 300 mg adquiridas para realização dos perfis de dissolução. ....	27
TABELA 4 - Especificações para o método de dissolução do AL. ....	32
TABELA 5 - Ordem/modelos de cinética de dissolução usados na avaliação do perfil de dissolução de cápsulas de AL. ....	33
TABELA 6 - Valores de absorbância obtidos na construção da curva analítica de AL.....	36
TABELA 7 - Valores da exatidão em três níveis de concentração de AL. ....	37
TABELA 8 - Valores obtidos do ensaio de precisão intra-dia em soluções de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AL. ....	38
TABELA 9 - Valores obtidos no ensaio de precisão inter-dia em soluções de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AL. ....	39
TABELA 10 - Valores estatísticos do teste Anova do ensaio de precisão intra-dia e inter-dia. ....	39
TABELA 11 - Limites de detecção e quantificação, em três níveis de confiança, para o método desenvolvido. ....	40
TABELA 12 - Valores de absorbâncias e estatísticos do teste Anova para robustez. ....	40
TABELA 13 - Coeficiente de Correlação de Pearson (r), aplicando cinética de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell nos perfis de dissolução por espectrofotometria UV/Vis.....	42
TABELA 14 - Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo cinético selecionado. ....	43
TABELA 15 - Eficiência de Dissolução (ED%) das cápsulas de AL (300 mg). ....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Ácido Lipóico
ANOVA	Análise de Variância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DHLA	Àcido dihidrolipóico
DPR	Desvio Padrão Relativo
ERO's	Espécies Reativas do Oxigênio
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
ED%	Eficiência de Dissolução

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 ÁCIDO LIPÓICO.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 DISSOLUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 PERFIL DE DISSOLUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV/VIS.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 VALIDAÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO E EXCIPIENTES.....	26
4.2 EQUIPAMENTOS.....	26
4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	26
4.4 ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS.....	28
4.4.1 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE.....	28
4.4.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	28
4.4.2.1 VALIDAÇÃO.....	29
4.4.2.1.1 LINEARIDADE.....	29
4.4.2.1.2 PRECISÃO.....	29
4.4.2.1.2.1 PRECISÃO INTRA-DIA (REPETIBILIDADE) .....	30
4.4.2.1.2.2 PRECISÃO INTRA-DIA (PRECISÃO INTERMEDIÁRIA) .....	30
4.4.2.1.3 EXATIDÃO.....	30
4.4.2.1.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ) .....	31
4.4.2.1.5 ESPECIFICIDADE .....	31
4.4.2.1.6 ROBUSTEZ.....	31
4.5 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO.....	31
4.5.1 ANÁLISE DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO.....	32
4.5.1.1 EFICIÊNCIA DE DISSOLUÇÃO.....	32
4.5.1.2 CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO.....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>

5.1 ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS.....	34
5.1.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO.....	35
5.1.1.1 ESPECIFICIDADE.....	35
5.1.1.2 LINEARIDADE.....	36
5.1.1.3 EXATIDÃO .....	37
5.1.1.4 PRECISÃO.....	38
5.1.1.5 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ) .....	40
5.1.1.6 ROBUSTEZ.....	40
5.2 PERFIS DE DISSOLUÇÃO.....	41
5.3 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO.....	42
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Ácido Lipóico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico), também conhecido como ácido tióctico, é um importante antioxidante que apresenta a propriedade de combater radicais livres gerados em eventos inflamatórios, metabólicos e endoteliais. Exerce sua ação tanto em meio lipídico quanto aquoso, o que o diferencia dos demais antioxidantes. É produzido por animais e humanos, contudo, a rota enzimática de sua síntese ainda não foi elucidada (PORTELA et al, 2014).

Em condições de estresse oxidativo, a dieta não fornece quantidade suficiente de AL para uma ação antioxidante considerável. Uma vez administrado na forma de suplementação, o AL tem sua potência funcional aumentada, visto que alcança níveis séricos considerados terapêuticos (4-8 µg/ml). Para isto, recomenda-se a administração de 600 a 1.200 mg/dia de AL por via oral (BORBA, 2014). No Brasil apresenta-se veiculado a cápsulas gelatinosas duras produzidas apenas em farmácias magistrais.

Ultimamente, as farmácias de manipulação surgem como uma alternativa para a obtenção de medicamentos. Consideram-se como equivalentes os medicamentos entre os quais há comprovação de que sob mesma apresentação farmacêutica, ambos contenham o mesmo fármaco na mesma dosagem. Em outra perspectiva, formas farmacêuticas sólidas tendem a apresentar maiores problemas em relação à biodisponibilidade. Por estes motivos, a realização de testes *in vitro*, como dissolução e quantificação do fármaco, se faz necessária no intuito de avaliar parâmetros de qualidade a partir da forma farmacêutica (NUNES et al, 2009).

A Farmacopéia Brasileira (2010) não fornece monografia inerente à determinação da percentagem de cedência no ensaio de dissolução para cápsulas de AL (BRASIL, 2010a). Qualquer método desenvolvido que não esteja especificado em farmacopéia ou formulários oficiais deve ser validado (GOMES et al, 2012).

O teor dissolvido de um fármaco é um aspecto imprescindível da garantia da qualidade de medicamentos. A USP 32 (2012) preconiza o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como técnica oficial na determinação do teor da dissolução do AL em cápsulas. Entretanto, trata-se de uma técnica que requer muito tempo de execução e exige grande quantidade de reagentes e materiais. Como alternativa, a espectrofotometria UV/Vis pode ser empregada, considerando-se os menores custos envolvidos e rápida execução da técnica (MALDANER; JARDIM, 2009; USP 32, 2012).

O ensaio de dissolução compreende um teste físico que caracteriza a passagem do fármaco para a forma solúvel a partir da forma farmacêutica intacta ou de seus fragmentos. Diante disto, um perfil de dissolução pode ser construído relacionando o percentual de fármaco dissolvido em função do tempo. Além da obtenção de parâmetros cinéticos indispensáveis para determinar a velocidade e eficiência do processo, o ensaio permite avaliar o tempo necessário para que determinadas porcentagens do fármaco se dissolvam (CHORILLI *et al.*, 2010; FIGER; RICCI-JÚNIOR, 2012).

Portanto, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar método de doseamento do AL em meio de dissolução por espectrofotometria UV/VIS, bem como realizar um estudo comparativo dos perfis de dissolução de cápsulas de AL aplicando o método analítico previamente validado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação do AL em cápsulas no estudo de dissolução.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar método espectrofotométrico UV/Vis para análise quantitativa do teor dissolvido do AL em cápsulas;
- Realizar estudo de dissolução para cápsulas de AL desenvolvidas e aquelas obtidas comercialmente;
- Realizar um estudo estatístico e comparativo dos perfis de dissolução das cápsulas de AL;
- Efetuar um estudo de cinética e eficiência de dissolução das cápsulas de AL.

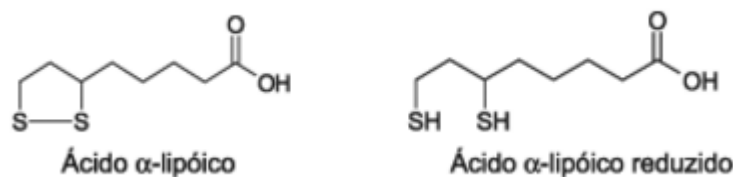
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 ÁCIDO LIPÓICO

Denominado de ácido lipóico, ácido alfa lipóico, ácido tióctico ou 1,2-ditiolano-3-pentanóico, foi isolado pela primeira vez a partir de fígado bovino em 1951 por L. Reed. As primeiras pesquisas acerca da atividade antioxidante do AL foram guiadas por Lester Packer, em 1991 na Universidade da Califórnia (PACKER; KRAEMER; RIMBACH, 2001; SHAY, et al., 2009; MORAES, J.D.D., 2011).

O AL é derivado do ácido octanóico e corresponde a um ácido graxo de cadeia linear, de oito carbonos, contendo um grupamento carboxila em uma extremidade, e em outra, um anel ditiolano com uma ponte dissulfeto, o que o classifica como um organossulfurado (Figura 1) (MANTA; BATISTAVIEIRA; CARLSSON, 2009; BILLGREN, et al., 2010). A presença de um átomo de carbono assimétrico na molécula implica atividade óptica e reflete a existência de dois enantiômeros: R-(+)-ácido lipóico e S-(+)-ácido lipóico. Dentre os quais, somente a forma R-(+)-ácido lipóico apresenta atividade biológica significativa, apesar de ser comercializada a mistura racêmica R/S-ácido lipóico (CARLSON et al., 2007).

FIGURA 1- Estrutura química do AL e sua forma reduzida.



Fonte: SCOTTI et.al., 2007.

O AL é sintetizado endogenamente pelas mitocôndrias e liga-se a complexos de alfa-cetodesidrogenase presentes nesta organela, agindo como cofator enzimático. Sua forma reduzida, o ácido dihidrolipóico (DHHLA), exerce atividade antioxidante ainda mais acentuada (SANTOS et al., 2010; MORAES, 2011). Uma pequena quantidade de AL é produzida no organismo humano, entretanto, com capacidade de reagir com ERO's (espécies reativas do oxigênio) tais como radicais superóxido, radicais hidroxila, ácido hipocloroso, radicais



peroxila, oxigênio singleto. Além do mais, apresenta a propriedade de regenerar outros antioxidantes como ácido ascórbico, vitamina E e glutathione (WOLLIN & JONES 2003).

É uma molécula sintetizada no fígado e nos rins da maioria das espécies animais, podendo ser encontrada também em vegetais. É obtida exogenamente através da carne vermelha, germe de trigo e levedo de cerveja (MORIKAWA et al. 2001; TEICHERT et al., 2005). A atividade antioxidante do AL é atribuída à presença do anel ditiolano que atua diretamente nos radicais oxidantes. O anel ditiolano confere também a coloração amarelada do pó, bem como absorvância máxima a 333 nm no espectro (PEREZ & CASTANEDA, 2006; PACKER; CADENAS, 2010; BILLGREN, et al., 2010).

Em circunstâncias do aumento do estresse oxidativo, a dieta não fornece quantidades suficientes de AL para que desempenhe atividade antioxidante satisfatória. A suplementação de 600 a 1.200 mg/dia de AL por via oral permite alcançar, no intervalo de 3 a 5 dias, níveis séricos considerados terapêuticos ( $4-8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (MORIKAWA et al., 2001; GONZÁLEZ; MOY; GUZAMÁN et al., 2008).

Devido seu comportamento anfipático, o AL é facilmente absorvido e transportado por meio das membranas celulares. Grande parte da dose administrada por via oral, cerca de 93%, é absorvida pelo intestino, entretanto, apenas 20 a 30% escapa da metabolização hepática. Uma vez no interior da célula, o AL é reduzido a DHLA, forma qual é carregada para o espaço intersticial onde desempenha seu efeito protetor. É excretado predominantemente pela urina na forma de 4,6-bismetilmercapto-hexanóico, correspondente ao metabólito majoritário (CREMER et al., 2006; GONZÁLEZ; MOY; GUZAMÁN et al., 2008).

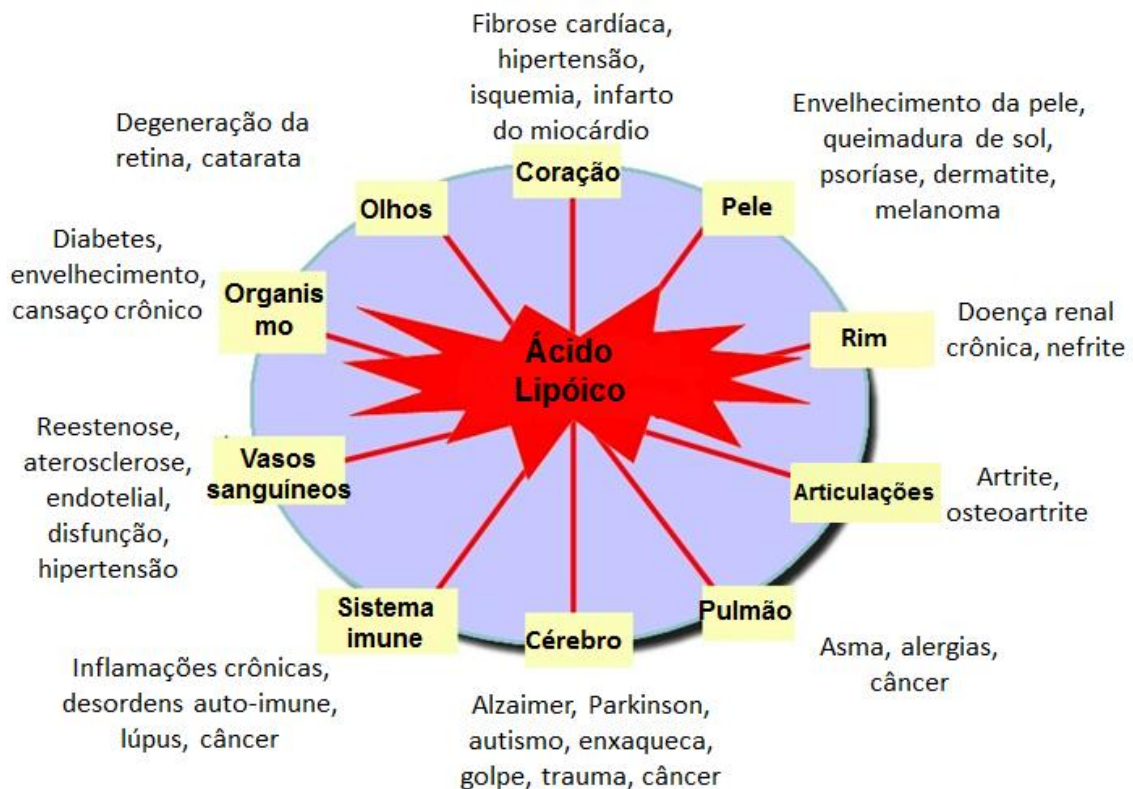
Em relação a outros antioxidantes, o AL se destaca com algumas particularidades: apresenta muito baixo potencial *redox*, sendo por esse motivo capaz de reciclar outros antioxidantes; ampla distribuição pela mitocôndria; regeneração proporcional ao aumento glicêmico e por influencia dos ácidos graxos plasmáticos não esterificados, o que aponta uma relação entre o grau de aumento do fluxo metabólico e a atividade antioxidante (SENA; NUNES; LOURO, 2007).

As principais comprovações terapêuticas do AL, verificadas através de testes clínicos em humanos, revelam seu efeito sistêmico ao provar sua capacidade na diminuição dos níveis glicêmicos e colesterolêmicos; na melhoria da vasodilatação endotelial em pacientes com diabetes melítus tipo 2, reduzindo o risco vascular; e efeito tópico ao diminuir linhas faciais, melhorando a cor e textura da pele (HEINISCH et al., 2010; ANSAR et al., 2011; PORASUPHATANA et al., 2012; ZHAO; HU, 2014; SHERIF; BENDAS; BADAWY, 2014).

A ação hipoglicemiante do AL se dá por sua ação em aumentar a sensibilidade dos músculos e adipócitos à insulina, resultando no aumento da absorção de glicose nesses tecidos. O efeito no antienvhecimento cutâneo pode ser explicado por sua capacidade em induzir o aumento da produção de colágeno por saturação de fibroblastos (Al-ATTAR, 2010; SHERIF; BENDAS; BADAWY, 2014).

De acordo com Ansar et al. (2011), ao tratar pacientes acometidos com diabetes tipo 2, durante 4 semanas, com AL em diferentes doses resultou em um aumento da sensibilidade à insulina em 15% com 600 mg, 14% com 1200 mg e 22% com 1800 mg. A Figura 2 esquematiza algumas outras atuações do AL apresentadas na literatura.

FIGURA 2 - Atuações do AL segundo a literatura.



Fonte: Adaptado de [www.drbyma.com](http://www.drbyma.com), 2014.

Segundo Koufaki (2014), o AL se degrada na presença de luz e em temperaturas acima de 40 °C, ocorrendo uma mudança física no composto e no seu comportamento frente ao espectro de absorção. Se funde a 62 °C e, além disso, é capaz de se polimerizar através da abertura do anel ditiolano seguido da formação de ligações dissulfureto intermoleculares.

Essas características dificultam a utilização do AL, pois influenciam negativamente em sua estabilidade físico-química.

Conseqüentemente, grupos de pesquisa concentram-se em melhorar a estabilidade do AL, tendo como objetivo sua veiculação em novas formas farmacêuticas como emulsões múltiplas, micelas, lipossomas, micropartículas, nanopartículas e partículas poliméricas (MITRI et.al., 2011; MENDOZA et.al., 2012).

O controle de qualidade consiste em uma ferramenta indispensável, pois através dele pode-se garantir um medicamento seguro e eficaz (BARBOZA; 2010). A realização de estudos de dissolução é imprescindível durante as etapas de desenvolvimento de formulações, na constatação de variáveis críticas, no processo de produção e controle de qualidade de medicamentos, além de estabelecer as correlações *in vivo/in vitro* (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

### 3.2 DISSOLUÇÃO

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010) o teste de dissolução determina a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução a partir da forma farmacêutica, quando submetida à aparelhagem específica. Representa um aspecto de avaliação de formas farmacêuticas sólidas, consistindo em uma etapa vital para prever o desempenho *in vivo* de fármacos, pois indica, *in vitro*, o comportamento de liberação e solubilização da substância ativa. Estes dados são importantes para auxiliar na determinação da absorção do fármaco em testes de biodisponibilidade (OLIVEIRA et.al, 2009; MARTIS; PAIM; STEPPE, 2010; LU et.al., 2011; MARQUES-MARINHO, 2012; KASSAYE; GENETE, 2013; SANTOS et.al.; 2013).

O teste de dissolução mostra-se rápido, viável, simples e acessível. É comumente realizado para constatar a qualidade lote a lote de um medicamento, guiar o desenvolvimento de novas formulações, certificar-se da qualidade do produto acabado, tal como seu desempenho depois de modificações na formulação, no processo de fabrico, mudança no local de fabrico ou aumento da escala de fabricação (LEE; RAW; YU, 2008; USP 32, 2012; DIAS et.al., 2011).

A dissolução deve ser discriminativa, ou seja, ter capacidade de constatar alterações na formulação que podem estar presentes desde o fabrico às características físico-químicas do fármaco (polimorfismo, higroscopicidade, tamanho de partícula), as quais podem interferir na

solubilidade e, conseqüentemente, na ação do produto no organismo (PHARM. FORUM, 2004).

O ensaio de dissolução pode ser alterado por inúmeros fatores que interferem nos resultados. Todos são pertinentes, mas alguns devem ser minuciosamente inspecionados para obtenção de resultados acreditados (MARCOLONGO, 2003).

- Fármaco e Formulação

As velocidades de dissolução e liberação da substância ativa podem ser afetadas por diversos fatores, dentre os quais se destacam as propriedades físico-químicas do fármaco (solubilidade, dimensão das partículas e o estado de cristalinização), assim como os componentes da formulação (FARINHA; PAIS; BICA, 1997).

Conforme os aspectos de solubilidade dos fármacos, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica os distribui em quatro classes: classe I com alta solubilidade e permeabilidade; classe II com baixa solubilidade e alta permeabilidade; classe III com alta solubilidade e baixa permeabilidade e classe IV com baixa solubilidade e permeabilidade. Deste modo, se torna possível pressupor o comportamento do ativo e, com isto, atribuir as melhores condições para inseri-lo em uma forma farmacêutica de maneira tal a melhorar sua biodisponibilidade (MARCOLONGO, 2003).

O tamanho da partícula influencia diretamente sobre a velocidade de dissolução, posto que partículas de tamanhos reduzidos dispersam-se mais rapidamente nos solventes. Em contrapartida, uma redução demasiada do tamanho das partículas do fármaco pode acarretar formação de agregados que afetam na dissolução (VILA JATO, 2001). Acerca da cristalinidade, geralmente as formas amorfas e anidras são mais solúveis que as cristalinas e hidratadas do mesmo fármaco, respectivamente (GIBALDI, 1991).

A formulação bem como o processo de obtenção do medicamento pode alterar a liberação de fármacos, promovendo problemas de biodisponibilidade. Cada um dos excipientes que compõem a formulação exerce, de forma direta ou não, alguma influência no processo de dissolução, seja negativa ou positiva (MARCOLONGO, 2003). Como exemplo, o estearato de magnésio pode ser citado como um lubrificante insolúvel capaz de retardar a dissolução de modo proporcional a sua concentração. Por outro lado, altas concentrações de amido, um diluente/desintegrante, favorece a dissolução (ABDOU, 1989).

- Meio de dissolução

Os fatores mais relevantes ligados ao meio de dissolução referem-se ao volume, desgaseificação, pH e temperatura. Os meios de dissolução mais utilizados são solução HCL entre 0,01 e 0,05 N, soluções tampão fosfato ou acetato de pH entre 1,2 e 6,8 e, por último, a água. A utilização da água como meio de dissolução se explica por sua ação não corrosiva no equipamento e por apresentar resultados satisfatoriamente comparáveis àqueles obtidos em meio ácido (ABDOU, 1989). O volume do meio a ser utilizado deve seguir à condição sink de 5 a 10 vezes o necessário para saturação (MARQUES; BROWN, 2002).

A desgaseificação do meio favorece o ensaio de modo a evitar a formação de bolhas que venham a interferir na velocidade de dissolução (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O valor de pH do meio deve ser estabelecido tendo base, especialmente, em que tipo de liberação o fármaco se enquadra (liberação imediata ou liberação controlada) e o sitio de melhor absorção que o fármaco apresenta *in vivo* (STORPIRTIS, 1999). É permitida uma variação de pH de  $\pm 0,05$  em relação ao valor estabelecido. Quanto à temperatura, o meio deve ser controlado em razão de não haver grandes variações, uma vez que temperaturas elevadas favorecem a solubilidade do fármaco e, em consequência, à dissolução (MARCOLONGO, 2003).

- Aparato e Rotação

O aparato é selecionado dependendo do tipo de forma farmacêutica sólida a ser testada. Geralmente, emprega-se o aparato pá para avaliar dissolução de comprimidos e a cesta para cápsulas. Este último é comumente usado utilizado para formas não desintegrantes, empregando-se velocidade de agitação entre 50 a 150 rpm (USP 32, 2012). A aplicação destes aparatos é baseada em ampla experimentação que a denomina como simples, robusta e padronizada, sendo utilizada mundialmente. Motivo pelo qual é indicada como primeira escolha nos testes de dissolução *in vitro*, pelos compêndios oficiais (MOLLER; SIEWERT; 1995; FARINHA et al., 1997).

A velocidade de rotação deve possibilitar a liberação apropriada do fármaco, de modo a não acelerar ou atrasar o processo de dissolução. Desta forma, considera-se uma oscilação entre 4 a 5% na velocidade de agitação estabelecida para o ensaio (MARQUES; BROWN, 2002; USP 32, 2012).

De acordo com o especificado na monografia do AL, o ensaio deve-se proceder em volume variante entre 500 a 900 mL de meio, preservando à temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , utilizando uma haste de aço rotatória com extremidade regulável (cesta ou pá) para proporcionar agitação do meio a uma velocidade estabelecida (USP 32, 2012).

### 3.3 PERFIL DE DISSOLUÇÃO

Avalia-se a cinética e eficiência de dissolução de um produto através de três categorias possíveis de ensaios de dissolução: ensaio de dissolução com um único ponto de coleta; ensaio de dissolução com dois pontos de amostragem e perfil de dissolução ( $\geq 5$  pontos de amostragem). O perfil de dissolução propicia avaliar mais detalhadamente como a dissolução ocorre em função do tempo, o que a torna mais discriminativa em comparação aos outros tipos de dissolução (PHARM. FORUM, 2004; CHORILLI et. al., 2010).

Os métodos empregados na comparação dos perfis de dissolução são classificados em: análise de variância (ANOVA); método modelo dependente; método modelo independente e modelo dependente (SERRA; STORPIRTIS, 2007). Os métodos apoiados em ANOVA estimam o grau de variância entre os perfis, certificando se há ou não diferença estatisticamente expressiva. Por sua vez, o modelo independente analisa os fatores de diferença ( $f1$ ) e de similaridade ( $f2$ ) da porcentagem de fármaco dissolvido comparada entre um produto teste e um de referência. De outro modo, o modelo dependente aborda modelos matemáticos aplicados à comparação de perfis. Geralmente, os modelos mais empregados são o de cinética de ordem zero e de primeira ordem, Hixson-Crowell, Higushi, quadrático, Weibull, Gompertz, Baker-lonsdale e Korsmeyer-Peppas (POLLI; REKHI; SHAH, 1996).

### 3.4 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV/VIS

As técnicas espectrofotométricas baseiam-se na absorção molecular da energia eletromagnética. Tal processo é influenciado pela concentração e estrutura das moléculas. A espectrofotometria de absorção pode ser classificada, de acordo com o comprimento de onda eletromagnético aplicado, em ultravioleta, visível e infravermelho, as quais são utilizadas como técnicas de identificação e quantificação de substâncias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

TABELA 1 - Faixas de comprimento de onda utilizados na espectrofotometria.

<b>Espectrofotometria</b>	<b>Faixa de comprimento de onda</b>
Ultravioleta (UV)	190 – 380 nm
Visível (VIS)	380 – 780 nm
Infravermelho próximo (NIR)	780 – 2500 nm
Infravermelho médio (MIR)	4 – 25 $\mu\text{m}$
Infravermelho distante	25 – 300 $\mu\text{m}$

Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

É uma das técnicas mais utilizadas na rotina laboratorial, tendo em vista o baixo custo e o grande número de aplicações empregadas, comparada a outros tipos de técnicas. Fundamentalmente, obedece a lei de Lambert-Beer em que a luz incide, sob determinado comprimento de onda, através de uma solução da amostra, pela qual será absorvida. Esta lei relaciona a luz na forma de absorbância (A) ou transmitância (T) com a concentração da amostra e a espessura do caminho óptico, representado pela espessura da cubeta, mostrado na equação (ROCHA; TEIXEIRA, 2004; SKOOG; HOLLE; NIEMAN, 2006).

$$A = \epsilon cL$$

Onde:

A: absorbância;

$\epsilon$ : absortividade molar ( $\text{M}^{-1} \text{L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), próprio de cada substância a ser analisada;

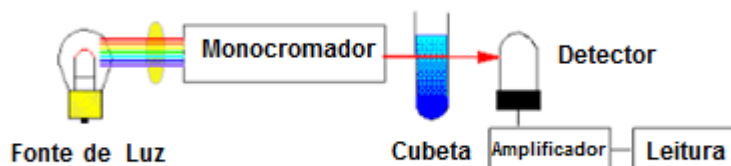
c: concentração (M);

L: caminho óptico, espessura da cubeta (cm), geralmente 1 cm.

A espectroscopia UV-Vis baseia-se em transições eletrônicas causadas por radiação luminosa na região ultravioleta e no visível (HARRIS, 2006). A energia aplicada excita os elétrons presentes na amostra, ocorrendo a emissão de luz por meio de transições eletrônicas. Geralmente, os instrumentos espectroscópicos UV-Vis são compostos por cinco partes fundamentais: (1) fonte de luz; (2) monocromador responsável por selecionar o comprimento de onda desejado; (3) cubeta para acondicionar a amostra; (4) detector que converte a energia

radiante transmitida em um sinal elétrico mensurável; (5) unidade para decodificação do sinal elétrico (Figura 3).

FIGURA 3 - Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro



Fonte: adaptado de

[https://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=espectrofotometria%20ultravioleta&lang=3](https://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=espectrofotometria%20ultravioleta&lang=3)

O espectro de absorção pode sofrer influência de variáveis tais como o tipo de solvente, a temperatura, o pH da solução, a concentração e a natureza dos constituintes da amostra. A técnica se limita à análise de amostra contendo um único componente, a maioria dos métodos espectrofotométricos UV-vis se dispõem desta forma uma vez que apresentam maior segurança, o contrário se aplica a sistemas multicomponentes (SKOOG; HOLLE; NIEMAN, 2006).

A confiabilidade dos resultados do controle de qualidade de medicamentos é assegurada através da validação dos métodos analíticos (BARBOZA; 2010).

### 3.5 VALIDAÇÃO

Validar significa demonstrar que a metodologia em estudo é adequada para a finalidade desejada e capaz de reproduzir resultados confiáveis em análises qualitativas, semi-quantitativas e quantitativas de fármacos e substâncias. As instruções necessárias para proceder a uma validação estão estabelecidas em farmacopeias, resoluções e guias e podem ser aplicadas a técnicas analíticas, métodos não-cromatográficos, testes imunológicos ou microbiológicos (BRASIL, 2003; RIBANI et.al., 2004).

É necessário realizar a validação: em casos de modificação no processo de fabricação; quando o produto final apresentar qualidade duvidosa; na implantação de um processo ou método analítico novo; e em equipamentos novos (EMANUELLI; SCANDIUZZI, 2000; INMETRO, 2010).



Os tipos de validação são classificados em quatro categorias (I, II, III, IV) que variam de acordo com a sua finalidade. A categoria I se limita a testes quantitativos empregados na determinação do componente majoritário, a categoria II envolve análises de elementos menores e traços, a categoria III abrange testes de performance (dissolução, taxa de liberação) e, por fim, a categoria IV engloba os testes de identificação (INMETRO, 2010).

Durante a validação são avaliados parâmetros que variam com a necessidade de cada categoria (BRASIL, 2003; ICH, 2005; MATIOLI; VALENTINI; SOMMER, 2007; INMETRO, 2010).

- Especificidade

Avalia a capacidade do método em medir, de forma inequívoca, o analito de interesse em presença de interferentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Quando não se conhecem os interferentes, a especificidade pode ser analisada comparando os resultados com outros métodos independentes.

- Linearidade

A linearidade de um método expressa sua habilidade em produzir um sinal analítico, denominado variável dependente  $y$ , diretamente proporcional à sua concentração, denominada variável independente  $x$ . O modelo matemático que representa essa relação é conhecido como curva analítica ou curva de calibração (Ribeiro et.al., 2008).

Deve ser determinada pela análise de, no mínimo, 5 pontos de uma faixa de concentração predeterminada teoricamente. Uma expressão matemática é usada para calcular a concentração real do analito na amostra a partir do sinal analítico. A concentração calculada de cada ponto deve obedecer a uma variação de 80% a 120 % da concentração teórica. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + bx$$

Onde:

$y$  = sinal analítico (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

$x$  = concentração;

$a$  = interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ ;

$b$  = inclinação da curva analítica.

- Precisão/ Repetibilidade

A precisão analisa a proximidade dos resultados obtidos após uma série de medidas de uma mesma amostra. Geralmente, é expressa pela precisão intra-dia (repetitividade) e a precisão inter-dia (precisão intermediária). A precisão intra-dia avalia a concordância entre os resultados obtidos em um curto espaço de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão inter-dia, por sua vez, busca investigar a proximidade dos resultados adquiridos no mesmo laboratório, porém, com analistas diferentes e dias distintos. O desvio-padrão e o desvio padrão relativo são calculados para interpretar este parâmetro.

- Exatidão

A exatidão se expressa quando um método analítico apresenta os resultados em concordância com valores tomados como verdadeiros. Este parâmetro é estabelecido ao comparar os resultados obtidos com os do material considerado como referência ou com outro método validado, do qual o erro sistemático seja indicado como não significativo.

- Limite de Quantificação

Também conhecido como Limite de Determinação, refere-se a menor concentração estabelecida de um analito, em níveis aceitáveis de precisão e exatidão. Pode ser expresso em termos de concentração, cujo valor corresponde a média do branco somado a 5, 6 ou 10 desvios padrão. Outra forma de cálculo baseia-se em determinar o Limite de Detecção e Quantificação, utilizando o desvio padrão da resposta relacionado à inclinação da curva de calibração construída.

- Limite de Detecção

Corresponde a menor concentração do analito que pode ser detectada, porém, não obrigatoriamente quantificada. Este parâmetro é adequado para a abordagem de amostras na quais os níveis do analito sejam baixos, por exemplo, em análise de traços onde se faz necessário estimar o menor valor de concentração do analito capaz de ser detectado pelo método.

- Robustez

Este parâmetro traduz a capacidade do método em resistir a pequenas variações das condições analíticas, averiguando-se experimentalmente a influência de determinados fatores sobre o resultado do método analítico. Uma vez reconhecida a robustez de um método, o mesmo poderá ser empregado por outros laboratórios e estará hábil a fornecer resultados de segurança.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO E EXCIPIENTES

- Ácido Lipóico; Lote 15042088B; Grau de pureza a 99%;
- Amido de milho: Henrifarma<sup>®</sup>/JKI023;
- Celulose microcristalina 101: Galeno<sup>®</sup>/6610103419;
- Dióxido de silício coloidal: Henrifarma<sup>®</sup>/ 3150091614;
- Talco: Sintetica<sup>®</sup>/ 43405143.

### 4.2 EQUIPAMENTOS

Foi utilizado um Dissolutor Mod. 299 Nova Ética<sup>®</sup> para a dissolução das amostras e as análises foram lidas em Espectrofotômetro Shimadzu<sup>®</sup> UVmini – 1240.

### 4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Cápsulas de AL foram produzidas em uma farmácia de manipulação da cidade de João Pessoa – PB de acordo com estudo de compatibilidade fármaco-excipiente realizado por Silva (2014), do presente grupo de pesquisa. Os componentes utilizados na produção das cápsulas estão dispostos na Tabela 2.

TABELA 2 - Componentes utilizados na formulação de AL em cápsulas

<b>Componentes</b>	<b>Concentração % (p/p)</b>	<b>Função</b>
Acido lipóico	75,00	IFA
Amido de milho	18,25	Desintegrante
Celulose microcristalina 101	6,00	Diluente
Dióxido de silício coloidal	0,25	Deslizante
Talco	0,50	Lubrificante

Fonte: SILVA, 2014.

Foram adquiridas cápsulas de liberação imediata contendo 300 mg de AL provenientes de cinco farmácias de manipulação, conforme a Tabela 3, localizadas nas cidades de Campina Grande e João Pessoa no Estado da Paraíba. Também foram obtidas cápsulas de AL industrializadas comercializadas nos Estados Unidos, considerando que no Brasil o AL não é produzido em escala industrial. Não foram concedidas informações quantitativas e qualitativas dos excipientes que compunham a formulação das cápsulas de AL adquiridas no mercado.

TABELA 3 - Descrição das cápsulas de AL 300 mg adquiridas para realização dos perfis de dissolução.

<b>Produto/Cápsulas</b>	<b>Sigla</b>	<b>Data de Fabricação</b>	<b>Data de Validade</b>
Desenvolvidas na Pesquisa	DP	18-04-2015	15-10-2105
Industrializadas	I	15-07-2015	28-02-2018
Magistral 1	M1	11-09-2015	09-04-2016
Magistral 2	M2	11-09-2015	09-03-2016
Magistral 3	M3	11-09-2015	09-03-2016
Magistral 4	M4	11-09-2015	09-01-2016
Magistral 5	M5	11-09-2015	09-03-2016

Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.4 ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS

Tendo em vista que não existe método para análise do AL ou suas formulações farmacêuticas na Farmacopeia Brasileira e apesar da Farmacopeia Americana utilizar a HPLC para a quantificação deste fármaco, este grupo escolheu desenvolver o método para a Espectrofotometria UV/VIS devido sua utilização ser de baixo custo e de ampla aplicação na rotina laboratorial.

##### 4.4.1 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE

Inicialmente, preparou-se a solução padrão contendo AL e excipientes: em balão volumétrico de 500 mL solubilizou-se em água ultrapurificada o equivalente a 300 mg de AL juntamente com 100 mg da mistura de excipientes (aerosil, celulose microcristalina 101, talco farmacêutico e amido de milho) que compõem a formulação, resultando em solução final de concentração corresponde a  $600 \mu\text{g. mL}^{-1}$  de AL.

A partir da solução estoque de AL, na concentração  $600 \mu\text{g. mL}^{-1}$ , foi obtida a solução teste através de diluição em água ultrapurificada, que resultou na concentração de  $300 \mu\text{g. mL}^{-1}$  de AL. A solução teste foi empregada na avaliação da precisão, exatidão e robustez do método.

##### 4.4.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Submeteu-se a solução teste a análise em espectrofotômetro a fim de obter espectros de absorção na região do UV, mais especificamente em uma faixa correspondente entre 200 e 400 nm, no intuito de investigar em qual comprimento de onda verifica-se maior pico de absorção espectral.

#### 4.4.2.1 VALIDAÇÃO

A validação foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (LABDEM) localizado na UEPB, tendo como referência a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Official Methods of Analysis of AOAC International (AOAC INTERNATIONAL, 2012) e a International Conference on Harmonization (ICH, 1995), por meio da análise dos parâmetros de linearidade, precisão, especificidade/seletividade, exatidão e robustez aplicados à espectrofotometria UV/VIS.

##### 4.4.2.1.1 LINEARIDADE

A linearidade do método foi verificada através da elaboração de uma curva analítica contendo 6 pontos correspondentes às concentrações de 30, 75, 150, 300, 450 e 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , obtidas a partir de diluições da solução estoque de AL a 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Tais concentrações obedeceram ao intervalo de 80 e 120% da concentração teórica do teste (300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para cada ponto de concentração, três réplicas foram obtidas.

Após leitura integral das amostras em espectrofotômetro na região UV, a 333 nm, três curvas analíticas foram elaboradas plotando-se os valores da concentração em função da absorbância. A partir de valores médios entre tais curvas, uma curva analítica principal foi construída.

Por conseguinte, procederam-se os cálculos do coeficiente angular da reta, o seu ponto de intersecção e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) através do método dos mínimos quadrados, além do desvio padrão relativo, avaliado para cada ponto de concentração. Considera-se aceitável o valor de  $R^2$  maior ou igual a 0,99.

##### 4.4.2.1.2 PRECISÃO

A precisão foi admitida de duas formas, Precisão Intra-dia e Inter-dia, a partir de soluções teste calculando-se o DPR (desvio padrão relativo) das absorbâncias encontradas e pelo teste estatístico ANOVA. As soluções teste equivaliam a 100% da concentração teórica (300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) estabelecida para a realização destes experimentos..

#### 4.4.2.1.2.1 PRECISÃO INTRA-DIA (REPETIBILIDADE)

Foram preparadas 7 (sete) soluções de AL na concentração  $300 \mu\text{g. mL}^{-1}$ , as quais foram avaliadas duas vezes com o intervalo de 8 horas entre a primeira leitura, realizada logo após o preparo, e a segunda, somando 14 quantificações ao total. Todo o experimento foi efetuado por um único analista, manuseando o mesmo equipamento durante dois dias consecutivos.

#### 4.4.2.1.2.2 PRECISÃO INTER-DIA (PRECISÃO INTERMEDIÁRIA)

Este parâmetro foi analisado ao comparar os resultados conseguidos no mesmo laboratório, porém, em dias e analistas diferentes. Assim como na precisão intra-dia, realizadas um total de 14 (quatorze) quantificações de uma solução a  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AL durante 2 (dois) dias diferentes.

#### 4.4.2.1.3 EXATIDÃO

O parâmetro de exatidão foi averiguado após a linearidade e a especificidade serem estipuladas, visto que foram utilizadas 3 concentrações integrantes na curva de calibração estabelecida anteriormente. Desta forma, analisou-se soluções de concentração baixa ( $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), média ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e alta ( $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) com 3 réplicas cada, totalizando 9 quantificações.

A exatidão foi calculada através da relação entre a concentração média definida experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$E (\%) = \frac{\text{CME} \times 100}{\text{CMT}}$$

Onde:

E (%): exatidão em porcentagem;

CME: concentração média experimental;

CMT: concentração média teórica.



#### 4.4.2.1.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os resultados dos limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram obtidos em três níveis de confiança (95, 99 e 99,9%) aplicando-se uma planilha fornecida *on line* por Ribeiro et.al. (2008) a partir do desvio padrão da resposta e o coeficiente angular da curva de calibração desenvolvida.

#### 4.4.2.1.5 ESPECIFICIDADE

Procederam-se duas leituras na faixa entre 200 - 400 nm em aparelhagem específica (espectrofotômetro), ocorrendo uma varredura utilizando uma solução constituída apenas pelos excipientes empregados na produção das cápsulas, e outra com uma solução de AL na concentração de 300  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

#### 4.4.2.1.6 ROBUSTEZ

A robustez do método foi avaliada com soluções triplicadas de concentração na ordem de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , alterando-se a temperatura e o potencial hidrogênionico (pH,), na margem de  $\pm 5\%$ , de cada solução testada. Foi avaliado o nível de significância de tais oscilações por meio de tratamento de dados em ANOVA.

### 4.5 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

As cápsulas foram submetidas à dissolução com base nas especificações (Tabela 4) contidas na monografia do AL na USP 32 (2012).

TABELA 4 - Especificações para o método de dissolução do AL.

<b>Parâmetros</b>	
Temperatura	37 ± 0,5 °C
Sistema de agitação	1 (cesta - 40 mesh)
Velocidade	100 rpm
Meio de dissolução	Água ultrapurificada
Volume do meio	900 mL

Fonte: USP 32 (2012)

O perfil de dissolução foi desenvolvido utilizando-se 12 unidades de cada amostra de AL, submetidas às condições supracitadas. Alíquotas de 10 ml foram colhidas nos intervalos de 10, 20, 30, 50, 60 e 90 minutos. Posteriormente, filtradas em filtros de seringa e analisadas em espectrofotômetro UV/Vis a 333 nm, utilizando-se água como branco.

#### 4.5.1 ANÁLISE DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

##### 4.5.1.1 EFICIÊNCIA DE DISSOLUÇÃO

A eficiência de dissolução (ED%) foi estimada conforme Khan (1975), por meio da relação entre a área sob a curva do tempo 0 a 90 min ( $ASC_{0-90}$ ) e a área total do retângulo ( $ASC_{TR}$ ). A  $ASC_{0-90}$  foi determinada pelo método dos trapézios e a  $ASC_{TR}$  pelo cálculo da área considerando-se 100% de dissolução no tempo de 90 min. A equação utilizada é descrita a seguir:

$$ED \% = \frac{ASC_{0-90}}{ASC_{TR}} \times 100\%$$

Os resultados atingidos foram então aplicados em teste estatístico ANOVA para verificar se ocorreram diferenças relevantes entre os perfis de dissolução das amostras. Em seguida, o teste de Tukey foi empregado a fim de mostrar em quais amostras específicas se estabelecem essas diferenças, caso aconteçam.

#### 4.5.1.2 CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO

Para definir a cinética de dissolução das cápsulas de AL, aplicaram-se os perfis de dissolução a quatro modelos cinéticos: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell, cujas equações estão descritas na Tabela 5.

TABELA 5 - Ordem/modelos de cinética de dissolução usados na avaliação do perfil de dissolução de cápsulas de AL.

Ordem/modelo	Equação*
Ordem Zero	$Q_t = Q_0 - K_0t$
Primeira Ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 - K_1t$
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$
Hixson-Crowell	$Q_t^{1/3} = Q_0^{1/3} - K_c t$

\* $Q_t$  - quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ;  $Q_0$  - quantidade inicial de fármaco em solução;  $K_0$ ,  $K_1$ ,  $K_H$ ,  $K_C$ , - constantes de liberação de zero ordem, de primeira ordem, de Higuchi e de Hixson-Crowell, respectivamente;  $t$  - tempo.

Fonte: MAHLE et.al., 2007.

Para determinar o modelo matemático que melhor se enquadra cada perfil de dissolução, realizaram-se estudos de regressão linear para cada modelo tendo em vista obter equação da reta e, por conseguinte, o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ). Logo, foi determinado como o modelo mais adequado aquele cujo valor do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) fosse mais próximo de um.

Uma vez definido o modelo cinético para cada amostra, calcularam-se através da reta de regressão as seguintes constantes:

- Constante de velocidade de dissolução ( $k$ ): corresponde ao coeficiente angular da reta de regressão;
- Tempo de meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ): tempo necessário para que 50% do AL seja dissolvido;
- Quantidade de fármaco dissolvido após 60 min do teste de dissolução ( $Q_{60}$ ): segundo a USP 32 (2012), o  $Q_{60}$  para cápsulas deve corresponder a, no mínimo, 70% da quantidade total declarada.

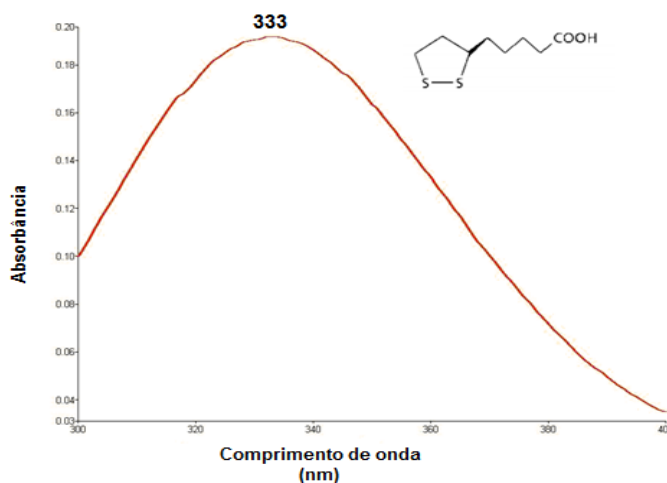
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS

O método desenvolvido para análise do AL e suas formulações foi realizado utilizando varredura nos comprimentos de onda de 200 a 400 nm, apresentando-se adequado para a quantificação do AL.

Foi investigado em qual comprimento de onda o AL apresentava o pico máximo de absorção de energia, através de leituras ao longo do espectro. Deste modo, foi detectado um pico de absorção por volta de 333 nm de comprimento de onda (Figura 4).

FIGURA 4 - Espectro de absorção do AL na região UV.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os dados encontrados corroboram com Billgren et.al., 2010, que atribui este fenômeno ao anel ditiolano presente na molécula.

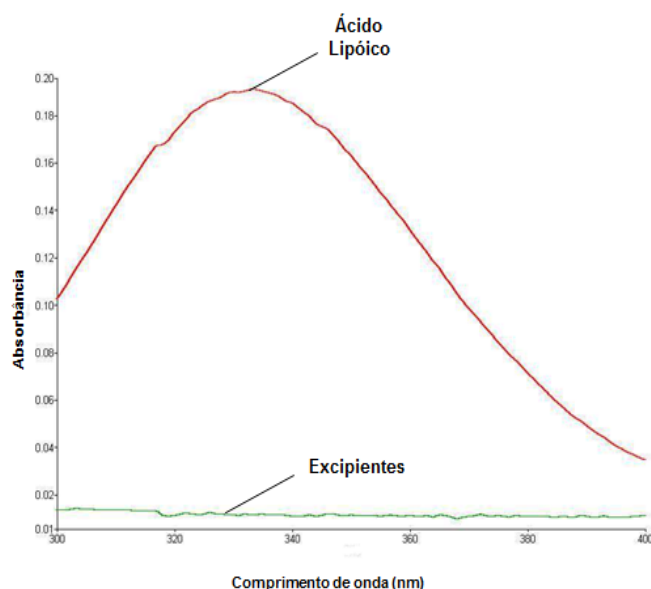
### 5.1.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

A validação é um instrumento através do qual é possível apontar se determinado método é totalmente seguro e adequado para atender determinadas finalidades. Desta forma, é fundamental que apresente resultados representativos, sem grandes variabilidades (RIBANI et.al., 2004; BORBA et.al., 2013). Logo, o processo de validação foi conduzido para a quantificação do percentual de dissolução do AL por meio do espectrofotômetro UV/Vis, tendo como base avaliar os critérios de especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

#### 5.1.1.1 ESPECIFICIDADE

A partir do gráfico de absorção analisado, observado na figura 5, foi realizada a comparação entre a solução teste contendo AL e a solução contendo apenas os excipientes.

FIGURA 5 - Espectro de absorção do AL e dos excipientes na região UV.



Fonte: Dados da pesquisa.

Foi observado que o método analítico apresenta especificidade frente ao AL, pois não se observou pico de absorção quanto aos excipientes no comprimento de onda atribuído ao

AL, assegurando-se assim que o método se mostra seletivo e específico para a análise de formulações contendo AL.

#### 5.1.1.2 LINEARIDADE

Obedecendo às orientações da resolução e guias citados anteriormente, uma curva analítica foi elaborada com seis pontos de concentração, respeitando o intervalo de 80 a 120% da concentração teórica do teste (300  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ). Os valores médios de absorvâncias obtidos para cada concentração estão exibidos na Tabela 6, além de seus desvios padrões relativos.

TABELA 6 - Valores de absorvância obtidos na construção da curva analítica de AL.

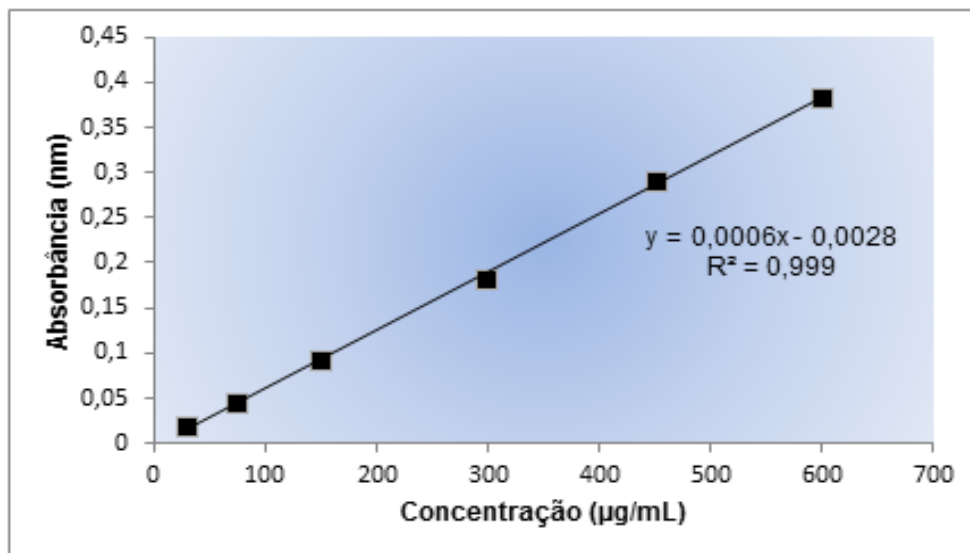
<b>Concentração (<math>\mu\text{g. mL}^{-1}</math>)</b>	<b>30</b>	<b>75</b>	<b>150</b>	<b>300</b>	<b>450</b>	<b>600</b>
<b>Concentrações</b>	0,0192	0,0437	0,0922	0,1811	0,2732	0,3638
<b>Médias</b>	0,0196	0,0432	0,0897	0,1815	0,2790	0,3620
	0,0199	0,0428	0,0925	0,1834	0,2748	0,3610
<b>Média</b>	<b>0,0196</b>	<b>0,0432</b>	<b>0,0915</b>	<b>0,182</b>	<b>0,2757</b>	<b>0,3623</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,03</b>	<b>1,04</b>	<b>1,68</b>	<b>0,55</b>	<b>1,09</b>	<b>0,39</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

Pode-se observar que o menor valor de desvio padrão corresponde à concentração teórica definida para o desenvolvimento dos testes de validação (300  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ), demonstrando menor possibilidade de ocorrer resultados com valores consideravelmente afastados.

A Figura 6 representa a curva de calibração e a equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados. Este método estabelece parâmetros da relação entre duas ou mais grandezas de um fenômeno ou o valor mais provável de uma grandeza mensurada várias vezes.

FIGURA 6 - Curva analítica do AL nas concentrações de 30, 75, 150, 300, 450, 600  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  obtida por espectrofotômetro UV/Vis.



Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com a RDC 899/03, o coeficiente de correlação expressou-se dentro do especificado, tendo  $R^2 = 0,99$ , ou seja, pode-se assegurar que há correlação linear entre as concentrações e as absorbâncias correspondentes, dentro de uma limitada faixa de concentração.

#### 5.1.1.3 EXATIDÃO

Foram quantificadas três concentrações diferentes, declaradas com valores de baixa, média e alta concentração, de acordo com a tabela 7.

TABELA 7 - Valores da exatidão em três níveis de concentração de AL.

Concentração Teórica ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Média da Concentração Real ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Exatidão (%) $\pm$ DPR
75	76,72	102,33 $\pm$ 1,00
300	308,00	102,66 $\pm$ 0,68
600	608,44	101,40 $\pm$ 0,39

Fonte: Dados da pesquisa.

Obtiveram-se exatidões que variaram de 102,33 a 101,40%, quando comparadas aos valores verdadeiros. O intervalo aceitável é 95-105% (BRASIL, 2003). Portanto, os valores apresentados mostram-se dentro do que a legislação recomenda.

#### 5.1.1.4 PRECISÃO

Os valores obtidos de absorvâncias e desvios padrões estão juntamente exibidos nas Tabelas 8 e 9, correspondentes à precisão intra-dia e inter-dia, respectivamente. As precisões foram analisadas por meio do desvio padrão e pelo método estatístico Anova, dos quais os resultados estão dispostos na Tabela 10.

TABELA 8 - Valores obtidos do ensaio de precisão intra-dia em soluções de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AL.

<b>Período</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>
<b>Concentrações Médias (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	310,83	310,00
	312,00	312,50
	311,33	311,50
	313,00	314,00
	311,66	309,16
	325,33	309,50
	321,50	310,83
<b>DPR médio (%)</b>		<b>1,48</b>

Fonte: Dados da pesquisa.



TABELA 9 - Valores obtidos no ensaio de precisão inter-dia em soluções de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AL.

<b>Analista</b>	<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
<b>Concentrações Médias (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	310,50	319,33
	312,16	320,66
	311,50	319,00
	313,50	318,66
	310,50	316,00
	317,50	310,33
	316,16	307,16
<b>DPR médio (%)</b>		<b>1,34</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

A RDC 899/03 determina para produtos farmacêuticos um desvio padrão relativo inferior a 5%. À vista disto, declara-se o método como preciso tendo DPR= 1,34 %, não sofrendo influência da mudança de analista e/ou do período em que é realizado.

TABELA 10 - Valores estatísticos do teste Anova do ensaio de precisão intra-dia e inter-dia.

<b>Parâmetros estatísticos</b>	<b>Precisão intra-dia</b>	<b>Precisão inter-dia</b>
<b><math>F</math> tabelado</b>	4,75	4,75
<b><math>F</math> calculado</b>	3,06	1,56
<b>Valor-<math>p</math></b>	0,11	0,23

Fonte: Dados da pesquisa.

Utilizou-se também o teste Anova, para resultados mais fidedignos. Este teste é capaz de indicar diferenças estatisticamente relevantes entre os resultados obtidos em diferentes períodos e analistas. Desta forma, pode-se observar que para ambas as precisões os valores de  $F_{\text{calculado}}$  mostraram-se inferiores aos de  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ ), assim como o valor- $p$  maior que o nível de significância ( $p > 0,05$ ). Logo, afirma-se que não há diferenças significativas nas precisões e isto certifica a precisão do método.

### 5.1.1.5 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram determinados por meio de planilha eletrônica disponibilizada por Ribeiro et.al. (2008), a qual possibilita estimar os limites em três níveis de confiança a partir de dados da curva analítica. Os valores achados estão expostos na Tabela 11 e evidenciam as menores concentrações que o método desenvolvido é capaz de detectar e quantificar.

TABELA 11 - Limites de detecção e quantificação, em três níveis de confiança, para o método desenvolvido.

Nível de confiança (%)	LD ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
95	14,25	21,16
99	19,21	23,65
99,9	25,18	26,82

Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.1.1.6 ROBUSTEZ

Para avaliação da robustez, os experimentos foram realizados alterando-se em  $\pm 5\%$  dos valores de pH e temperatura da solução teste de concentração  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AL. Na Tabela 12 estão descritos os valores das absorvâncias e do tratamento estatístico por Anova.

TABELA 12 - Valores de absorvâncias e estatísticos do teste Anova para robustez.

Alterações	DPR (%)	Valor-p	$F$ calculado	$F$ tabelado
pH	4.3	1,79	0,33	1,32
	4.1			
	3.9			
Temperatura	20	0,71	0,79	0,23
	25			
	30			

Fonte: Dados da pesquisa.

Observou-se que para as modificações submetidas os valores de  $F_{\text{calculado}}$  ( $F = 1,32$ ;  $F = 0,23$ ) mostraram-se menores que os de  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F = 5,14$ ), bem como o valor-p maior que o nível de significância selecionado ( $p > 0,05$ ). Portanto, é possível afirmar que não há diferenças significativas diante das alterações realizadas, indicando o método como robusto.

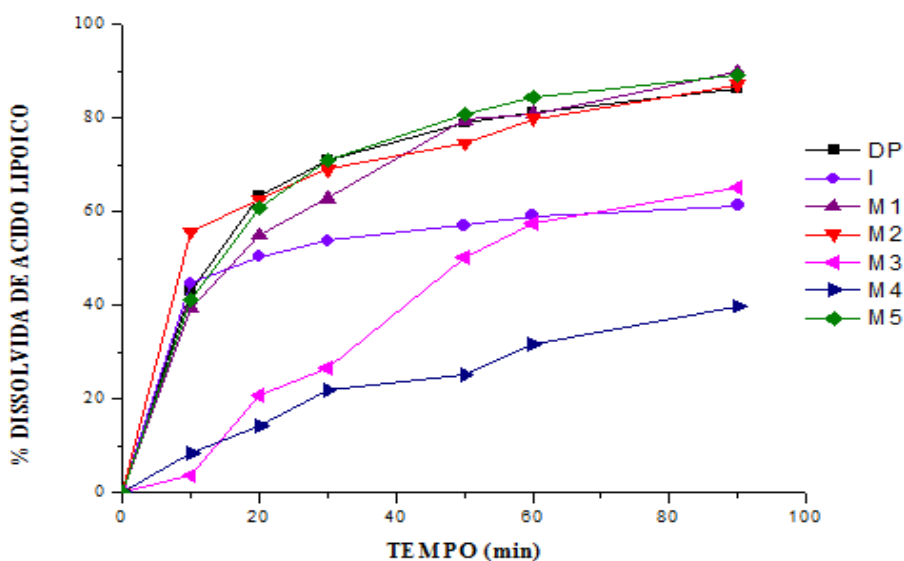
A USP 32 (2009) recomenda o uso da CLAE para a determinação do teor da dissolução do AL em cápsulas. Entretanto, trata-se de uma técnica onerosa que exige grande quantidade de reagentes e materiais, além de um maior tempo de execução.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a espectrofotometria UV/VIS se mostrou uma técnica linear, precisa, exata, específica e robusta de acordo com os parâmetros de validação, além de apresentar baixo custo e rápida execução. Nesse sentido, pode-se assegurar o uso da espectrofotometria UV/VIS como técnica alternativa a CLAE na análise de cápsulas de AL em teste de dissolução.

## 5.2 PERFIS DE DISSOLUÇÃO

Os perfis de dissolução adquiridos permitiram a determinação de inúmeros parâmetros, possibilitando uma análise mais discriminativa em relação ao comportamento *in vitro* dos medicamentos. A figura 7 dispõe sobre os perfis de dissolução das amostras quantificadas por espectrofotometria UV/Vis.

FIGURA 7 - Perfis de dissolução a partir das cápsulas de AL (300 mg) por espectrofotometria UV/Vis.



Fonte: Dados da pesquisa.

As formas farmacêuticas sólidas de administração oral conferem maiores problemas quanto à biodisponibilidade, o que torna essencial avaliar a ocorrência de tal problema através de teste *in vitro*. Este teste permite observar como ocorre a dissolução do medicamento em função do tempo (MAHLE et.al., 2007).

### 5.3 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

Apoiando-se nos perfis de dissolução (figura 7) foi possível definir a velocidade do processo de dissolução ( $k$ ), a meia vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ), a quantidade máxima dissolvida em 60 minutos do início do teste ( $Q_{60}$ ), os fatores de diferença e similaridade e a eficiência de dissolução (ED%)

Primeiramente, determinou-se como qual modelo matemático se comporta o processo de dissolução de cada amostra avaliada. Para isto, foi obtida a reta de regressão linear dos resultados dos perfis aplicando-se quatro modelos cinéticos (Tabela 5). Para averiguar o melhor modelo cinético foi considerado o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) proveniente da reta de regressão.

A tabela 13 descreve os valores de  $r$  de cada amostra. Enquadrou-se naquele modelo o perfil de dissolução cujo valor de  $r$  mais se aproximou de 1. Logo, apenas a dissolução da amostra I se assimilou à cinética de Higuchi, enquanto que as demais se caracterizaram como de primeira ordem.

TABELA 13 - Coeficiente de Correlação de Pearson ( $r$ ), aplicando cinética de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell nos perfis de dissolução por espectrofotometria UV/Vis.

Amostra	Ordem/modelo matemático			
	Ordem zero	Primeira Ordem	Higuchi	Hixson-Crowell
DP	0,8151	0,9783	0,8902	0,9567
I	0,7120	0,8410	0,8902	0,8125
M <sub>1</sub>	0,8837	0,9939	0,9845	0,9837
M <sub>2</sub>	0,7872	0,9422	0,9347	0,9142
M <sub>3</sub>	0,9677	0,9871	0,9556	0,9850
M <sub>4</sub>	0,9744	0,9861	0,9865	0,9830
M <sub>5</sub>	0,8438	0,9927	0,9674	0,9771

Fonte: Dados da pesquisa

A cinética de primeira ordem relaciona a velocidade de liberação do fármaco com a quantidade de fármaco remanescente na formulação, este modelo é aplicado às formulações de liberação imediata (PINHO et.al., 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; SCHESHOWITSCH et.al., 2007). O modelo de Higuchi, por sua vez, atribui que a porcentagem de fármaco dissolvida é dependente da raiz quadrada do tempo. Tal modelo é próprio de formulações de liberação prolongada (SCHESHOWITSCH et al., 2007). Todavia, mesmo caracterizando-se como uma formulação de liberação imediata, a amostra I, por meio da dissolução, mostrou lenta liberação do fármaco. Isto justifica sua relação próxima ao modelo cinético de Higuchi. Segundo Manadas; Pina; Veiga (2002) e Costa; Lobo; Lopes (2005) faz-se necessário destacar que os modelos matemáticos aplicados são direcionados principalmente para comprimidos, tendo limitações quando atribuídos para cápsulas.

A tabela 14 apresenta os parâmetros cinéticos ( $k$ ,  $t_{50\%}$  e  $Q_{60}$ ) de cada amostra por UV/vis, definidos segundo o modelo cinético apropriado.

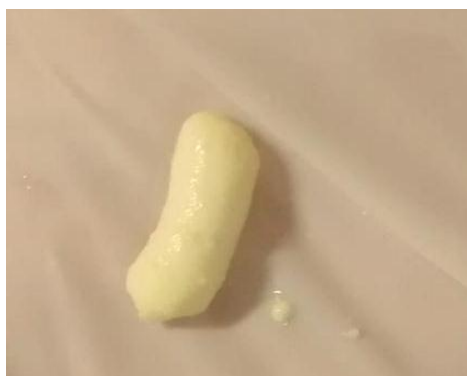
TABELA 14 - Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo cinético selecionado.

Amostras	$k$	$t_{50\%}$ (min)	$Q_{60}$ (%)
DP	$0,04 \text{ min}^{-1}$	17,11	78,40
I	$0,008 \text{ mg/L min}^{-1}$	38,07	62,76
M <sub>1</sub>	$0,04 \text{ min}^{-1}$	16,49	77,99
M <sub>2</sub>	$0,04 \text{ min}^{-1}$	17,42	76,48
M <sub>3</sub>	0,01 min	55,21	52,91
M <sub>4</sub>	$0,006 \text{ min}^{-1}$	113,98	30,57
M <sub>5</sub>	$0,04 \text{ min}^{-1}$	15,78	80,92

Fonte: Dados da pesquisa

A partir dos valores de cinética obtidos, observou-se que grande parte das amostras expressam velocidades de dissolução semelhantes, com exceção das amostras I e M<sub>4</sub> que manifestaram os menores valores de  $k$ . Isto pode estar relacionado ao fato de que a amostra M<sub>4</sub>, ao final da maioria dos testes de dissolução, apresentou-se aparentemente intacta (Figura 8), ou seja, não ocorreu a desintegração do seu invólucro, impossibilitando a liberação efetiva do fármaco nele inserido.

FIGURA 8 - Cápsula M<sub>4</sub> não dissolvida ao término do teste de dissolução.



Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com Abdou (1989), as características físico-químicas do fármaco, excipientes empregados na formulação, método de fabricação, armazenamento e a embalagem podem interferir na liberação do fármaco, alterando de forma expressiva sua velocidade de dissolução.

As amostras que exibiram melhor desempenho quanto à velocidade de dissolução, também demonstraram melhores tempos de meia vida ( $t_{50\%}$ ). Quanto ao percentual de fármaco dissolvido em 60 minutos ( $Q_{60}$ ), a USP 32 (2012) estabelece que neste limite de tempo o percentual dissolvido para o AL deve corresponder a no mínimo 70% da dose total submetida ao teste. Portanto, comprovou-se que as amostras DP, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e M<sub>5</sub> apresentaram resultados aceitáveis, com destaque para o desempenho da amostra M<sub>5</sub> que apresentou menor tempo de meia vida e maior percentual de dissolução em 60 minutos após o início do teste.

A ED% constitui-se na avaliação integral comparativa da área sob a curva (ASC) do perfil de dissolução em razão da área representada pelo tempo total do ensaio. A tabela 15 dispõe dos valores de ED% das amostras analisadas.

TABELA 15 - Eficiência de Dissolução (ED%) das cápsulas de AL (300 mg).

Amostra	ED%± DPR
	UV/Vis
DP <sup>a</sup>	73,43± 3,75
I <sup>b</sup>	53,50± 5,90
M <sub>1</sub> <sup>a,b,c</sup>	67,23± 1,59
M <sub>2</sub> <sup>a,c,e</sup>	69,47± 5,03
M <sub>3</sub> <sup>b,d</sup>	39,23± 7,89
M <sub>4</sub> <sup>d</sup>	24,15± 9,87
M <sub>5</sub> <sup>a,c,e</sup>	70,30± 6,76

\*As amostras que apresentam letras iguais não apresentam diferença estatística quanto a ED%

Fonte: Dados da pesquisa.

A Eficiência de Dissolução (ED%) é designada por muitos como sendo o parâmetro mais seguro para a determinação da equivalência farmacêutica, tendo em vista sua capacidade de detectar diferenças, entre formulações (SERRA; STORPIRTIS, 2007).

Depois de obtidos os valores de ED%, aplicaram-se estes resultados à interpretação estatística utilizando-se ANOVA e, posteriormente, foram submetidos ao teste de Tukey a fim de observar as amostras que apresentavam diferenças, levando em consideração nível de significância a 0,05. Os grupos constatados como equivalentes foram: (I, M<sub>1</sub> e M<sub>3</sub>); (M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub>); (M<sub>5</sub> e M<sub>2</sub>).

O elevado desvio padrão apresentado pela amostra M<sub>4</sub> pode estar relacionado a não uniformidade de dose, citada anteriormente, como também pode estar associado à desintegração incompleta do invólucro, fato semelhantemente reportado por Pinho et al. (2011) ao realizar testes de dissolução em cápsulas de carbamazepina.

A ED% de dissolução mais satisfatória ocorreu para as cápsulas de AL desenvolvidas pelo presente grupo de pesquisa (SILVA, 2014). Este parâmetro uma vez determinado pode vir a subsidiar o comportamento de dissolução do AL *in vivo* após estudo de correlação *in vivo* – *in vitro* (OFOEFULE; UDEOGARANYA; OKONTA, 2001). Logo, é possível prever o comportamento do medicamento *in vivo* considerando que o processo de absorção depende diretamente da concentração do fármaco dissolvido no meio biológico e do tempo em que permanece em contato com as regiões de absorção gastrintestinal (KHAN, 1975; FARINHA; PAIS; BICA, 1997).

Portanto, após análise envolvendo os perfis de dissolução foi possível inferir que as amostras DP, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e M<sub>5</sub> mostraram-se semelhantes na totalidade dos parâmetros investigados, embora, faz-se necessária a realização de estudos *in vivo* para afirmar a bioequivalência entre estas formulações.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia de espectrofotometria UV/VIS desenvolvida para a determinação do teor de AL em cápsulas no ensaio de dissolução apresentou-se linear, precisa, exata, específica e robusta, demonstrando-se assim eficaz na quantificação do AL nas formulações analisadas.

O método de dissolução mostrou-se discriminativo para a avaliação do AL veiculado em cápsulas, sendo a formulação desenvolvida por este grupo de pesquisa a de melhor comportamento diante dos critérios de dissolução.

O teste de dissolução *in vitro* é considerado de grande importância para o controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas, pois avalia a liberação e solubilidade do ingrediente ativo, parâmetros estes que influenciam diretamente no processo de absorção e ação do fármaco *in vivo*.

É relevante a realização de estudos de pré-formulação, pois através dos quais é possível obter informações sobre interações físico-químicas entre componentes de uma formulação, conduzindo, desta forma, para a elaboração de uma melhor forma farmacêutica que, associada às Boas Práticas de Fabricação, assegure estabilidade, segurança e eficácia.

## REFERÊNCIAS

ABDOU, H. M. **Dissolution, bioavailability & bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company, 1989.

AL-ATTAR, A.M. Physiological and histopatological investigations on the effects of lipoic acid in rats exposed to malathion. **J Biomed Biotechnol**. 2010.

ALLEN JR, Loyd V.; POPOVICH, Nicholas G.; ANSEL, Howard C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos-9**. Artmed Editora, 2013.

ANSAR, H.et al.. Effect of alpha-lipoic acid on blood glucose, insulin resistance, and glutathione peroxidase of type 2 diabetic patients. **Saudi Med J**. v.32, n.6, 2011.

AOAC. International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 19. ed., 2012.

BARBOZA, Fernanda Malaquias et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 747-749, 2010.

BILLGREN, ES et al. Lipoic Acid Biosynthesis and Enzymology. In: **Comprehensive natural Products Chemistry**. 7. ed., 2010.

BORBA, P.A.A. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria UV para quantificação de carvedilol. **Quím. Nova**, v.36, n.4, 2013.

BRASIL. Resolução n.899, de 29 de maio de 2003. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 2 jun 2003.

CARLSON, D.A. et al. The plasma pharmacokinetics of R-(+)-Lipoic Acid Administered as Sodium R-(+)-Lipoate to Healthy Human Subjects. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n.4, 2007.

CHORILLI, M. et al. Estudo de perfil de dissolução dos medicamentos de referência, genérico e similar contendo cefalexina na forma farmacêutica cápsula. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, p. 69-73, v.31, n. 1, 2010.

COSTA, P., LOBO, J. M. S.; LOPES, C. M. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, 2005.

CREMER, D.R. et al. Safety evaluation of  $\alpha$ -lipoic acid (ALA). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 46, 2006.

DIAS, C.L. et al. Dissolution method for milnacipran hydrochloride capsules: development, validation, and study of changes in dissolution rate after storage. **Dissolution Technologies**. Porto Alegre, 2011.

EMANUELLI, T; SCANDIUZZI, M. Validação de processos na indústria farmacêutica. In: CONGRESSO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E COSMÉTICOS, 2000, Rio Grande do Sul. **Anais**. Rio Grande do Sul: Universidade do Rio Grande do Sul, 2000. p. 57.

FARINHA, A.; PAIS, J.P.; BICA, A. O ensaio de dissolução in vitro na avaliação da qualidade biofarmacêutica. **LEF – Boletim**, v.4, n.15,1997.

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

FINGER, A; RICCI- JÚNIOR, E. Estudo do perfil de dissolução de cápsulas manipuladas de diacereína. **Rev. Bras. Farm**, v.93, n.3, p. 392-395, 2012.

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

GOMES, E.C.L. et al. Desenvolvimento e Validação de Método analítico para quantificação do Fármaco Bevacizumabe por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência. **Quim. Nova**, v. 35, n.3, p.608-611, 2012.

GONZÁLEZ, O.P.; MOY, A.N.L.; GUZAMÁN, J.M. El alfa-tocoferol y el ácido alfa-lipóico. Una sinergia antioxidante com potencial em medicina preventiva. **Rev Invest Clin**, v. 60, n.1, 2008.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. New York: LTC, 2006.

HEINISCH, B.B. et al. Alpha-lipoic acid improves vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized trial. **Eur J Clin Invest**, v.40, n.2, 2010.

ICH, International Conference on Harmonization. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, Q2(R1). 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Brasil, 2010.

KASSAYE, L.; GENETE, G. Evaluation and comparison of in vitro dissolution profiles diferente brands of amoxicillin capsules. **Afr Health Sci.**, v. 12, n.2, 2013.

KHAN, K.A. The concept of dissolution efficiency. **J. Pharm. Pharmac.**, v.27, n.48, 1975.

KOUFAKI, M. Therapeutic applications of lipoic acid: a patente review (2011-2014). **Expert Opin Ther Pat.**, v.24, n.9, 2014.

LEE, S. L.; RAW, A. S.; YU, L. **Dissolution Testing. In Biopharmaceutics Applications in Drug Development.** Springer: New York, 2008.

LU, X. et al. Of a two-step tier-2 dissolution method for blinded overencapsulated erlotinib tablets using UV fiber optic detection. **J. Pharm. Biomed Anal.**, v.56, n.1, 2011.

MAHLE, F. et.al. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida comercializados no Brasil. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.28, n.3, p. 265-271, 2007.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quim. Nova.** Campinas, v.32, n.1, 2009.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, 2002.

MANTA, C; BATISTA-VIEIRA, F; CARLSSON, J. Development of lipoic acid activated agarose. **Chemistry Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n.1, 2009.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica.** 2003. 127f. São Paulo, 2003. 127p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M.R.C.; BROWN, E. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analítica**, v.1, 2002.

MARQUES-MARINHO, F.D. et al. Simvastatin assay and dissolution studies by feasible RP-HPLC in tablets. **Quím. Nova.** Minas Gerais, v.35, n.6, 2012.

MARTINS, M.T.; PAIM, C.S.; STEPPE, M. Development of a dissolution test for lamotrigine in tablet form using an ultraviolet method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** Rio Grande do Sul, v.46, n.2, 2010.

MATIOLI, G.; VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A. Validação de métodos analíticos. **Arq Mundi.** Paraná, v.11, n.2, 2007.

MENDOZA, A.E.H. et al. Comparison of pharmacokinetic profiles of PM02734 loaded lipid nanoparticles and cyclodextrins: in vitro and in vivo characterization. **J Biomed Nanotechnol.** v.8, 2012.

MITRI, K. et al. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. **Int J Pharm.** v. 75, 2011.

MOLLER, H., SIEWERT, M. FIP guidelines for dissolution testing of solid oral products. **Pharm. Ind., Aulendorf,** v. 57, n. 5, 1995.

MORAES, J.D.D. **Desenvolvimento de cosmético contendo ácido alfa-lipóico para a prevenção de alterações da pele e do envelhecimento cutâneo.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

MORIKAWA, T.; YASUNO, R.; WADA, H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria. **FEBS Lett.** v. 498, 2001.

NUNES, RS et al. Thermal behavior of verapamil hydrochloride and its association with excipients. **J. Therm Anal Calorim.** v. 97, n. 1, 2009.

OFOEFULE, S.I.; UDEOGARANYA P.O.; OKONTA J.M. Prediction of in vivo bioavailability of six brands of ciprofloxacin film coated tablets using the concept dissolution efficiency (DE). **Bollettino chimico farmaceutico.,** v.140, n.3, 2001.

OLIVEIRA, E.F.S. et al. Dissolution test optimization for meloxicam in the tablet pharmaceutical form. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** Alfenas, v.45, n.1, 2009.

PACKER, I.; CADENAS, E. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. **J Clin Biochem Nutr.** v. 48, n. 1, 2010.

PACKER, L; KRAEMER, K; RIMBACH, G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. **Nutrition.** v. 17, 2001.

PEREZ, O.G; CASTANEDA, R. E. G Therapeutic perspectives on the combination of  $\alpha$ -lipoic acid and vitamin E. **Nutrition Research.** v. 26, 2006.

PINHO, J.J.R.G. et.al. Avaliação da qualidade físico-química de cápsulas manipuladas de carbamazepina. **Hu Revista,** v.37, n.1, 2011.

PHARM. F. **The Dissolution Procedure: Development and Validation,** v. 30, n. 1, 2004.

POLLI, J.E.; REKHI, G.S.; SHAH, V.P. Methods to compare dissolution profiles. **Drug Information Journal.** v. 30, 1996.

PORASUPHATANA, S. et.al. Glycemic and oxidative status of patients with type 2 diabetes mellitus following oral administration of alpha lipoic acid: a randomized double-blinded placebo controlled study. **Asia Pac J Clin Nutr.** v.21, n.1, 2012.

PORTELA, et al. Of Alpha-Lipoic Acid Raw Material And Capsules By Dynamic Thermogravimetric Method. **Thermochim Acta.** v.95, n.8, 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova.** v. 27, n.5, 2005.

RIBEIRO, F.A.L. e tal. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quím. Nova.** São Paulo, v.31, n.1,2008.

ROCHA, F.R.P; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Química Nova.** v. 27, 2004.

SANTOS, I. M. S. et al. Alterations on monoamines concentration in rat hippocampus produced by lipoic acid. **Arq. Neuro-psiquiatr,** São Paulo, v. 68, n. 3, 2010.

SANTOS, O.M.M.S et al. A Dissolution Test for Finasteride in Immediate-Release Capsules. **Dissolution Technologies.** Alfenas, 2013.

SCHESHOWITSCH, K. et.al. Avaliação da qualidade e perfil de dissolução de cápsulas manipuladas de piroxicam. **Lat. Am. J. Pharm,** v. 26, n.5, 2007.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v.43, n.2, 2007.

SENA, C. M.; NUNES, E.; LOURO, T. Disfunção Endotelial na Diabetes Tipo 2: Efeito de Antioxidantes. **Rev Port Cardiol.,** v.26, 2007.

SERRA, C.H.R.; STORPITIS, S. Comparação de perfis de dissolução de cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Rev Bras Cienc Farm.,** v.43, n.1, 2007.

SHAY, K.P. et al. Alpha Lipoic acid as dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1790, 2009.

SHERIF, S.; BENDAS, E.R.; BADAWY, S. The clinical efficacy of cosmeceutical application of liquid crystalline nanostructured dispersions of alpha lipoic acid as anti-wrinkle. **Eur J Pharm Biopharm.** v.86, 2014.

SILVA, P.C.D. **Estudo termoanalítico de compatibilidade fármaco-excipientes e de estabilidade entre ácido lipóico e adjuvantes tecnológicos.** 2014. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2014.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. São Paulo: Bookman Companhia Editora, 2006.

STORPIRTIS, S. et al. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 35, n.1, 1999.

TEICHERT, J. et al. Pharmacokinetics of alfa -lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. **J. Clin. Pharmacol.** v. 45, 2005.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 32 ed. Rockville: **United States Pharmacopeial Convention**, 2012.

VILA JATO, J. L. **Tecnologia farmacêutica: formas farmacêuticas**. Madrid: Editorial Sintesis, 2001.

WOLLIN, S. D.; JONES, P. J. Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition**. v. 133, p. 3327–3330, 2003

ZHAO, L.; HU, F.X. Lipoic acid treatment of aged type 2 diabetes mellitus complicated with acute cerebral infarction. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v.18, 2014.