

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Entacapona: desenvolvimento e validação de métodos analíticos, método de dissolução e estudo preliminar de estabilidade

CLÉSIO SOLDATELLI PAIM

PORTO ALEGRE, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Entacapon: desenvolvimento e validação de métodos analíticos, método de dissolução e estudo preliminar de estabilidade

Dissertação apresentada por **Clésio Soldatelli Paim**
para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.06.2007, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Cristiane de Bona da Silva
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Prof. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

P143e Paim, Clésio Soldatelli

Entacapona: desenvolvimento e validação de métodos analíticos, método de dissolução e estudo preliminar de estabilidade – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - xxv, 171 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Entacapona. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3 Método de dissolução. 4. Validação: Métodos de análise de fármacos. 5. Estabilidade. 6. Controle de qualidade de medicamentos. I. Steppe, Martin. II. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Martin Steppe pela orientação e dedicação oferecidas durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Professora Elfrides Schapoval pela confiança e dedicação demonstrada em minha vida acadêmica e profissional.

Ao Professor Tércio Oppe pelo auxílio e orientação durante a Iniciação Científica.

Aos meus amigos do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade pela amizade e conhecimentos adquiridos: Ana Rita, Andreas, Alini, Cássia, Julia, Juliana Sippel, Juliana Roman, Letícia, Marcelo, Patrícia e Vanessa. Em especial a Heloisa pela colaboração na execução desse trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, Carolina, Leila, Lorena e Rose, pelo auxílio durante a realização desse trabalho.

Aos meus amigos Eduardo Palma e Bibiana Araújo pela amizade e convívio nesses anos de Faculdade de Farmácia. Em especial ao Eduardo pelo auxílio na realização das análises por espectrometria de massas.

À minha amiga Cristiane Silva pelo auxílio, convívio e amizade durante minha vida acadêmica e profissional.

À Magda, pelo auxílio e amizade durante a graduação e pós-graduação.

Ao Laboratório de Síntese Orgânica desta Faculdade, em especial a Professora Vera Lima, pela disponibilidade no auxílio às análises de RMN.

Ao meu amigo Diogo Miron pelas discussões científicas e colaboração no desenvolvimento do estudo de robustez.

À Lisiane Bajerski pelo auxílio e companheirismo, extremamente importantes nesse momento.

À minha irmã Elisangela Paim pelo apoio, amor e companheirismo e ao meu amigo Alexandre pela amizade.

À minha querida vó Gema Adelina pelo amor, exemplo de força e vontade de viver.

A minha querida sobrinha Amandinha, minha irmã Luciane e meu cunhado Ivan, partes importantes de minha família.

Aos meus pais Albino e Nilza, pela educação prestada, apoio, dedicação, amor e por sempre acreditarem em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação desta Faculdade pelas condições de trabalho oferecidas.

À Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira pela oportunidade de trabalho.

A todos aqueles, que de uma maneira ou outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas.....	xxi
Resumo.....	xxiii
Abstract.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO GERAL.....	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
3.1. Doença de Parkinson.....	11
3.2. Tratamento farmacológico.....	12
3.3. Inibidores da COMT.....	14
3.3. Farmacocinética.....	15
3.4. Métodos de análise.....	16
3.5. Descrição.....	18
4. CAPÍTULO 1 – EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE TRABALHO DE ENTACAPONA.....	21
4.1. Introdução.....	23
4.2. Objetivos específicos.....	23
4.3. Produto farmacêutico.....	24
4.4. Parte experimental.....	24
4.4.1. Extração do fármaco da formulação.....	24
4.4.2. Caracterização dos produtos de extração.....	25
4.4.2.1. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	25
4.4.2.1.1. Resultados.....	25
4.4.2.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	27
4.4.2.2.1. Resultados.....	27
4.4.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H) e de carbono (RMN ¹³ C).....	29

4.4.2.3.1. Resultados.....	29
4.4.2.4. Volumetria em meio não-aquoso.....	32
4.4.2.4.1. Condições volumétricas.....	32
4.4.2.4.2. Preparação e padronização da solução de metóxido de sódio 0,05NSV.....	33
4.4.2.4.3. Análise volumétrica do PEA.....	33
4.4.2.4.4. Resultados.....	34
4.5. Discussão.....	34
4.6. Conclusões.....	37
5. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE METODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA.....	39
5.1. Introdução.....	41
5.2. Objetivos específicos.....	42
5.3. Parte experimental.....	42
5.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	42
5.3.1.2. Resultados.....	42
5.3.2. Espectrofotometria na região do UV e do visível.....	43
5.3.2.1. Determinação da solubilidade da SQT de entacapona.....	43
5.3.2.2. Condições espectrofotométricas.....	44
5.3.2.3. Resultados.....	44
5.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	47
5.3.3.1. Condições cromatográficas.....	47
5.3.3.2. Resultados.....	48
5.4. Discussão.....	49
5.5. Conclusões.....	50
6. CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA E ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS PROPOSTOS.....	53
6.1. Introdução.....	55
6.2. Objetivos específicos.....	56
6.3. Parte experimental.....	57
6.3.1. Validação do método quantitativo por espectrofotometria na região do UV.....	57

6.3.1.1. Equipamento e condições espectrofotométricas.....	57
6.3.1.2. Especificidade.....	57
6.3.1.3. Linearidade.....	58
6.3.1.4. Precisão.....	59
6.3.1.4.1. Preparação da solução da SQT de entacapona.....	60
6.3.1.4.2. Preparação da solução amostra dos comprimidos.....	60
6.3.1.5. Exatidão.....	61
6.3.1.6. Robustez.....	62
6.3.2. Resultados.....	64
6.3.2.1. Especificidade.....	64
6.3.2.2. Linearidade.....	65
6.3.2.3. Precisão.....	67
6.3.2.3.1. Repetibilidade e precisão intermediária.....	67
6.3.2.4. Exatidão.....	67
6.3.2.5. Robustez.....	68
6.3.3. Discussão.....	69
6.3.4. Validação do método quantitativo por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE).....	73
6.3.4.1. Equipamento e condições cromatográficas.....	73
6.3.4.2. Especificidade.....	73
6.3.4.2.1. Solução placebo.....	73
6.3.4.2.2. Hidrólise ácida e aquecimento a 80 °C.....	74
6.3.4.2.3. Hidrólise alcalina.....	74
6.3.4.2.4. Degradação oxidativa e aquecimento a 80 °C.....	74
6.3.4.2.5. Degradação fotolítica.....	75
6.3.4.2.6. Homogeneizado dos produtos de degradação forçada.....	75
6.3.4.3. Linearidade.....	76
6.3.4.4. Precisão.....	77
6.3.4.4.1. Preparação da solução da SQT de entacapona.....	77
6.3.4.4.2. Preparação da solução amostra dos comprimidos.....	77
6.3.4.5. Exatidão.....	77
6.3.4.6. Robustez.....	78
6.3.4.7. Adequabilidade do sistema.....	81

6.3.5. Resultados.....	81
6.3.5.1. Especificidade.....	81
6.3.5.1.1. Solução placebo.....	81
6.3.5.1.2. Hidrólise ácida e aquecimento a 80 °C.....	82
6.3.5.1.3. Hidrólise alcalina.....	83
6.3.5.1.4. Degradação oxidativa e aquecimento a 80 °C.....	83
6.3.5.1.5. Degradação fotolítica.....	84
6.3.5.1.6. Homogeneizado dos produtos de degradação forçada.....	85
6.3.5.2. Linearidade.....	86
6.3.5.3. Precisão.....	88
6.3.5.4. Exatidão.....	88
6.3.5.5. Robustez.....	89
6.3.5.6. Adequabilidade do sistema.....	90
6.3.6. Discussão.....	91
6.4. Análise estatística comparativa dos métodos.....	96
6.4.1. Resultados.....	97
6.4.2. Discussão.....	97
6.5. Conclusões.....	98
6.6. Artigo publicado.....	98
7. CAPÍTULO IV - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE ENTACAPONA.....	105
7.1. Introdução.....	107
7.2. Objetivos específicos.....	109
7.3. Parte Experimental.....	110
7.3.1. Desenvolvimento do método de dissolução.....	110
7.3.1.1. Equipamentos e condições do método de dissolução.....	110
7.3.2. Determinação da solubilidade da SQT de entacapona.....	111
7.3.4. Estabilidade das soluções de entacapona SQT e dos comprimidos de entacapona nos meios de dissolução.....	111
7.3.4.1. Preparação da solução da SQT de entacapona.....	112
7.3.4.2. Preparação da solução amostra.....	112
7.3.5. Influência do filtro.....	113

7.3.5.1. Preparação da solução da SQT de entacapona.....	113
7.3.5.2. Preparação da solução amostra.....	114
7.3.6. Validação do método de dissolução.....	114
7.3.6.1. Especificidade.....	114
7.3.6.2. Linearidade.....	115
7.3.6.3. Precisão.....	115
7.3.6.3.1. Preparação da solução da SQT de entacapona.....	115
7.3.6.3.2. Preparação da solução amostra dos comprimidos.....	116
7.3.6.4. Exatidão.....	116
7.3.6.5. Robustez.....	117
7.4. Resultados.....	117
7.4.1. Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....	117
7.4.1.1. Determinação da solubilidade da SQT de entacapona.....	117
7.4.1.2. Verificação dos perfis de dissolução.....	118
7.4.1.3. Estabilidade das soluções de entacapona SQT e dos comprimidos de entacapona.....	120
7.4.1.4. Influência dos filtros.....	121
7.4.2. Validação do ensaio de dissolução.....	122
7.4.2.1. Especificidade.....	122
7.4.2.2. Linearidade.....	123
7.4.2.3. Precisão.....	125
7.4.2.4. Exatidão.....	126
7.4.2.5. Robustez.....	127
7.4.3. Perfil de dissolução.....	127
7.5. Discussão.....	127
7.6. Conclusões.....	134
8. CAPÍTULO V – ESTABILIDADE PRELIMINAR – DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO EM CONDIÇÕES FOTOLÍTICAS E ESPECTROMETRIA DE MASSA DO PRODUTO DE FOTODEGRADAÇÃO...	137
8.1. Introdução.....	139
8.2. Objetivos específicos.....	140
8.3. Parte Experimental.....	140

8.3.1. Avaliação da cinética de degradação da solução de entacapona nos comprimidos revestidos em condições fotolíticas.....	140
8.3.1.1. Condições do estudo.....	140
8.3.1.2. Preparação das soluções.....	141
8.3.1.2.1. Preparação da solução da SQT de entacapona.....	141
8.3.1.2.2. Preparação da solução amostra dos comprimidos.....	141
8.3.1.3. Definição da ordem de reação.....	142
8.3.2. Resultados.....	142
8.3.3. Discussão.....	146
8.4.1. Espectrometria de massas do produto de fotodegradação.....	148
8.4.1.1. Equipamentos e condições espectrométricas.....	148
8.4.1.2. Preparação da solução fotodegrada.....	149
8.4.2. Resultados.....	149
8.4.3. Discussão.....	152
8.4.4. Conclusões.....	153
9. DISCUSSÃO GERAL.....	155
10. CONCLUSÕES GERAIS.....	159
11. REFERÊNCIAS.....	163

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1. Estrutura química de entacapona.....	18
FIGURA 4.1. Curva de aquecimento obtida por DSC para o PEE.....	26
FIGURA 4.2. Curva de aquecimento obtida por DSC para o PEAH.....	26
FIGURA 4.3. Curva de aquecimento obtida por DSC para o PEA.....	26
FIGURA 4.4. Espectro na região do IV do PEA acetonitrila em pastilhas de KBr.....	27
FIGURA 4.5. Espectros sobrepostos na região do IV (650 a 2000 cm^{-1}) do padrão de entacapona publicado em MOFFAT e colaboradores (2004) e do PEA em pastilhas de KBr.....	28
FIGURA 4.6. Espectro de RMN ^1H do PEA.....	30
FIGURA 4.7. Estrutura química da entacapona e respectivas atribuições do espectro de RMN ^1H em DMSO_{d6}	31
FIGURA 4.8. Espectro de RMN ^{13}C do PEA em DMSO_{d6}	31
FIGURA 4.9. Estrutura química da entacapona e respectivas atribuições do espectro de RMN ^{13}C em DMSO_{d6}	32
FIGURA 5.1. Cromatograma obtido por CCD na análise da solução de SQT de entacapona, solução amostra dos comprimidos de entacapona e da solução de adrenalina.....	43
FIGURA 5.2. Espectro sobreposto na região do UV (200 a 400 nm) da solução da SQT de entacapona e da solução amostra dos comprimidos de entacapona em acetonitrila a 10 $\mu\text{g/ml}$	45
FIGURA 5.3. Espectros sobrepostos na região do UV e do visível (200 a 500 nm) da solução da SQT de entacapona (a) e da solução amostra dos comprimidos de entacapona (b) em etanol a 10 $\mu\text{g/ml}$	45
FIGURA 5.4. Espectros sobrepostos na região do UV e do visível (200 a 500 nm) da solução da SQT de entacapona (a) e da solução amostra dos comprimidos de entacapona (b) em metanol a 10 $\mu\text{g/ml}$	46
FIGURA 5.5. Espectros sobrepostos na região do UV e do visível (200 a 500 nm) da solução da SQT de entacapona (a) e da solução amostra dos comprimidos de entacapona (b) em metanol a 10 $\mu\text{g/ml}$	46
FIGURA 5.6. Cromatogramas sobrepostos da SQT de entacapona e da solução amostra de entacapona em metanol a 20 $\mu\text{g/ml}$	48

FIGURA 5.7. Espectros sobrepostos de absorção na região do UV obtido em detector de arranjo de fotodiodos, acoplado ao sistema de CLAE, da solução da SQT e da solução amostra dos comprimidos de entacapona em metanol a 20 µg/ml.....	49
FIGURA 6.1. Espectro de absorção na região do UV da solução placebo dos excipientes dos comprimidos em acetonitrila, na faixa de 200 a 400 nm.....	64
FIGURA 6.2. Representação gráfica da curva padrão, da equação da reta e do coeficiente de correlação da SQT de entacapona em acetonitrila obtida pelo método por espectrofotometria na região do UV a 305 nm.....	66
FIGURA 6.3. Cromatogramas sobrepostos da solução placebo dos excipientes e da solução amostra dos comprimidos de entacapona em solução metanólica.....	82
FIGURA 6.4. Cromatograma da degradação forçada da SQT de entacapona em condições ácidas por CLAE.....	82
FIGURA 6.5. Cromatograma da degradação forçada da SQT de entacapona em condições alcalinas por CLAE.....	83
FIGURA 6.6. Cromatograma da degradação forçada da SQT de entacapona em H ₂ O ₂ 30% a 80 °C por CLAE.....	83
FIGURA 6.7. Cromatograma da degradação forçada da SQT de entacapona sob luz ultravioleta 254 nm por CLAE.....	84
FIGURA 6.8. Espectros sobrepostos de absorção na região do UV (200 a 370 nm) obtidos em detector de arranjo de fotodiodos, acoplado ao sistema de CLAE, do fármaco entacapona e do produto de fotodegradação.....	84
FIGURA 6.9. Cromatograma obtido da mistura dos produtos de degradação forçada da solução amostra dos comprimidos de entacapona nas diferentes condições de estresse.....	85
FIGURA 6.10. Curva de pureza do pico de entacapona obtido da mistura dos produtos de degradação forçada da solução amostra dos comprimidos de entacapona nas diferentes condições de estresse.....	85
FIGURA 6.11. Representação gráfica da curva padrão, da equação da reta e do coeficiente de correlação de SQT de entacapona por CLAE.....	87

FIGURA 7.1. Perfis de dissolução de comprimidos de entacapona nos meios de dissolução de tampão acetato e fosfato, utilizando aparelhagem pás a 50 rpm.....	118
FIGURA 7.2. Perfis de dissolução de comprimidos de entacapona nos meios de dissolução contendo SDS em diferentes concentrações (0,25; 0,375 e 0,5%) utilizando aparelhagem pás a 50 rpm.....	119
FIGURA 7.3. Espectro de absorção na região do UV da solução placebo dos excipientes dos comprimidos em tampão acetato de sódio pH 5,3, na faixa de 200 a 400 nm.....	122
FIGURA 7.4. Cromatograma obtido por CLAE da solução placebo dos excipientes da formulação em tampão acetato de sódio pH 5,3 e metanol a 305 nm.....	122
FIGURA 7.5. Representação gráfica da curva padrão, da equação da reta e do coeficiente de correlação de SQT de entacapona em metanol pelo método de CLAE.....	124
FIGURA 7.6. Cromatogramas sobrepostos da SQT de entacapona e da solução amostra de entacapona em metanol a 20 µg/ml.....	126
FIGURA 7.7. Perfis de dissolução de comprimidos de entacapona nos meios de dissolução de tampão acetato pH 5,3, utilizando aparelhagem pás a 50 rpm.....	127
FIGURA 8.1. Cromatogramas sobrepostos das soluções de entacapona expostas à radiação UV 254 nm por CLAE – tempo zero: sem exposição, 15 minutos de exposição e 120 minutos de exposição.....	142
FIGURA 8.2. Representação gráfica da cinética de ordem zero para fotodegradação de entacapona.....	144
FIGURA 8.3. Representação gráfica da cinética de primeira ordem para fotodegradação de entacapona.....	145
FIGURA 8.4. Representação gráfica da cinética de segunda ordem para fotodegradação de entacapona.....	145
FIGURA 8.5. Cromatograma obtido de degradação forçada da SQT de entacapona sob luz ultravioleta por CLAE-EM de varredura (MS-Scan) da massa molecular de 304.....	149

FIGURA 8.6. Espectro de massas do produto obtido em 7,1 minutos pelo método de CLAE-EM.....	150
FIGURA 8.7. Espectro de massas do produto obtido em 7,8 minutos pelo método de CLAE-EM.....	150
FIGURA 8.8. Espectro de massas para identificação do fragmento majoritário a partir da massa molecular de 304 por EM/EM.....	151
FIGURA 8.9. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM/EM no modo MRM-ESI ⁻ , utilizando a transição 304,1 > 66,2.....	151

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1. Freqüências de absorção das principais bandas do espectro na região do IV do PEA e suas respectivas atribuições.....	29
TABELA 4.2. Atribuições do espectro de RMN ¹ H do PEA em <i>DMSO</i> _{d6}	30
TABELA 4.3. Atribuições do espectro de RMN ¹³ C do PEA em <i>DMSO</i> _{d6}	32
TABELA 4.4. Condições volumétricas utilizadas para determinação quantitativa do PEA.....	33
TABELA 4.5. Determinação quantitativa do PEA	34
TABELA 5.1. Determinação da solubilidade da SQT de entacapona conforme a F. Bras. IV, 1988.....	44
TABELA 5.2. Condições cromatográficas definidas para identificação e quantificação de entacapona nos comprimidos revestidos por CLAE.....	47
TABELA 6.1. Excipientes farmacêuticos presentes nos comprimidos revestidos de entacapona (Comtan [®]), com sua respectiva função e proporção.	58
TABELA 6.2. Preparação da curva padrão para avaliação da linearidade do método analítico por espectrofotometria na região do UV.....	59
TABELA 6.3. Preparação das soluções para realização da exatidão do método por espectrofotometria na região do UV através do teste de recuperação.....	61
TABELA 6.4. Fatores e níveis estudados para realização do teste de robustez.....	62
TABELA 6.5. Desenho experimental de Plackett-Burman selecionado para verificação da robustez do método analítico por espectrofotometria na região do UV.....	63
TABELA 6.6. Absorvâncias obtidas no método por espectrofotometria na região do UV a 305 nm para realização da curva padrão em acetonitrila.....	65
TABELA 6.7. Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas por espectrofotometria na região do UV.....	66

TABELA 6.8. Resultados da repetibilidade e da precisão intermediária do método analítico por espectrofotometria na região do UV em acetonitrila a 305 nm.....	67
TABELA 6.9. Resultados referentes ao estudo de exatidão por espectrofotometria na região do UV, realizado através do método de adição de padrão.....	68
TABELA 6.10. Resultados referentes à porcentagem de entacapona obtida em cada experimento para avaliação da robustez do método analítico por espectrofotometria na região do UV.....	69
TABELA 6.11. Resultados dos efeitos e t calculado para os fatores analisados no estudo da robustez por espectrofotometria no UV.....	69
TABELA 6.12. Preparação da curva padrão para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE.....	76
TABELA 6.13. Preparação das soluções para o teste de exatidão do método analítico por CLAE, através do método de adição de padrão.....	78
TABELA 6.14. Fatores e níveis estudados para realização do teste de robustez por CLAE.....	79
TABELA 6.15. Desenho experimental de Plackett-Burman para verificação da robustez do método analítico por CLAE.....	79
TABELA 6.16. Áreas médias obtidas na realização da curva padrão da SQT de entacapona por CLAE.....	86
TABELA 6.17. Análise da variância (ANOVA) das áreas obtidas por CLAE.....	87
TABELA 6.18. Resultados da repetibilidade e da precisão intermediária do método analítico por CLAE a 305 nm.....	88
TABELA 6.19. Resultados referentes ao estudo de exatidão do método analítico por CLAE, realizado através do método de adição de padrão, por CLAE.....	89
TABELA 6.20. Resultados referentes à porcentagem de entacapona obtida em cada experimento do teste de robustez.....	89
TABELA 6.21. Resultados dos efeitos e t calculado para os fatores em análise no estudo da robustez por CLAE.....	90

TABELA 6.22. Parâmetros aproximados de conformidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados para CLAE.....	90
TABELA 6.23. Análise comparativa dos métodos propostos por UV e CLAE utilizando Teste <i>t</i> de <i>Student</i>	97
TABELA 7.1. Preparação da curva padrão para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE para o método de dissolução.....	115
TABELA 7.2. Solubilidade da SQT de entacapona a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	117
TABELA 7.3. Resultados comparativos da quantidade de entacapona dissolvida para obtenção do perfil de dissolução de comprimidos em soluções tampões acetato pH 5,1, 5,3 e 5,5 e tampão fosfato pH 5,8, utilizando pás a 50 rpm ($n = 3$).....	118
TABELA 7.4. Resultados comparativos da quantidade de entacapona dissolvida para obtenção do perfil de dissolução de comprimidos em soluções tampões acetato pH 5,1, 5,3 e 5,5 e tampão fosfato pH 5,8, utilizando pás a 50 rpm ($n = 3$).....	119
TABELA 7.5. Resultados comparativos da quantidade de entacapona dissolvida para obtenção do perfil de dissolução de comprimidos em SDS 0,5% e em solução tampão acetato de sódio pH 5,3, utilizando pás a 50 rpm ($n=12$)...	120
TABELA 7.6. Resultados da estabilidade das soluções da SQT e da amostra dos comprimidos de entacapona em solução tampão acetato de sódio pH 5,3 e metanol.....	121
TABELA 7.7. Resultados referentes à determinação da influência dos filtros na filtração da SQT de entacapona e na solução amostra.....	121
TABELA 7.8. Áreas médias obtidas no método por CLAE a 305 nm na realização da curva padrão em metanol.....	123
TABELA 7.9. Análise da variância (ANOVA) das áreas obtidas por CLAE.....	124
TABELA 7.10. Resultados de precisão intermediária do método de dissolução por CLAE utilizando diferentes analistas.....	125
TABELA 7.11. Resultados referentes ao estudo de exatidão do método analítico por CLAE, realizado através do método de adição de padrão.....	126

TABELA 8.1. Áreas obtidas após exposição da solução dos comprimidos de entacapona expostos à luz UV 254 nm para determinação da cinética de degradação por CLAE.....	143
TABELA 8.2. Valores de concentrações, logaritmo da concentração (Log C) e inverso da concentração (1/C) obtidos para realização dos cálculos de para determinação da cinética de degradação.....	144

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância;
CIVIV	Correlação <i>in vivo</i> – <i>in vitro</i> ;
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
DMSO _{d6}	Dimetilsulfóxido deuterado;
DSC	Calorimetria exploratória de varredura;
EC	Eletroforese capilar;
epm	Erro padrão da média;
FDA	Food and Drug Administration;
gl	Graus de Liberdade;
ICH	International Conference on Harmonization;
PEE	Produto de extração em etanol;
PEAH	Produto de extração em acetato de etila : hexano (1:1);
PEA	Produto de extração em acetonitrila;
r	Coefficiente de correlação de Pearson;
Rf	Fator de retenção
SQ	Soma dos Quadrados;
SQT	Substância química de trabalho;

RESUMO

Palavras chave: entacapona, cromatografia líquida de alta eficiência, método de dissolução, validação de métodos analíticos, estabilidade.

Entacapona, inibidor da catecol-o-metiltransferase, é utilizada como terapia adjuvante à associação de levodopa + carbidopa no tratamento da doença de Parkinson. No Brasil encontra-se disponível na forma de comprimidos revestidos com o nome comercial de Comtan[®]. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos para o controle de qualidade da entacapona em comprimidos revestidos e método de dissolução, bem como, estudos preliminares de estabilidade durante o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e na determinação da cinética de fotodegradação. Devido à falta da substância química de referência de entacapona, realizou-se a extração do fármaco a partir dos comprimidos e a caracterização qualitativa e quantitativa por calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectrofotometria na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e volumetria em meio não-aquoso. Métodos utilizando cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e CLAE foram utilizados para análise qualitativa de entacapona. A validação dos métodos para determinação quantitativa (UV e CLAE) foi realizada de acordo os parâmetros das principais Guias Oficiais (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 30, 2007). O método de dissolução foi desenvolvido e validado de acordo com a USP. Os métodos qualitativos e quantitativos descritos nesse trabalho demonstraram-se adequados para determinação de entacapona em comprimidos revestidos. Para o método de dissolução as seguintes condições foram selecionadas: solução tampão acetato pH 5,3 como meio, utilizando pás a 50 rpm. A cinética de fotodegradação em metanol, frente à luz UV indicou reação de segunda ordem. Análises por CLAE-EM/EM sugerem que o produto de fotodegradação formado seja o isômero geométrico de entacapona (Z-entacapona).

ABSTRACT

“Entacapone: Development and validation of analytical methods, dissolution method and preliminary study of stability”.

Keywords: entacapone, high-performance liquid chromatography, dissolution method, validation of analytical methods, stability.

Entacapone, inhibitor of the catechol-*O*-methyltransferase, is used as adjunct with levodopa + carbidopa association in the treatment of Parkinson's disease. In Brazil it is available in tablets coated with the commercial name of Comtan[®]. The aim of this work was to develop and validate analytical methods for the quality control of entacapone in coated tablets, as well as, preliminary studies of stability during the development of stability-indicating high-performance liquid chromatography (HPLC) method and determination of photodegradation kinetics. Due to the lack of entacapone reference standard, it was necessary to extract the drug by the tablets and the qualitative and quantitative characterization was carried out by differential scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance (NMR) and non-aqueous titration of weak acid. Methods using thin-layer chromatography (TLC), ultraviolet spectroscopy (UV) and HPLC were performed to entacapone qualitative analysis. The validation of the methods for quantitative determination (UV and CLAE) was accomplished of agreement the parameters of the main Official Guides (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 30, 2007). The dissolution test was developed and validate in according by USP. The qualitative and quantitative methods described in this study demonstrated to be adequate to determination of entacapone in coated tablets. For dissolution test the following conditions were selected: buffer acetate pH 5,3 as medium, using paddles at 50 rpm. The photodegradation kinetics in methanol, front to UV light indicated the second-order reaction. LC-MS/MS method results suggest that the photodegradation product was the geometric isomer of entacapone (*Z*-entacapone).

1. INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da expectativa de vida média da população mundial, a doença de Parkinson e demais doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e a isquemia cerebral) têm se tornado um problema de saúde pública mundial (FORMAN *et al.*, 2004).

A doença de Parkinson é um distúrbio neurológico caracterizado pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra e por inclusões neuronais conhecidas por corpúsculos de Lewy (RIEDER e ROTTA, 2004). A doença provoca severa incapacidade ou morte em 25% dos pacientes com até 5 anos da doença, em 65% dos pacientes com até 10 anos e 80% dos pacientes com até 15 anos (EMEA, 2005). A morte, normalmente, resulta de complicações da imobilidade, incluindo pneumonia por aspiração ou embolia pulmonar (STANDAERT e YOUNG, 2003).

A associação de levodopa + carbidopa é a principal escolha para o tratamento da doença de Parkinson, bem como a utilização dos inibidores da catecol-o-metiltransferase (COMT), como terapia adjuvante (WEINER e SHULMAN, 2003; EMEA, 2005). No Brasil, os principais inibidores da COMT comercializados são entacapona e tolcapona (KOROKOLVAS, 2004).

A autorização de introdução no mercado de Comtan[®] (entacapona) foi concedida em setembro de 1998 pela European Medicines Agency (EMEA), em nome da Novartis Europharm Limited. Após cinco anos a autorização foi renovada, concluindo que a relação risco/benefício de Comtan[®] se mantinha favorável (EMEA, 2005). Nos Estados Unidos, a autorização de comercialização foi concedida em Outubro de 1999 (FDA, 2005) e no Brasil em dezembro de 1998 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005). O fármaco também é comercializado em associação com levodopa + carbidopa em comprimidos revestidos.

Na literatura científica pesquisada constam trabalhos que relatam a quantificação de entacapona e seu isômero geométrico em fluidos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a quantificação dos metabólitos de entacapona por eletroforese capilar (EC), EC acoplada a espectrometria de massas (EM) e por CLAE acoplada a EM (KARLSSON e WIKBERG 1992; WIKBERG *et al.*, 1993; KESKI-HYNNILLÄ *et al.*, 1998; LEHTONEN *et al.*, 1999; KESKI-HYNNILLÄ *et al.*, 2000; KESKI-HYNNILLÄ *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2005). Em relação à quantificação de entacapona em matéria-prima e comprimidos revestidos consta apenas um método de análise por espectrofotometria na região do visível (RAJESWARI *et al.*, 2006).

As condições do ensaio de dissolução para comprimidos de entacapona são descritas pelo Food and Drug Administration (FDA, 2006), porém não existem referências em relação ao método de quantificação. EMEA (2005) também faz referência ao ensaio, porém apenas cita o meio de dissolução utilizado. Em relação a estudos de estabilidade apenas constam ensaios realizados na matéria-prima e em comprimidos de entacapona para registro do medicamento (EMEA, 2005). Além disso, os Códigos Oficiais não descrevem metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa do fármaco e na forma farmacêutica de comprimidos revestidos.

Com base no exposto, a validação de métodos analíticos para realização do controle de qualidade do fármaco entacapona em comprimidos revestidos, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa, o método de dissolução e a determinação da cinética de degradação em condições fotolíticas, justificam a realização deste trabalho.

A validação de métodos analíticos, utilizados para avaliar a qualidade do fármaco entacapona, garante que os mesmos atendam às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; ICH 2005, USP 30, 2007), demonstrando a importância do desenvolvimento deste trabalho.

2. OBJETIVO GERAL

2.1 Objetivo geral

↳ Desenvolver e validar métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa, ensaio de dissolução e estudo preliminar de estabilidade de entacapona em comprimidos revestidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma síndrome neurodegenerativa, que apresenta como principal característica patológica a perda dos neurônios dopaminérgicos pigmentados da parte compacta da substância negra, com o aparecimento de inclusões intracelulares conhecidas como corpúsculos de Lewy. A perda progressiva de neurônios dopaminérgicos constitui um aspecto do envelhecimento normal, entretanto, a perda de 70 a 80% de neurônios dopaminérgicos caracteriza a doença de Parkinson sintomática (STANDAERT e YOUNG, 2003).

A doença de Parkinson é diagnosticada pelo aparecimento de sintomas motores, caracterizados por tremor, rigidez ou acinesia, bradicinesia e instabilidade postural (KOLLER e MONTGOMERY, 1997). O primeiro sintoma característico é o tremor unilateral de um dos membros. Como o processo degenerativo afeta outras partes do cérebro, além dos gânglios basais, a doença também está associada à demência (RANG *et al.*, 2004). Porém, devido à frequência com que essas manifestações clínicas ocorrem em outras doenças, a precisão diagnóstica é extremamente prejudicada (RIEDER e ROTTA, 2004).

Apesar da identificação de mutações gênicas e a presença de toxinas exógenas e endógenas associados à doença de Parkinson, a etiologia ainda é desconhecida (RIEDER e ROTTA, 2004; GOSAL *et al.*, 2006).

A incidência é estimada em 4,5 a 16 casos por 100.000 indivíduos ao ano. A doença é rara antes dos 50 anos de idade, porém, a incidência aumenta de 5 casos na faixa etária de 45 a 49 anos para 90 casos por 100.000 na faixa etária com mais de 75 anos e, em média, 2 a 3% da população ocidental irá desenvolver a doença (EMEA, 2005). RIEDER e ROTTA (2004) afirmam que a doença atinge cerca de 1 a 2% da população acima dos 65 anos.

3.2. Tratamento farmacológico

Os medicamentos atualmente utilizados no tratamento da doença de Parkinson proporcionam alívio sintomático, sem modificar a patogenia da doença ou, em outras palavras, a evolução natural da doença prossegue apesar do tratamento (STANDAERT e YOUNG, 2003; WEINER e SHULMAN, 2003).

No tratamento da doença de Parkinson são utilizadas diversas classes terapêuticas, entre elas:

- Agentes anticolinérgicos: triexifenidil, benztropina e biperideno;
- Precursores dopaminérgicos combinados com inibidores da descarboxilase de aminoácidos aromáticos periféricos: levodopa + carbidopa e levodopa + benserazida;
- Agonistas dopaminérgicos: bromocriptina, lisurida, pergolida e ropinirol;
- Inibidores da monoamina-oxidase do tipo B: selegilina;
- Liberadores de dopamina: amantadina;
- Inibidores da catecol-o-metiltransferase (COMT): tolcapona e entacapona (STANDAERT e YOUNG, 2003; RIEDER e ROTTA, 2004).

A associação de levodopa + carbidopa é a principal escolha para o tratamento da doença de Parkinson. A levodopa, por meio da enzima descarboxilase, é convertida em dopamina, principal neurotransmissor depletado na doença. Após a administração oral, a levodopa é completamente absorvida, alcançando pico sérico em 15 a 45 minutos. Na circulação, sofre conversão à dopamina pela descarboxilase e à 3-O-metildopa, por ação da COMT e, com isso, apenas 5% da levodopa circulante chega ao cérebro, caso ela não esteja associada aos inibidores da descarboxilase (carbidopa ou benzerazida), os quais impedem a conversão periférica (RIEDER e ROTTA, 2004). A utilização de um inibidor da descarboxilase reduz em cerca de 10 vezes a dose necessária de levodopa e diminui os efeitos colaterais periféricos associados à dopamina. A descarboxilação da levodopa à

dopamina ocorre rapidamente dentro do cérebro, pois os inibidores da descarboxilase não ultrapassam a barreira hematoencefálica (RANG *et al.*, 2004).

Porém, mesmo em associação, a utilização de levodopa continua apresentando alguns efeitos colaterais indesejáveis, tais como as discinesias, problemas psiquiátricos e flutuações da função motora (WEINER e SHULMAN, 2003).

As flutuações da função motora são uma das principais complicações do tratamento prolongado durante a utilização da associação de levodopa + carbidopa. Após um certo período de tratamento, observa-se que os efeitos benéficos da medicação começam a diminuir antes do horário da próxima dose (acinesia própria do final da dose). A acinesia é mais preponderante no período da manhã, antes da primeira dose do dia (acinesia matinal), ou seja, muitas vezes uma ou duas doses da medicação não produzem o efeito desejado. Posteriormente, as flutuações entre o estado de boa mobilidade e dessa para as manifestações parkinsonianas podem tornar-se aleatórias, sem relação evidente com os horários das doses, sobretudo em pacientes que administram várias doses de levodopa (WEINER e SHULMAN, 2003). As flutuações, em alguns pacientes, refletem a variação da concentração plasmática da levodopa, e sugere-se que, com o decorrer da doença, perde-se a capacidade dos neurônios de armazenarem dopamina, de modo que o benefício terapêutico da levodopa depende da formação contínua da dopamina extraneuronal, o qual é dependente da administração de levodopa (KOLLER, 1996; RANG *et al.*, 2004).

A transição entre a função motora relativamente normal e o retorno à sintomatologia da doença de Parkinson pode levar de alguns minutos a três ou quatro horas. Esse fenômeno chamado *on-off* acontece quando as flutuações entre esses dois extremos se processam de maneira súbita e imprevisível. O quadro clínico dessas flutuações pode ser observado mesmo durante um rápido exame médico, ou seja, o paciente pode entrar em estado parkinsoniano grave (*off*), apresentando acentuada rigidez tipo roda dentada, tremor de repouso e acinesia grave, impossibilitando-o de levantar-se da cadeira, ao lado de comprometimento dos reflexos posturais, a ponto de cair ou não conseguir manter-se em pé. Porém, com administração dos fármacos, dentro de poucos minutos, o paciente volta ao

estado normal, não apresentando tremor e sendo capaz de caminhar sem dar a menor impressão de ter sintomas parkinsonianos (WEINER e SHULMAN, 2003).

Esse problema pode estar associado às alterações da capacidade de resposta dos receptores centrais à dopamina, assim como às flutuações dos níveis do neurotransmissor disponível. Existem numerosas medidas terapêuticas que podem ser adotadas diante das flutuações de motricidade, entre elas a administração de um inibidor da COMT (SCHAPIRA e OBESO, 2000; WEINER e SHULMAN, 2003). Estudos reportaram que 50% dos pacientes podem desenvolver flutuações da função motora após dois ou três anos de tratamento com a associação de levodopa + carbidopa (GORDIN *et al.*, 2004).

3.3. Inibidores da COMT

A descoberta que a presença do grupamento nitrocatecol em determinadas moléculas causava alta atividade inibitória da COMT, proporcionou uma disputa entre a Roche[®] e a Orion[®] para desenvolvimento de fármacos com essas propriedades farmacológicas. No final dos anos 80, as duas empresas registraram os produtos nos Estados Unidos e na Europa com os nomes de tolcapona e entacapona, respectivamente (GORDIN *et al.*, 2004).

Os inibidores da COMT, como o nome sugere, têm a capacidade de inibir essa enzima e, com isso, evitar o metabolismo da levodopa, evitando a formação de 3-O-metildopa e prolongando a eliminação plasmática. O aumento na quantidade de levodopa disponível para penetrar a barreira hematoencefálica aumenta a biodisponibilidade e prolonga a meia-vida efetiva do fármaco (KERÄNEN *et al.*, 1991; STOCCHI *et al.*, 2004). A inibição é seletiva, reversível e reduz significativamente o fenômeno de desgaste em pacientes com flutuações na doença de Parkinson, aumentando o tempo *on* em cerca de 37%. A administração de entacapona juntamente com levodopa e um inibidor da descarboxilase proporciona aumento significativo da eficácia clínica do tratamento em pacientes com flutuações motoras (STOCCHI *et al.*, 2004).

Embora o mecanismo de ação e os efeitos clínicos dos inibidores da COMT sejam semelhantes, eles diferem em relação aos efeitos adversos e as propriedades farmacocinéticas. A tolcapona tem duração de ação maior e atua em nível periférico e central, enquanto a entacapona tem ação mais curta e atua, principalmente, em nível periférico. Entretanto, pesquisas científicas associam a tolcapona a casos de toxicidade hepática potencialmente fatal e, devido a isso, pacientes submetidos ao tratamento com esse fármaco devem ser monitorados regularmente. Em relação a entacapona, a literatura pesquisada não descreve casos de hepatotoxicidade (WATERS, 2000; STANDAERT e YOUNG, 2003). KORLIPARA e colaboradores (2004), através do estudo de toxicidade em cultura de células de neuroblastoma humanos, demonstraram que o fármaco entacapona não é tóxico.

3.3. Farmacocinética

O fármaco entacapona é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, atingindo o pico de concentração plasmática máxima em 1 hora. Apresenta uma grande intra e intervariação individual, sofre extensivo metabolismo de primeira passagem no fígado e a biodisponibilidade é de, aproximadamente, 35% após administração oral (WIKBERG *et al.*, 1993).

A baixa biodisponibilidade pode estar relacionada ao reduzido valor do pKa de entacapona (4,5), pois em pH intestinal o fármaco está ionizado. Fármacos que apresentam grupamento ionizável são mais facilmente absorvidos através da parede do intestino quando estão na forma não-ionizada. Além disso, a diminuição do pH diminui a solubilidade de entacapona e limita a absorção no estômago. Por essa razão, a síntese de pró-fármacos com a finalidade de aumentar a solubilidade em pH ácido e as características lipofílicas em pH neutro, têm sido objetivo de pesquisas científicas (LEPPÄNEN *et al.*, 2000; SAVOLAINEN *et al.*, 2000). No entanto, conforme afirmado por SAVOLAINEN e colaboradores (2000), a baixa biodisponibilidade não está associada apenas às propriedades físico-químicas, pois a síntese do pró-fármaco *N*-alquil carbamato, mais lipofílico e mais solúvel, não melhorou a biodisponibilidade.

O principal metabólito de entacapona em plasma humano é o isômero Z-entacapona, porém o mesmo representa apenas 5% da área sobre a curva dos isômeros. A eliminação do fármaco ocorre principalmente pelas fezes na forma de metabólitos conjugados glicuronídicos de entacapona e de seu isômero Z-entacapona (WIKBERG *et al.*, 1993; HOLM e SPENCER, 1999).

3.4. Métodos de análise

Apenas um método de quantificação de entacapona em matéria-prima e comprimidos revestidos é descrito na literatura pesquisada. O método por espectrofotometria na região do visível a 689 nm baseia-se na reação colorimétrica das hidroxilas fenólicas de entacapona com cloreto férrico e ferrocianeto de potássio (RAJESWARI *et al.*, 2006).

Em relação à determinação de entacapona e metabólitos em fluidos biológicos por métodos cromatográficos e eletroforéticos acoplados ou não a espectrometria de massas (EM) foram encontrados os seguintes métodos validados, citados abaixo.

KARLSSON e WIKBERG (1992) propuseram um método para quantificação de entacapona e seu isômero (Z-entacapona) em plasma humano e urina por CLAE, com detecção amperométrica e utilizando como fase móvel mistura de tampões pH 2,0 (fosfato de sódio, ácido cítrico e EDTA), metanol e tetraidrofurano (63:50:5).

WIKBERG e colaboradores (1993) propuseram um método para identificação e quantificação de entacapona e metabólitos, porém em urina de ratos e humanos. O método utilizado foi a CLAE com detector ultravioleta de arranjo de fotodiodos (310 nm) e coluna em fase reversa de octadecilsilano (C18).

A utilização de EC com detecção a 335 nm foi descrita por LEHTONEN e colaboradores (1999) para quantificação de metabólitos de entacapona e de metabólitos do isômero Z-entacapona. Como eletrólito foi utilizada solução tampão fosfato pH 7,0 contendo 25 mM de fosfato de potássio monobásico, 50 mM borato e 20 mM de dodecil sulfato de sódio, fase estacionária capilar de sílica fundida e voltagem de 15 Kv.

KESKI-HYNNILLÄ e colaboradores (1998) validaram um método para quantificar metabólitos de entacapona, do isômero (*Z*-entacapona) e de outros inibidores da COMT (nitecapona e tolcapona) utilizando métodos acoplados de CLAE e EM. Em 2001, KESKI-HYNNILLÄ e colaboradores, também, publicaram um método para quantificação de metabólitos de entacapona, utilizando CLAE e EM acoplados.

O emprego de EC acoplada a EM foi descrito para quantificação de metabólitos de entacapona e do seu isômero em urina. Acetato de amônio 20 mM e o metabólito de nitecapona (3-*O*-Glucuronídico) foram utilizados como eletrólito e padrão interno, respectivamente (KESKI-HYNNILLÄ *et al.*, 2000).

Recentemente, RAMAKRISHNA e colaboradores (2005) validaram um método para quantificação de entacapona em plasma humano, utilizando CLAE com detector ultravioleta a 310 nm, coluna octadecilsilano (C18) e fase móvel constituída de mistura de tampão fosfato de potássio 30 mM e acetonitrila (62:38). A extração do fármaco do plasma foi realizada através da extração líquido-líquido utilizando mistura de acetato de etila e *n*-hexano (50:50).

Em relação ao método de dissolução, o FDA (2006) descreveu as condições para a realização do ensaio: 900 ml de tampão fosfato de potássio pH 5,5, utilizando pás a 50 rpm e coletas em 10, 20, 30 e 45 minutos, no entanto, não foram descritas as condições espectrofotométricas ou cromatográficas para quantificação do fármaco dissolvido. O documento, que aprovou a comercialização de medicamento (EMEA, 2005), cita apenas que o meio de dissolução tampão fosfato pH 5,5 foi o mais adequado, no entanto, as demais condições do ensaio não são descritas.

Estudos de estabilidade apenas são referenciados pelo EMEA (2005) para registro do produto, onde a estabilidade do fármaco foi verificada a 25 °C e 60% de umidade relativa (UR). A estabilidade em comprimidos foi realizada à temperatura ambiente e 75% de UR, 25 °C e 60% de UR e em condições fotolíticas. Os resultados demonstraram que não houve alteração nas características físico-químicas dos produtos.

3.5. Descrição

O derivado nitrocatecol entacapona (Figura 3.1) apresenta as seguintes características:

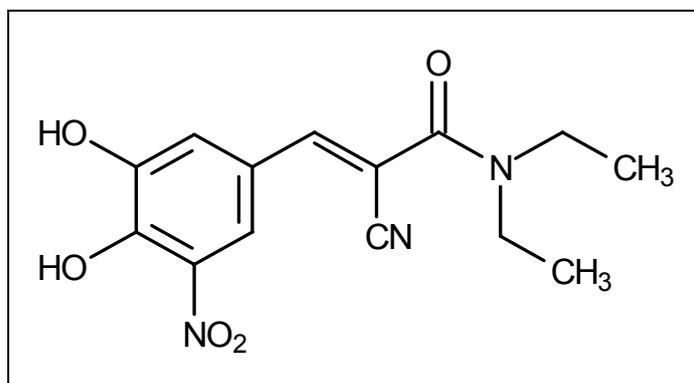


FIGURA 3.1. Estrutura química de entacapona (THE MERCK Index, 2000).

- Nome químico: (E)-2-ciano-3-(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil)-N,N-dietil-2-propenamida (THE MERCK Index, 2000);
- O fármaco entacapona pode ser sintetizado em duas formas estereoisômeras: *E* = *trans* e *Z* = *cis*. O isômero *E* foi escolhido por apresentar uma rota de síntese mais favorável e, devido a isso, o isômero *Z* foi considerado uma impureza de síntese. A avaliação da atividade farmacológica e toxicológica, realizada através de estudos clínicos e toxicológicos, demonstrou que ambos os isômeros são similares (EMEA, 2005). No entanto, LEPPÄNEN e colaboradores (2001) afirmaram que o isômero *E* é mais ativo.
- Fórmula molecular: C₁₄H₁₅N₃O (THE MERCK Index, 2000; MOFFAT *et al.*, 2004);
- Massa molecular: 305,29 (THE MERCK Index, 2000);
- Denominação Comum Internacional (DCI): entacapone (EMEA, 2005);

- Denominação Comum Brasileira (DCB): entacapona;
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): 130929-57-6 (THE MERCK Index, 2000);
- Faixa de fusão: 162 -163° C (THE MERCK Index, 2000);
- Solubilidade: praticamente insolúvel em água (EMEA, 2005). Em tampão fosfato 0,16 M pH 5,0 e pH 7,4: 77 µg/ml e 1752 µg/ml, respectivamente (SAVOLAINEN *et al*, 2000). LEPPÄNEN e colaboradores (2000) também descreveram a solubilidade em tampão pH 1,2 igual a 17 µg/ml;
- pKa: 4,5 (THE MERCK Index, 2000).

**4. CAPÍTULO I - EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA
DE TRABALHO (SQT) DE ENTACAPONA**

4.1. Introdução

A pureza das substâncias de referência é de fundamental importância para a validação de métodos analíticos. De acordo com o FDA, existem duas categorias de substâncias de referência: compendiais e não-compendiais. As substâncias de referência compendiais são aquelas adquiridas comercialmente de fontes como a USP e não necessitam de caracterização posterior. As substâncias de referência não-compendiais são aquelas com elevado teor de pureza, entretanto necessitam ser cuidadosamente caracterizadas (SWARTZ e KRULL, 1998).

Devido à negativa da empresa detentora da patente do produto (Orion Corporation) e da Indústria farmacêutica que o comercializa no Brasil (Novartis), bem como do alto custo para aquisição da substância química de referência de entacapona, optou-se por realizar a extração a partir dos comprimidos e, posteriormente, a caracterização do fármaco para desenvolver este trabalho.

4.2. Objetivos específicos

- ↳ Desenvolver método de extração de entacapona a partir dos comprimidos revestidos;
- ↳ Caracterizar qualitativamente e quantitativamente o produto extraído da formulação através de análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectrofotometria na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) e volumetria em meio não-aquoso.

4.3. Produto Farmacêutico

Comprimidos revestidos de entacapona 200 mg, sob o nome comercial de Comtam[®], fabricados pela Orion (Finlândia). Para a comercialização no Brasil são importados, embalados e distribuídos pela Novartis Biociências S. A.

Os excipientes presentes na formulação são: celulose microcristalina, manitol, croscarmelose sódica, óleo vegetal hidrogenado, hidroxipropilmetilcelulose, polissorbato 80, glicerol 85%, sacarose, estearato de magnésio, óxido de ferro amarelo, óxido de ferro vermelho e dióxido de titânio.

O produto farmacêutico utilizado neste trabalho apresenta data de fabricação de 09/2004, data de validade de 08/2007 e número de lote Z0009 (NOVARTIS, 2004).

4.4. Parte Experimental

4.4.1. Extração do fármaco da formulação

A extração do fármaco entacapona dos comprimidos foi realizada, individualmente, nos seguintes solventes:

- Etanol (CLAE);
- Acetato de etila (P.A.) : hexano (P.A.) (1:1) (v/v);
- Acetonitrila (CLAE).

Para realizar a extração de entacapona da forma farmacêutica, transferiram-se 5 comprimidos, previamente triturados, para erlenmeyer de 500 ml, com auxílio de 250 ml de solvente e agitou-se, magneticamente, por 10 minutos. Filtrou-se em filtro quantitativo Framex, modelo 389¹, para separar os produtos insolúveis presentes na formulação e realizou-se a evaporação dos solventes em evaporador rotatório Fisatom, modelo 802D, a 40 °C. O resíduo obtido foi dessecado em dessecador a vácuo, à temperatura ambiente por 24 horas. Todo procedimento descrito foi realizado sob proteção da luz.

Como resultado das extrações nos três diferentes solventes, obtiveram-se produtos de cor alaranjada, denominados inicialmente de produto de extração em etanol (PEE), produto de extração em acetato de etila e hexano (PEAH) e produto de extração em acetonitrila (PEA).

4.4.2. Caracterização dos produtos de extração

Utilizaram-se as seguintes técnicas para caracterização dos produtos de extração: calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) e volumetria com detecção potenciométrica em meio não-aquoso.

4.4.2.1 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N_2) FC-60-A, integrador TA-60WS e software de controle e análise TA-60 versão 2.0.

Para realizar o ensaio, transferiu-se, individualmente, aproximadamente 1,0 mg dos produtos de extração, obtidos nos diferentes solventes, para portas-amostra de alumínio com capacidade de 4 μl , as quais foram seladas e colocadas no forno do calorímetro exploratório de varredura. A rampa de aquecimento utilizada foi de 5 $^\circ\text{C}/\text{minuto}$.

4.4.2.1.1 Resultados

As Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 apresentam as curvas de aquecimento obtidas por DSC para os PEE, PEAH e PEA, respectivamente.

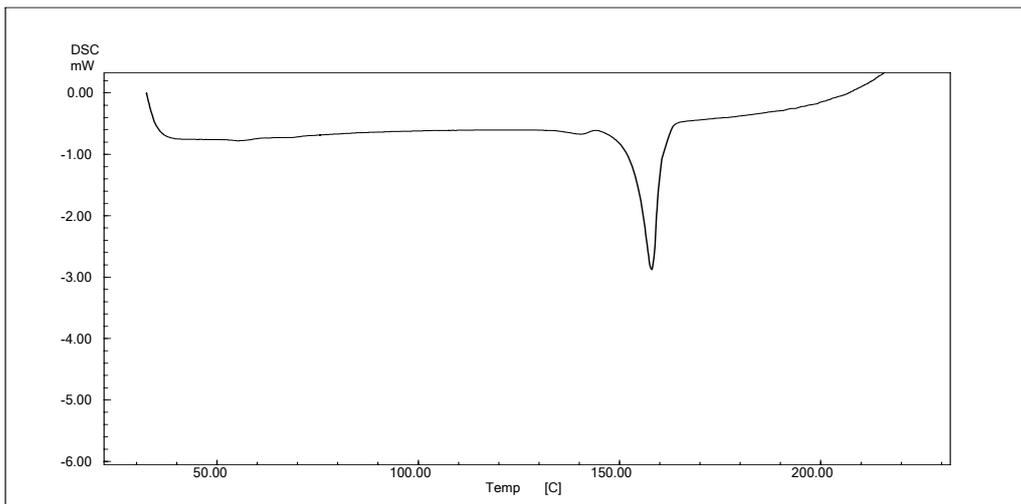


FIGURA 4.1. Curva de aquecimento obtida por DSC para o PEE.

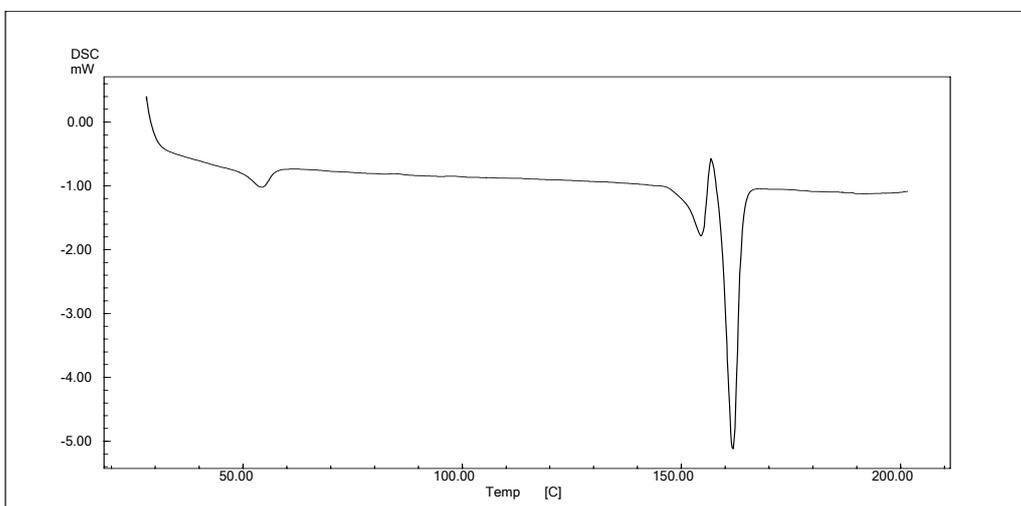


FIGURA 4.2. Curva de aquecimento obtida por DSC para o PEAH.

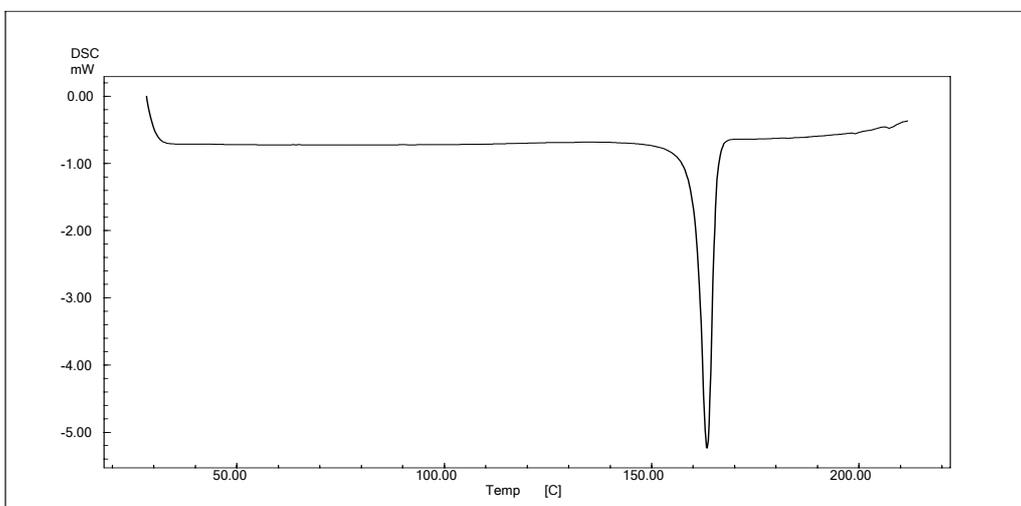


FIGURA 4.3. Curva de aquecimento obtida por DSC para o PEA.

A faixa de fusão obtida para o PEE mostrou-se extremamente alargada (153,45 °C a 159,79 °C) em relação ao preconizado na bibliografia.

O PEAH apresentou faixa de fusão de 157,9 °C a 163,96 °C, no entanto observou-se um pico próximo ao pico atribuído ao fármaco entacapona.

A faixa de fusão obtida para o PEA foi de 160,61 °C a 165,6 °C.

4.4.2.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A caracterização do PEA por espectrofotometria na região do IV foi realizada através da preparação de uma pastilha contendo 1,5 mg da amostra do PEA e 150 mg de brometo de potássio (KBr). As análises foram realizadas em espectrofotômetro FTIR, marca Shimadzu, modelo 8001.

4.4.2.2.1. Resultados

O espectro na região do IV do PEA em pastilha de KBr, na faixa de 600 a 3800 cm^{-1} , está apresentado na Figura 4.4.

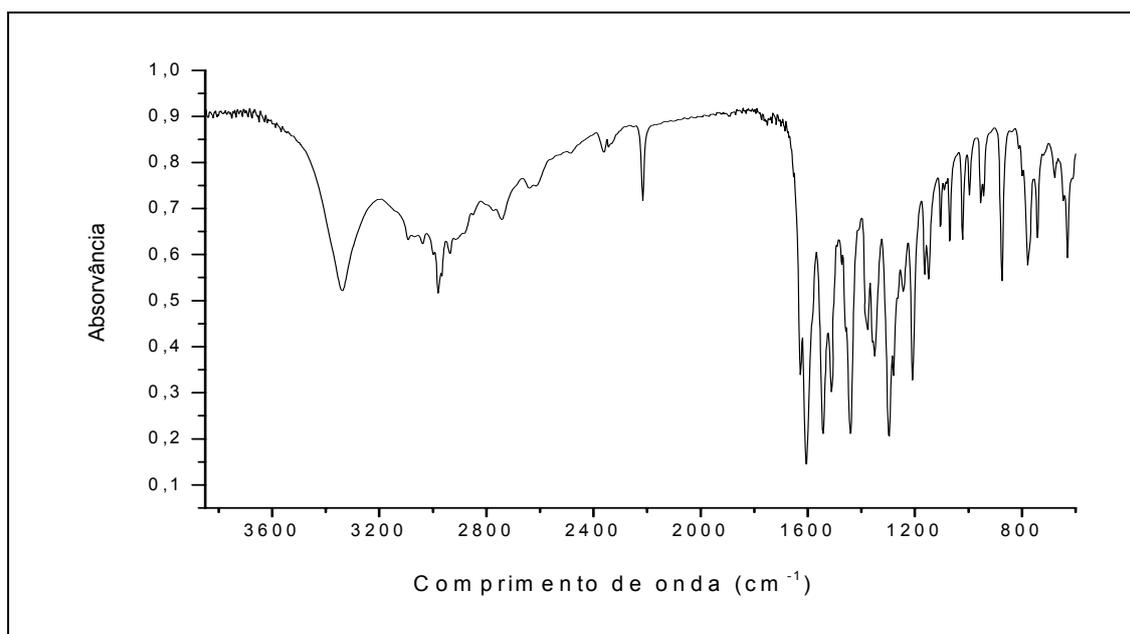


FIGURA 4.4. Espectro de absorção na região do IV do PEA em pastilhas de KBr.

A fim de verificar a presença de bandas adicionais no espectro de absorção na região do infravermelho do PEA, as quais poderiam ser caracterizadas como impurezas, realizou-se a comparação desse com o espectro presente na bibliografia (MOFFAT *et al.*, 2004).

Os espectros na região do IV do PEA e do padrão de entacapona (MOFFAT *et al.*, 2004) estão sobrepostos na Figura 4.5.

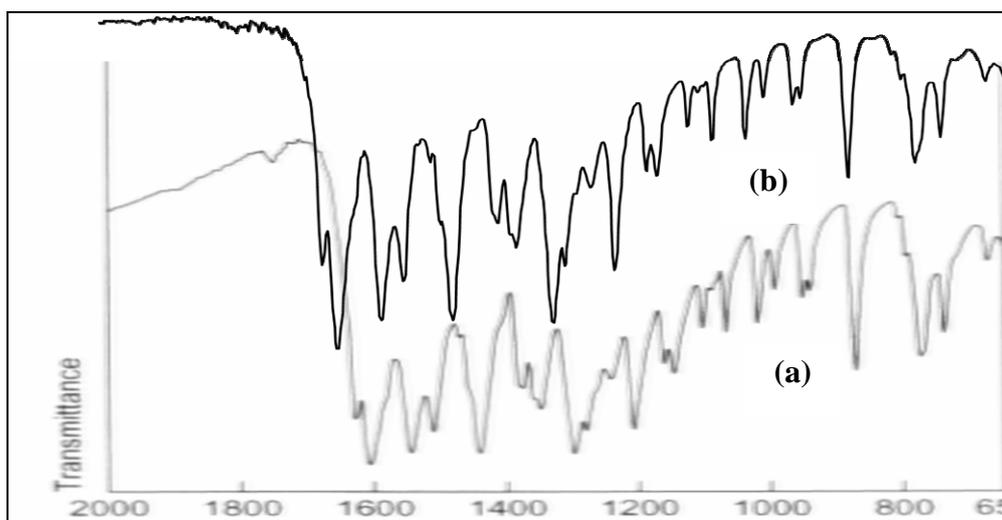


FIGURA 4.5. Espectros sobrepostos na região do IV (650 a 2000 cm^{-1}) do (a) padrão de entacapona publicado em MOFFAT e colaboradores (2004) e (b) do PEA em pastilhas de KBr.

A identificação dos grupamentos químicos característicos de cada banda de absorção do espectro do PEA encontra-se descrita na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 Freqüências de absorção das principais bandas do espectro na região do IV do PEA e suas respectivas atribuições (WIKBERG *et al.*, 1993; PAVIA *et al.*, 2001a; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Freqüência (cm ⁻¹)	Atribuição
3400	Deformação axial de OH
2260 – 2240	Deformação axial de CN
1610	Deformação axial CO de amida
1620	Deformação axial C=C
1550	Deformação axial assimétrica de NO ₂
1450	Deformação angular de CH ₂
1375	Deformação angular 2 CH ₃
1350	Deformação axial simétrica NO ₂
1220	Deformação angular de CO de fenol

4.4.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C)

Os espectros de RMN ¹H e de RMN ¹³C do PEA foram realizados em equipamento Varian, modelo YH-300 de 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono, utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) como solvente.

4.4.2.3.1. Resultados

O espectro de RMN ¹H do PEA está apresentado na Figura 4.6.

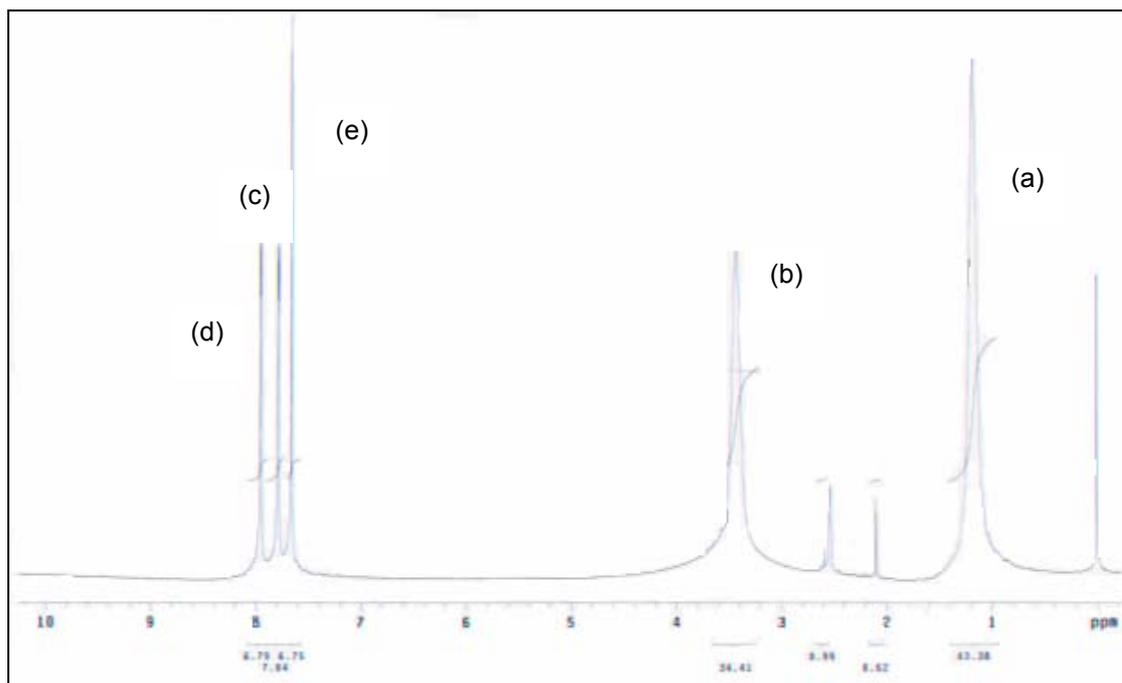


FIGURA 4.6. Espectro de RMN ^1H em DMSO_{d6} do PEA.

As atribuições do espectro de RMN ^1H , bem como a estrutura química de entacaona indicando essas atribuição, estão apresentadas nas Tabelas 4.2 e na Figura 4.7, respectivamente.

TABELA 4.2. Atribuições do espectro de RMN ^1H do PEA em DMSO_{d6} (GOTTLIEB *et al.*, 1997; LEPPÄNEN *et al.*, 2000; LEPPÄNEN *et al.*, 2001; PAVIA *et al.*, 2001b).

Hidrogênio	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade	Número de hidrogênios	Interpretação
A	1,18	multiplete	6	2 CH_3
-	2,10	multiplete	-	Acetonitrila*
-	2,50	multiplete	-	Solvente (DMSO_{d6})
B	3,40	multiplete	4	2 CH_2
C	7,78	dublete	1	H do aromático
D	7,95	singleto	1	H da liga dupla
E	7,60	dublete	1	H do aromático

* impureza da extração

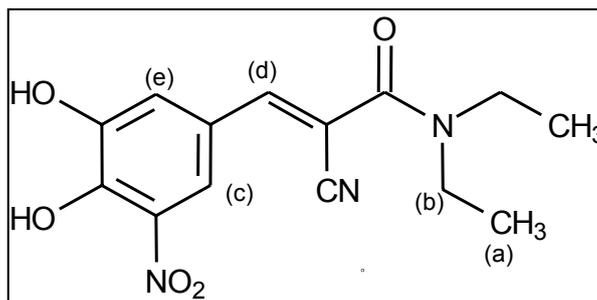


FIGURA 4.7. Estrutura química de entacapona e respectivas atribuições do espectro de RMN ¹H em *DMSO*_{d6}.

O espectro de RMN ¹³C do PEA está apresentado na Figura 4.8.

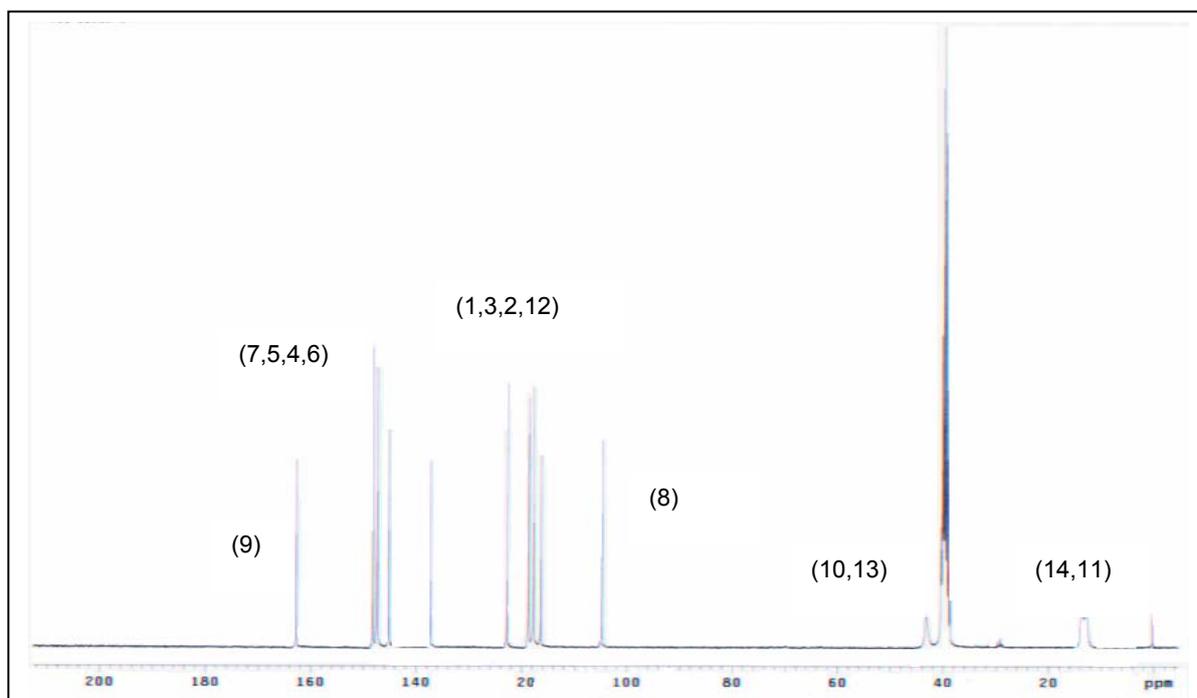


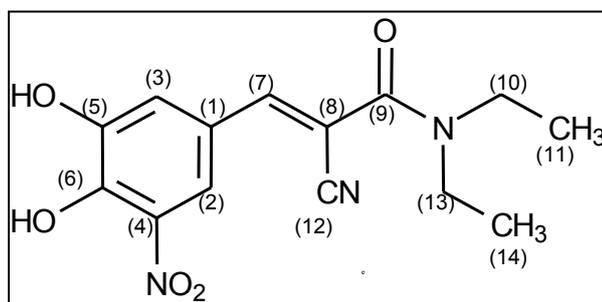
FIGURA 4.8. Espectro de RMN ¹³C em *DMSO*_{d6} do PEA.

As atribuições do espectro de RMN ¹³C, bem como a estrutura química de entacapona indicando essas atribuição, estão apresentadas nas Tabelas 4.3 e na Figura 4.9, respectivamente.

TABELA 4.3 Atribuições do espectro de RMN ^{13}C do PEA em DMSO_{d6} (LEPPÄNEN *et al.*, 2000; LEPPÄNEN *et al.*, 2001; PAVIA *et al.*, 2001b).

Carbono	Deslocamento químico (ppm)	Interpretação	Carbono	Deslocamento químico (ppm)	Interpretação
C1	122,7	C aromático	C8	104,7	C = C
C2	117,7	C aromático	C9	162,7	C = O
C3	118,6	C aromático	C10	43,1	R - CH ₂ - N
C4	145,1	C aromático	C11	12,7	R- CH ₃
C5	147,3	C aromático	C12	116,3	C \equiv N
C6	137,2	C aromático	C13	39,5	R-CH ₂ -N
C7	148,1	C = C	C14	13,5	R- CH ₃

Os demais picos próximos ao deslocamento de 40 ppm correspondem ao solvente DMSO_{d6} (GOTTLIEB *et al.*, 1997).

**FIGURA 4.9.** Estrutura química da entacapona e respectivas atribuições do espectro de RMN ^{13}C em DMSO_{d6} .

4.4.2.4. Volumetria em meio não-aquoso

4.4.2.4.1. Condições volumétricas

A USP 30 (2007) e a F. Bras. IV, 1988 descrevem uma série de condições para a realização da volumetria em meio não-aquoso para determinação quantitativa de ácidos fracos.

A Tabela 4.4 descreve as condições volumétricas utilizadas para determinação quantitativa do PEA.

TABELA 4.4. Condições volumétricas utilizadas para determinação quantitativa do PEA.

Descrição	Condição
Titulante	Metóxido de sódio 0,05N SV
Solvente	Dimetilformamida
Detecção do ponto final	Potenciométrica - Eletrodo combinado de pH Digimed DME-CV1

4.4.2.4.2. Preparação e padronização da solução de metóxido de sódio 0,05 N SV

Pesou-se, cuidadosamente, 1,25 g de sódio metálico com auxílio de 75 ml de metanol (P. A.) e deixou-se em repouso até ocorrer a solubilização. Transferiu-se para balão volumétrico de 1l e completou-se o volume com tolueno. Para realizar a padronização foram pesados, aproximadamente, 40 mg de padrão primário de ácido benzóico (Merck), diluído em 40 ml de dimetilformamida e foi adicionado duas gotas de indicador azul de timol 1% (p/V) em dimetilformamida. A titulação foi realizada até o ponto final, visualizado por uma coloração azul intensa. O ensaio de padronização foi realizado em triplicata e adaptado a partir do descrito na USP 30 (2007).

4.4.2.4.3. Análise volumétrica do PEA

Pesou-se o equivalente a 90 mg do PEA e dilui-se em 80 ml de dimetilformamida. Agitou-se levemente com auxílio de magneto até ocorrer a solubilização e titulou-se com solução de metóxido de sódio 0,05 N SV. Para verificar a variação do potencial em milivolt (mV) e determinação do ponto final foi utilizado aparelho medidor de pH Digimed DM-20.

As soluções tituladas foram protegidas com filme de vedação (Para-film[®]) para evitar a exposição excessiva ao dióxido de carbono. A interferência do dióxido

de carbono foi determinada procedendo à titulação de 80 ml de dimetilformamida, como branco da amostra.

A equivalência do ponto final foi de 1 ml de metóxido de sódio 0,05 *N SV* para cada 15,265 mg de entacapona no PEA.

4.4.2.4.4. Resultados

Os resultados referentes à determinação quantitativa do PEA por volumetria em meio não-aquoso estão apresentados na Tabela 4.5.

TABELA 4.5. Determinação quantitativa do PEA por volumetria em meio não-aquoso.

Amostra	Teor (%)	Média (%)	DPR
1	97,45		
2	98,67		
3	98,24	98,00	0,44
4	98,01		
5	97,64		
6	97,99		

4.5. Discussão

Para a realização da extração do fármaco entacapona a partir dos comprimidos revestidos foram utilizados, individualmente, três solventes: etanol, mistura de acetato de etila e hexano (1:1) e acetonitrila. A utilização da mistura de acetato de etila e hexano (1:1) baseou-se na literatura, pois a mesma foi utilizada por KARLSSON e WIKBERG (1992) para extração de entacapona do plasma. A escolha de etanol e acetonitrila foi baseada na polaridade intermediária dos mesmos (5,2 e 6,2, respectivamente), solventes com polaridade superior a mistura de acetato de etila e hexano (2,15), porém em comparação com a água (9,0), menos polares. A

utilização da água foi descartada devido à baixa solubilidade do fármaco nesse meio (EMEA, 2005).

A extração do fármaco entacapona a partir dos comprimidos revestidos resultou em três produtos de extração, denominados: produto de extração em etanol (PEE), produto de extração em acetato de etila e hexano 1:1 (PEAH) e produto de extração em acetonitrila (PEA). Para caracterização de entacapona nesses produtos foram realizados ensaios por DSC. As técnicas de espectroscopia na região do IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C foram utilizadas posteriormente apenas para caracterização do PEA. A determinação quantitativa do teor de entacapona no PEA foi realizada utilizando a volumetria em meio não-aquoso.

A utilização da análise térmica por DSC para determinação da pureza de um produto farmacêutico é realizada assumindo que qualquer impureza presente diminuirá e alargará a faixa de fusão característica do produto puro. Isto significa que o perfil do pico de uma substância pura apresenta-se extremamente afilado em um espectro de DSC, no entanto, se existirem impurezas, nota-se a diminuição na temperatura da faixa de fusão e o pico torna-se mais alargado ou ainda o aparecimento de outros picos (FORD e TINMINS, 1989).

Os resultados da curva de pureza realizados no PEE (Figura 4.1) apresentaram uma faixa de fusão extremamente alargada (153,45 °C a 159,79°C) e inferior em relação à citada na literatura (162 °C a 163 °C), indicando, possivelmente, que alguns dos adjuvantes da formulação foram extraídos juntamente com o fármaco entacapona, o que pode ser caracterizado como impurezas no produto de extração. Resultados semelhantes foram encontrados com o PEAH (Figura 4.2), a faixa de fusão mostrou-se alargada e inferior (157,9 °C a 163,96 °C) à citada na literatura, o que caracteriza, também, a presença de impurezas nesse produto.

O ensaio realizado para avaliar a pureza do PEA (Figura 4.3) apresentou uma faixa de fusão de 160,61°C a 165,60°C, semelhante à preconizada na literatura, indicando um bom índice de pureza. Diante dos resultados obtidos nas análises por DSC, procedeu-se a caracterização apenas do produto de extração obtido em acetonitrila (PEA).

A espectroscopia no IV determina informações estruturais sobre a molécula em estudo. As absorções das ligações presentes na molécula são determinadas em faixas do espectro na região do IV, através da análise de bandas características dos grupos funcionais presentes (PAVIA *et al.*, 2001a).

O espectro de absorção no IV pode ser utilizado como a impressão digital da molécula, ou seja, comparando o espectro de absorção no IV de duas substâncias, pode-se estabelecer se as mesmas são idênticas. Se o espectro infravermelho coincidir banda a banda, pode-se concluir, na maioria dos casos, que as substâncias apresentam a mesma identidade (PAVIA *et al.*, 2001a).

O espectro de absorção no IV do PEA mostrou-se similar ao espectro apresentado por MOFFAT e colaboradores (2004) para o padrão de entacapona, demonstrando que o produto extraído tratava-se do fármaco em questão. A interpretação das bandas permitiu a obtenção de informações estruturais, através de grupos funcionais, que também confirmaram a identificação da molécula.

A caracterização do PEA também foi realizada através da RMN ^1H e RMN ^{13}C . A ressonância magnética nuclear é uma técnica extremamente eficaz para caracterizar exatamente uma estrutura química em matérias-primas e produtos acabados. A técnica também permite a detecção de impurezas (WATSON, 2005b).

Os resultados obtidos nos ensaios de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o PEA demonstraram que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de entacapona. A comparação com espectros da literatura (LEPPÄNEN *et al.*, 2000; LEPPÄNEN *et al.*, 2001) facilitou a interpretação, bem como, a literatura pesquisada confirmou os resultados obtidos (PAVIA *et al.*, 2001b). Conforme verificado nas Figuras 4.6 e 4,8, os sinais referentes aos substituintes da etila da amida apresentaram-se largos em ambos os espectros, no entanto, conforme LEPPÄNEN e colaboradores (2001), esses resultados devem-se à dificuldade de rotação dos substituintes da etila, causada pela conformação planar do grupamento ciano.

A volumetria em meio não-aquoso é uma técnica rápida e exata que permite a quantificação de fármacos denominados ácidos ou bases fracas, os quais não podem ser quantificados em meios aquosos (F. Bras. IV, 1988; USP 30, 2007). Por

essa razão, tais métodos são extremamente utilizados pelos Códigos Oficiais para quantificação de fármacos em matérias-primas. O fármaco entacapona como é um ácido fraco ($pK_a = 4,5$) foi quantificado por essa técnica utilizando detecção potenciométrica do ponto final e solução de metóxido de sódio 0,05 N SV como titulante. A utilização do indicador utilizado na padronização da solução titulante (azul de timol 1% em dimetilformamida) não foi possível, devido à interferência provocada pela cor alaranjada no ponto final.

Os resultados da determinação quantitativa em meio não-aquoso demonstraram um bom índice de pureza do PEA (98,00%), confirmando os resultados anteriormente encontrados na caracterização através das outras técnicas, viabilizando sua utilização. Diante desses resultados, o PEA, foi definido como substância química de trabalho (SQT) de entacapona nesse trabalho.

4.6. Conclusões

- O PEE apresentou faixa de fusão que diferiu daquela preconizada na literatura;
- O PEAH apresentou faixa de fusão próxima à preconizada na bibliografia, no entanto um pico adicional próximo à faixa de fusão característica do fármaco, o que sugere a presença de impurezas;
- O PEA apresentou faixa de fusão semelhante à preconizada na bibliografia, bem como, espectro na região do IV com a presença de todas as bandas presentes no espectro do padrão de entacapona;
- A interpretação do espectro de RMN 1H e RMN ^{13}C demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de entacapona;
- O resultado da quantificação por volumetria em meio não-aquoso com metóxido de sódio demonstrou a alta pureza de entacapona no PEA (98,00%);

- Tendo em vista os resultados obtidos caracterizou-se o PEA, como substância química de trabalho (SQT) de entacapona, utilizando-a no desenvolvimento e validação dos métodos propostos nesta dissertação.

**5. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO QUALITATIVA**

5.1. Introdução

A identificação de fármacos em produtos acabados pode ser realizada através da aplicação de técnicas como a cromatografia em camada delgada (CCD), a espectrofotometria na região do UV e do visível e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A CCD é uma técnica de separação que oferece fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo (LOPES, 1997). A verificação da seletividade do método proposto pode ser realizada através da aplicação de um fármaco estruturalmente semelhante ao fármaco teste.

A identificação de fármacos por espectrofotometria na região do UV e do visível é realizada através da comparação do espectro da solução amostra com o espectro de uma solução padrão do mesmo fármaco em determinada concentração. Além disso, verifica-se se os produtos apresentam os mesmos comprimentos de onda máximos e mínimos de absorção. Mesmo não sendo um método seletivo, possui ampla aplicação nos Códigos Oficiais (F. Bras. IV, 1988).

A CLAE, quando utilizada para identificação de compostos, realiza a comparação entre os tempos de retenção obtidos para o pico da solução amostra e da solução padrão do mesmo fármaco. A utilização de um detector de arranjo de fotodiodos permite, além da comparação do tempo de retenção, verificar a similaridade entre os espectros obtidos.

5.2. Objetivos específicos

↳ Desenvolver método por CCD, espectrofotometria na região do UV e do visível e CLAE para identificação de entacapona nos comprimidos revestidos.

5.3. Parte experimental

5.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As soluções da substância química de referência de adrenalina (Merck), da SQT de entacapona e da solução amostra dos comprimidos de entacapona foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg/ml. As soluções foram mantidas em ultra-som por 15 minutos, com posterior filtração da solução amostra dos comprimidos em papel filtro quantitativo Framex, modelo 389¹.

O desenvolvimento cromatográfico foi realizado em placas cromatográficas aluminizadas de sílica-gel 60 F₂₅₄ (Merck). As aplicações das soluções foram realizadas nas placas, as quais foram transferidas para cubas, previamente saturadas com o sistema eluente, constituído de uma mistura de isobutanol, metanol, água e ácido fórmico anidro (66,7:9,5:9,5:14,3). Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram retiradas da cuba e mantidas à temperatura ambiente para secar. A seguir, realizou-se a visualização das manchas, através da exposição das placas à lâmpada de UV 254 nm Vilber Lourmat 6 LC. Posteriormente, o Rx e os fatores de retenção (Rf) referentes aos fármacos aplicados foram determinados. Com exceção da água, os solventes utilizados foram de grau analítico.

5.3.1.2. Resultados

O cromatograma obtido por CCDE nas condições descritas acima, bem como os valores de Rf estão apresentados na Figura 5.1.

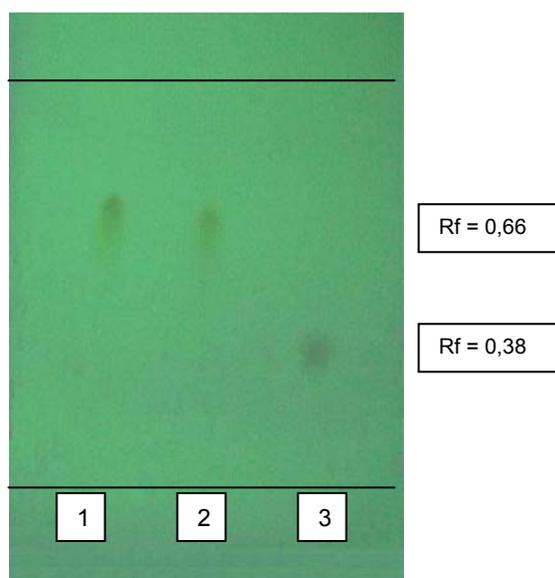


FIGURA 5.1. Cromatograma e R_f obtidos por CCD na análise da solução da SQT de entacapona (1), solução amostra dos comprimidos de entacapona (2) e da solução de adrenalina (3), revelados por luz UV 254 nm.

O Rx obtido entre o R_f da entacapona e o R_f da adrenalina foi de 1,74.

5.3.2. Espectrofotometria na região do UV e do visível

5.3.2.1. Determinação da solubilidade da SQT de entacapona

A determinação da solubilidade da SQT de entacapona foi realizada para verificar quais solventes poderiam ser utilizados como diluentes nos métodos qualitativos e quantitativos a serem desenvolvidos. Esse ensaio foi realizado conforme descrito na F. Bras. IV, 1988, através do método de partes, porém, ao invés de pesar 1 g da SQT de entacapona, pesou-se 10 mg. Os solventes utilizados para verificação da solubilidade foram: etanol, metanol, acetonitrila, acetato de etila, ácido clorídrico 0,1 M, hidróxido de sódio 0,1 M e soluções tampões fosfato pH 6,5, pH 7,0 e pH 7,5, mantidos à temperatura ambiente. Os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico e as soluções reagentes e soluções tampões foram preparadas de acordo com a USP 30 (2007).

5.3.2.2. Condições espectrofotométricas

Foram traçados espectros de absorção molecular na região do ultravioleta e do visível, das soluções de SQT e dos comprimidos de entacapona, na concentração de 10 µg/ml, diluídas em acetonitrila, metanol, etanol e tampão fosfato pH 7,5. As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro ultravioleta Shimadzu, modelo UV-160A, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm. Todos os procedimentos realizados foram protegidos da luz.

5.3.2.3. Resultados

Os resultados da determinação da solubilidade da SQT de entacapona, realizados conforme o método de partes descrito na F. Bras. IV, 1988, estão descritos na Tabela 5.1.

TABELA 5.1. Determinação da solubilidade da SQT de entacapona conforme a F. Bras. IV, 1988.

Solvente	Solubilidade
Etanol	Pouco solúvel
Metanol	Ligeiramente solúvel
Acetonitrila	Ligeiramente solúvel
Ácido clorídrico 0,1 M	Praticamente insolúvel ou insolúvel
Hidróxido de sódio 0,1 M	Ligeiramente solúvel
Tampão fosfato pH 6,5	Muito pouco solúvel
Tampão fosfato pH 7,0	Pouco solúvel
Tampão fosfato pH 7,5	Pouco solúvel
Acetato de etila	Muito pouco solúvel

Os espectros sobrepostos das soluções da SQT de entacapona e da amostra dos comprimidos de entacapona, diluídas em acetonitrila a 10 µg/ml estão apresentados na Figura 5.2.

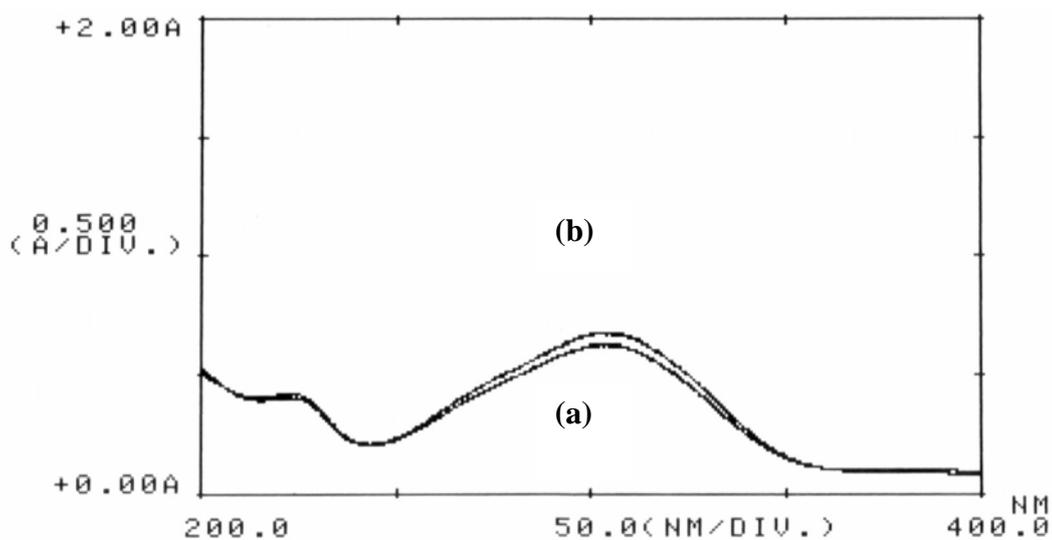


FIGURA 5.2. Espectros sobrepostos na região do UV (200 a 400 nm) da solução da SQT de entacapona (a) e da solução amostra dos comprimidos de entacapona (b) em acetonitrila a 10 µg/ml.

Os espectros sobrepostos das soluções da SQT de entacapona e da amostra dos comprimidos de entacapona, diluídas em metanol a 10 µg/ml estão apresentados na Figura 5.3.

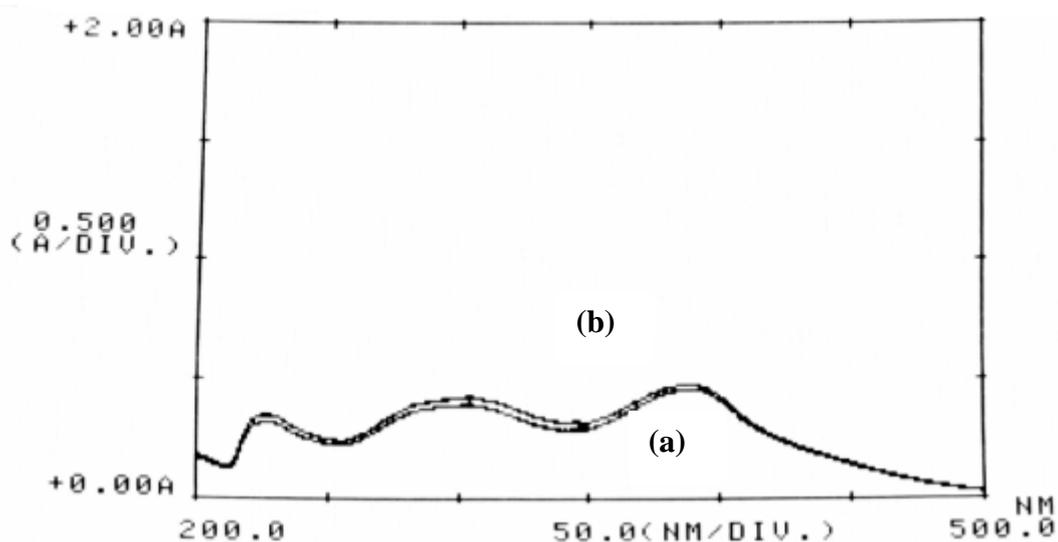


FIGURA 5.3. Espectros sobrepostos na região do UV e do visível (200 a 500 nm) da solução da SQT de entacapona (a) e da solução amostra dos comprimidos de entacapona (b) em etanol a 10 µg/ml.

Os espectros sobrepostos das soluções da SQT de entacapona e da amostra dos comprimidos de entacapona, diluídas em metanol a 10 µg/ml estão apresentados na Figura 5.4.

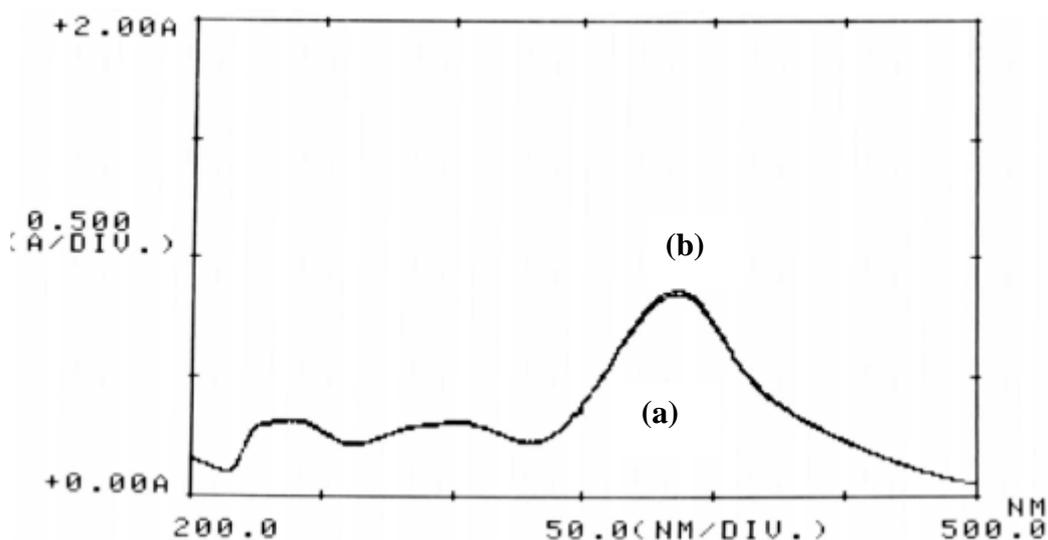


FIGURA 5.4. Espectros sobrepostos na região do UV e do visível (200 a 500 nm) da solução da SQT de entacapona (a) e da solução amostra dos comprimidos de entacapona (b) em metanol a 10 µg/ml.

Os espectros sobrepostos das soluções da SQT de entacapona e da amostra dos comprimidos de entacapona, diluídas em metanol a 10 µg/ml estão apresentados na Figura 5.5.

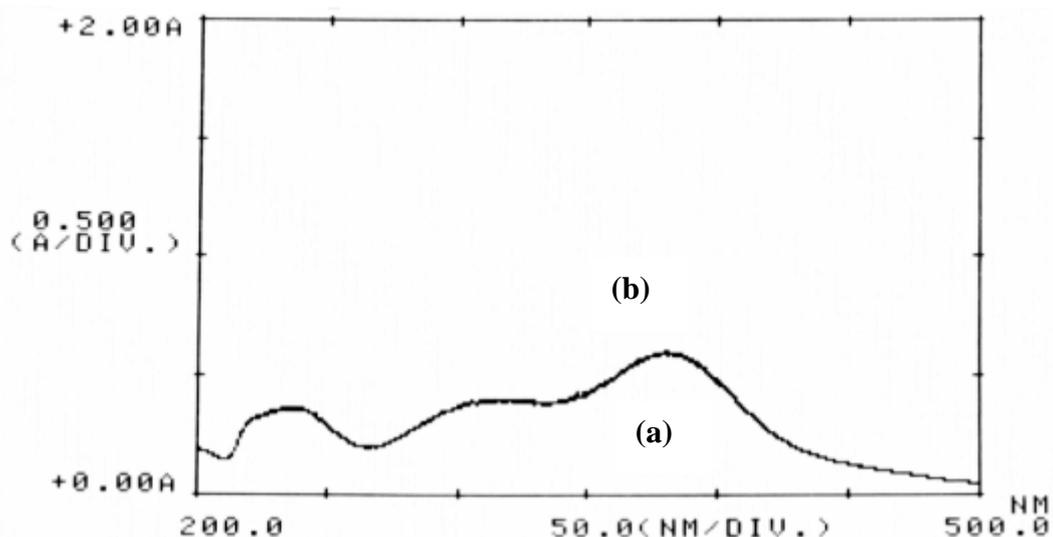


FIGURA 5.5. Espectros sobrepostos na região do UV e do visível (200 a 500 nm) da solução da SQT de entacapona (a) e da solução amostra dos comprimidos de entacapona (b) em solução tampão pH 7,5 a 10 µg/ml.

5.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.3.3.1. Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu equipado com controlador de sistema SCL10-ADvp operado pelo programa Class VP 6.12 SP2. O equipamento é composto de sistema binário de bombas LC-10ADvp, detector de arranjo de fotodiodos SPD- M10ADvp, forno CTO-10ACvp e auto-injetor SIL-10ADvp.

As condições cromatográficas definidas para identificação e quantificação de entacopona por CLAE estão apresentadas na Tabela 5.2.

TABELA 5.2. Condições cromatográficas definidas para identificação e quantificação de entacopona nos comprimidos revestidos por CLAE.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel	Água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10%) e acetonitrila (65:35)
Fluxo	2,0 ml/min
Coluna	ACE [®] octadecilsilano (250 mm x 4 mm, 5 µm de diâmetro interno)
Detecção	305 nm, detector de arranjo de fotodiodos
Temperatura do forno	25 °C
Volume injetado	20 µl

Os componentes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de nylon de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro interno e degaseificados com gás hélio por 15 minutos. A coluna foi previamente estabilizada com a fase móvel durante 15 minutos a um fluxo de 2,0 ml/min. Após estabilização do sistema, as soluções da SQT de entacopona e dos comprimidos de entacopona, previamente filtradas em membrana de nylon Millex[®] 0,45 µm, marca Millipore, foram

injetadas no cromatógrafo a líquido em um volume de 20 μ l. Todos os procedimentos realizados foram protegidos da luz.

5.3.3.2. Resultados

Os cromatogramas sobrepostos da SQT de entacapona e da solução amostra dos comprimidos de entacapona, na concentração de 20 μ g/ml em metanol, estão apresentados na Figura 5.6.

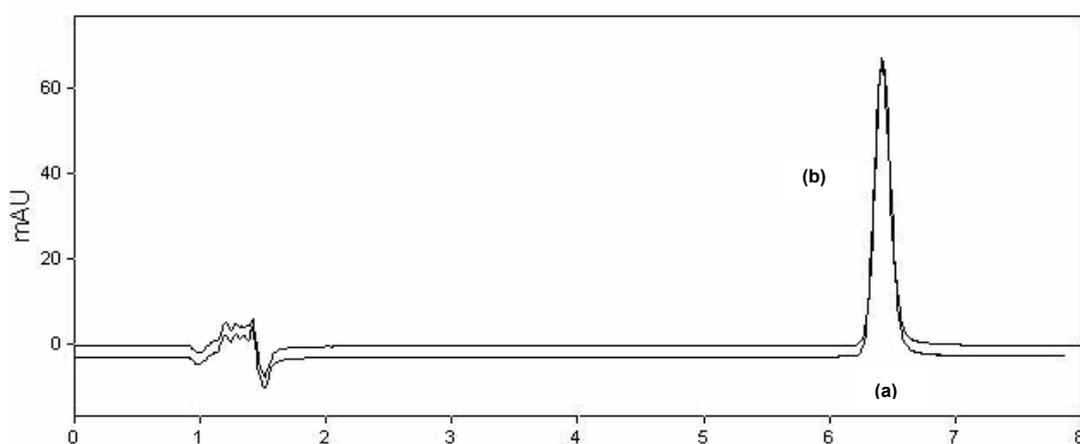


FIGURA 5.6. Cromatogramas sobrepostos da SQT de entacapona (a) e da solução amostra dos comprimidos de entacapona (b) em metanol a 20 μ g/ml. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna ACE[®] octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 μ l, temperatura de análise 25 °C.

A Figura 5.7 apresenta os espectros sobrepostos de absorção na região do UV (200 a 370 nm), obtidos em detector de arranjo de fotodiodos, do ápice dos picos de entacapona nas soluções da SQT e amostra dos comprimidos em metanol a 20 μ g/ml.

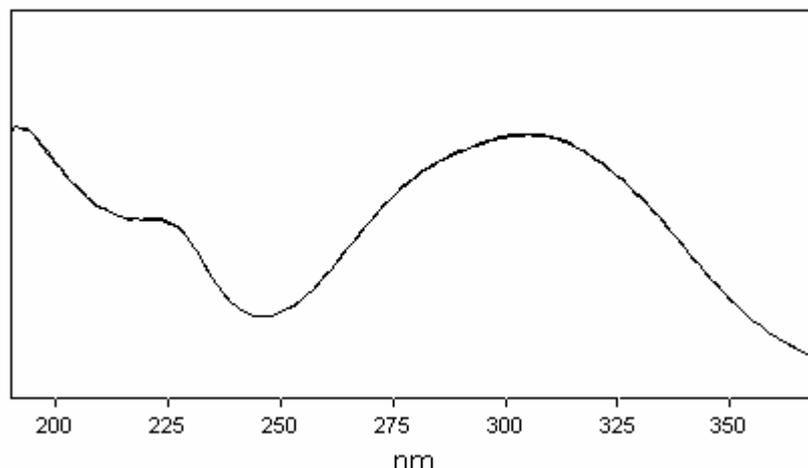


FIGURA 5.7. Espectros sobrepostos de absorção na região do UV (190 a 370 nm) obtidos em detector de arranjo de fotodiodos, acoplado ao sistema de CLAE, da solução da SQT e da solução amostra dos comprimidos de entacapona em metanol a 20 µg/ml.

5.4. Discussão

Para o desenvolvimento do método de identificação por CCD foram testadas diversas combinações de solventes orgânicos a fim de verificar qual sistema eluente permitiria a obtenção de Rf e Rx adequados para a separação de entacapona e adrenalina. O sistema eluente que proporcionou a melhor separação dos fármacos, com fatores de retenção satisfatórios, foi constituído de uma mistura de isobutanol, metanol, água e ácido fórmico anidro (66,7:9,5:9,5:14,3). A utilização do método por CCD permitiu identificar o fármaco entacapona em comprimidos, quando esse foi analisado juntamente com a SQT de entacapona, através da comparação dos valores dos fatores de retenção (Rf) obtidos. Além disso, os resultados demonstraram a capacidade do método desenvolvido de separar substâncias com estruturas químicas semelhantes (entacapona e adrenalina), ou seja, apresenta seletividade adequada para diferenciá-las, conforme verificado pelo valor de Rx obtido (1,74). Diante dos resultados, sugere-se a mesma identidade das amostras dos comprimidos de entacapona com a SQT de entacapona, devido à similaridade no perfil cromatográfico e aos valores de Rf obtidos. Os valores de Rf obtidos de 0,38 e 0,66 para adrenalina e entacapona, respectivamente, mostraram-se adequados para análises qualitativas.

A determinação da solubilidade na SQT de entacapona foi útil para verificação dos solventes nos quais a solubilidade do fármaco fosse igual ou superior a 1 mg/ml e, posteriormente, utilizá-los no desenvolvimento de métodos qualitativos e quantitativos por espectrofotometria na região do UV.

Os espectros na região do UV, na faixa de 200 a 400 nm, obtidos para a solução da SQT de entacapona e para a solução amostra dos comprimidos de entacapona em acetonitrila (Figura 5.2) apresentaram máximos e mínimos de absorção nos mesmos comprimentos de onda. Nessas condições, o comprimento de onda de absorção máxima de entacapona foi de 305 nm. Os espectros obtidos em etanol (Figura 5.3), metanol (Figura 5.4) e solução tampão fosfato pH 7,5 (Figura 5.5), na região do UV e do visível (200 a 500 nm), apresentaram máximos e mínimos de absorção nos mesmos comprimentos de onda para as soluções da SQT e para a amostra dos comprimidos de entacapona. Os comprimentos de onda máximos obtidos foram de 303 nm e 387 nm para etanol, 303 nm e 385 nm para metanol e 305 nm e 378 nm para a solução tampão pH 7,5. Diante desses resultados, verificou-se a adequabilidade dos métodos desenvolvidos para identificação de entacapona nos comprimidos revestidos por espectrofotometria na região do UV e do visível.

A semelhança entre os tempos de retenção relativos obtidos ($t_r = 6,7$ minutos) no método por CLAE para a SQT de entacapona e para solução amostra dos comprimidos de entacapona (Figura 5.6), bem como a similaridade entre os respectivos espectros (Figura 5.7) permitiram identificar entacapona na forma farmacêutica. Os resultados demonstraram a adequabilidade do método para identificação de entacapona nos comprimidos.

5.5. Conclusões

- O método proposto por CCD mostrou-se adequado para identificação de entacapona nos comprimidos revestidos, bem como seletividade para diferenciar produtos estruturalmente semelhantes;

- A obtenção de espectros com os mesmos comprimentos de onda máximos e mínimos de absorção, para as soluções da SQT e da amostra de entacapona em acetonitrila, demonstrou a viabilidade da utilização do método por espectrofotometria na região do UV para identificação de entacapona nos comprimidos revestidos;
- A obtenção de espectros com os mesmos comprimentos de onda máximos e mínimos de absorção, para as soluções da SQT e da amostra de entacapona em etanol, metanol e solução tampão fosfato pH 7,5, demonstrou a viabilidade da utilização do método por espectrofotometria na região do UV e do visível para identificação de entacapona nos comprimidos revestidos;
- Os semelhantes tempos de retenção obtidos para as soluções da SQT e da amostra de entacapona demonstraram a viabilidade da utilização do método por CLAE para identificação de entacapona nos comprimidos revestidos.

**6. CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA E ANÁLISE
ESTATÍSTICA COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS PROPOSTOS**

6.1. Introdução

A espectrofotometria na região do UV/visível é um método muito utilizado no controle de qualidade de produtos farmacêuticos pelo potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessas regiões. Mesmo apresentando seletividade dependente do grupamento cromóforo presente, o método apresenta uma série de aplicações na quantificação de fármacos em produtos farmacêuticos onde não existe a interferência dos excipientes, determinação de pKa, liberação do fármaco em ensaios de dissolução, monitoramento da cinética de degradação e identificação de fármacos através do comprimento de absorção máxima em determinado solvente (WATSON, 2005a).

A CLAE é o método quantitativo que apresentou o maior desenvolvimento nos últimos anos, principalmente em relação às inovações em colunas e *softwares* de controle dos equipamentos. Por essa razão, é o método de escolha da Indústria Farmacêutica para a realização do controle de qualidade de seus produtos e o método mais preconizado pelos Códigos Oficiais (WATSON, 2005c).

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, se os parâmetros de desempenho analítico do método contemplam as exigências para a aplicação analítica pretendida (BRASIL, 2003, ICH, 2005; USP 30, 2007). Os estudos para validação dos métodos analíticos por espectrofotometria na região do UV e por CLAE são realizados de acordo com os principais Códigos Oficiais, avaliando os seguintes parâmetros de desempenho analítico: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez (BRASIL, 2003, ICH, 2005; USP 30, 2007).

A especificidade do método analítico por CLAE pode ser realizada através do estudo de degradação forçada do fármaco, o qual proporciona identificar os prováveis produtos de degradação, definir as rotas de degradação, a estabilidade da molécula e validação de um método indicativo de estabilidade (ICH 2003). A utilização de um detector de arranjo de fotodiodos na CLAE permite a verificação da

pureza do pico e detecção de qualquer impureza coeluinto junto ao pico do fármaco em estudo (ERMER, 2001; BRASIL, 2003, ICH, 2005).

Além de ensaios pontuais a robustez pode ser avaliada através da realização de um estudo fatorial, utilizando desenho experimental de Plackett-Burman, o qual permite a variação de um número relativamente grande de fatores em um número relativamente pequeno de experimentos (SNYDER *et al.*, 1997; HEYDEN *et al.*, 2001).

Para o desenvolvimento e validação do método quantitativo para determinação de entacapona em comprimidos revestidos por CLAE foram otimizados e adaptados métodos descritos na literatura para quantificação de entacapona em fluidos biológicos, conforme os trabalhos descritos no item 3.4 da revisão bibliográfica (KARLSSON e WIKBERG, 1992; WIKBERG *et al.*, 1993; RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

6.2. Objetivos específicos

- ↪ Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do UV para determinação quantitativa de entacapona em comprimidos revestidos;
- ↪ Desenvolver e validar método por CLAE, indicativo de estabilidade, para determinação quantitativa de entacapona em comprimidos revestidos;
- ↪ Comparar estatisticamente os métodos propostos através de Teste *t* de *Student*, presumindo variâncias equivalentes.

6.3. Parte experimental

6.3.1. Validação do método quantitativo por espectrofotometria na região do UV

6.3.1.1. Equipamento e condições espectrofotométricas

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro ultravioleta Shimadzu, modelo UV-160A, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm. As soluções da SQT e da amostra dos comprimidos de entacapona foram preparadas empregando acetonitrila como diluente e detecção a 305 nm. Todos os procedimentos realizados foram protegidos da luz.

6.3.1.2. Especificidade

Avaliou-se a especificidade do método analítico através da preparação de uma solução placebo com os excipientes da formulação (NOVARTIS, 2004), a fim de verificar a interferência dos mesmos na determinação quantitativa de entacapona no seu comprimento de onda máximo de absorção (305 nm).

Para a preparação do placebo, os excipientes foram individualmente pesados, triturados e homogeneizados em gral. A função e a proporção dos excipientes presentes na formulação de Comtan[®] foram determinadas de acordo com as especificações de concentrações percentuais médias descritas por KIBBE (2000) e estão apresentados na Tabela 6.1.

A solução placebo foi preparada a partir da pesagem da mistura dos excipientes equivalentes a meio peso médio dos comprimidos de entacapona e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 60 ml de acetonitrila. Manteve-se em ultra-som por 15 minutos e agitação mecânica por mais 15 minutos. O volume foi completado e a solução filtrada. Transferiu-se uma alíquota de 2 ml dessa solução para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com acetonitrila. Realizou-se nova diluição, transferindo-se 2 ml para balão volumétrico de 20 ml e completando o volume com acetonitrila.

TABELA 6.1. Excipientes farmacêuticos presentes nos comprimidos revestidos de entacapona (Comtan[®]), com sua respectiva função e proporção (KIBBE, 2000).

Excipiente	Função	Proporção proposta*
Celulose microcristalina	Desintegrante / diluente	30,0%
Manitol	Aglutinante seco / diluente	30,0%
Croscarmelose sódica	Desintegrante	2,0%
Óleo vegetal hidrogenado	Lubrificante	0,5%
Hidroxipropil metilcelulose	Revestimento	1,0%
Polissorbato 80	Agente de molhabilidade / revestimento	1,0%
Glicerol a 85%	Revestimento	1,0%
Sacarose	Aglutinante seco	2,0%
Estearato de magnésio	Lubrificante	1,0%
Dióxido de titânio	Pigmento	0,5%
Óxido de ferro amarelo	Pigmento	0,05%
Óxido de ferro vermelho	Pigmento	0,05%

* q.s.p. 100% com o fármaco entacapona.

6.3.1.3. Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através da construção de três curvas padrão, contendo seis concentrações.

A partir de uma solução estoque da SQT de entacapona (100 µg/ml), em acetonitrila, foram realizadas as diluições de acordo com a Tabela 6.2.

TABELA 6.2. Preparação da curva padrão para avaliação da linearidade do método analítico por espectrofotometria na região do UV.

N	Volume de solução estoque (ml)	Balão volumétrico (ml)	Concentração final (µg/ml)
1	3,0	100	3,0
2	2,0	50	4,0
3	5,0	100	5,0
4	4,0	50	8,0
5	5,0	50	10,0
6	5,0	25	20,0

As médias das absorvâncias, correspondentes a cada diluição, foram utilizadas para plotagem de um gráfico de absorvância *versus* concentração.

A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) da curva padrão foram determinados através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e analisados através da análise de variância (ANOVA).

6.3.1.4. Precisão

A precisão do método analítico, realizada através da repetibilidade e da precisão intermediária, foi avaliada através da determinação do desvio padrão relativo (DPR) entre os resultados obtidos na determinação quantitativa de entacapona nos comprimidos revestidos.

Para a determinação da repetibilidade, o DPR foi calculado a partir da análise de sete amostras em um mesmo dia. Para a determinação da precisão intermediária, as análises referentes ao terceiro dia foram realizadas por um analista diferente (analista B) e foi avaliada através da determinação do DPR entre os resultados obtidos durante os três dias de análise da repetibilidade.

6.3.1.4.1. Preparação da solução da SQT de entacapona

Pesou-se, exatamente, o equivalente a 20 mg da SQT de entacapona, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com acetonitrila. Uma alíquota de 2 ml dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 20 ml e o volume completo com o mesmo diluente. A partir dessa solução, transferiu-se 2 ml para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com acetonitrila, de modo a obter solução a 10 µg/ml de entacapona.

6.3.1.4.2. Preparação da solução amostra dos comprimidos

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos revestidos, os quais foram triturados a pó fino. Pesou-se, exatamente, o equivalente a 100 mg de entacapona, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 60 ml de acetonitrila e manteve-se em ultra-som por 15 minutos e agitação mecânica por mais 15 minutos. O volume foi completado e a solução filtrada. Transferiu-se uma alíquota de 2 ml dessa solução para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com acetonitrila. A partir dessa solução, transferiu-se 2 ml para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com acetonitrila, de modo a obter solução a 10 µg/ml de entacapona.

A concentração (C_a), em µg/ml, das soluções amostra de entacapona foi determinada conforme a equação que segue:

$$C_a = \frac{(A_a * C_{SQT})}{A_{SQT}}$$

Onde:

A_a = absorvância absoluta da solução amostra de entacapona;

C_{SQT} = concentração da solução da SQT de entacapona;

A_{SQT} = absorvância absoluta da solução da SQT de entacapona.

O teor ($C\%$) de entacapona nos comprimidos revestidos foi calculado conforme a equação que segue:

$$C\% = \frac{(Ca * 100)}{Ct}$$

Onde:

Ca = concentração da solução amostra de entacapona

Ct = concentração teórica da solução amostra de entacapona

6.3.1.5. Exatidão

Para a realização do teste de exatidão, determinado através do método de adição de padrão, alíquotas de 5,0 ml da solução amostra dos comprimidos de entacapona, com concentração teórica de aproximadamente 100 µg/ml em acetonitrila foram transferidas para balões volumétricos de 50 ml, os quais foram denominados **A**, **R1**, **R2** e **R3**. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas de 1,0, 2,0 e 5,0 ml de uma solução da SQT de entacapona a 100 µg/ml nos balões denominados **R1**, **R2** e **R3**, respectivamente, em triplicata. Uma alíquota de 5,0 ml foi transferida para um balão volumétrico de 50 ml, o qual foi denominado **P**. O volume das soluções foi completado com acetonitrila. A Tabela 6.3. exemplifica a preparação das soluções acima.

TABELA 6.3. Preparação das soluções para realização da exatidão do método por espectrofotometria na região do UV através do teste de recuperação.

Amostra	Volume (ml) de solução amostra (100 µg/ml)*	Volume (ml) de solução da SQT de entacapona (100 µg/ml)	Concentração (µg/ml)*
A	5,0	-	10,0
R1	5,0	1,0	12,0
R2	5,0	2,0	14,0
R3	5,0	5,0	20,0
P	-	5,0	10,0

* concentração teórica

O teor recuperado da SQT de entacapona (R%) foi calculado a partir da equação que segue:

$$R\% = \left[\frac{C_R - C_A}{C_{SQT}} \right] * 100$$

Onde:

C_R = concentração da solução amostra ($\mu\text{g/ml}$) adicionada da SQT de entacapona.

C_A = concentração da solução amostra de entacapona ($\mu\text{g/ml}$);

C_{SQT} = concentração da solução da SQT de entacapona adicionada ($\mu\text{g/ml}$).

6.3.1.6. Robustez

Os fatores e níveis estudados para a realização do estudo de robustez estão apresentados na Tabela 6.4.

TABELA 6.4. Fatores e níveis estudados para realização do teste de robustez.

Fatores	Nominal	Nível (-1)	Nível (+1)
Tempo de agitação mecânica (min.)	15	12	18
Tempo de agitação em ultra-som (min.)	15	12	18
Comprimento de onda (nm)	305	302	308

Os seguintes experimentos, nos níveis especificados, foram realizados para determinação do efeito dos fatores em teste, de acordo com a Tabela 6.5. Para completar o número de fatores do desenho experimental foram utilizados fatores *dummy*, os quais não apresentam significado físico (HEYDEN *et al.*, 2001).

TABELA 6.5. Desenho experimental de Plackett-Burman selecionado para verificação da robustez do método analítico por espectrofotometria na região do UV.

Exp	Sonicação	λ	Dummy	Dummy	Dummy	Agitação	Dummy
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Os efeitos dos fatores em análise foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$E_x = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2}$$

Onde:

E_x = efeito do fator em análise;

$\sum Y(+)$ e $\sum Y(-)$ = soma das respostas onde o fator em análise está nos níveis extremos (+) e (-), respectivamente;

N = número de experimentos do desenho experimental.

A estimativa do erro do experimento foi obtida de acordo com a seguinte equação:

$$E_e = \sqrt{\frac{\sum E_{dummy}^2}{n_{erro}}}$$

Onde:

E_e = estimativa do erro aleatório do experimento;

$\sum E_{dummy}^2$ = soma quadrada dos n_{erro} *dummy*.

Calculado os efeitos dos fatores (E_x) e do erro do experimento (E_e), determinou-se a significância dos fatores em análise através da realização do Teste *t* de *Student*, da seguinte maneira:

$$t = \frac{E_x}{E_e}$$

Onde:

E_x = efeito do fator em análise;

E_e = estimativa do erro aleatório do experimento.

O valor de t calculado foi comparado com t crítico bicaudal para um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) e 4 graus de liberdade (gl).

6.3.2. Resultados

6.3.2.1. Especificidade

O espectro de absorção no ultravioleta da solução placebo dos comprimidos em acetonitrila, na faixa de 200 a 400 nm, está apresentado na Figura 6.1.

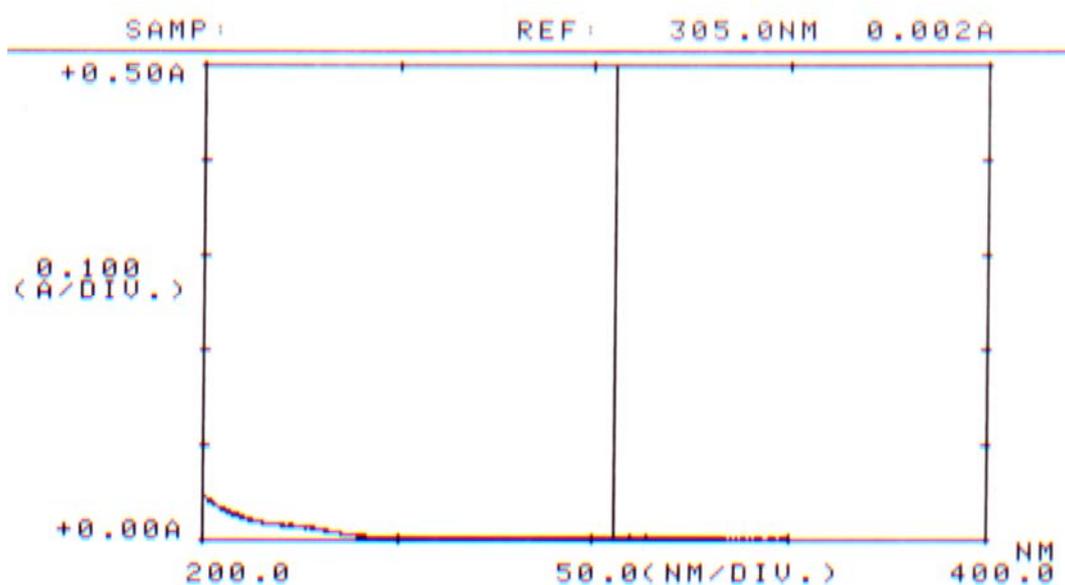


FIGURA 6.1. Espectro de absorção na região do UV da solução placebo dos excipientes dos comprimidos em acetonitrila, na faixa de 200 a 400 nm.

O espectro de absorção na região do UV demonstra que não existiu interferência dos excipientes da formulação no comprimento de onda máximo de entacapona (305 nm).

6.3.2.2. Linearidade

As absorvâncias obtidas na realização da curva padrão da SQT de entacapona em acetonitrila a 305 nm, para o método por espectrofotometria na região do UV, estão descritas na Tabela 6.6.

TABELA 6.6. Absorvâncias obtidas no método por espectrofotometria na região do UV a 305 nm para realização da curva padrão em acetonitrila.

Concentração (µg/ml)	Absorvâncias	Absorvância média	DPR
3,0	0,194	0,194	0,79
	0,196		
	0,193		
4,0	0,265	0,264	0,44
	0,265		
	0,263		
5,0	0,327	0,328	0,30
	0,328		
	0,329		
8,0	0,529	0,529	0,29
	0,530		
	0,527		
10,0	0,663	0,662	0,09
	0,662		
	0,662		
20,0	1,320	1,317	0,49
	1,310		
	1,322		

A partir das absorvâncias obtidas na faixa de concentração estudada foram calculados a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) (Figura 6.2) para avaliar, estatisticamente, através da análise da variância (ANOVA) os resultados obtidos.

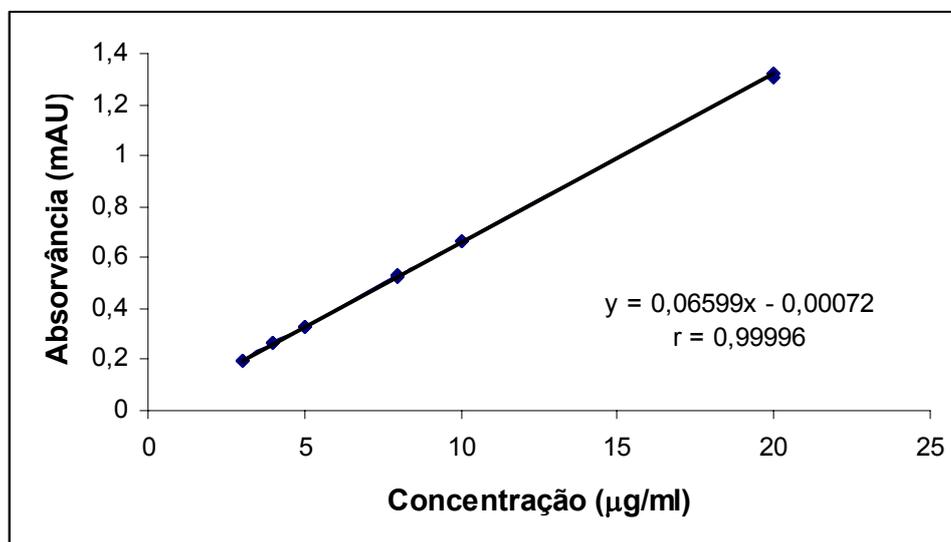


FIGURA 6.2. Representação gráfica da curva padrão, da equação da reta e do coeficiente de correlação da SQT de entacopona em acetonitrila obtida pelo método por espectrofotometria na região do UV a 305 nm.

A Tabela 6.7 apresenta os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão da SQT de entacopona.

TABELA 6.7. Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas por espectrofotometria na região do UV.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F
ENTRE	5	2,577775167	0,515555033	63561,58*
- regressão linear	1	2,577696085	2,577696085	317798,1*
- desvio de linearidade	4	$7,90821 \times 10^{-5}$	$1,97705 \times 10^{-5}$	2,44
RESÍDUO	12	$9,73333 \times 10^{-5}$	0,000008111	-
TOTAL	17	2,57787250	-	-

* significativo para $p < 0,05$

6.3.2.3. Precisão

6.3.2.3.1. Repetibilidade e precisão intermediária

A Tabela 6.8. apresenta os resultados de repetibilidade e de precisão intermediária do método analítico por espectrofotometria na região do UV, obtidos durante os três dias de análise.

TABELA 6.8. Resultados da repetibilidade e da precisão intermediária do método analítico por espectrofotometria na região do UV em acetonitrila a 305 nm.

Amostra	Repetibilidade			Precisão intermediária
	Dia 1	Dia 2	Dia 3*	
1	103,30	97,59	103,00	
2	103,62	100,52	101,24	102,02
3	103,94	99,55	100,44	99,72
4	101,35	99,05	100,59	
5	100,10	99,87	103,12	102,25
6	100,84	101,46	103,66	
7	100,97	100,00	103,68	
Média (%)	102,02	99,72	102,25	101,33
DPR	1,52	1,21	1,41	1,38

* analista B

6.3.2.4. Exatidão

A Tabela 6.9 apresenta os resultados do estudo de exatidão, realizado através do método de adição de padrão, do método analítico por espectrofotometria na região do UV.

TABELA 6.9. Resultados referentes ao estudo de exatidão, realizado através do método de adição de padrão, por espectrofotometria na região do UV a 305 nm.

Concentração adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentagem recuperada (%)	Média (%)	DPR
2,0	97,00	98,50	1,34
	99,50		
	99,00		
4,0	99,25	98,50	0,76
	98,50		
	97,75		
10,0	98,60	97,87	0,97
	98,20		
	96,80		

6.3.2.5. Robustez

A Tabela 6.10 apresenta os resultados dos teores de entacapona, obtidos em cada experimento, para avaliação da robustez do método analítico.

TABELA 6.10. Teores de entacapona, obtidos em cada experimento, para avaliação da robustez do método analítico por espectrofotometria na região do UV.

Experimento	Teor de entacapona (%)
1	100,10
2	103,00
3	100,90
4	101,50
5	104,10
6	102,40
7	101,00
8	104,50

A Tabela 6.11 apresenta os efeitos dos fatores em análise e o valor de t calculado.

TABELA 6.11. Resultados dos efeitos e t calculado para os fatores analisados no estudo da robustez por espectrofotometria na região do UV.

Fator	Efeito	t calculado
Tempo de agitação mecânica	0,56	1,14
Tempo de agitação em ultra-som	- 0,94	-1,94
Comprimento de onda	- 0,12	-0,25

$t_{tab(0,05; 4)} = 2,78$; Erro experimental (E_e) = 0,487.

6.3.3. Discussão

A espectrofotometria na região do UV, por ser um método fácil, rápido e de custo relativamente baixo, tem sido amplamente utilizada para a determinação quantitativa de fármacos (CLURCZAK, 1998).

Na literatura pesquisada foi encontrado apenas um método para quantificação de entacapona em matéria-prima e em comprimidos. O método descrito por espectrofotometria na região visível, baseava-se na reação colorimétrica do fármaco entacapona com cloreto férrico e ferrocianeto de potássio e leitura da absorvância a 689 nm (RAJESWARI *et al.*, 2006). Diante disso, objetivou-se a validação de um método simples por espectrofotometria na região do UV para determinação quantitativa de entacapona em comprimidos revestidos.

Para realizar a validação do método quantitativo por espectrofotometria na região do UV foram testados os seguintes solventes: solução tampão fosfato 0,05 M pH 7,5, etanol, metanol e acetonitrila.

Devido ao baixo custo, o primeiro solvente avaliado foi a solução tampão fosfato 0,05 M pH 7,5. Durante a preparação, verificou-se que a solução estoque de 1 mg/ml apresentava uma coloração alaranjada escura, a qual poderia ser um indicativo da degradação do fármaco. A determinação da estabilidade foi verificada através das leituras da absorvância em 378 nm de uma solução a 10 µg/ml em tempos pré-determinados. Os resultados demonstraram a instabilidade de entacapona nessa solução, pois a degradação em 10 minutos foi de 1% e, em 150 minutos, chegou a 5%. Esses resultados podem estar correlacionados à oxidação de grupamentos fenólicos, conforme ocorre com a adrenalina em meio neutro e alcalino (FU e SIBLEY, 1977; USP 30, 2007).

Outro solvente utilizado para verificar a possibilidade de validação do método foi etanol. Os resultados preliminares demonstraram que o fármaco apresentou dois comprimentos de onda de absorção máximos (303 nm e 387 nm) e em ambos apresentou especificidade e estabilidade. No entanto, apenas em 303 nm o método apresentou linearidade na faixa estudada de 4 µg/ml a 25 µg/ml. Os testes de repetibilidade e precisão intermediária demonstraram a precisão do método, porém o mesmo não apresentou exatidão. A exatidão, avaliada através do cálculo de recuperação, apenas é demonstrada se a absorvância apresentar um crescimento proporcional ao aumento da concentração, o que não foi verificado com a utilização do solvente etanol, ou seja, o método não atendeu a Lei de Lambert-Beer (PAVIA *et al.*, 2001c; MENDHAM *et al.*, 2002a).

Alternativamente, realizou-se a curva padrão utilizando metanol, porém verificou-se o mesmo comportamento de falta de proporcionalidade entre os resultados de concentração e leitura da absorvância.

Os resultados preliminares para avaliar a possibilidade de validação do método utilizando solventes como solução tampão fosfato pH 7,5, etanol e metanol não foram satisfatórios. Devido à boa solubilidade da SQT de entacapona em acetonitrila optou-se por utilizar esse solvente para validação do método analítico.

Inicialmente, realizaram-se estudos para verificar a estabilidade do fármaco em acetonitrila, através da leitura da absorvância de uma solução a 10 µg/ml, em tempos pré-determinados. Os resultados demonstraram que o fármaco manteve-se estável nesse meio, por, no mínimo, 24 horas.

A especificidade do método analítico por espectrofotometria na região do UV utilizando acetonitrila como diluente foi avaliada através da pesquisa da possível interferência dos excipientes da formulação na determinação quantitativa de entacapona. O espectro de absorção no ultravioleta da solução placebo, na faixa de 200 a 400 nm (Figura 6.1), constatou que não houve interferência dos excipientes da formulação no comprimento de onda máximo de entacapona em acetonitrila (305 nm), demonstrando a especificidade do método analítico.

A linearidade do método analítico, avaliada através da construção de três curvas padrão, foi determinada a partir do coeficiente de correlação (r) (Figura 6.2) e da ANOVA (Tabela 6.7). O valor do coeficiente de correlação ($r = 0,99996$), determinado através do estudo de regressão linear, demonstrou a existência de uma relação entre as absorvâncias obtidas e a concentração da SQT de entacapona, ou seja, existia evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003). A ANOVA das absorvâncias obtidas demonstrou que existia regressão linear e não havia desvio da linearidade para $p < 0,05$.

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (entre-dias). Os valores experimentais obtidos para a determinação quantitativa de entacapona nos comprimidos revestidos, durante os três dias de análise, foram de 102,02%, 99,72% e 102,25%. O valor máximo de DPR obtido para análise da repetibilidade foi de 1,52% no primeiro dia de

análise. A precisão intermediária foi avaliada através da determinação do DPR entre os três dias de análise realizados para determinação da repetibilidade do método. O teor médio de entacapona foi 101,33% nos comprimidos e o DPR obtido de 1,38, demonstraram a precisão intermediária do método. Os resultados de DPR obtidos inferiores a 2,0, conforme preconiza a literatura, demonstraram a precisão do método analítico em termos de repetibilidade e precisão intermediária (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 30, 2007).

A exatidão do método analítico por espectrofotometria na região do UV foi determinada através do teste de recuperação. As porcentagens médias de recuperação estiveram na faixa de 97,87% a 98,50% (Tabela 6.9), o que demonstrou a exatidão do método proposto.

A análise dos resultados do estudo de robustez, realizada através do cálculo dos efeitos de cada fator estudado e determinação do Teste *t* de *Student*, demonstrou que os fatores estudados, tempo de agitação mecânica e em ultra-som e comprimento de onda, não apresentaram efeito significativo sobre a quantificação do entacapona em comprimidos por espectrofotometria na região do UV. A análise estatística realizada pelo Teste *t* de *Student*, (Tabela 6.11), demonstrou que não ocorreu diferença significativa entre o efeito obtido no ensaio para cada fator com o valor de $t_{(0,05; 4)}$ bicaudal tabelado em 2,78. O erro experimental do método apresentou valor de 0,487. Diante disso, demonstrou-se que, em relação a esses fatores, o método foi robusto.

Considerando os resultados dos parâmetros analíticos avaliados, concluiu-se que o método espectrofotométrico na região UV foi adequado para determinação quantitativa de entacapona nos comprimidos revestidos.

6.3.4. Validação do método quantitativo por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE)

6.3.4.1. Equipamento e condições cromatográficas

Os equipamentos e condições cromatográficas utilizadas estão descritos no item 5.3.3.1.

6.3.4.2. Especificidade

A especificidade do método analítico foi avaliada através da verificação da interferência dos excipientes da formulação e dos produtos de degradação forçada, formados a partir da SQT e do produto acabado de entacapona, com o pico de entacapona. A pureza do pico do fármaco foi verificada utilizando as ferramentas disponíveis no *software Class VP Versão 5.42*. A interferência dos reagentes utilizados para realização da degradação forçada foi avaliada através da preparação de um branco da solução.

6.3.4.2.1. Solução placebo

Avaliou-se a seletividade do método analítico através da preparação de uma solução placebo com os excipientes da formulação (NOVARTIS, 2004), de acordo com a Tabela 6.1.

A solução placebo foi preparada a partir da pesagem da mistura dos excipientes equivalentes a $\frac{1}{4}$ do peso médio dos comprimidos de entacapona e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 60 ml de metanol. Manteve-se em ultra-som por 15 minutos e agitação mecânica por mais 15 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente e filtrou-se. Transferiu-se uma alíquota de 2 ml dessa solução para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com metanol.

6.3.4.2.2. Hidrólise ácida e aquecimento a 80 °C

Devido à baixa solubilidade de entacapona em meio ácido (LEPPÄNEN *et al.*, 2000; SAVOLAINEN *et al.*, 2000), a hidrólise nessas condições foi realizada a partir de solução metanólica da SQT de entacapona a 1 mg/ml. Transferiu-se uma alíquota de 2 ml dessa solução para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M, de modo a obter solução a 0,1 mg/ml. Essa solução foi dividida em duas alíquotas de 10 ml. A primeira alíquota foi utilizada para preparar a próxima diluição (tempo zero) e a segunda alíquota foi mantida por 2 horas a 80 °C em banho de água. Após transferiu-se uma alíquota de 4 ml de cada uma das soluções para balões volumétricos de 20 ml e completou-se os volumes com metanol, para obter solução a 20 µg/ml. A hidrólise ácida do produto acabado foi realizada de acordo com o mesmo procedimento descrito para a SQT de entacapona, porém, após a primeira diluição, a solução foi agitada e filtrada.

6.3.4.2.3. Hidrólise alcalina

A hidrólise alcalina foi realizada através da diluição de 10 mg da SQT de entacapona em 10 ml de hidróxido de sódio 0,1 M, obtendo solução a 1 mg/ml. Após foram retiradas alíquotas de 2 ml dessa solução nos tempos zero, 1 hora e 2 horas, transferidas para balão volumétrico de 20 ml e adicionado 2 ml de ácido clorídrico 0,1 M para neutralização. O volume foi completado com metanol, de modo a obter solução a 0,1 mg/ml. Realizaram-se novas diluições em metanol para obter soluções a 20 µg/ml. A degradação forçada em meio alcalino para o produto acabado foi realizada de acordo com o procedimento descrito para a SQT de entacapona, porém, após a primeira diluição, a solução foi agitada e filtrada.

6.3.4.2.4. Degradação oxidativa e aquecimento a 80 °C

Devido à baixa solubilidade de entacapona em peróxido de hidrogênio, verificada em testes preliminares, a degradação oxidativa foi realizada através da diluição de 2,0 ml de uma solução da SQT de entacapona a 1 mg/ml em metanol em 20 ml de peróxido de hidrogênio 30%, de modo a obter solução a 0,1 mg/ml. Essa

solução foi dividida em duas alíquotas de 10 ml. A primeira alíquota foi utilizada para preparar a próxima diluição (tempo zero) e a segunda alíquota foi mantida por 2 horas a 80 °C em banho de água. Após transferiu-se uma alíquota de 4 ml de cada uma das soluções para balões volumétricos de 20 ml e completou-se os volumes com metanol, para obter solução a 20 µg/ml. A degradação forçada em peróxido de hidrogênio para o produto acabado foi realizada de acordo com o procedimento descrito para a SQT de entacapona, porém após a primeira diluição a solução foi agitada e filtrada. Alternativamente, realizou-se a degradação oxidativa utilizando peróxido de hidrogênio 3% e temperatura a 80 °C em banho de água.

6.3.4.2.5. Degradação fotolítica

A degradação fotolítica foi realizada diluindo 10 mg da SQT de entacapona em 10 ml de metanol, de modo a obter solução a 1 mg/ml. Transferiu-se essa solução para cubetas descartáveis de quartzo Plastibrand[®], as quais foram colocadas sob incidência direta a uma distância de 10 cm da lâmpada Ecovolume[®] 30 Watts, emissora de luz ultravioleta de 254 nm por 15 minutos, em câmara de vidro espelhada internamente (100×16×16 cm). Após o tempo decorrido, as amostras foram retiradas e diluídas em metanol até concentração teórica de 20 µg/ml. A verificação da interferência do calor, dentro da câmara de vidro, foi realizada através da colocação de uma cubeta contendo a amostra nas mesmas condições, porém protegida com papel laminado. A degradação forçada em condições fotolíticas para o produto acabado foi realizada de acordo com o procedimento descrito para a SQT de entacapona, porém após a primeira diluição a solução foi agitada e filtrada.

6.3.4.2.6. Homogeneizado dos produtos de degradação forçada

A especificidade do método analítico por CLAE também foi verificada na presença de todos os produtos de degradação forçada obtidos nas diferentes condições realizadas. Para isso, uma solução com alíquotas equivalentes da última diluição de cada condição de degradação forçada foi preparada e injetada.

6.3.4.3. Linearidade

Avaliou-se a linearidade do método analítico através da construção de três curvas padrão, contendo seis concentrações.

A partir da solução estoque da SQT de entacopona (250 µg/ml) em metanol, foram realizadas as seguintes diluições, utilizando o mesmo solvente para completar o volume, de acordo com a Tabela 6.12.

TABELA 6.12. Preparação da curva padrão para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE.

N	Volume de solução estoque (ml)	Balão volumétrico (ml)	Concentração final (µg/ml)
1	2,0	50	10,0
2	3,0	50	15,0
3	4,0	100	20,0
4	5,0	50	25,0
5	3,0	25	30,0
6	4,0	25	40,0

As médias das áreas, correspondentes a cada diluição, foram utilizadas para plotagem de um gráfico de absorvância *versus* concentração.

A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) da curva padrão foram determinados através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e analisados através da análise de variância (ANOVA).

6.3.4.4. Precisão

A precisão do método analítico por CLAE foi avaliada e calculada conforme o item 6.3.1.4, descrito no método espectrofotométrico, a partir da preparação das soluções padrão e amostra, conforme abaixo.

6.3.4.4.1. Preparação da solução da SQT de entacapona

Pesou-se, exatamente, o equivalente a 25 mg da SQT de entacapona, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com metanol. Uma alíquota de 4 ml dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi completado com o mesmo solvente, de modo a obter uma solução com concentração de 20 µg/ml de entacapona.

6.3.4.4.2. Preparação da solução amostra dos comprimidos

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos revestidos, os quais foram triturados a pó fino. Pesou-se, o equivalente a 50 mg de entacapona e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 60 ml de metanol. A solução foi mantida em ultra-som por 15 minutos e agitada mecanicamente por mais 15 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente e filtrou-se. Uma alíquota de 2 ml dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi completado com o mesmo solvente, de modo a obter uma solução com concentração teórica de 20 µg/ml de entacapona.

6.3.4.5. Exatidão

Para a realização do teste de exatidão, determinado através do método de adição de padrão, alíquotas de 4,0 ml da solução amostra dos comprimidos de entacapona, com concentração teórica de aproximadamente 0,5 mg/ml em metanol, foram transferidas para balões volumétricos de 100 ml, os quais foram denominados **A**, **R1**, **R2** e **R3**. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas de 1,0, 2,0 e 4,0 ml de uma solução da SQT de entacapona na concentração de 0,5 mg/ml nos balões

denominados **R1**, **R2** e **R3**, respectivamente, em triplicata. Uma alíquota de 4,0 ml foi transferida para um balão volumétrico de 100 ml, o qual foi denominado **P**. O volume das soluções foi completado com metanol.

A Tabela 6.13 exemplifica a preparação das soluções utilizadas no teste de exatidão através do método de adição de padrão.

TABELA 6.13. Preparação das soluções para o teste de exatidão do método analítico por CLAE, através do método de adição de padrão.

Amostra	Volume da solução amostra (0,5 mg/ml)*	Volume da solução da SQT de entacapona (0,5 mg/ml)	Concentração (µg/ml)*
A	4,0	-	20,0
R1	4,0	1,0	25,0
R2	4,0	2,0	30,0
R3	4,0	4,0	40,0
P	-	4,0	20,0

* concentração teórica

O teor recuperado da SQT de entacapona foi calculado de acordo com o item 6.3.1.5.

6.3.4.6. Robustez

Os fatores e níveis estudados para a realização do estudo de robustez estão apresentados na Tabela 6.14.

TABELA 6.14. Fatores e níveis estudados para realização do teste de robustez por CLAE.

Fatores	Nominal	Nível estudado	Nível estudado
		(-1)	(+1)
pH da água	3,0	2,7	3,3
% de acetonitrila	35	33	37
Temperatura do forno (°C)	25	20	30
Fluxo (ml/min.)	2,0	1,8	2,2
λ (nm)	305	302	308
Marca da coluna	Ace [®]	Ace [®]	Hypersil [®]

Os fatores estudados foram examinados de acordo com o desenho experimental fatorial para 7 fatores, totalizando 8 experimentos. Para cada experimento foram realizadas injeções para a solução da SQT e para a solução amostra dos comprimidos de entacapona a 20 µg/ml. O parâmetro avaliado no ensaio da robustez foi o conteúdo percentual de entacapona na amostra testada. A Tabela 6.15 apresenta o desenho experimental de Plackett-Burman, bem como os experimentos realizados.

TABELA 6.15. Desenho experimental de Plackett-Burman para verificação da robustez do método analítico por CLAE.

Experimento	pH	Coluna	Dummy	Detector	% ACN	Temp.	Fluxo
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Os efeitos dos fatores em análise foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$E_x = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2}$$

Onde:

E_x = efeito do fator em análise;

$\sum Y(+)$ e $\sum Y(-)$ = soma das respostas onde o fator em análise está nos níveis extremos (+) e (-), respectivamente;

N = número de experimentos do desenho experimental.

A interpretação estatística foi realizada utilizando algoritmo de Dong para estimativa do erro experimental (DONG *apud* HEYDEN *et al.*, 2001). A utilização do cálculo a partir do fator *dummy* não é indicada, pois o estudo ficaria apenas com um grau de liberdade.

Pelo método de Dong, uma estimativa inicial do erro é obtida da seguinte maneira:

$$S_0 = 1,5 \times \text{mediana}|E_i|$$

Onde:

S_0 = estimativa inicial do erro e $\text{mediana}|E_i|$ = mediana em módulo dos efeitos dos fatores do experimento.

O valor 1,5 na equação acima é apropriado para variáveis aleatórias que possuem distribuição normal $N(0, \sigma^2)$. Quando E_i são realizações independentes de uma distribuição, a mediana dos efeitos absolutos $|E_i|$ é aproximadamente $0,675 \sigma$ e, assim, S_0 é uma estimativa do erro experimental (DONG *apud* HEYDEN *et al.*, 2001). A partir de S_0 , pode-se estimar o erro padrão (s_1) como:

$$s_1 = \sqrt{\frac{\sum E_i^2}{n}} \text{ para todos } |E_i| < 2,5 S_0$$

Onde:

E_i = efeitos dos fatores menores que $2,5S_0$ e

n = número de efeitos absolutos menores que $2,5S_0$.

Usando s_1 ao invés de S_0 evita-se a super estimativa do erro. O fato de eliminar efeitos que excedem o limite de $2,5S_0$ segue a premissa de $p(|E| > 2,5S_0) \sim 0,01$, para distribuição normal.

A significância dos fatores em análise é determinada através da realização do Teste *t* de *Student*, da seguinte maneira:

$$t = \frac{E_x}{s_1} \quad \text{Onde:}$$

E_x = efeito do fator em análise;

s_1 = estimativa do erro padrão do experimento.

6.3.4.7. Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi verificada diariamente durante a validação do método através dos seguintes parâmetros: fator de cauda (TF), pratos teóricos (N), fator de capacidade (k'), resolução (R) e precisão instrumental (repetibilidade das injeções).

6.3.5. Resultados

6.3.5.1. Especificidade

6.3.5.1.1. Solução placebo

A Figura 6.3 apresenta os cromatogramas sobrepostos das soluções placebo e amostra dos comprimidos de entacapona obtidas por CLAE.

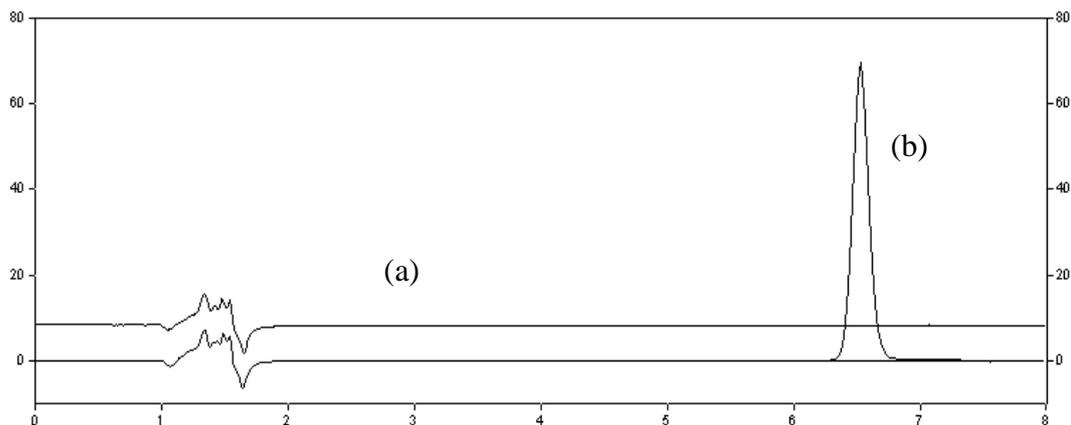


FIGURA 6.3. Cromatogramas sobrepostos da solução placebo dos excipientes dos comprimidos (a) e da solução amostra dos comprimidos de entacaona (b), em solução metanólica. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna ACE[®] octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

6.3.5.1.2. Hidrólise ácida e aquecimento a 80 °C

A Figura 6.4 apresenta o cromatograma da degradação forçada da SQT de entacaona em condições ácidas e aquecimento.

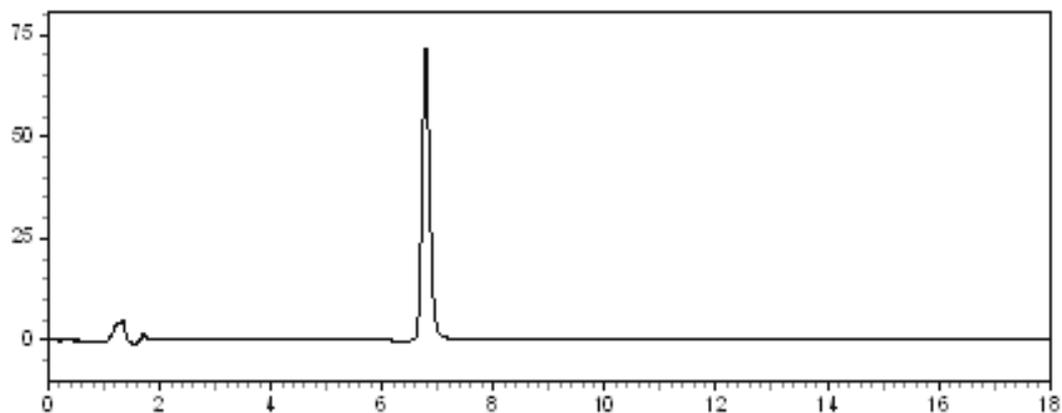


FIGURA 6.4. Cromatograma da degradação forçada da SQT de entacaona em condições ácidas (HCl 0,1 M) e aquecimento (80 °C) por CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna ACE[®] octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

6.3.5.1.3. Hidrólise alcalina

A Figura 6.5 apresenta o cromatograma da degradação forçada da SQT de entacapona em condições alcalinas.

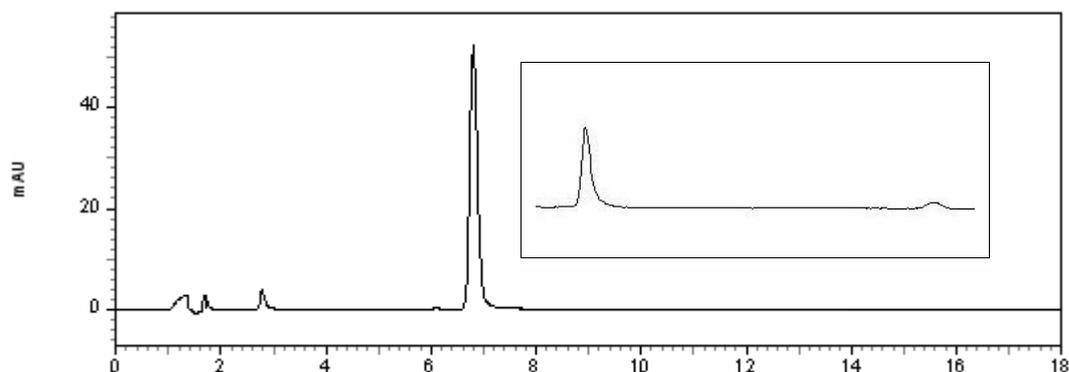


FIGURA 6.5. Cromatograma da degradação forçada da SQT de entacapona em condições alcalina (NaOH 0,1 M) por 2 horas por CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna ACE[®] octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C. Escala em aumento para verificação dos produtos de degradação entre 2,0 a 6,5 minutos.

6.3.5.1.4. Degradação oxidativa e aquecimento a 80 °C

A Figura 6.6 apresenta o cromatograma da degradação forçada da SQT de entacapona em H₂O₂ 30% e aquecimento a 80 °C.

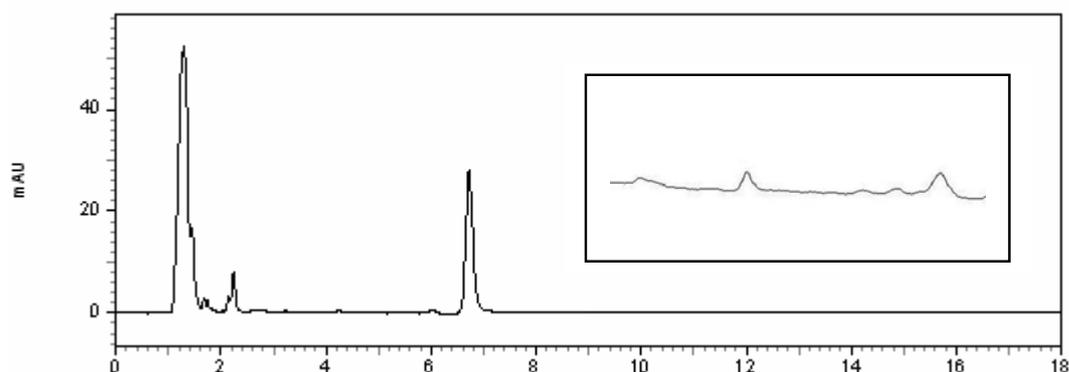


FIGURA 6.6. Cromatograma da degradação forçada da SQT de entacapona em H₂O₂ 30% a 80 °C por CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna ACE[®] octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C. Escala em aumento para verificação dos produtos de degradação entre 3,0 a 6,5 minutos.

6.3.5.1.5. Degradação fotolítica

A Figura 6.7 apresenta o cromatograma da degradação forçada da SQT de entacapona sob luz ultravioleta a 254 nm.

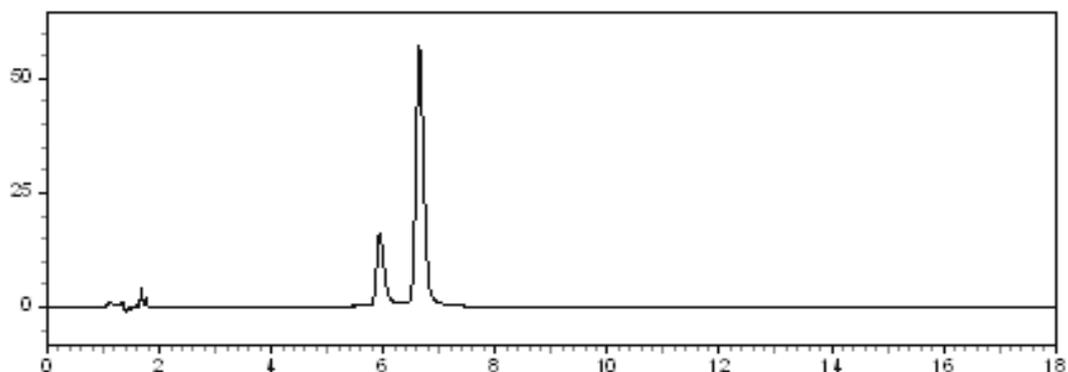


FIGURA 6.7. Cromatograma da degradação forçada da SQT de entacapona sob luz ultravioleta 254 nm, por 15 minutos, por CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna ACE[®] octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 μ l, temperatura de análise 25 °C.

A Figura 6.8 apresenta os espectros sobrepostos da SQT de entacapona e do produto de fotodegradação obtido em condições fotolíticas.

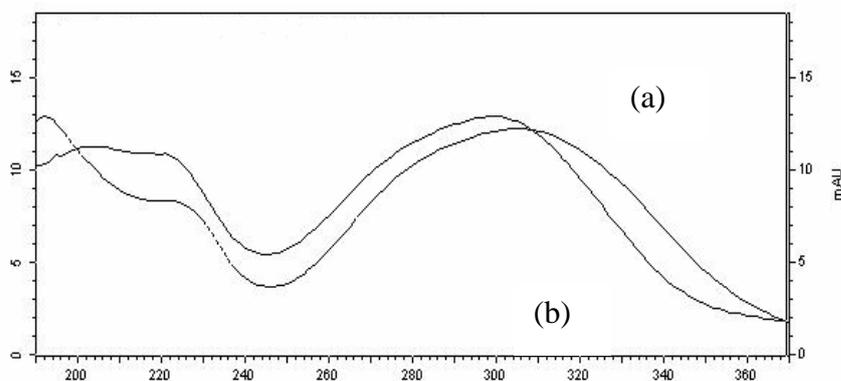


FIGURA 6.8. Espectros sobrepostos de absorção na região do UV (190 a 370 nm) obtidos em detector de arranjo de fotodiodos, acoplado ao sistema de CLAE, do fármaco entacapona (a) e do produto de fotodegradação (b). Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna ACE[®] octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 μ l, temperatura de análise 25 °C.

6.3.5.1.6. Homogeneizado dos produtos de degradação forçada

A Figura 6.9 apresenta o cromatograma da mistura dos produtos de degradação forçada da solução amostra dos comprimidos de entacapona nas diferentes condições de estresse.

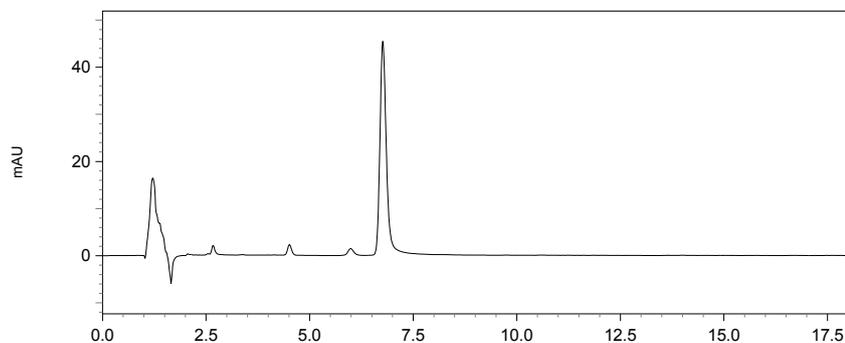


FIGURA 6.9. Cromatograma obtido da mistura dos produtos de degradação forçada da solução amostra dos comprimidos de entacapona nas diferentes condições de estresse. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna ACE[®] octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

A curva de pureza do pico de entacapona, obtido da mistura dos produtos de degradação forçada da solução amostra dos comprimidos de entacapona nas diferentes condições de degradação forçada está apresentada na Figura 6.10.

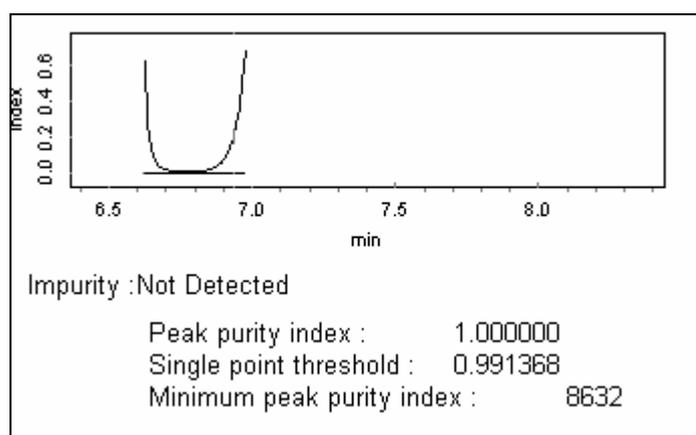


FIGURA 6.10. Curva de pureza do pico de entacapona obtido da mistura dos produtos de degradação forçada da solução amostra dos comprimidos de entacapona nas diferentes condições de estresse.

6.3.5.2. Linearidade

A Tabela 6.16 apresenta os valores experimentais obtidos na construção das curvas padrão de entacapona. A representação da curva e a equação da reta, obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na Figura 6.11.

TABELA 6.16. Áreas médias obtidas na realização da curva padrão da SQT de entacapona em metanol por CLAE.

Concentração (µg/ml)	Áreas obtidas*	Área média	DPR
10,0	336937,25	337787,50	0,24
	337837,00		
	338588,25		
15,0	508821,75	514565,90	1,32
	512833,00		
	522043,00		
20,0	679719,75	687671,67	1,04
	693524,25		
	689771,00		
25,0	862921,00	869768,50	0,70
	871753,00		
	874631,50		
30,0	1064046,25	1063949,90	0,12
	1062617,00		
	1065168,50		
40,0	1411817,25	1418337,00	0,50
	1417386,25		
	1425807,50		

* Cada valor representa a média de três determinações

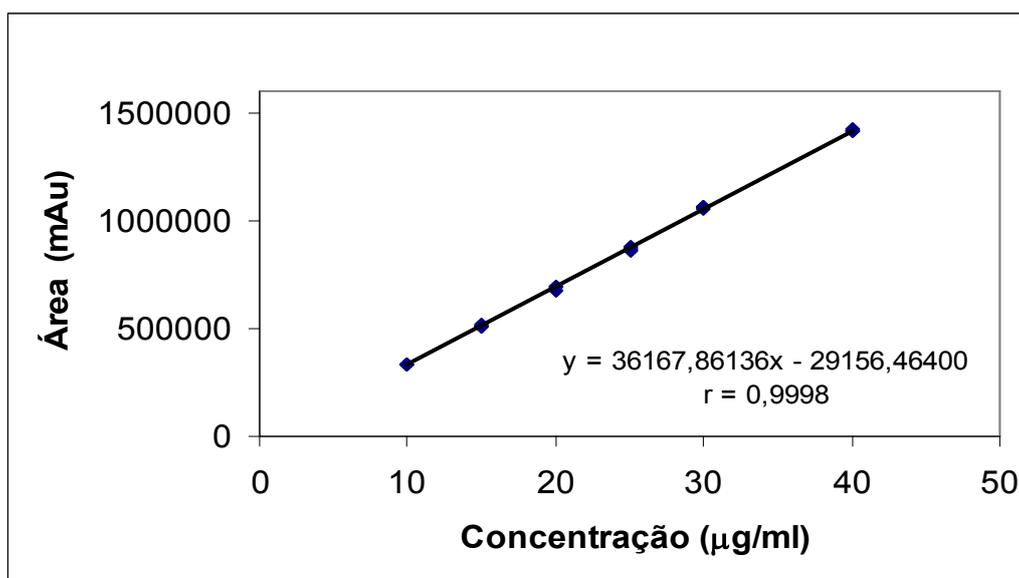


FIGURA 6.11. Representação gráfica da curva padrão, da equação da reta e do coeficiente de correlação da SQT de entacopona em metanol obtida por CLAE.

A Tabela 6.17 apresenta os resultados dos tratamentos estatísticos realizados sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão da SQT de entacopona para avaliação da linearidade por CLAE.

TABELA 6.17. Análise da variância (ANOVA) das áreas obtidas por CLAE.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F
ENTRE	5	$2,28957 \times 10^{12}$	$4,57913 \times 10^{11}$	14208,97*
- regressão linear	1	$2,2892 \times 10^{12}$	$2,2892 \times 10^{12}$	71033,5*
- desvio de linearidade	4	366228010,8	91557002,71	2,84
RESÍDUO	12	386724556	32227046,34	-
TOTAL	17	$2,28995 \times 10^{12}$	-	-

* significativo para $p < 0,05$.

6.3.5.3. Precisão

Os resultados de precisão (repetibilidade) e precisão intermediária do método proposto por CLAE encontram-se na Tabela 6.18.

TABELA 6.18. Resultados da repetibilidade e da precisão intermediária do método analítico por CLAE a 305 nm.

Amostra	Repetibilidade			Precisão intermediária
	Dia 1	Dia 2	Dia 3*	
1	100,23	100,86	100,31	
2	101,06	100,90	100,75	
3	100,64	101,67	101,46	99,69
4	98,79	101,90	102,33	100,88
5	99,40	100,86	101,34	
6	98,83	99,27	98,67	100,87
7	98,86	100,71	101,24	
Média (%)	99,69	100,88	100,87	100,48
DPR	0,95	0,84	1,14	0,68

* analista B

6.3.5.4. Exatidão

Os resultados do estudo de exatidão, realizado através do método de adição de padrão, estão descritos na Tabela 6.19.

TABELA 6.19. Resultados referentes ao estudo de exatidão do método analítico por CLAE, realizado através do método de adição de padrão.

Concentração adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentagens recuperadas (%)	Média (%)	DPR (%)
5,0	98,74	99,63	0,81
	99,83		
	100,31		
10,0	101,72	102,26	0,46
	102,51		
	102,55		
20,0	101,17	101,92	0,92
	101,62		
	102,98		

6.3.5.5. Robustez

A Tabela 6.20 apresenta os resultados da porcentagem de entacapona, na solução amostra, obtida em cada experimento.

TABELA 6.20. Resultados referentes à porcentagem de entacapona, obtida em cada experimento, do teste de robustez.

Experimento	Porcentagem de entacapona (%)
1	100,41
2	101,83
3	101,21
4	100,05
5	99,43
6	100,44
7	102,97
8	101,14

A Tabela 6.21 apresenta os efeitos dos fatores em análise e o valor de t calculado.

TABELA 6.21. Resultados dos efeitos e t calculado para os fatores em análise no estudo da robustez por CLAE.

Fator	Efeito	t calculado
pH da água	0,07%	0,08
Marca da coluna	0,45%	0,57
λ (nm)	1,16%	1,48
% de acetonitrila	-1,32%	-1,68
Temperatura do forno (°C)	-0,99%	-1,27
Fluxo (ml/min)	0,16%	0,20

$t_{tab(0,05; 7)} = 2,36$; Erro experimental (E_e) = 0,785.

6.3.5.6. Adequabilidade do sistema

A Tabela 6.22 apresenta os resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos pelo método cromatográfico e os valores preconizados.

TABELA 6.22. Parâmetros aproximados de adequabilidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados para CLAE (FDA, 1994; SHABIR, 2003).

Parâmetro	Recomendação	Fotodegradado	Entacapona
Fator de capacidade (k')	$K' > 2$	4,4	5,1
Repetibilidade das injeções	$DPR \leq 2\%$, $n \geq 5$	0,23%	0,26%
Resolução (R)	$R > 2$		2,90
Fator de cauda (TF)	$TF < 2$	1,10	1,13
Pratos teóricos (N)	$N > 2000$	9700	10900

6.3.6. Discussão

As melhores condições cromatográficas foram definidas após o teste de diferentes proporções de solventes orgânicos (acetonitrila e metanol) e água, ajustada em diferentes valores de pH na fase móvel. A utilização de água pH 3,0 (ajustada com ácido fosfórico 10%) e acetonitrila (65:35) mostrou-se adequada, proporcionando um tempo de retenção reprodutível de, aproximadamente, 6,7 minutos para entacapona, excelente eficiência (10000 pratos teóricos) e simetria (1,1) e boa resolução (2,9) entre o fármaco e o produto de fotodegradação, com tempo de retenção de, aproximadamente, 6,0 minutos.

A proporção de acetonitrila teve influência direta no tempo de retenção do fármaco e na resolução entre entacapona e o produto de fotodegradação. Com a concentração de 35% de acetonitrila obteve-se os melhores resultados, pois apresentou boa resolução (2,9) e tempos de retenção adequados para análises de rotina de controle de qualidade. A utilização de 30% de acetonitrila na fase móvel melhorou a resolução entre os picos (4,1), no entanto, os tempos de retenção foram de 9,2 e 10,8 minutos para o fotodegradado e a entacapona, respectivamente. Ao contrário, com a utilização de 40% de acetonitrila, os tempos de retenção diminuíram para 4,1 e 4,5 minutos e a resolução foi de apenas 2,0.

O pH da água, ajustado em 3,0, da fase móvel foi definido em função da melhor simetria e aumento do número de pratos teóricos. Verificou-se a proporcionalidade entre a diminuição do pH da água e a melhora dos parâmetros de conformidade do sistema, no entanto, fases móveis com pH abaixo de 3 provocam diminuição no tempo de vida útil das colunas cromatográficas (SNYDER *et al.*, 1997). Esses resultados devem-se ao pka do fármaco (4,5), o qual em pH 3,0 está praticamente na forma não-ionizada.

O tempo de retenção, obtido em, aproximadamente, 6,7 minutos, mostrou-se adequado para análises de rotina em controle de qualidade. O comprimento de onda selecionado de 305 nm foi escolhido por apresentar maior absorção (mAU) em função das concentrações de entacapona avaliadas.

A partir da definição das condições cromatográficas, procedeu-se a validação do método indicativo de estabilidade de entacapona por CLAE.

A especificidade do método por CLAE foi avaliada através da verificação da interferência dos excipientes da formulação e através da degradação forçada da SQT de entacapona e dos comprimidos de entacapona em condições hidrolíticas ácidas e alcalinas, fotolítica e oxidativas.

O cromatograma da solução placebo dos comprimidos (Figura 6.3) demonstrou que não existia interferência dos excipientes da formulação no tempo de retenção atribuído à entacapona no comprimento de onda de absorção máxima (305 nm). Esses resultados foram corroborados pela análise da pureza do pico de entacapona (99,99%), obtido da solução amostra dos comprimidos, no qual não foram detectadas impurezas. Dessa forma, concluiu-se que não existiam excipientes coeluinto junto ao pico de entacapona.

Os estudos de degradação forçada são realizados para degradar as substâncias deliberadamente para o desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade e conhecimento das rotas de degradação (ICH, 2003).

A realização dos estudos da degradação forçada em meio ácido (HCl 0,1 M) demonstrou que, mesmo após aquecimento da solução ácida a 80 °C por 2 horas, não ocorreu degradação da SQT (Figura 6.4) e dos comprimidos de entacapona. A área do pico de entacapona, em ambas as soluções, manteve-se similar à obtida na solução de SQT preparada em condições normais de análise, não sendo detectados picos adicionais nos cromatogramas. Além disso, os resultados de determinação da curva de pureza dos picos de entacapona na SQT e nos comprimidos revestidos demonstraram a pureza do pico de entacapona. Os resultados demonstraram que o fármaco entacapona e o produto acabado de entacapona apresentaram-se estáveis em meio ácido nas condições estudadas.

Em relação à degradação forçada em condições alcalinas, os resultados demonstram que não houve degradação do fármaco no tempo zero na SQT e nos comprimidos de entacapona, porém quando realizada a análise da solução mantida em NaOH 0,1 M por 1 hora, observou-se o aparecimento de picos referentes a produtos de degradação em torno de 2,7 e 6,2 minutos e a redução da área relativa referente à entacapona. Os teores residuais de entacapona na SQT foram de 88,88% e 74,18%, após 1 hora e 2 horas em contato com a solução alcalina,

respectivamente. A degradação da solução amostra dos comprimidos foi similar, apresentando teores de 89,12% e 74,55%, respectivamente. No entanto, os resultados de determinação da curva de pureza dos picos de entacapona na SQT (100,00%) e nos comprimidos revestidos (99,99%) demonstraram que os produtos formados não interferiram na quantificação de entacapona. Verificou-se, também, quando se analisou os cromatogramas em 305 nm, que as áreas dos picos de degradação formados não foram equivalentes ao decréscimo da área de entacapona. Provavelmente, esses resultados devem-se à formação de produtos de degradação com baixo peso molecular ou com absorção em outro comprimento de onda, conforme verificado com o produto em 2,7 minutos, onde a absorção máxima era em 254 nm e 280 nm. Esses resultados também podem estar correlacionados com a oxidação de grupamentos fenólicos (FU e SIBLEY, 1977; USP 30, 2007).

Em relação à exposição do fármaco em H_2O_2 , os resultados demonstraram que não houve degradação instantânea de entacapona na SQT e nos comprimidos quando expostos à degradação forçada em H_2O_2 3%. No entanto, quando expostos em H_2O_2 30% e aquecimento a 80 °C durante 2 horas observou-se a formação de produtos de degradação em 4,2 e 6,2 minutos. A área de entacapona diminuiu aproximadamente 65% em ambas as soluções, porém os produtos de degradação formados não apresentaram área correspondente a esse decréscimo em 305 nm. A análise do espectro do produto de degradação obtido em 4,2 minutos, demonstrou que o mesmo apresentava máximos de absorção em 240 nm e 262 nm. A análise em outros comprimentos de onda também não detectou picos adicionais. A injeção de uma solução branco do H_2O_2 permitiu verificar que os picos com tempos de retenção de 1,65 e 2,15 minutos (Figura 6.6) referiam-se ao estabilizante presente no peróxido de hidrogênio. A análise de pureza do pico de entacapona na SQT (100,00%) e nos comprimidos (99,99) demonstrou a seletividade do método proposto nessas condições. A degradação nessas condições pode estar relacionada à oxidação do grupamento fenólico (FU e SIBLEY, 1977; USP 30, 2007).

Os espectros dos produtos de degradação formados em 6,2 minutos em condições alcalinas e condições oxidativas foram similares ao espectro do produto de fotodegradação.

A degradação forçada em luz ultravioleta de 254 nm demonstrou que as soluções de entacapona na SQT (Figura 6.7) e nos comprimidos revestidos degradam em condições fotolíticas. A área do pico de entacapona em ambas as soluções decresceu em torno de 11% e visualizou-se a presença de um pico adicional, com tempo de retenção de aproximadamente 6,0 minutos. Os espectros sobrepostos da entacapona e do produto de fotodegradação (Figura 6.8) demonstraram a similaridade entre os dois produtos, indicando uma possível isomerização do fármaco entacapona, conforme verificado por KARLSSON e WIKBERG (1992) e LEHTONEN e colaboradores (1999). Os resultados de determinação da curva de pureza dos picos de entacapona na SQT (100,00%) e nos comprimidos revestidos (100,00%) demonstraram que o produto formado não interferiu na quantificação de entacapona, garantindo a seletividade do método analítico.

Devido ao comportamento do fármaco em condições fotolíticas, essa condição foi utilizada para determinação da cinética de degradação e realização do espectro de massas do fotodegradado, conforme o Capítulo V deste trabalho.

Além da seletividade demonstrada na presença dos produtos de degradação forçada, formados individualmente em cada condição de estresse, a mistura de todos os produtos de degradação formados também demonstrou a seletividade do método por CLAE, conforme verificado pelo resultado de pureza do pico de entacapona (Figura 6.10).

Os resultados de degradação forçada também possibilitaram concluir que o método por espectrofotometria na região do UV possivelmente não apresentará especificidade suficiente para quantificação de entacapona na presença do produto de degradação formado em condições fotolíticas, devido à absorção de ambos em 305 nm.

A linearidade do método analítico, avaliada através da construção de três curvas padrão, foi determinada a partir do coeficiente de correlação (r) e da análise da variância (ANOVA) (Figura 6.11 e Tabela 6.17, respectivamente). A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ($y = 36167,86136x - 29156,464$) e o valor do coeficiente de correlação ($r = 0,9998$)

indicaram a existência de relação entre as áreas obtidas e a concentração da SQT de entacopona, ou seja, existe evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003). Os resultados obtidos na ANOVA das absorvâncias obtidas demonstram que a regressão foi significativa e que não ocorreu desvio da linearidade na faixa de concentração estudada (10 – 40 µg/ml).

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade e da precisão intermediária (Tabela 6.18). Os valores experimentais obtidos para a determinação quantitativa de entacopona nos comprimidos revestidos durante três dias de análise foram de 99,69%, 100,88% e 100,87%. O valor máximo de DPR foi de 1,14, obtido no primeiro dia de análise da repetibilidade. A precisão intermediária, avaliada através da determinação do DPR entre os dias de análise da repetibilidade do método, apresentou teor médio de entacopona de 100,48% nos comprimidos e DPR de 0,68. Os resultados de DPR obtidos inferiores a 2,0, conforme preconiza a literatura, demonstraram a precisão do método analítico em termos de repetibilidade e precisão intermediária (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 30, 2007).

A exatidão do método analítico por CLAE foi determinada através do teste de recuperação. As porcentagens médias de recuperação encontradas (Tabela 6.19) apresentaram valores na faixa de 99,63% a 102,26%, demonstrando a exatidão do método proposto.

A robustez do método analítico foi avaliada através de um desenho experimental de Plackett-Burman, experimento de dois níveis que permite realizar a variação de um número relativamente elevado de fatores em um número relativamente pequeno de experimentos. Os fatores selecionados representam aqueles mais susceptíveis a mudanças quando o método é transferido para outros laboratórios, analistas ou instrumentos e que, potencialmente, podem influenciar a resposta (HEYDEN *et al.*, 2001). A análise dos resultados do estudo de robustez, realizada através do cálculo dos efeitos de cada fator estudado e determinação do Teste *t* de *Student*, demonstrou que os fatores avaliados não apresentaram efeito significativo sobre a quantificação de entacopona nos comprimidos revestidos por CLAE. A análise estatística realizada pelo Teste *t* de *Student* (Tabela 6.21) demonstrou que não existiu diferença significativa entre o efeito obtido no ensaio para cada fator com o valor de $t_{(0,05; 7)}$; bicaudal tabelado (2,36). O erro experimental

do método apresentou valor de 0,785. Desta forma, demonstrou-se que em relação a esses fatores, o método é robusto.

O conhecimento dos produtos de degradação formados durante os ensaios de degradação forçada permitiu verificar que a interferência mais significativa seria do produto formado pela degradação fotolítica. Devido a isso, a avaliação da possível interferência desse produto foi avaliada diariamente antes da realização da validação do método proposto. A análise dos parâmetros de conformidade do sistema permitiu verificar a adequabilidade do método proposto por CLAE (Tabela 6.22). O resultado do fator de capacidade (k') demonstrou que o pico do produto de fotodegradação e o pico de entacapona apresentavam um tempo de retenção adequado, com uma separação eficiente dos picos referentes ao solvente e a fase móvel. O baixo DPR obtido no teste de repetibilidade das injeções garantiu que o sistema instrumental estava em condições de produzir resultados confiáveis. A resolução (R) encontrada entre o pico do fotodegradado e o pico de entacapona superior a 2 garante que, mesmo na presença dos produtos de degradação forçada formados nesse estudo, a quantificação de entacapona será exata e precisa. Os demais parâmetros de conformidade do sistema avaliados, fator de cauda (FT) e pratos teóricos (N), apresentaram resultados que garantem que o método proposto é adequado para a quantificação de entacapona em comprimidos revestidos.

Considerando os resultados dos parâmetros analíticos avaliados, concluiu-se que o método por CLAE foi adequado para determinação quantitativa de entacapona nos comprimidos revestidos.

6.4. Análise estatística comparativa dos métodos

Para verificar a capacidade de utilizar indistintamente os métodos desenvolvidos por espectrofotometria no UV e por CLAE para quantificação de entacapona nos comprimidos revestidos, realizou-se a análise estatística comparativa entre os resultados obtidos de repetibilidade para os dois métodos propostos, utilizando o Teste t de *Student*, presumindo variâncias equivalentes.

6.4.1. Resultados

Na Tabela 6.23 estão apresentados os valores médios obtidos na determinação do teor de entacapona através dos métodos propostos por espectrofotometria na região do UV e por CLAE, bem como a comparação entre os mesmos, efetuada através do Teste *t* de *Student*.

TABELA 6.23. Análise comparativa dos métodos propostos por UV e CLAE utilizando Teste *t* de *Student*.

Parâmetros	Variável 1 (UV)	Variável 2 (CLAE)
Média	101,33	100,48
Variância	3,15	1,21
Observações	21	21
Variância agrupada	2,18	-
Hipótese de diferença média	0	-
gl	40	-
Estatística <i>t</i> (<i>t</i> calculado)	1,86	-
<i>t</i> crítico bi-caudal	2,02 (p<0,05)	-

6.4.2. Discussão

O resultado do Teste *t* de *Student*, presumindo variâncias equivalentes e $p < 0,05$, demonstrou não haver diferença significativa entre os métodos propostos por espectrofotometria na região do UV e por CLAE, para quantificação de entacapona nos comprimidos revestidos, ou seja, os métodos podem ser intercambiáveis. Porém, cabe salientar, que se a amostra apresentar produtos de degradação, o método por espectrofotometria na região do UV não pode ser utilizado, considerando a possível interferência do produto de fotodegradação em 305 nm.

6.5. Conclusões

- O método desenvolvido e validado por espectrofotometria na região do UV apresenta especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, ou seja, adequado para o controle de qualidade de rotina de comprimidos de entacaponas;
- O método desenvolvido e validado por CLAE apresenta especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, ou seja, adequado para o controle de qualidade de rotina de comprimidos de entacaponas;
- Os métodos validados por espectrofotometria na região do UV e por CLAE, para a determinação quantitativa de entacaponas nos comprimidos revestidos, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com o Teste *t* de *Student*, presumindo variâncias equivalentes.

6.6. Artigo publicado

**7. CAPÍTULO IV - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE
DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE ENTACAPONA**

7.1. Introdução

A absorção de fármacos após administração oral, a partir de formas farmacêuticas sólidas, depende da liberação do mesmo da sua forma farmacêutica, da dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e da permeabilidade através das membranas. Fatores relacionados ao paciente, tais como fisiologia da membrana, fluxo sanguíneo e pH do trato gastrintestinal, bem como fatores relacionados ao fármaco e à formulação, como solubilidade e natureza química do fármaco, polimorfismo, coeficiente de partição, quiralidade, tamanho de partícula, entre outros, tornam o processo de absorção complexo e variável. Qualquer fator que afete a desagregação ou a dissolução pode afetar a biodisponibilidade do fármaco (SHARGEL *et al.*, 2005).

A classificação biofarmacêutica do fármaco pode ser utilizada no desenvolvimento do método de dissolução e verificação da possibilidade de realização de correlação *in vivo-in vitro* (CIVIV).

De acordo com AMIDON e colaboradores (1995), os fármacos podem ser classificados em quatro classes biofarmacêuticas:

- Classe 1: alta solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 2: baixa solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 3: alta solubilidade e baixa permeabilidade;
- Classe 4: baixa solubilidade e baixa permeabilidade;

A CIVIV é esperada quando a dissolução é a etapa limitante da absorção do fármaco na circulação, ou seja, para aqueles com baixa solubilidade. Por essa razão, se o fármaco é altamente permeável e a dissolução é a etapa limitante da absorção (classe 2), é muito provável o desenvolvimento de uma CIVIV (AMIDON *et*

al., 1995; FDA, 2000; ROHRS, 2001). Porém, para fármacos da classe 4, como a entacapona, além da dissolução do fármaco, a permeabilidade também é uma etapa limitante de absorção, e conseqüentemente, uma CIVIV torna-se limitada ou não é esperada (AMIDON *et al.*, 1995).

Além da possibilidade da CIVIV, o método de dissolução é requisito fundamental na indústria farmacêutica para assegurar a qualidade lote a lote do produto farmacêutico, desenvolvimento de novas formulações e garantir a qualidade após mudanças na formulação e no processo de produção, avaliar a qualidade da formulação em função do tempo e condições de armazenamento durante o período de validade do produto (FDA, 1997; MARQUES e BROWN, 2002). Devido a isso, o método de dissolução é exigido pelo FDA para todos os produtos apresentados como formas farmacêuticas sólidas de uso oral (SHARGEL *et al.*, 2005).

O método de dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido, em um determinado volume de meio, mantida à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, após determinado período, utilizando equipamento com dispositivo para promover agitação do meio em uma determinada velocidade (F. Bras. IV ed, 1988; USP 30, 2007).

O percentual de dissolução pode ser influenciado por diversos fatores, dentre os quais o processo de fabricação da forma farmacêutica, os tipos e quantidades de excipientes utilizados, o teor de água e as propriedades físico-químicas do fármaco (SKOUG *et al.*, 1997).

A seleção criteriosa das condições de ensaio deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminativo, resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos e distinguir mudanças significativas na composição ou no processo de produção (MANADAS *et al.*, 2002; USP 30, 2007). Um perfil de dissolução adequado apresenta 100% de liberação do fármaco entre 45 e 60 minutos, ou seja, perfis com liberação do fármaco muito rápida não demonstram poder discriminativo. Em relação à perfis de dissolução muito lentos, alterações no tipo de aparelhagem, velocidade de rotação e meio de dissolução podem ser realizadas (FORTUNATO, 2005). Além disso, o conhecimento das propriedades físico-químicas do fármaco, como pKa, solubilidade,

função da relação pH/tensoativo e estabilidade em função do pH são de suma importância (SKOUG *et al.*, 1997).

Os meios de escolha mais usuais para o desenvolvimento do método de dissolução são ácido clorídrico diluído, soluções tampões na faixa de pH fisiológico, água e tensoativos (polissorbatos 80, sais biliares e laurilsulfato de sódio). A escolha do meio ideal para ensaios de rotina deve estar relacionada com a capacidade discriminativa, estabilidade do fármaco no meio e relevância do desempenho *in vivo-in vitro*, quando possível. Durante os estudos preliminares para desenvolvimento do método, a determinação do pH antes e após a realização do método pode ser útil (USP 30, 2007).

A literatura pesquisada (FDA, 2006) apresenta as condições do método de dissolução para comprimidos de entacapona, no entanto não são indicadas as condições para quantificação do fármaco dissolvido. Diante disso, justifica-se o desenvolvimento e validação de um método de dissolução discriminativo, ou seja, o qual apresente uma velocidade de dissolução adequada para comparação de perfis de dissolução de diferentes formulações e realização do controle de qualidade de rotina dos comprimidos de entacapona.

A validação de métodos analíticos para dissolução de formas farmacêuticas sólidas deve incluir a avaliação da especificidade, estabilidade do fármaco no meio de dissolução, precisão, exatidão, linearidade e robustez. Porém, para a determinação das melhores condições, também devem ser realizados testes de solubilidade e interferência de filtros (USP 30, 2007).

7.2. Objetivos específicos

↳ Desenvolver e validar método de dissolução para comprimidos revestidos de entacapona.

7.3. Parte Experimental

7.3.1. Desenvolvimento do método de dissolução

7.3.1.1. Equipamentos e condições do método de dissolução

Utilizou-se para o desenvolvimento e validação do método de dissolução equipamento de dissolução SOTAX, modelo AT7, cromatógrafo a líquido Agilent, modelo 1200 Series utilizando coluna cromatográfica Agilent Eclipse[®] XDB octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro interno) e espectrofotômetro ultravioleta Shimadzu, modelo UV-160A.

Para a definição das condições do ensaio de dissolução mais adequadas, foram avaliados os meios que apresentaram condição *sink* ou próximas a solubilização da dose do fármaco (200 mg) em um volume de 900 ml de meio de dissolução, previamente mantidos em ultra-som por 15 minutos para desaeração. A temperatura foi mantida constante a 37,0 °C ± 0,5 °C e como aparelhagem foram utilizadas pás a 30 rpm e 50 rpm. Para o desenvolvimento do ensaio de dissolução foram realizados testes iniciais em três comprimidos.

Alíquotas de 10 ml do meio de dissolução foram manualmente retiradas nos intervalos de 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos e imediatamente filtradas em filtro quantitativo Framex, modelo 389¹. Transferiu-se 5 ml do filtrado para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com metanol, de modo a obter solução na concentração de 44,44 µg/ml.

O meio de dissolução não foi repostado, porém as devidas correções de concentração foram realizadas. Com base nos resultados preliminares obtidos nos perfis de dissolução, realizou-se a validação do método, realizando as coletas nos seguintes intervalos de tempo: 3, 6, 9, 12, 15, 30 e 60 minutos, utilizando 900 ml de meio tampão acetato pH 5,3.

As condições cromatográficas para determinação do teor de entacapona dissolvida estão apresentadas na Tabela 5.2, com exceção da marca e do comprimento da coluna, que nesse ensaio, foi de 150 mm.

7.3.2. Determinação da solubilidade da SQT de entacapona

A determinação da solubilidade da SQT de entacapona foi avaliada através da preparação de uma solução saturada (2 mg/ml) nos seguintes meios:

- Água ultrapura;
- Tampão biftalato ácido 0,05 M pH 3,5;
- Tampão acetato 0,05 M pH 4,5, pH 5,1, pH 5,3 e 5,5;
- Tampão fosfato 0,05 M pH 5,8, pH 6,0, pH 6,5, pH 7,0 e pH 7,5;
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,25% (p/V) pH 5,0, 0,375% (p/V) pH 5,0 e 0,5% (p/V) pH 5,0.

Os meios tamponados utilizados nesse ensaio foram preparados de acordo com a USP 30 (2007) e as soluções foram mantidas em banho de água a $37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitadas, a cada 10 minutos, em agitador de vórtex.

Alíquotas de 10 ml dessas soluções foram retiradas 1 hora e 2 horas após o início do experimento e filtradas através de filtro de membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Transferiu-se 1 ml desse filtrado para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com metanol de modo a obter solução na concentração teórica de $100\text{ }\mu\text{g/ml}$. A determinação da solubilidade foi realizada utilizando as condições cromatográficas descritas na Tabela 5.2 do método validado por CLAE.

7.3.4. Estabilidade das soluções de entacapona SQT e dos comprimidos de entacapona nos meios de dissolução

Foram preparadas soluções da SQT de entacapona e da amostra dos comprimidos, nas mesmas condições do método de dissolução, comparando as áreas obtidas das soluções mantidas à temperatura de $37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas e à temperatura ambiente por 24 horas, com a mesma solução obtida no tempo zero. A determinação da estabilidade foi realizada utilizando as condições cromatográficas descritas na Tabela 5.2 do método validado por CLAE.

7.3.4.1. Preparação da solução da SQT de entacapona

Foram pesados, exatamente, 11,11 mg da SQT de entacapona e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 50 ml. Adicionou-se 5 ml de metanol, manteve-se em ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com solução tampão acetato pH 5,3 (Solução A). Transferiu-se 5 ml dessa solução para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com solução tampão acetato pH 5,3, de modo a obter uma solução com concentração de 44,44 µg/ml de entacapona (Solução B). A área obtida para essa solução foi considerada como o tempo zero no estudo da estabilidade.

Para verificar a estabilidade da Solução A, estocou-se, ao abrigo da luz, uma alíquota de 10 ml dessa solução, a 37,0 °C ± 0,5 °C, durante 2 horas. Posteriormente, realizou-se uma diluição em tampão acetato pH 5,3, de modo a obter uma solução com concentração de 44,44 µg/ml de entacapona

A estabilidade da Solução B foi verificada após 24 horas da preparação. A solução foi mantida em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A estabilidade da SQT de entacapona também foi verificada realizando a diluição da Solução A em metanol e analisada após 24 horas.

7.3.4.2. Preparação da solução amostra

Foram pesados, exatamente, o equivalente a 11,11 mg de entacapona a partir do peso médio dos comprimidos e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de solução tampão acetato pH 5,3. Manteve-se em ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente (Solução A). Essa solução foi filtrada em filtro quantitativo Framex e uma alíquota de 5 ml foi transferida para balão volumétrico de 25 ml e o volume completado com solução tampão acetato pH 5,3, de modo a obter uma solução com concentração de 44,44 µg/ml de entacapona (Solução B). A área obtida para essa solução foi considerada como tempo zero no estudo da estabilidade.

Posteriormente, prepararam-se as soluções para verificação da estabilidade da solução B em tampão acetato pH 5,3 e em metanol, conforme descrito no item 7.3.4.1 para a SQT de entacapona.

7.3.5. Influência do filtro

Prepararam-se soluções da SQT de entacapona e da amostra dos comprimidos nas mesmas condições do método de dissolução, comparando a concentração antes e após as filtrações realizadas, empregando a espectrofotometria na região do UV a 305 nm.

7.3.5.1. Preparação da solução da SQT de entacapona

Foram pesados, exatamente, 11,11 mg da SQT de entacapona e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 50 ml. Para ocorrer a solubilização foram adicionados 5 ml de metanol e a solução foi mantida em ultra-som por 30 minutos. O volume foi completado com solução tampão acetato pH 5,3 e, posteriormente, homogeneizado (Solução A). Transferiu-se uma alíquota de 5 ml dessa solução para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com o metanol, de modo a obter uma solução com concentração de 22,22 µg/ml de entacapona. A leitura da absorvância dessa solução a 385 nm foi utilizada como referência (sem filtração).

Para a verificação da interferência dos filtros utilizados, a Solução A foi filtrada em papel de filtro quantitativo Framex, diluída em metanol a 22,22 µg/ml de entacapona e filtrada em membrana filtrante de nylon de 0,45 µm. Realizou-se a leitura da absorvância dessa solução a 305 nm e comparou-se o resultado com o obtido com a leitura da solução sem filtração.

7.3.5.2. Preparação da solução amostra

Pesou-se, exatamente, o equivalente a 11,11 mg de entacapona a partir do peso médio dos comprimidos e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de solução tampão acetato pH 5,3. A solução foi mantida em ultra-som por 30 minutos, o volume foi completo com o mesmo solvente e homogeneizado (Solução A). Centrifugou-se a 3000 rpm por 10 minutos, transferiu-se uma alíquota de 5 ml dessa solução para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com metanol, de modo a obter uma solução com concentração de 22,22 µg/ml de entacapona. A leitura da absorvância dessa solução a 305 nm foi utilizada como referência (sem filtração).

Para a verificação da interferência dos filtros utilizados, a Solução A foi filtrada em papel de filtro quantitativo Framex, posteriormente diluída em metanol a 22,22 µg/ml de entacapona e filtrada em membrana filtrante de nylon de 0,45 µm. Realizou-se a leitura da absorvância a 305 nm e comparou-se o resultado com o obtido com a leitura da solução sem filtração.

7.3.6. Validação do método de dissolução

7.3.6.1. Especificidade

Transferiu-se o equivalente a 1 peso médio da mistura dos excipientes, de acordo com o especificado na Tabela 6.1, para uma cuba de dissolução, utilizando 900 ml do meio de dissolução selecionado. Utilizou-se rotação de 150 rpm por 1 hora e como aparelhagem pás (USP 30, 2007). Posteriormente ao ensaio de dissolução, alíquotas de 10 ml foram coletadas e filtradas utilizando papel filtro quantitativo Framex, diluídas no meio de dissolução a concentração teórica de 10 µg/ml e analisadas por espectrofotometria na região do UV. O mesmo procedimento foi realizado para a determinação da especificidade por CLAE, porém as amostras foram diluídas em metanol a concentração teórica de 44,44 µg/ml, filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm e injetadas. As amostras foram preparadas em duplicata.

7.3.6.2. Linearidade

Avaliou-se a linearidade do método analítico através da construção de três curvas padrão, preparadas em um mesmo dia, contendo seis concentrações.

Pesou-se 20 mg da SQT de entacapona e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 5 ml de metanol. Completou-se o volume com solução tampão acetato pH 5,3, de modo a obter solução a 200 µg/ml. A partir dessa solução foram realizadas as seguintes diluições, utilizando solução tampão acetato pH 5,3 para completar o volume, de acordo com a Tabela 7.1.

TABELA 7.1. Preparação da curva padrão para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE para o método de dissolução.

N	Volume de solução estoque (ml)	Balão volumétrico (ml)	Concentração final (µg/ml)
1	1,0	20	10,0
2	2,0	20	20,0
3	3,0	20	30,0
4	4,0	20	40,0
5	5,0	20	50,0
6	6,0	20	60,0

As médias das áreas, correspondentes a cada diluição, foram utilizadas para plotagem de um gráfico de absorvância *versus* concentração. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) da curva padrão foram determinados através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e analisados através da análise de variância (ANOVA).

7.3.6.3. Precisão

7.3.6.3.1. Preparação da solução da SQT de entacapona

Foram pesados, exatamente, 11,11 mg da SQT de entacapona e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 50 ml. Adicionou-se 5 ml de metanol,

manteve-se a solução em ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com solução tampão acetato pH 5,3. Uma alíquota de 5 ml dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml e o volume foi completado com metanol, de modo a obter uma solução com concentração de 44,44 µg/ml de entacapona. Posteriormente a solução foi filtrada através de membrana filtrante de nylon de 0,45 µm e analisada por CLAE.

7.3.6.3.2. Preparação da solução amostra dos comprimidos

Para a preparação da solução amostra foram retiradas alíquotas de 10 ml de cada cuba de dissolução e filtradas em papel de filtro quantitativo Framex. Transferiu-se uma alíquota de 5 ml dessa solução para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o metanol, de modo a obter uma solução com concentração teórica de 44,44 µg/ml de entacapona. Posteriormente a solução foi filtrada através de membrana filtrante de nylon de 0,45 µm e analisada por CLAE.

7.3.6.4. Exatidão

Foram pesados 1 g da SQT de entacapona e transferidos quantitativamente, com auxílio de 50 ml de metanol, para balão volumétrico de 100 ml. Manteve-se a solução em ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com solução tampão acetato de sódio pH 5,3. Dessa solução foram transferidos 16 ml, 20 ml e 24 ml para as cubas de dissolução, contendo a mistura dos excipientes correspondente a um peso médio, equivalente a 80%, 100% e 120% da concentração do fármaco (44,44 µg/ml). Procedeu-se ao ensaio de dissolução nas condições selecionadas durante 60 minutos. Decorrido o tempo de análise, alíquotas de 10 ml foram retiradas do meio de dissolução e filtradas em filtro quantitativo Framex. Transferiu-se alíquotas de 5 ml dessas soluções para balão volumétrico de 25 ml e completou-se os volume com metanol, de modo a obter soluções a 35,56, 44,44 e 53,33 µg/ml. Posteriormente, as soluções foram filtradas através de membrana filtrante de nylon de 0,45 µm.

7.3.6.5. Robustez

A robustez do método foi avaliada no desenvolvimento do método de dissolução, utilizando como parâmetro crítico o pH do meio de dissolução.

7.4. Resultados

7.4.1. Desenvolvimento do método de dissolução

7.4.1.1. Determinação da solubilidade da SQT de entacapona

A Tabela 7.2 apresenta os resultados da solubilidade da SQT de entacapona nos meios estudados.

TABELA 7.2. Solubilidade da SQT de entacapona a 37,0 °C ± 0,5 °C.

Meio	Solubilidade (µg/ml) 1° hora	Solubilidade (µg/ml) 2° hora
Água	68,63	66,69
Tampão biftalato pH 3,5	98,97	147,11
Tampão acetato pH 4,5	93,92	142,62
Tampão acetato pH 5,1	165,42	197,43
Tampão acetato pH 5,3	219,22	234,85
Tampão acetato pH 5,5	259,32	324,08
Tampão fosfato pH 5,8	305,00	623,05
Tampão fosfato pH 6,0	648,36	1013,67
Tampão fosfato pH 6,5	1085,90	*
Tampão fosfato pH 7,0	1340,33	*
Tampão fosfato pH 7,5	*	*
SDS 0,25% (p/V) pH 5,0	139,21	162,25
SDS 0,375% (p/V) pH 5,0	205,50	202,92
SDS 0,50% (p/V) pH 5,0	261,40	287,35

* aparecimento de picos relacionados à degradação do fármaco.

7.4.1.2. Verificação dos perfis de dissolução

A Tabela 7.3 apresenta os resultados do teor de entacapona dissolvida nos seguintes meios de dissolução: soluções tampões acetato pH 5,1, 5,3 e 5,5 e tampão fosfato pH 5,8, utilizando pás a 50 rpm e coletas em 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos.

TABELA 7.3. Resultados comparativos da quantidade de entacapona dissolvida para obtenção do perfil de dissolução de comprimidos em soluções tampões acetato pH 5,1, 5,3 e 5,5 e tampão fosfato pH 5,8, utilizando pás a 50 rpm (n = 3).

Tempo (min)	Tampão pH 5,1 (% dissolvida)	Tampão pH 5,3 (% dissolvida)	Tampão pH 5,5 (% dissolvida)	Tampão pH 5,8 (% dissolvida)
5	36,73	37,86	50,71	58,39
10	63,23	77,68	81,69	88,64
15	71,66	88,56	94,76	95,01
30	82,64	96,11	98,50	100,31
60	90,49	99,67	102,49	102,18
120	94,10	99,75	99,86	102,00

Os perfis de dissolução obtidos nos tampões acetato pH 5,1, 5,3 e 5,5 e tampão fosfato pH 5,8 estão apresentados na Figura 7.1.

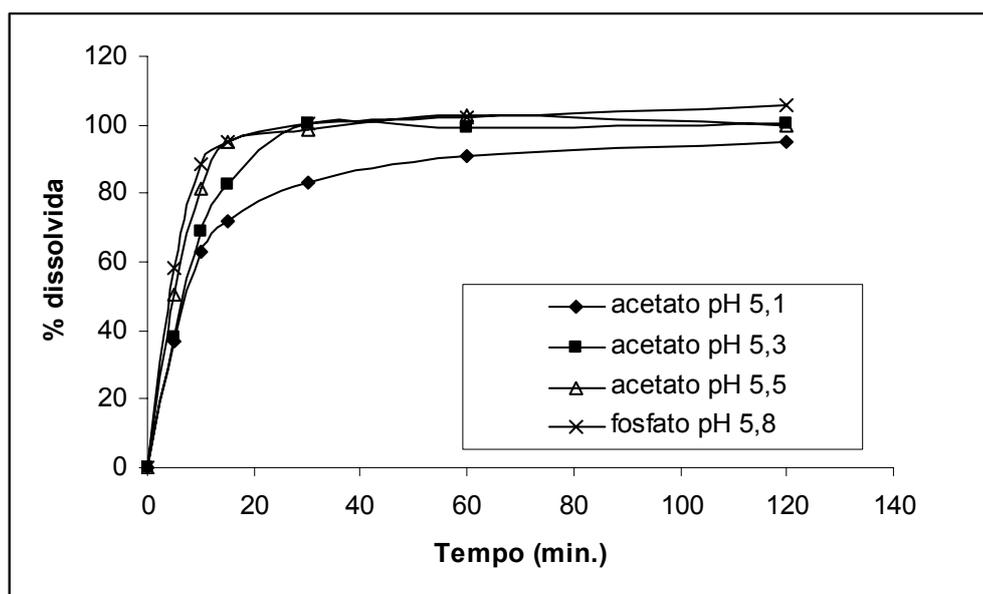


FIGURA 7.1. Perfis de dissolução de comprimidos de entacapona nos meios de dissolução de tampão acetato e fosfato, utilizando pás a 50 rpm e coletas em 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos.

A Tabela 7.4 apresenta os resultados do teor de entacapona dissolvida nos seguintes meios de dissolução: soluções de SDS 0,25%, 0,375% e 0,5%, ajustados com ácido fosfórico 0,1% até pH 5,0, utilizando pás a 50 rpm e coletas em 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos.

TABELA 7.4. Resultados comparativos da quantidade de entacapona dissolvida para obtenção do perfil de dissolução de comprimidos em soluções tampões acetato pH 5,1, 5,3 e 5,5 e tampão fosfato pH 5,8, utilizando pás a 50 rpm (n = 3).

Tempo (min)	SDS 0,25% (% dissolvida)	SDS 0,375% (% dissolvida)	SDS 0,50% (% dissolvida)
5	21,25	42,46	48,52
10	52,64	71,01	78,55
15	61,35	77,56	88,41
30	69,61	85,53	97,28
60	71,77	87,85	102,69
120	71,33	91,71	101,30

A Figura 7.2 apresenta os perfis de dissolução obtidos nas soluções de SDS 0,25%, 0,375% e 0,5%, ajustados com ácido fosfórico 0,1% até pH 5,0.

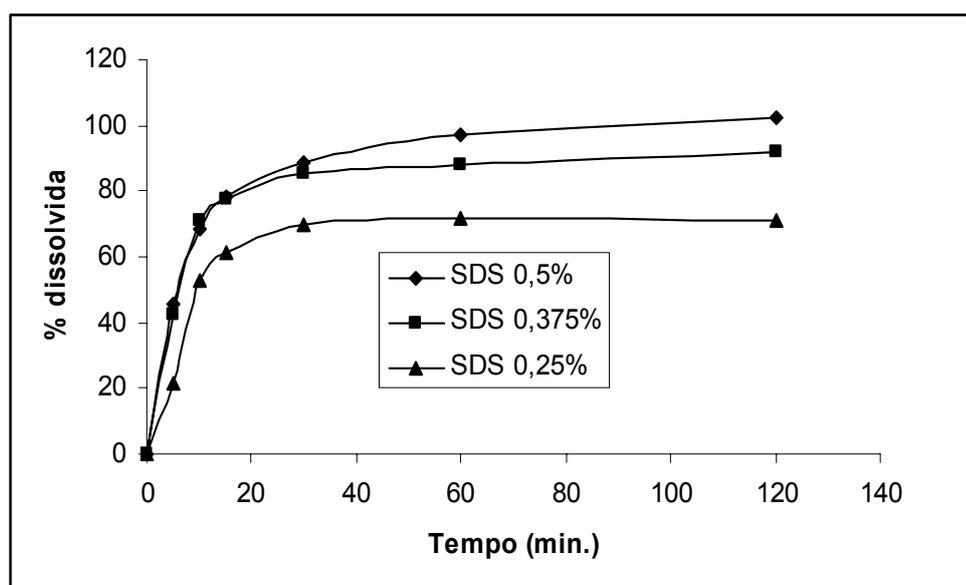


FIGURA 7.2. Perfis de dissolução de comprimidos de entacapona nos meios de dissolução contendo SDS em diferentes concentrações (0,25, 0,375 e 0,5%), utilizando pás a 50 rpm e coletas em 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos.

A Tabela 7.5 apresenta uma comparação entre os valores referentes a quantidade de entacapona dissolvida nas soluções de SDS 0,5% e na solução de tampão acetato de sódio pH 5,3, utilizando pás a 50 rpm e coletas realizadas em 3, 6, 9, 12, 15, 30 e 60 minutos.

TABELA 7.5. Resultados comparativos da quantidade de entacapona dissolvida para obtenção do perfil de dissolução de comprimidos em SDS 0,5% e em solução tampão acetato de sódio pH 5,3, utilizando pás a 50 rpm e coletas em 3, 6, 9, 12, 15, 30 e 60 minutos (n = 12).

Tempo (min)	Tampão pH 5,3 (% dissolvida)	DPR	SDS 0,5% (% dissolvida)	DPR
3	22,40	33,45	17,87	40,27
6	60,90	12,95	58,28	17,23
9	77,19	7,57	77,33	9,87
12	84,01	5,77	84,78	6,24
15	90,06	4,15	89,32	3,72
30	95,01	2,73	98,90	2,57
60	99,44	2,59	102,44	0,97

7.4.1.3. Estabilidade das soluções de entacapona SQT e dos comprimidos de entacapona no meio de dissolução e no diluente

Os resultados referentes à estabilidade das soluções da SQT de entacapona e da solução amostra dos comprimidos estão descritos na Tabela 7.6.

TABELA 7.6. Resultados da estabilidade das soluções da SQT e da amostra dos comprimidos de entacapona em tampão acetato de sódio pH 5,3 e metanol.

Condição	Concentração (µg/ml)*	% de entacapona
SQT tempo zero em tampão pH 5,3	44,44	-
SQT mantida a 37,0 °C ± 0,5 °C por 2 h em tampão pH 5,3	43,89	98,76
SQT mantida a temp. ambiente por 24 h em tampão pH 5,3	43,33	97,50
SQT mantida a temperatura ambiente por 24 h em metanol	44,31	99,70
Solução amostra (comprimidos) tempo zero em tampão pH 5,3	44,44	-
Solução amostra (comprimidos) mantida a 37,0 °C ± 0,5 °C por 2 h em tampão pH 5,3	43,92	98,84
Solução amostra (comprimidos) mantida a temp. ambiente por 24 h em tampão pH 5,3	43,44	97,74
Solução amostra (comprimidos) mantida a temp. ambiente por 24 h em metanol	44,20	99,46

* média de 2 determinações

7.4.1.4. Influência dos filtros

Os resultados referentes à influência dos filtros na filtração das soluções da SQT de entacapona e da solução amostra dos comprimidos estão descritos na Tabela 7.7.

TABELA 7.7. Resultados referentes à determinação da influência dos filtros na filtração da SQT de entacapona e na solução amostra.

Solução	Concentração (µg/ml)*	% de entacapona
SQT sem filtração	22,22	-
SQT filtrada	22,06	99,27
Amostra dos comprimidos centrifugada	22,22	-
Amostra dos comprimidos filtrada	22,05	99,23

* média de 2 determinações

7.4.2. Validação do ensaio de dissolução

7.4.2.1. Especificidade

O espectro de absorção no ultravioleta da solução placebo em tampão acetato de sódio pH 5,3, na faixa de 200 a 400 nm está apresentado na Figura 7.3.

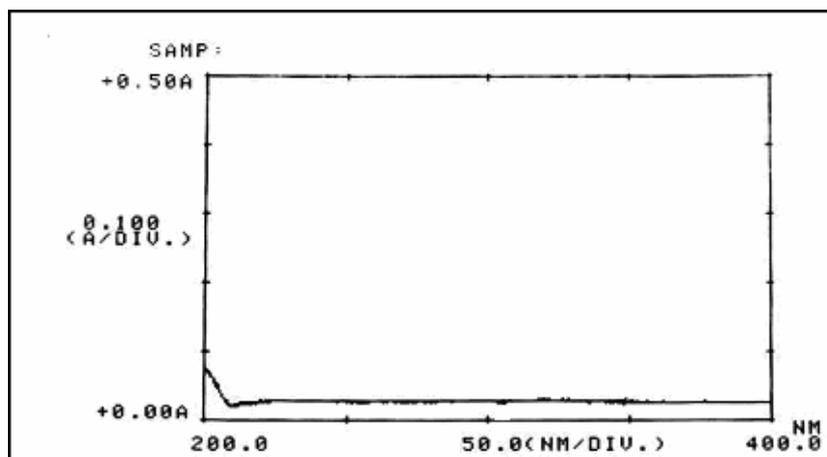


FIGURA 7.3. Espectro de absorção na região do UV da solução placebo dos excipientes dos comprimidos em tampão acetato pH 5,3, na faixa de 200 a 400 nm.

A Figura 7.4 apresenta o cromatograma da solução placebo em tampão acetato de sódio pH 5,3 e metanol.

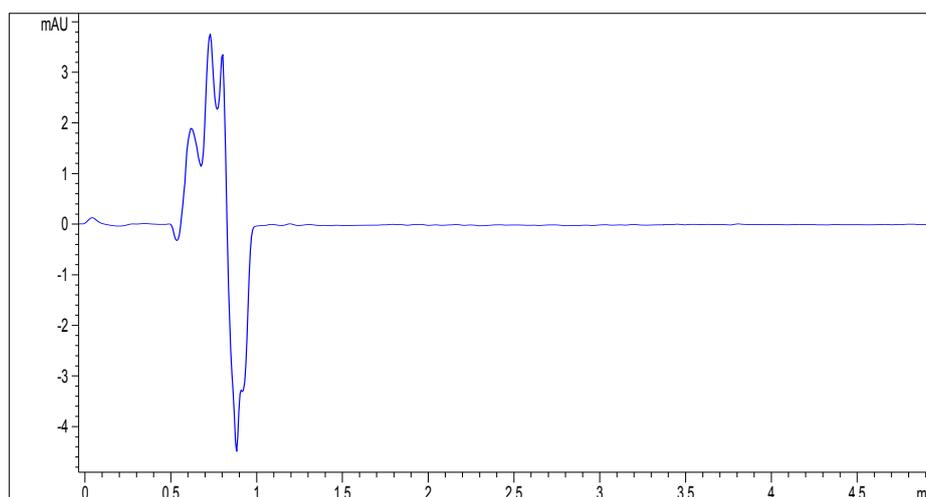


FIGURA 7.4. Cromatograma obtido através da análise por CLAE da solução placebo dos excipientes da formulação em tampão acetato de sódio pH 5,3 e metanol a 305 nm. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna Agilent Eclipse® XDB octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm; 5 µm), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

7.4.2.2. Linearidade

As áreas obtidas na realização da curva padrão da SQT de entacapona em metanol a 305 nm estão apresentadas na Tabela 7.8.

TABELA 7.8. Áreas médias obtidas na realização da curva padrão da SQT de entacapona por CLAE.

Concentração (µg/ml)	Áreas obtidas*	Área média	DPR
10,0	289,0010	293,6859	1,58
	293,7985		
	298,2582		
20,0	626,5881	629,2208	0,93
	625,1282		
	635,9461		
30,0	952,0292	964,8070	1,18
	968,2144		
	974,1775		
40,0	1302,8840	1306,7973	0,32
	1311,1100		
	1306,3980		
50,0	1648,7380	1643,2987	1,02
	1624,4840		
	1656,6740		
60,0	1994,7220	1995,8833	0,30
	1990,6410		
	2002,2870		

* média de 3 determinações

A partir das áreas obtidas foram calculados a equação da reta e o coeficiente de correlação (r), conforme a Figura 7.5.

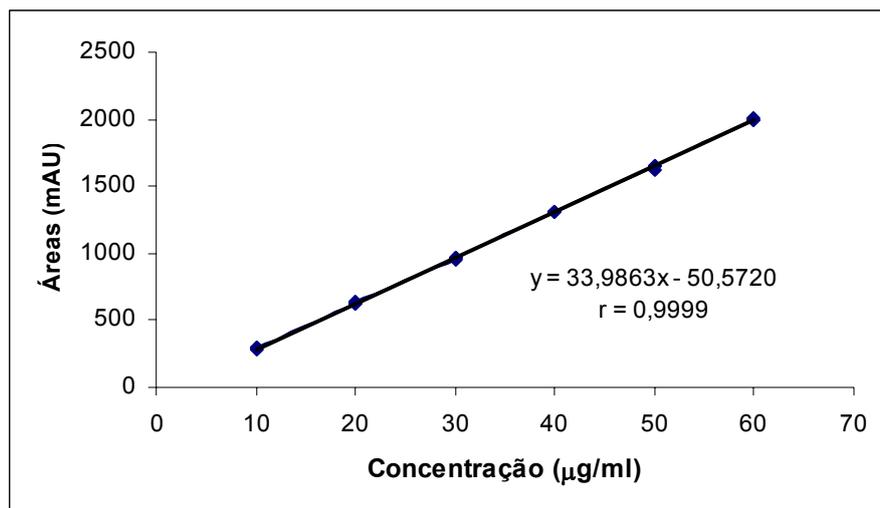


FIGURA 7.5. Representação gráfica da curva padrão, da equação da reta e do coeficiente de correlação de SQT de entacapona em metanol por CLAE.

A Tabela 7.9 apresenta os resultados dos tratamentos estatísticos realizados sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão da SQT de entacapona para avaliação da linearidade por método de dissolução por CLAE.

TABELA 7.9. Análise da variância (ANOVA) das áreas obtidas por CLAE.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F
ENTRE	5	6064486,176	1212897,235	13983,13*
- regressão linear	1	6064114,232	6064114,232	69911,34*
- desvio de linearidade	4	371,9440	92,9860	1,07
RESÍDUO	12	1040,881	86,741	-
TOTAL	17	6065527,056	-	-

* significativo para $p < 0,05$.

7.4.2.3. Precisão

Os resultados de repetibilidade do método analítico, avaliado através dos valores de DPR obtidos nas diferentes concentrações da curva padrão, podem ser visualizados na Tabela 7.8. O DPR máximo obtido foi de 1,58.

Os resultados de precisão intermediária do método de dissolução estão apresentados na Tabela 7.10.

TABELA 7.10. Resultados de precisão intermediária do método de dissolução por CLAE utilizando diferentes analistas.

Tempo (min)	Analista A (% dissolvida)	Analista B (% dissolvida)	Diferença percentual entre analistas
3	20,32	24,49	4,17
6	59,60	62,19	2,59
9	75,15	79,24	4,09
12	81,84	86,20	4,36
15	89,23	90,90	1,67
30	94,76	95,27	0,51
60	100,13	98,75	1,38

A Figura 7.6 apresenta o cromatograma sobreposto da SQT de entacapona e da solução amostra de entacapona obtido na determinação quantitativa do teor dissolvido de entacapona por CLAE.

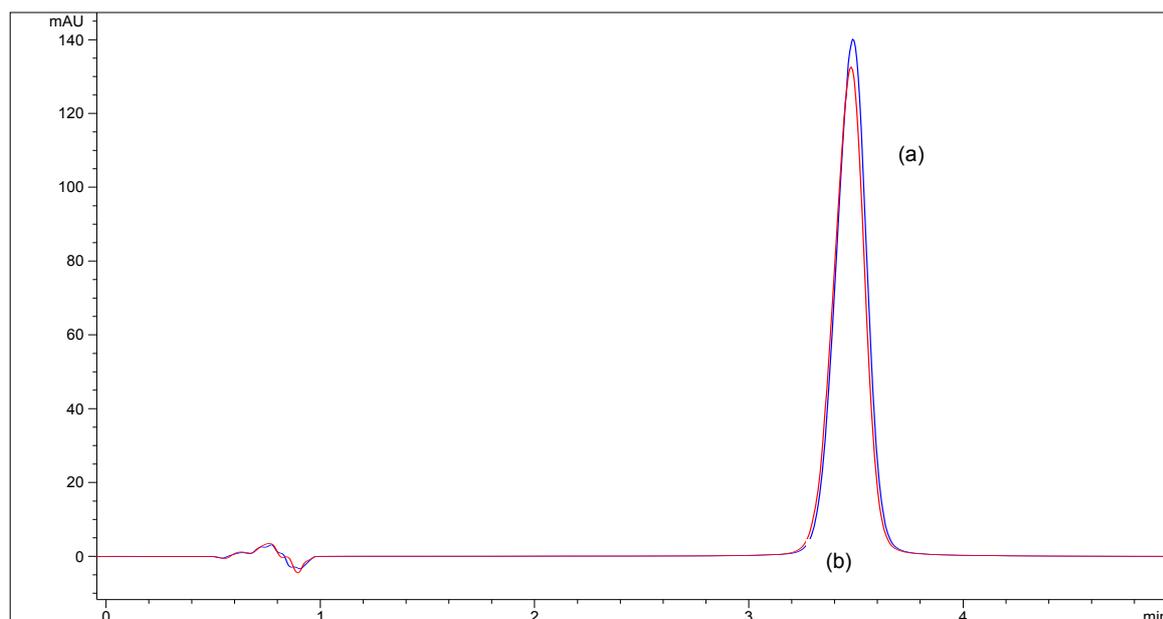


FIGURA 7.6. Cromatogramas sobrepostos da SQT de entacapona (a) e da solução amostra dos comprimidos de entacapona (b) em metanol a 44,44 µg/ml. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna Agilent Eclipse® XDB octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm; 5 µm), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

7.4.2.4. Exatidão

A Tabela 7.11 apresenta os resultados referentes ao estudo de exatidão realizado através do método de adição de padrão por CLAE.

TABELA 7.11. Resultados referentes ao estudo de exatidão do método analítico por CLAE, realizado através do método de adição de padrão.

Concentração adicionada (µg/ml)	Concentrações recuperadas (µg/ml)*	% de recuperação
35,56	35,44	99,66
	34,85	98,00
44,44	44,71	100,61
	44,49	100,11
53,33	54,22	101,67
	53,78	100,84

* média de 2 determinações

7.4.2.5. Robustez

As diferenças verificadas nos perfis de dissolução entre as soluções tampão acetato de sódio pH 5,1, pH 5,3 e pH 5,5, apresentados na Figura 7.1 e na Tabela 7.3, foram utilizadas para avaliar a robustez do método de dissolução.

7.4.3. Perfil de dissolução

Os resultados obtidos para o perfil de dissolução (n = 12) estão representados na Figura 7.7.

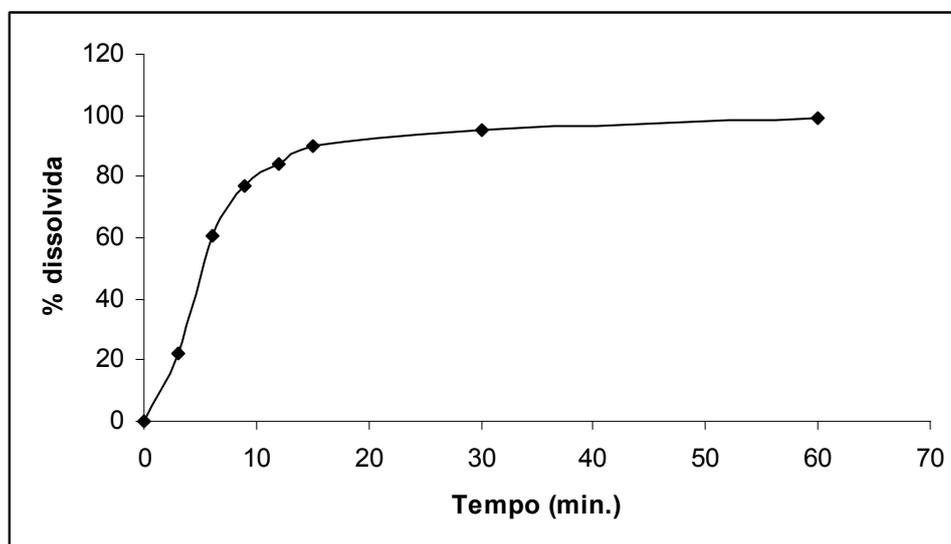


FIGURA 7.7. Perfil de dissolução de comprimidos de entacapona em tampão acetato pH 5,3, utilizando aparelhagem pás a 50 rpm.

7.5. Discussão

O fármaco entacapona é rapidamente absorvido pelo organismo, atingindo concentração plasmática máxima em aproximadamente 1 hora, no entanto, apresenta uma grande variação intra e inter-individual e biodisponibilidade média de apenas 35%. De acordo com esses dados e, conforme afirmado por HEIMBACH e colaboradores (2003), o fármaco pertence a classe 4 da classificação biofarmacêutica, apresentando problemas significativos para liberação a partir da forma farmacêutica. Por essa razão, a síntese de pró-fármacos tem sido objetivo de

uma série de pesquisas científicas para melhorá-la (LEPPÄNEN *et al.*, 2000; SAVOLAINEN *et al.*, 2000; HEIMBACH *et al.*, 2003). A possibilidade de realização de CIVIV para fármacos de classe 4 aumenta quanto maior for a biodisponibilidade do fármaco. Conforme estudos de correlação realizado para cápsulas gelatinosas de ritonavir, fármaco de classe 4, a CIVIV foi possível, pois a biodisponibilidade era de 70% (ROSSI *et al.*, 2007).

O desenvolvimento do ensaio de dissolução baseou-se nas propriedades físico-químicas da entacapona, a qual apresenta solubilidade dependente do pH, devido ao seu caráter ácido fraco (HEIMBACH *et al.*, 2003). A elevação do pH aumenta a ionização do fármaco e, com isso, sua solubilidade aumenta (ROHRS, 2001). Em virtude do pKa da entacapona (4,5), realizaram-se testes de solubilidade em pH uma unidade abaixo (pH 3,5), no próprio pKa (pH 4,5) e acima desse valor (5,1 a 7,5). A utilização de dodecilsulfato de sódio (SDS) como meio de dissolução também foi avaliada devido à baixa solubilidade do fármaco.

A determinação da solubilidade da SQT de entacapona, realizada no desenvolvimento do método de dissolução, foi avaliada para determinação dos prováveis meios de dissolução que apresentavam condição *sink*, definida como uma quantidade de solvente não inferior a 3 vezes o volume de meio necessário para obter uma solução saturada do fármaco (MARQUES e BROWN, 2002; USP 30, 2007).

Os resultados de solubilidade do fármaco demonstram que apenas o meio de dissolução em tampão fosfato pH 6,5 apresentou condição *sink*. Os meios tamponados em pH acima de 6,0 indicaram o início de degradação do fármaco, verificada pelo aparecimento de picos adicionais nos cromatogramas, e com isso, não foram avaliados. A utilização de meios de dissolução que não apresentam condição *sink* é justificada se os mesmos apresentarem perfis de dissolução mais discriminativos. Assim sendo, realizaram-se os estudos preliminares em tampão acetato pH 5,1, 5,3 e 5,5, tampão fosfato pH 5,8 e SDS 0,25%, 0,375% e 0,5%, meios onde a solubilidade do fármaco era total ou próxima a essa condição, ou seja, 200 mg de entacapona em 900 ml de meio (MARQUES e BROWN, 2002; USP 30, 2007).

Conforme SAVOLAINEN e colaboradores (2000) e LEPPÄNEN e colaboradores (2000), a solubilidade de entacapona em meios ácidos é muito baixa e, por essa razão, não foi avaliada.

Os perfis de dissolução foram realizados em duas etapas, utilizando pás a 50 rpm e 900 ml de meio de dissolução a $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. Na primeira etapa foram testados como meios de dissolução as soluções tampões acetato (pH 5,1, 5,3 e 5,5) e fosfato (pH 5,8) e na segunda etapa foram testadas soluções de SDS 0,25, 0,375 e 0,5% (p/V) pH 5,0.

Na primeira etapa, o perfil de dissolução obtido com a solução tampão acetato pH 5,1 (Figura 7.1 e Tabela 7.3) apresentou velocidade de dissolução lenta comparada aos outros meios utilizados, porém o teor médio de fármaco dissolvido em 120 minutos foi de 94,83%, indicando que ocorreu a saturação do meio de dissolução com o fármaco entacapona. Esse resultado é comprovado pelo ensaio de solubilidade do fármaco nesse meio, no qual, a solubilidade foi de 197,43 $\mu\text{g/ml}$, abaixo da solubilidade teórica total de 222,22 $\mu\text{g/ml}$, ou seja, um comprimido de 200 mg de entacapona em 900 ml do meio de dissolução.

A utilização da solução tampão acetato pH 5,3 apresentou velocidade de dissolução superior àquela obtida com a solução tampão acetato pH 5,1, como meio de dissolução. Entretanto, o percentual de dissolução em 60 minutos foi de 99,44 %, demonstrando adequada solubilização de entacapona nessas condições.

Os resultados obtidos demonstram que os meios de dissolução tampão acetato pH 5,5 e tampão fosfato pH 5,8 apresentaram uma rápida velocidade de dissolução de entacapona, com teor de fármaco dissolvido de 94,76% e 95,01%, respectivamente, em apenas 15 minutos.

Alternativamente, testou-se a redução da velocidade de rotação das pás para 30 rpm para a solução tampão acetato de sódio pH 5,5 e para a solução tampão fosfato de potássio pH 5,8, porém os resultados não foram satisfatórios. A porcentagem de dissolução para a solução tampão acetato de sódio pH 5,5 e para a solução tampão fosfato de potássio pH 5,8 foi de apenas 74,81% e 83,27% em 120 minutos, respectivamente, demonstrando que a velocidade de agitação influenciava a dissolução de entacapona.

Após verificação dos resultados obtidos com as soluções tampões acetato e fosfato, realizou-se o perfil de dissolução em SDS pH 5,0 em diferentes concentrações (0,25, 0,375 e 0,5%), com o objetivo de verificar se esses meios apresentavam melhor perfil discriminativo em comparação com os resultados obtidos com as soluções tampões. A utilização das soluções ajustadas a pH 5,0 é justificada pela baixa solubilidade de entacapona nesse pH (SAVOLAINEN *et al.*, 2000).

O perfil de dissolução obtido com a solução de SDS 0,25% (p/V) pH 5,0 (Figura 7.2) demonstrou uma velocidade de dissolução lenta comparada aos demais meios utilizados, porém a quantidade de fármaco dissolvida foi de apenas 68,49% em 60 minutos, semelhante à obtida em 30 minutos, demonstrando que ocorreu a saturação do meio de dissolução. Esse resultado está relacionado com a baixa solubilidade do fármaco nesse meio (162,25 µg/ml), conforme demonstra a Tabela 7.2.

A utilização do meio de dissolução contendo SDS 0,375% (p/V) pH 5,0 apresentou comportamento semelhante, no entanto, a quantidade dissolvida em 120 minutos foi de 89,3%, superior ao encontrado anteriormente, porém ainda com uma liberação incompleta devido a baixa solubilidade nesse meio (202,92 µg/ml).

O perfil de dissolução utilizando SDS 0,5% (p/V) pH 5,0 apresentou o perfil de dissolução mais lento e alcançou, em 60 minutos, a dissolução da quantidade total de fármaco presente nos comprimidos. A solubilidade do fármaco apresentou valor de 287,35 µg/ml, abaixo da condição *sink*, porém, acima da concentração mínima para solubilização de 100% da dose (222,22 µg/ml).

Os resultados da determinação da solubilidade e dos perfis de dissolução realizados em diferentes concentrações de SDS pH 5,0 demonstraram a existência de uma relação de proporcionalidade entre o aumento da solubilidade e o aumento da concentração de tensoativo.

De acordo com os resultados, os perfis de dissolução que apresentaram maior capacidade de poder discriminativo foram a solução de SDS 0,5% (p/V) pH 5,0 e a solução tampão acetato de sódio pH 5,3, ambas utilizando pás a 50 rpm. A Tabela 7.5 demonstra a semelhança entre os perfis de dissolução obtidos nesses

dois meios de dissolução. A escolha da solução tampão acetato de sódio pH 5,3 baseou-se na capacidade tamponante desse meio, diferentemente do observado com a solução de SDS, onde se verificou uma diminuição de 0,3 unidades de pH após a realização do ensaio de dissolução. Outros fatores determinantes devem-se à dificuldade em trabalhar com solução de SDS, em virtude da formação de espuma, bem como a maior variabilidade obtida (DPR) nos primeiros pontos do perfil de dissolução. Sugere-se que a alta variabilidade obtida no primeiro tempo de coleta (3 minutos) em ambos os meios, deve-se à baixa porcentagem de entacapona dissolvida.

Em relação aos resultados obtidos com a solução tampão acetato de sódio pH 5,3, como meio de dissolução, a porcentagem de entacapona dissolvida de, aproximadamente, 100% foi alcançada entre 30 e 60 minutos, demonstrando-se adequada conforme FORTUNATO (2005). Os resultados apresentaram uma rápida liberação de entacapona nos primeiros pontos do perfil de dissolução (3 a 15 minutos), tornando-se mais lenta com o decorrer do ensaio. Conforme se verificou nos ensaios de desenvolvimento do método, a utilização de meios de dissolução onde a solubilidade de entacapona é menor proporcionaram uma liberação lenta, porém incompleta da quantidade total do fármaco (solução tampão acetato de sódio pH 5,1). A utilização da solução tampão fosfato de sódio pH 5,3 proporcionou um perfil de dissolução mais discriminativo, em comparação aos outros meios pesquisados, bem como a completa dissolução do fármaco. Os meios com maior solubilidade proporcionam uma dissolução do fármaco muito rápida.

A determinação da estabilidade de entacapona na SQT e nos comprimidos de entacapona no meio de dissolução e no solvente utilizado para realizar as diluições foi importante para verificar se o fármaco mantinha-se estável durante o tempo de análise (USP 30, 2007). Os resultados demonstraram que o fármaco entacapona manteve-se estável em tampão acetato pH 5,3 durante 2 horas a 37 °C, no entanto, quando permanecia na mesma solução por 24 horas, degradava mais que o percentual permitido pela literatura de 2% (USP 30, 2007). Diante desses resultados, avaliou-se a utilização de metanol para realização da segunda diluição e os resultados obtidos demonstraram a melhor estabilidade do fármaco nessas condições.

O ensaio para verificação da interferência dos filtros utilizados demonstrou que os mesmos não adsorveram o fármaco e podem ser utilizados com segurança no método de dissolução.

Diante dos resultados foi realizada a validação do método de dissolução utilizando solução tampão acetato de sódio pH 5,3 como meio de dissolução, a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, previamente desaerado em ultra-som por 15 minutos, e como aparelhagem foram utilizadas pás a 50 rpm. O método escolhido para a validação apresentou o pH semelhante ao descrito pelo FDA (pH 5,5), porém como demonstraram os resultados, pequenas alterações no pH do meio de dissolução alteram significativamente a liberação do fármaco. Outra diferença encontrada refere-se ao tipo de sal utilizado para preparação da solução tampão, o FDA (2006) preconiza fosfato de potássio, no entanto, a USP utiliza acetato de sódio para preparação do pH 5,5.

Na avaliação da especificidade (Figura 7.3), verificou-se que existia interferência dos excipientes da formulação em 385 nm, comprimento de onda máximo de entacapona em tampão acetato de sódio pH 5,3 e metanol, utilizando o método por espectrofotometria na região do UV. A interferência dos excipientes, calculada em relação à absorvância da solução da SQT de entacapona na mesma concentração, foi de 3,0%, superior ao estabelecido de até 2%, tornando a aplicação desse método inviável (USP 30, 2007). A utilização de outro comprimento de onda, conforme sugere a USP 30 (2007), foi descartada devido à constante interferência dos excipientes na faixa de 220 a 400 nm. Diante disso, optou-se por utilizar a CLAE para determinação da quantidade de entacapona dissolvida.

De acordo com SKOUG e colaboradores (1997), os métodos desenvolvidos para a determinação quantitativa de fármacos em matéria-prima e produtos acabados, impurezas ou produtos de degradação são geralmente adaptáveis para uso na determinação da quantidade de fármaco dissolvido em ensaios de dissolução. Com isso, o método validado nesse trabalho por CLAE, descrito no Capítulo III, serviu como base para essa finalidade. No entanto, para avaliar a porcentagem de fármaco dissolvido, optou-se pela utilização de uma coluna analítica de 150 mm de comprimento com o objetivo de diminuir o tempo de análise, o qual foi de, aproximadamente, 3,5 minutos. A curva de pureza (99,99%) do pico de

entacapona comprovou que não existiam possíveis impurezas ou interferentes da formulação coelundo com o pico de entacapona em 305 nm.

O cromatograma obtido para a solução placebo em tampão acetato de sódio pH 5,3 com diluição final em metanol (Figura 7.4), utilizado para avaliar a especificidade por CLAE, demonstrou que, no tempo de retenção relativo à entacapona, não foi observada interferência dos excipientes da formulação, indicando a especificidade do método. Diante desse resultado, procedeu-se a validação do método de dissolução por CLAE.

A linearidade do método analítico foi determinada a partir do coeficiente de correlação (r) (Figura 7.5) e da análise da variância (ANOVA) (Tabela 7.9). A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ($y = 33,98632x - 50,57224$) e o valor do coeficiente de correlação ($r = 0,99998$) indicaram a existência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003). Os resultados obtidos na ANOVA demonstram que a regressão foi significativa ($F = 69912,75$) e o valor de F calculado para o desvio da linearidade ($F = 1,07$) foi inferior ao valor de F tabelado para $p < 0,05$, demonstrando linearidade na faixa de concentração estudada (10 – 60 $\mu\text{g/ml}$).

A precisão do método de dissolução foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade, determinada a partir do cálculo do DPR de múltiplas injeções realizadas na determinação da linearidade do método, demonstrou que o valor máximo encontrado foi de 1,58, abaixo do preconizado de 2,0, demonstrando a repetibilidade do método de dissolução (USP 30, 2007).

A precisão intermediária foi determinada através da realização do perfil de dissolução em dias diferentes por dois analistas. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7.10, a diferença entre as médias de dissolução dos dois analistas nos tempos com dissolução abaixo de 85% foi inferior a 10%. A maior diferença obtida entre os analistas ocorreu no tempo de 12 minutos, com um valor de 4,36%. Nos tempos de dissolução acima de 85%, a maior diferença obtida foi de 1,67% no tempo 15 minutos. Esses resultados demonstraram a precisão do método de dissolução (USP 30, 2007).

A exatidão do método de dissolução foi determinada através do teste de recuperação, no qual quantidades conhecidas da SQT de entacapona em solução foram adicionadas ao placebo da formulação nas cubas de dissolução. As percentagens médias de recuperação (Tabela 7.11) na faixa de 98,00 a 101,67 demonstraram a exatidão do método proposto.

Em relação às especificações para a determinação da quantidade de fármaco dissolvido, os Códigos Oficiais preconizam uma quantidade mínima dissolvida em função do tempo, porém o FDA recomenda apenas especificação em um único ponto de 85% de fármaco liberado em 60 minutos ou menos para fármacos altamente solúveis. As Farmacopéias Americana, Britânica e Brasileira preconizam, geralmente, entre 70 e 75% de quantidade de fármaco dissolvido em 30 ou 45 minutos. Como a entacapona não pertence à classe de fármacos de alta solubilidade, sugere-se, como especificação, 70% de fármaco dissolvido em 60 minutos.

De acordo com os resultados obtidos no desenvolvimento do método de dissolução, o fator mais crítico para avaliação da robustez foi o pH da solução tampão acetato. Todo o desenvolvimento do método de dissolução foi baseado na solubilidade do fármaco em função do pH e, de acordo com os resultados de solubilidade e perfil de dissolução entre as soluções com pH 5,1, 5,3 e 5,5, considerou-se necessário, para evitar possíveis variações nos resultados no perfil de dissolução e no teor de dissolução, uma exata preparação da solução tampão.

Devido à fotolabilidade de entacapona verificada em estudos anteriores, o equipamento de dissolução foi protegido da luz durante a execução dos ensaios.

7.6. Conclusões

➤ Os ensaios de solubilidade realizados confirmaram as características dos ácidos fracos, os quais apresentam aumento da solubilidade em função do aumento do pH na faixa próxima ao pKa. Além disso, os ensaios de solubilidade permitiram verificar a instabilidade de entacapona em soluções tampões com pH acima de 6,5.

- A utilização de solução tampão acetato pH 5,3 apresentou o perfil com a maior capacidade de poder discriminativo entre os meios testados, pois alcançou uma velocidade de dissolução lenta, o que permite a possibilidade de detectar desvios de fabricação, garantir reprodutibilidade lote a lote e a comparação de perfis de dissolução de formulações diferentes.

- O método de dissolução desenvolvido e validado utilizando CLAE para determinação da quantidade dissolvida de entacapona em solução tampão acetato de sódio pH 5,3 apresentou especificidade, linearidade, precisão e exatidão, ou seja, adequado para realização do controle de qualidade de rotina dos comprimidos revestidos do fármaco;

**8. CAPÍTULO V – ESTABILIDADE PRELIMINAR - DETERMINAÇÃO DA
CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO EM CONDIÇÕES FOTOLÍTICAS E
ESPECTROMETRIA DE MASSA DO PRODUTO DE FOTODEGRADAÇÃO**

8.1. Introdução

O teste de estabilidade fornece informações sobre como a qualidade da matéria-prima ou mesmo do produto acabado variam frente a variações aos diferentes fatores analisados, como temperatura, umidade, luz, reações de hidrólise e reações de oxidação (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999). Além disso, a estabilidade depende das propriedades físicas e químicas dos fármacos, excipientes e embalagens utilizados (MATTHEWS, 1999).

De acordo com o ICH (2003), os testes de estabilidade devem ser conduzidos em duas etapas: testes acelerados e testes confirmatórios. Os testes acelerados de estabilidade (degradação forçada) servem para identificar os fatores que provocam a degradação do fármaco, selecionar os critérios de condução dos testes e para avaliar a adequabilidade das técnicas analíticas. Os estudos confirmatórios devem ser realizados para propiciar informações necessárias sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos.

As reações de degradação de um produto farmacêutico ocorrem em velocidades definidas, são de natureza química e dependem de várias condições, como, por exemplo, concentração dos reagentes, temperatura, pH, radiação ou presença de catalisadores. No entanto, para definir-se a ordem e a velocidade de reação são necessários estudos de cinética química, os quais podem ser classificados em reações de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem. Nas reações de ordem zero, a velocidade é independente da concentração, nas reações de primeira ordem, a velocidade de degradação é dependente da concentração e nas reações de segunda ordem, a velocidade de reação é dependente de dois fatores (LACHMAN *et al.*, 2001).

A luz é um fator ambiental capaz de fornecer energia necessária para desencadear reações de degradação de acordo com o comprimento de onda (λ) emissor da radiação luminosa. Quanto menor o λ da radiação, maior energia é

absorvida por mol de reagente, e com isso, mais rápida a degradação (LACHMAN *et al.*, 2001). Uma série de reações pode ser iniciada fotoquimicamente, tais como: hidrólise, oxidação, isomerização, abertura de anel, polimerização ou remoção de vários substituintes, como halogênios ou grupos carboxílicos (TØNNESEN, 2001).

O estudo preliminar de estabilidade de entacapona foi realizado através da degradação forçada do fármaco e dos comprimidos revestidos, para o desenvolvimento de um método analítico indicativo de estabilidade (Capítulo III) e através do estudo de cinética de degradação.

A cinética de degradação foi calculada em condições fotolíticas para definir a ordem e a velocidade da reação de degradação da solução metanólica de entacapona.

8.2. Objetivos específicos

- ↳ Determinar a cinética de degradação da solução metanólica de entacapona nos comprimidos revestidos a partir do estudo preliminar de fotoestabilidade;
- ↳ Sugerir a provável identificação do produto de degradação formado em condições fotolíticas por espectrometria de massas.

8.3. Parte Experimental

8.3.1. Avaliação da cinética de degradação da solução de entacapona nos comprimidos revestidos em condições fotolíticas

8.3.1.1. Condições do estudo

A determinação da cinética de degradação da solução de entacapona nos comprimidos revestidos foi realizada utilizando lâmpada emissora de luz UV germicida Ecolume ZW (254 nm) de 30 W, mantida em câmara horizontal de vidro espelhada internamente (100x16x16 cm). As soluções amostras foram colocadas em cubetas descartáveis de quartzo Plastibrand[®] com 10 mm de caminho óptico.

A verificação da temperatura interna foi realizada com auxílio de um termômetro digital de máxima e mínima, marca Incoterm[®]. Para a realização da determinação quantitativa foram utilizadas as condições cromatográficas descritas na Tabela 5.2 do método validado por CLAE.

8.3.1.2. Preparação das soluções

8.3.1.2.1. Preparação da solução da SQT de entacapona

A solução da SQT de entacapona utilizada nesse estudo foi preparada de acordo com o descrito no item 6.3.4.4.1, na concentração de 20 µg/ml.

8.3.1.2.2. Preparação da solução amostra dos comprimidos

Para a preparação da solução amostra dos comprimidos de entacapona, foram pesados, exatamente, o equivalente a 50 mg de entacapona, transferidos para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de metanol e mantidos em ultrassom por 15 minutos. Agitou-se mecanicamente por mais 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente, de modo a obter solução com concentração teórica de 1 mg/ml de entacapona. Posteriormente, realizou-se a filtração e transferiu-se, quantitativamente, com auxílio de pipeta automática Brand, alíquotas de 500 µl dessa solução para cubetas descartáveis, vedadas com *para-film*[®]. Essas cubetas foram colocadas em câmara de vidro espelhada a 10 cm de exposição da lâmpada emissora da luz ultravioleta 254 nm, as quais permaneceram sob exposição da luz durante os seguintes tempos: 5, 10, 20, 30, 40, 60 e 120 minutos. Em cada intervalo de tempo foram retiradas três cubetas contendo as amostras. Transferiu-se, quantitativamente, o volume total de cada cubeta para balões volumétricos de 25 ml e completou-se o volume com metanol, de modo a obter três soluções, em cada intervalo de tempo, na concentração teórica de 20 µg/ml de entacapona. Uma cubeta contendo a amostra, porém protegida da radiação luminosa com papel alumínio, foi colocada na câmara de vidro espelhada para verificação da influência da temperatura na degradação da amostra.

8.3.1.3. Definição da ordem de reação

A ordem de reação foi definida através dos resultados de concentração de entacapona, obtidos em cada tempo de exposição, para construção dos gráficos de:

- Tempo de exposição da amostra a radiação UV (min.) X concentração ($\mu\text{g/ml}$) para ordem zero;
- Tempo de exposição da amostra a radiação UV (min.) X logaritmo da concentração ($\mu\text{g/ml}$) para primeira ordem;
- Tempo de exposição da amostra a radiação UV (min.) X $1/\text{concentração}$ ($\mu\text{g/ml}$) para segunda ordem.

8.3.2. Resultados

Os cromatogramas sobrepostos das soluções de entacapona no tempo zero (sem exposição) e expostas à radiação UV por 10 e 120 minutos estão apresentados na Figura 8.1.

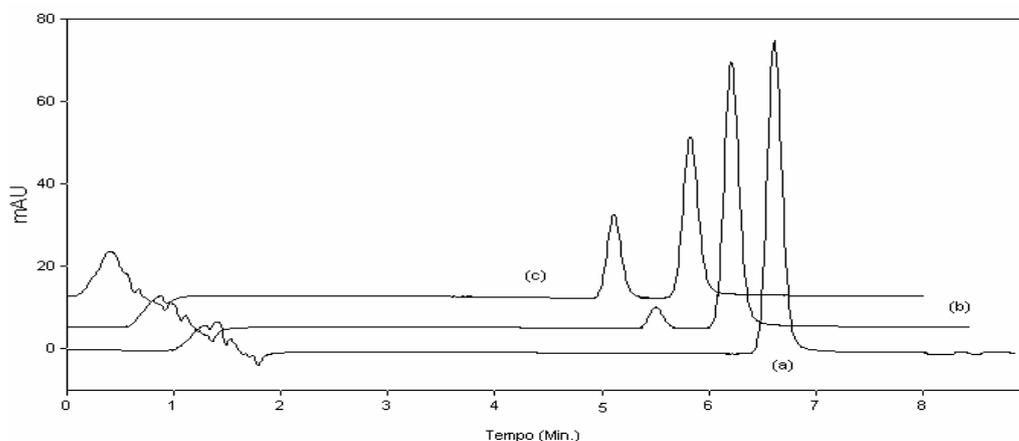


FIGURA 8.1. Cromatogramas sobrepostos das soluções de entacapona expostas à radiação UV 254 nm por CLAE – (a) tempo zero: sem exposição, (b) 10 minutos de exposição e (c) 120 minutos de exposição. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10 %) e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 2,0 ml/min, coluna ACE[®] octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm; 5 μm), detecção em λ de 305 nm, volume de injeção 20 μl , temperatura de análise 25 °C.

A Tabela 8.1 apresenta as áreas obtidas após exposição da solução dos comprimidos de entacapona à luz UV 254 nm, em diferentes tempos.

TABELA 8.1. Áreas obtidas após exposição da solução dos comprimidos de entacapona expostos à luz UV 254 nm para determinação da cinética de degradação por CLAE.

Tempo (minutos)	Área*	Área média	DPR
0	768389,00	766868,50	0,28
	765348,00		
5	706850,50	714094,50	0,94
	715409,00		
	720024,00		
10	698129,50	689798,83	1,06
	686648,50		
	684618,50		
20	657520,50	649862,33	2,24
	633069,00		
	658997,50		
30	594996,00	598013,17	0,76
	595804,00		
	603239,50		
40	560421,00	570947,17	1,60
	575992,00		
	576428,50		
60	513608,50	530357,50	3,87
	553268,50		
	524195,50		
120	366966,50	389159,33	4,94
	399704,50		
	400807,00		

* média de 3 determinações.

A Tabela 8.2 apresenta os valores de concentrações, logaritmo da concentração (Log C) e inverso da concentração (1/C) utilizados para construção dos gráficos e definição da ordem da reação.

TABELA 8.2. Valores de concentrações, logaritmo da concentração (Log C) e inverso da concentração (1/C) obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem da reação.

Tempo (min.)	Concentração (µg/ml)	Log C	1/C
0	20,0260	1,3016	0,0499
5	18,7088	1,2720	0,0535
10	18,0134	1,2556	0,0555
20	16,9705	1,2297	0,0589
30	15,6165	1,1936	0,0640
40	14,8382	1,1714	0,0674
60	13,8498	1,1414	0,0722
120	10,1625	1,007	0,0984

As Figuras 8.2, 8.3 e 8.4 apresentam as representações gráficas das cinéticas de degradação de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem, respectivamente.

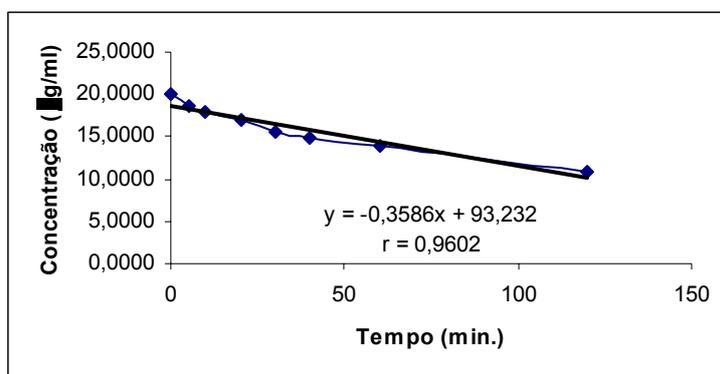


FIGURA 8.2. Representação gráfica da cinética de ordem zero para degradação de entacapona em condições fotolíticas.

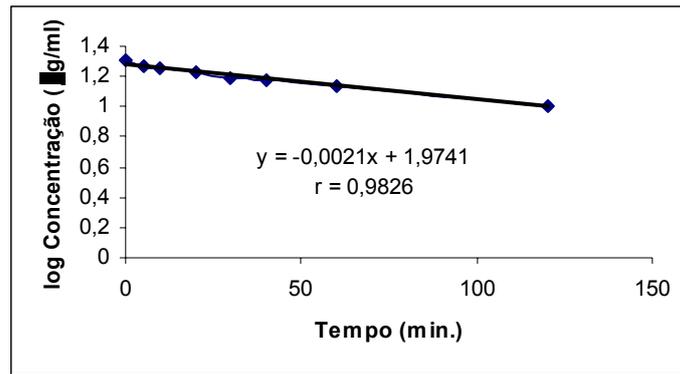


FIGURA 8.3. Representação gráfica da cinética de primeira ordem para degradação de entacapona em condições fotolíticas.

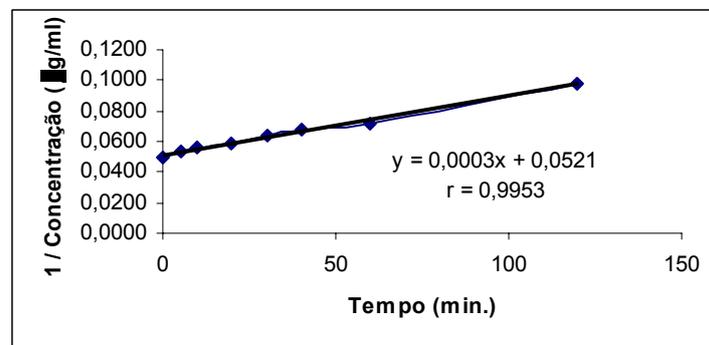


FIGURA 8.4. Representação gráfica da cinética de segunda ordem para degradação de entacapona em condições fotolíticas.

De acordo com os valores encontrados dos coeficientes de correlação, verificou-se que degradação da amostra dos comprimidos de entacapona em condições fotolíticas obedece a uma cinética de segunda ordem.

A partir da definição da ordem da reação, calculou-se a constante das velocidades de degradação (k) e o valor de $t_{90\%}$.

Os valores de k em cada tempo foram calculados a partir da seguinte equação:

$$1/C = 1/Co + kt$$

Onde:

C = concentração de entacapona no tempo t

C_0 = concentração inicial de entacapona

O valor de k médio foi obtido a partir da média aritmética dos valores de k , para cada tempo de exposição.

O valor de $t_{90\%}$ foi calculado a partir da seguinte equação:

$$t_{90\%} = 1/9kC_0$$

O valor encontrado de k médio foi $0,000485 \text{ min}^{-1}$, semelhante ao obtido pela equação da reta (0,0003). O valor de $t_{90\%}$ foi de 11,45 minutos, ou seja, tempo necessário para a concentração do fármaco decair a 90% da concentração inicial.

8.3.3. Discussão

A avaliação da estrutura química de um fármaco pode indicar possíveis rotas de degradação que a mesma pode sofrer. A presença de grupos funcionais como, nitro, nitroso, cetona, sulfona, duplas e triplas ligações são mais susceptíveis a degradação por radiação luminosa. A sensibilidade à degradação de um fármaco será maior à medida que aumenta o número desses grupamentos cromóforos e, especialmente, se estiverem conjugados, permitindo a interação entre os elétrons livres. Para que uma reação fotoquímica ocorra é necessário que a molécula em estudo apresente máximos de absorção na região de amplitude da fonte de radiação e quanto mais próximos os máximos de absorção estiverem da luz visível, mais fotolábel será a substância (NUDELMAN, 1975). Devido à isso, a absorção em 254 nm e a presença de grupamentos nitro, duplas e uma tripla ligações na molécula de entacapona é um forte indicativo da susceptibilidade de degradação em condições fotolíticas empregadas nesse estudo.

A determinação da cinética de reação de degradações fotoquímicas é complexa devido ao número de variáveis envolvidas, tais como, os diferentes espectros de distribuição da fonte luminosa, a intensidade e o comprimento de onda dos fótons incidentes, as propriedades espectrais das substâncias, o tamanho e a forma do recipiente de acondicionamento (YOSHIOKA e STELLA, 2000).

A determinação das áreas de entacapona para determinação da cinética de fotodegradação foi realizada utilizando o método validado e indicativo de estabilidade proposto nessa dissertação e apresentado no Capítulo III. A curva de pureza do pico de entacapona demonstrou que o produto de fotodegradação, mesmo apresentando um tempo de retenção próximo (6,0 minutos), não interfere na quantificação de entacapona. A resolução obtida de 2,9 minutos entre o produto de fotodegradação e o fármaco entacapona (Tabela 6.22) garantiu a adequabilidade do método para o estudo da cinética de degradação em condições fotolíticas.

A avaliação dos resultados, ilustrados nas Figuras 8.2, 8.3 e 8.4, demonstrou que a reação de segunda ordem apresentou o melhor coeficiente de correlação ($r = 0,9953$), sugerindo que a degradação da amostra dos comprimidos de entacapona em condições fotolíticas obedece a uma cinética de segunda ordem nas condições utilizadas no estudo, ou seja, a velocidade de reação é dependente de dois reagentes (NUDELMAN, *et al.*, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001).

A temperatura interna da câmara de vidro manteve-se em torno de 32 °C e a área da solução amostra, utilizada como controle térmico, manteve-se estável durante o período de tempo do estudo. Esse resultado demonstra que a degradação do fármaco, nas condições do estudo, não foi influenciada pela temperatura.

A acentuada degradação de entacapona observada nas condições fotolíticas empregadas justifica o revestimento da forma farmacêutica estudada utilizando dióxido de titânio e óxidos de ferro. Devido à capacidade de absorverem radiação abaixo de 400 nm, os óxidos de ferro amarelo e vermelho são utilizados na formulação para diminuir a fotodegradação do fármaco (THOMA, 1996).

A partir da similaridade entre os espectros obtidos do fármaco entacapona e do produto de fotodegradação visualizadas durante a degradação forçada em condições fotolíticas (Figura 6.8) e referências (KARLSSON e WIKBERG, 1992; LEHTONEN *et al.*, 1999), onde a luz poderia provocar a isomerização do fármaco em solução, realizou-se a técnica de espectrometria de massas dos produtos. Essa técnica possibilita a determinação da massa molecular e do espectro de massas de uma substância, bem como a obtenção de informações estruturais da molécula, a partir da medida da massa dos fragmentos produzidos (McMURRY, 2000).

8.4.1. Espectrometria de massas do produto de fotodegradação

8.4.1.1. Equipamento e condições espectrométricas

A técnica utilizada para identificação do produto de degradação foi a CLAE acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM).

A separação cromatográfica entre o fármaco e o produto de degradação foi realizada em cromatógrafo a líquido Shimadzu e coluna analítica ACE[®] octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro interno). O equipamento, equipado com controlador de sistema SCL10-ADvp e controlado pelo programa MassLynx (Versão 3.5), opera com sistema binário composto por bombas LC-10ADvp, forno CTO-10ACvp e auto-injetor SIL-10ADvp. A fase móvel utilizada foi uma mistura de água pH 3,0 (ajustado com ácido acético glacial 10%) e acetonitrila (65:35), fluxo isocrático de 1 ml/minuto, com razão de *split* de 1:5. O volume de injeção foi de 20 µl (via injetor automático do CLAE).

A detecção do fármaco foi realizada por detector de espectrometria de massas Micromass[®] modelo Quattro LC, equipado com duplo quadrupolo e uma interface de ionização por *eletrospray*, operado no modo negativo (ES⁻). O gás de nebulização e dessolvatação foi nitrogênio, enquanto argônio foi utilizado como gás de colisão. Os parâmetros operacionais fixados foram: fluxo de gás para nebulização de 51 l/h, fluxo de gás para dessolvatação de 372 l/h, voltagem de cone de 50 V, voltagem do capilar de 2,95 kV, potencial de entrada de 42 V, energia de colisão de 5 V, potencial de saída na célula de colisão de 50 V, temperaturas da fonte de íons de 130 °C e da sonda de 300 °C.

Os cromatogramas foram registrados no modo de varredura (MS-SCAN) para verificar a massa molecular dos produtos presentes na amostra degradada e no modo de monitorização com reação múltipla (MRM), utilizando a transição m/z de 304 > 62 para entacapona e o produto de fotodegradação.

8.4.1.2. Preparação da solução fotodegradada

Para a realização do ensaio foi utilizada solução da SQT de entacapona (1 mg/ml), preparada de acordo com o item 6.3.4.2.5, exposta à luz ultravioleta de 254 nm durante 15 minutos. A partir dessa solução foram realizadas diluições sucessivas em metanol até concentração de 5 µg/ml.

8.4.2. Resultados

A Figura 8.5 apresenta o cromatograma realizado pelo método de CLAE acoplada a detector de massas (CLAE-EM) de varredura (MS-Scan) para verificação dos produtos presentes na amostra degradada com massa molecular de 304, pelo método de ES⁻ e em escala de aumento o cromatograma obtido nas mesmas condições de análise por CLAE-UV a 305 nm.

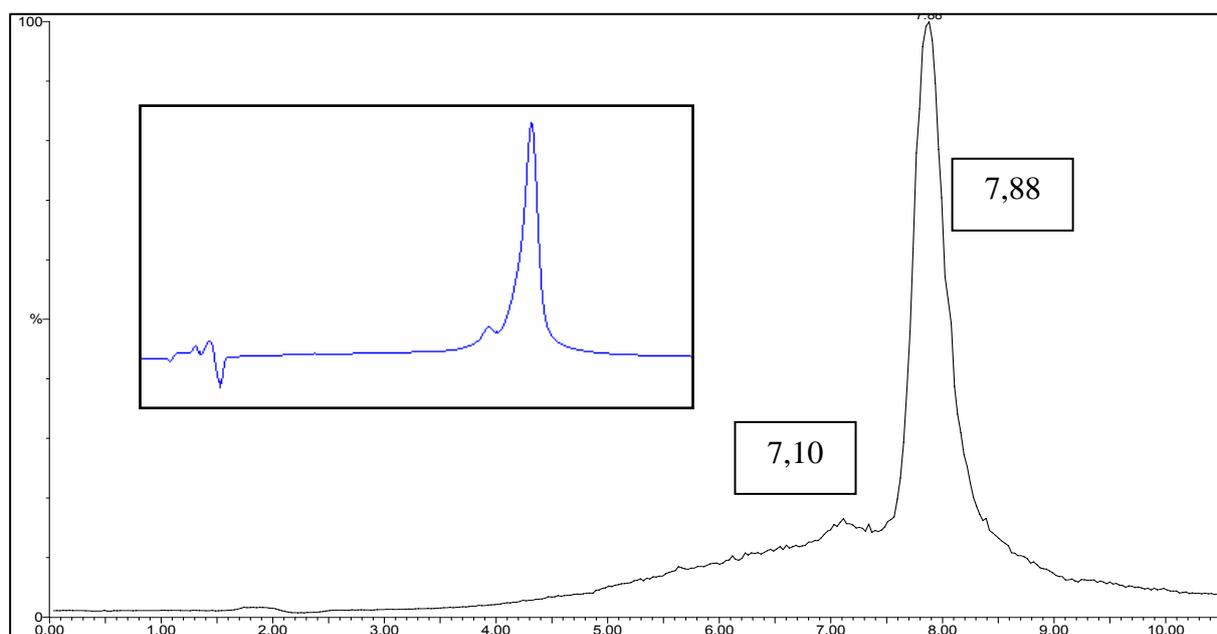


FIGURA 8.5. Cromatograma obtido de degradação forçada da SQT de entacapona sob luz ultravioleta 254 nm por CLAE-EM de varredura (MS-Scan) da massa molecular de 304. Escala em aumento do cromatograma obtido nas mesmas condições de análise por CLAE-UV a 305 nm.

As figuras 8.6 e 8.7 apresentam os espectros de massas dos produtos obtidos em 7,1 e 7,8 minutos.

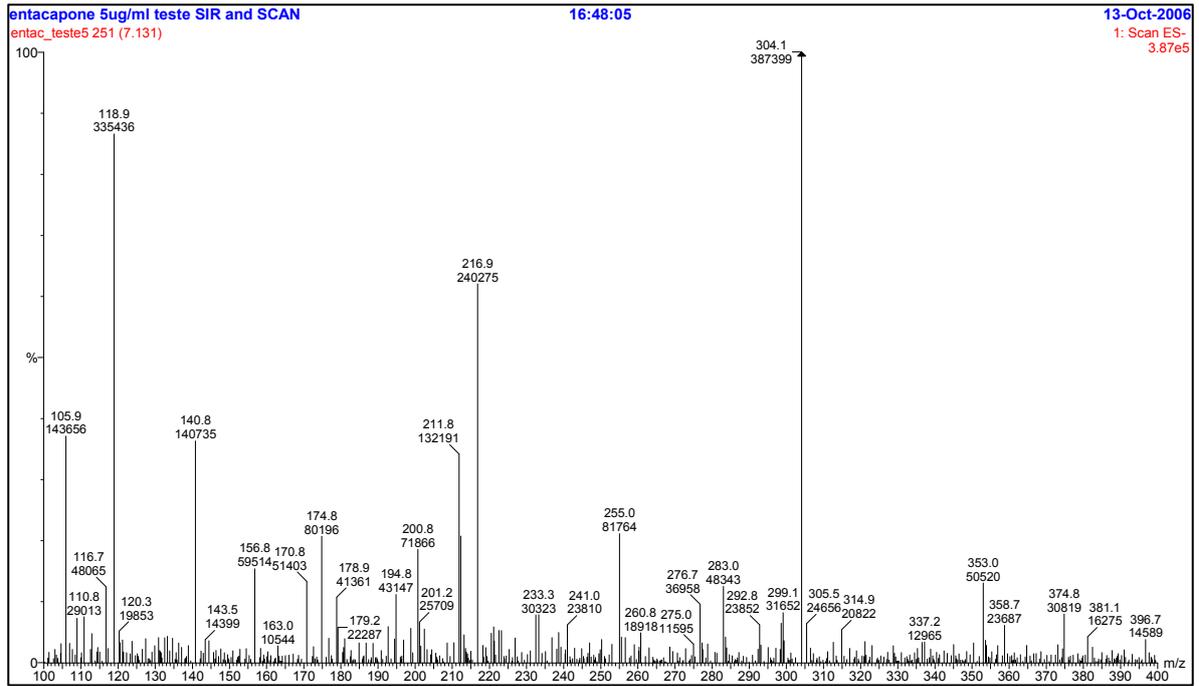


FIGURA 8.6. Espectro de massas do produto obtido em 7,1 minutos pelo método de CLAE-EM.

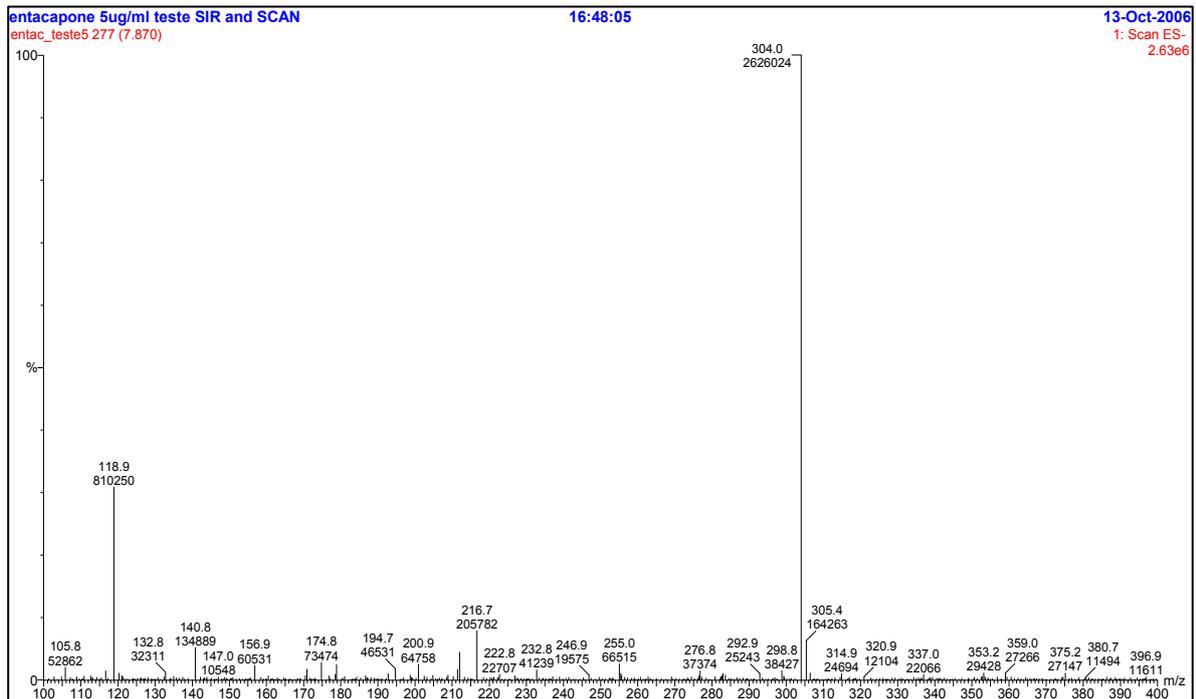


FIGURA 8.7. Espectro de massas do produto obtido em 7,8 minutos pelo método de CLAE-EM.

O espectro de massas de uma injeção direta da amostra pelo método de EM-EM está apresentado na Figura 8.8.

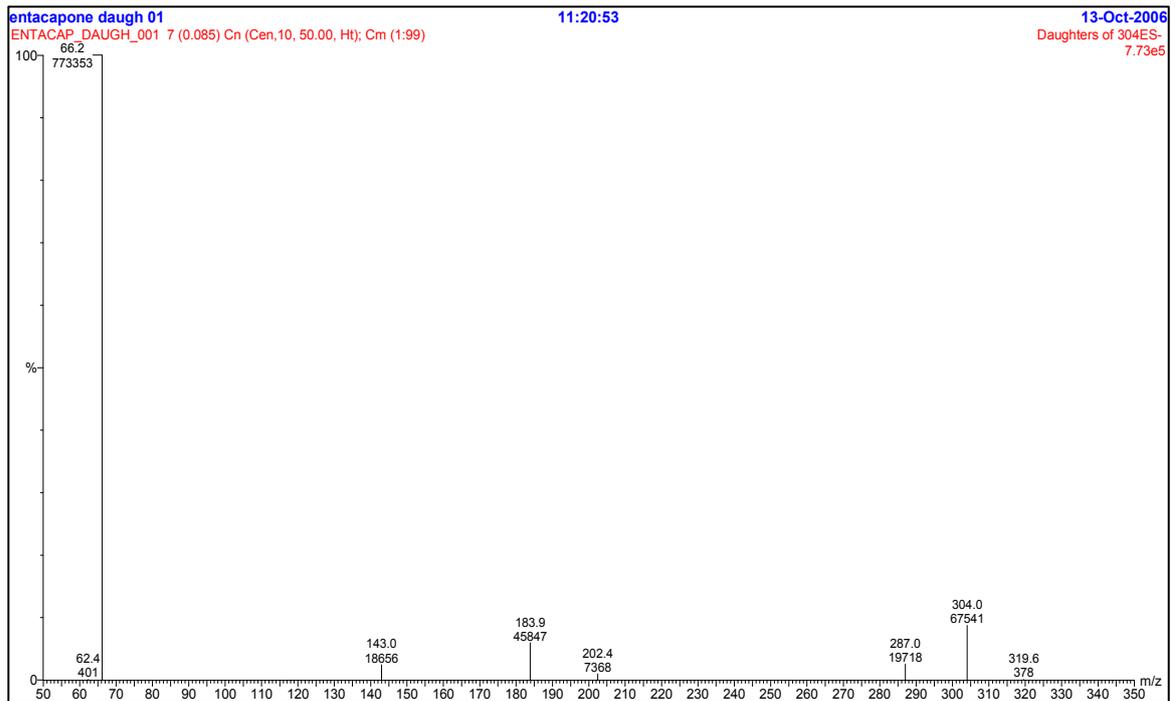


FIGURA 8.8. Espectro de massas para identificação do fragmento majoritário a partir da massa molecular de 304 por EM/EM.

A Figura 8.9 apresenta o cromatograma obtido por CLAE-EM/EM no modo MRM-ESI⁻, utilizando as transições 304,1 > 66,2.

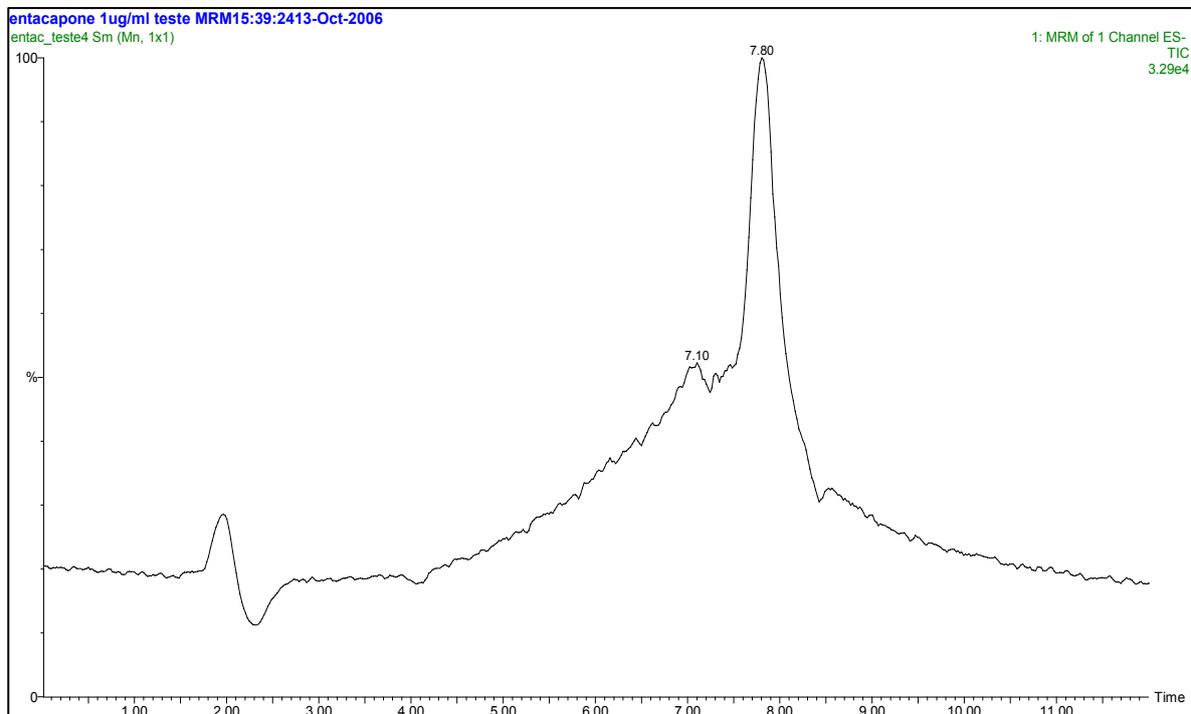


FIGURA 8.9. Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM no modo MRM-ESI⁻, utilizando a transição 304,1 > 66,2.

8.4.3. Discussão

Um espectrômetro de massa é um dispositivo que considera diretamente os constituintes moleculares: prótons, nêutrons e elétrons. As diferenças na composição das moléculas (elementos químicos presentes ou em seus arranjos) são exploradas nessa técnica. Diante disso, a seletividade é a principal vantagem da espectrometria de massas sobre outras técnicas (SKOOG, 2002).

Além disso, o equipamento permite a sua utilização em técnicas acopladas (CLAE-EM), as quais têm a capacidade de separar misturas complexas, identificar e quantificar compostos em uma única operação. Essas técnicas estão sendo muito utilizadas, porém apresentam algumas limitações devido à complexidade e custo do equipamento e à qualificação do analista (MENDHAM *et al.*, 2002b).

Após ajuste das condições do espectrômetro, realizou-se ensaio por CLAE acoplada a detector de massas (CLAE-EM), fazendo uma varredura para verificação da massa dos produtos majoritários na amostra. A análise do cromatograma obtido verificou a presença de dois picos em 7,1 e 7,8 minutos. Os espectros referentes a estes picos confirmaram que estes apresentaram a mesma massa molecular majoritária de 304 (ES^-), conforme apresentam as Figuras 8.6 e 8.7, respectivamente. Corroboram com essas informações os estudos anteriores de degradação forçada em condições fotolíticas realizados por CLAE/UV (Figura 8.5 – escala em aumento), os quais verificaram a presença de dois produtos com tempos de retenção próximos, um dos quais atribuído ao produto de fotodegradação e o outro ao fármaco entacapona.

Uma vez confirmada a massa do composto majoritário (304), realizou-se a fragmentação do mesmo através da injeção direta da amostra. Após ajuste das condições instrumentais pelo método de EM-EM, obteve-se como fragmento majoritário uma massa de 66,2 (Figura 8.8). O conhecimento desse fragmento foi de suma importância para a realização da análise por CLAE-EM/EM, uma vez que, nessas condições, a especificidade e seletividade são garantidas.

Após conhecimento do fragmento majoritário de entacapona, realizou-se uma análise por CLAE-EM/EM para verificar se os compostos obtidos em 7,1 e 7,8 minutos apresentavam o mesmo padrão de fragmentação, utilizando a transição

304,1 > 66,2. Nesse modo de análise seqüencial (CLAE-EM/EM), o espectrômetro de massas funciona como um duplo filtro de massa, no primeiro estágio a massa molecular é selecionada e, posteriormente é induzida a quebra da molécula. Os fragmentos formados são analisados em um segundo estágio e, como o perfil dos fragmentos gerados depende da estrutura da molécula original, a identificação da substância torna-se ainda mais precisa (SKOOG, 2002).

O cromatograma obtido (Figura 8.9) verificou que os produtos com tempos de retenção de 7,1 e 7,8 minutos apresentavam a mesma transição de 304,1 > 66,2. A obtenção de produtos com mesma massa molecular e mesmo espectro de massas pode ser indicativo da isomeria geométrica desses produtos (ZHAO *et al.*, 2004; PAN *et al.*, 2005; LIANG *et al.*, 2006). KESKI-HYNNILÄ e colaboradores (1998) também obtiveram espectros de massas semelhantes para os produtos de metabolização de entacapona: glicuronídicos *E*-entacapona e *Z*-entacapona, confirmando os resultados obtidos nesse ensaio.

De acordo com esses resultados sugere-se que o produto de degradação forçada sob luz ultravioleta 254 nm seja o isômero geométrico *Z*-entacapona. Entretanto, a conclusão definitiva sobre a identificação do produto de fotodegradação como o isômero geométrico *Z*-entacapona apenas será possível através da utilização de uma substância química de referência do isômero ou realização do isolamento dessa substância e análise por RMN¹H, no qual poder-se-ia verificar as diferentes constantes de acoplamento (*J*) entre os hidrogênios atribuíveis à ligação dupla. Em relação ao espectro de RMN¹³C, esperam-se alterações nos deslocamentos dos carbonos próximos à dupla ligação, conforme verificado por CARDOSO (2000), para a molécula de terbinafina.

8.4.4. Conclusões

➤ A degradação da amostra dos comprimidos de entacapona em condições fotolíticas obedeceu a uma cinética de segunda ordem, ou seja, a velocidade de reação é dependente de dois fatores;

➤ Sugere-se que o produto de degradação formado em condições fotolíticas seja o isômero geométrico *Z*-entacapona, pois apresentou a mesma massa molecular e o mesmo espectro de massas do isômero *E*-entacapona.

9. DISCUSSÃO GERAL

Embora a entacapona faça parte da lista de fármacos e produtos acabados considerados de alta prioridade para elaboração de monografias da USP, não existem, até o presente, monografias para a matéria-prima e comprimidos de entacapona. Além disso, na literatura pesquisada até o desenvolvimento desse trabalho, somente constava um artigo publicado descrevendo o controle de qualidade do fármaco e de comprimidos revestidos utilizando espectrofotometria no visível para determinação quantitativa de entacapona (RAJESWARI *et al.*, 2006).

Devido à falta da substância química de referência de entacapona para desenvolvimento desse trabalho, realizou-se a extração e caracterização do fármaco a partir dos comprimidos revestidos. A caracterização do PEA por calorimetria exploratória de varredura (DSC), espectroscopia no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono (RMN¹³C) permitiu verificar que o PEA apresentava alto teor de pureza. No entanto, apenas a quantificação do mesmo por volumetria em meio não-aquoso garantiu que o teor de entacapona no produto de extração estava adequado para utilização como substância química de trabalho (SQT).

A validação do método por espectrofotometria na região do UV simples, sem a necessidade de derivatização e complexação, permitiu a determinação qualitativa e quantitativa de uma maneira rápida e usual, de extrema importância para o controle de qualidade de rotina de entacapona nos comprimidos revestidos.

Os estudos de degradação forçada realizados no fármaco entacapona e na amostra dos comprimidos de entacapona proporcionou o conhecimento das prováveis rotas de degradação e a validação do método indicativo de estabilidade. Os resultados obtidos nos ensaios de degradação demonstraram a instabilidade de entacapona em condições fotolíticas, oxidativas e alcalinas. O cromatograma obtido através do homogeneizado dos produtos de degradação (Figura 6.9) e a curva de

pureza obtida para o pico de entacapona nessas condições (Figura 6.10), demonstrou a seletividade do método por CLAE.

A validação do método por CLAE, com a utilização de condições usuais de coluna (C18) e detector (UV) e sem a necessidade de adição de sais para tamponamento da fase móvel, permitiu a determinação qualitativa e quantitativa de uma maneira rápida e eficiente. Além disso, a capacidade do método de separação de entacapona e seu provável isômero geométrico, principal impureza da rota de síntese e produto de degradação formado em condições fotolíticas, garante a validação de um método cromatográfico indicativo de estabilidade, extremamente útil para o controle de qualidade de rotina de comprimidos de entacapona.

Os métodos propostos neste trabalho para quantificação de entacapona em comprimidos foram comparados estatisticamente através do Teste *t* de *Student*, presumindo variâncias equivalentes. O resultado demonstrou que não ocorreu diferença significativa entre os mesmos e, com isso, os métodos por CLAE e por UV são intercambiáveis se a amostra não apresentar produtos de degradação.

O desenvolvimento e a validação de um método de dissolução, utilizando solução tampão acetato de sódio pH 5,3 e pás a 50 rpm, mostrou-se extremamente útil para realização do controle de qualidade dos comprimidos de entacapona. A obtenção do perfil de dissolução nessas condições demonstrou a provável capacidade do método de detectar desvios de fabricação, garantir reprodutibilidade lote a lote e comparar formulações diferentes.

A determinação da cinética de degradação em condições fotolíticas definida como de segunda ordem permitiu prever o grau de transformação ocorrido durante o período do estudo. A alta velocidade de degradação do fármaco em solução permitiu detectar a acentuada labilidade em condições fotolíticas, informação de extrema importância para a produção, controle de qualidade, armazenamento e embalagem de matérias-primas e comprimidos.

A realização da técnica por espectrometria de massas gerou informações importantes, onde sugere-se que o produto de fotodegradação de entacapona seja o isômero geométrico Z-entacapona, porém o isolamento e a análise de ressonância magnética nuclear necessitam ser realizados para confirmação.

10. CONCLUSÕES GERAIS

- O PEA, caracterizado por DSC, espectroscopia na região do IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C e quantificado por volumetria em meio não-aquoso com metóxido de sódio demonstrou um alto índice de pureza. Tendo em vista os resultados obtidos foi utilizado como substância química de trabalho (SQT) de entacapona e utilizado no desenvolvimento e validação dos métodos propostos;
- Os métodos propostos por CCD, espectrofotometria na região do UV e CLAE demonstraram-se adequados para identificação de entacapona em comprimidos revestidos;
- Os métodos propostos por espectrofotometria na região do UV e CLAE demonstraram especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, ou seja, adequados para o controle de qualidade de rotina de comprimidos de entacapona. Além de não apresentarem diferenças estatisticamente significativas de acordo com o Teste *t* de *Student*, presumindo variâncias equivalentes;
- O método de dissolução desenvolvido e validado utilizando CLAE para determinação da quantidade dissolvida de entacapona em solução tampão acetato de sódio pH 5,3 foi considerado adequado para o controle de qualidade de rotina dos comprimidos revestidos do fármaco;
- A degradação da amostra dos comprimidos de entacapona em condições fotolíticas obedeceu a uma cinética de segunda ordem, ou seja, a velocidade de reação é dependente de dois fatores;
- Sugere-se que o produto de degradação formado em condições fotolíticas seja o isômero geométrico Z-entacapona, pois apresentou a mesma massa molecular e o mesmo espectro de massas do fármaco entacapona.

11. REFERÊNCIAS

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

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Registro de Medicamentos – Comtan®**. Disponível em http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/rconsulta_produto_detalhe.as. Acesso em 29.8.2005.

CARDOSO, S. **Terbinafina: validação de metodologia de análise e estabilidade fotoquímica**. 2000. 210 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). UFRGS, Porto Alegre, mar. 2000.

CLURCZAK, E. Validação de métodos em espectroscopia para análises farmacêuticas. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 22-28, 1998.

EMEA. European Medicines Agency. **Scientific discussion**. August, 1997. Disponível em <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/comtan/comtan.htm>. Acesso em 15.4.2005.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrate approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FDA. Reviewer Guidance: Validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), November, 1994.

FDA. Guidance for Industry: Dissolution Testing for Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), August, 1997.

FDA. Guidance for Industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/active ingredients, based on Biopharmaceutics classification. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2000.

FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Federal Register, V.67, n. 99, May 22, 2002/Notices. Disponível em: www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/052202b.pdf. Acesso em 22.8.2005.

FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm. Acesso em 10.8.2006.

FORD, J., TINMINS. The use of thermal analysis in the purity determination of pharmaceuticals. In: _____ . **Pharmaceutical Thermal Analysis. Techniques and Applications**. New York: Ellis Hor Wood Limited, 1989. p.108-135.

FORMAN, M.; TROJANOWSKI, J.; LEE, V. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine*, v. 10, p. 1055-1063, 2004.

FORTUNATO, D. Dissolution method .development for immediate release solid oral dosage forms. **Dissolution Technologies**, v. 12, n. 3, p. 12-14, 2005.

FU, C.; SIBLEY, M. Quantitative high-pressure liquid chromatographic determination of epinephrine in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 3, p. 425-426, 1977.

GORDIN, A.; KAAKKOLA, S.; TERÄVÄINEN, H. Clinical advantages of COMT inhibition with entacapona – a review. **Journal of Neural Transmission**, v. 111, p. 1343-1363, 2004.

GOSAL, D.; ROSS, O.; TOFT, A. Parkinson's disease: the genetics of a heterogeneous disorder. **European Journal of Neurology**, v. 13, p. 616-627, 2006.

GOTTLIEB, H.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 7512-7515, 1997.

HEIMBACH, T.; OH, D.; LI, L.; FORSBERG, M.; SAVOLAINEN, J.; LEPPÄNEN, J.; MATSUNAGA, Y.; FLYNN, G.; FLEISHER, D. Absorption rate limit considerations for oral phosphate prodrugs. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 6, p. 848-856, 2003.

HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.; MASSART, D. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001.

HOLM, K.; SPENCER, C. A review of its use in Parkinson's disease. **Drugs**, v. 58, n. 1, p. 159-177, 1999.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Guideline on stability testing: photostability testing of new drug substance and products Q1B. In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 1996.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Guideline on Stability Testing of New Drug Substance and Products Q1A(R2). In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2003.

- ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2005.
- KARLSSON, M.; WIKBERG, T. Liquid chromatographic determination of a new catechol-O-methyltransferase inhibitor, entacapone, and its Z-isomer in human plasma and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 10, p. 593-600, 1992.
- KERÄNEN, T.; GORDIN, A.; KARLSSON, M.; KORPELA, K.; PENTIKÄINEN, P.; SCHULTZ, E.; SEPPÄLÄ, L.; WIKBERG, T. Effect of the novel catechol-O-methyltransferase inhibitor OR-611 in healthy volunteers. **Neurology**, v. 41(3 Supl 1), p. 345, 1991.
- KESKI-HYNNILÄ, H.; ANDERSIN, R.; LUUKKANEN, L.; TASKINEN, J.; KOSTIAINEN, R. Analysis of catechol-type glucuronides in urine samples by liquid chromatography-electrospray ionization –tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 794, p. 75-83, 1998.
- KESKI-HYNNILÄ, H.; RAANAA, K.; TASKINEN, J.; KOSTIAINEN, R. Direct analysis of nitrocatechol-type glucuronides in urine by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 749, p. 253-263, 2000.
- KESKI-HYNNILÄ, H.; RAANAA, K.; FORSBERG, M.; MÄNNISTÖ, P.; TASKINEN, J.; KOSTIAINEN, R. Quantification of entacapone glucuronide in rat plasma by on-line coupled restricted access media column and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 759, p. 227-236, 2001.
- KIBBE, A. H. (Ed.) **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3th ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.
- KOLLER, W. Management of motor fluctuations in Parkinson's disease. **European Neurology**, v.36 (Supl. 1), p. 43-48, 1996.
- KOLLER, W.; MONTGOMERY, E. Issues in the early diagnosis of Parkinson's disease. **Neurology**, v.49 (Supl. 1), p. 10-25, 1997.
- KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-858, 1999.
- KORLIPARA, L.; COOPER, J.; SCHAPIRA, A. Differences in toxicity of the catechol-O-methyl transferase inhibitors, tolcapone and entacapone to cultured human neuroblastoma cells. **Neuropharmacology**, v. 46, p. 562-569, 2004.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara Ed. 2004/2005**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1.25 – 1.26.
- LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. Testes de estabilidade e fundamentos da cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.; KANIG, J. (Ed). **Teoria e**

prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001, v. 2, Cap.26, p. 1277-1355.

LEHTONEN, P.; LEHTINEN, S.; MÄLKKI-LAINE, L.; WIKBERG, T. Micellar electrokinetic capillary chromatography method for direct determination of glucuronides of entacapone and its (Z)-isomer in human urine. **Journal of Chromatography A**, v. 836, p. 173-188, 1999.

LEPPÄNEN, J.; HUUSKONEN, J.; SAVOLAINEN, J.; NEVALAINEN, T.; TAIPALE, H.; VESALAINEN, J.; GYNTHNER, J.; JÄRVINEN, T. Synthesis of a water-soluble prodrug of entacapone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 1967-1969, 2000.

LEPPÄNEN, J.; WEGELIUS, E.; NEVALAINEN, T.; JÄRVINEN, T.; GYNTHNER, J.; HUUSKONEN, J. Structural studies of acyl esters of entacapone. **Journal of Molecular Structure**, v. 562, p. 129-135, 2001.

LIANG, Y.; ZHANG, R.; ADARAYAN, E.; ADAMSON, G.; ZHAO, J.; KASSAHUN, K.; EMARY, W. Quantitation of geometric isomers of a phosphodiesterase inhibitor in rat and monkey plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1293–1298, 2006.

LOPES, J. Cromatografia em Camada Delgada. In: COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. (Coord.). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. São Paulo: Editora da Unicamp, 1997. p. 45-56.

MANADAS, R.; PINA, M.; VEIGA, F. Dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375-399, 2002.

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

MATTHEWS, B. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 831-856, 1999.

MCMURRY, J. Structure determination: mass spectrometry and infrared spectroscopy. In: _____. **Organic Chemistry**. 5th ed. Pacific Grove: Brooks/Cole, 2000. p. 441-442.

MENDHAM, J.; DENNEY, R.; BARNES, J.; THOMAS, M. Espectroscopia eletrônica molecular In: _____ **Vogel – Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2002a. Cap. 17. p. 352-354.

MENDHAM, J.; DENNEY, R.; BARNES, J.; THOMAS, M. Espectrometria de massas. In: _____ **Vogel – Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2002b. Cap. 19. p. 400-429.

MOFFAT, A.; OSSELTON, M.; WIDDOR, B (Ed.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 3th ed. Chicago: Pharmaceutical Press, 2004. v. 2, p. 977-978.

NOVARTIS. Comtan. São Paulo, 2004. 1 f. Bula.

NUDELMAN, N. E. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Atheneo, 1975.

PAIM, C.; GONÇALVES, H.; MIRON, D.; SIPPEL, J.; STEPPE, M. Stability-Indication LC determination of entacapone in tablets. **Chromatographia**, v. 65, n. 9/10, p. 595-599, 2007.

PAN, C.; XU, X.; HE, H.; CAI, X.; ZHANG, X. Separation and identification of cis and trans isomers of 2-buten-1,4-diol and lafutidine by HPLC and LC-MS. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6B, n. 1, p. 74-78, 2005.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Infrared spectroscopy. In: _____. **Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 3th ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001a. Cap. 2, p. 13-84.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: _____. **Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 3th ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001b. Cap. 3. p. 138 - 156.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Ultraviolet spectroscopy. In: _____. **Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 3th ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001c. Cap. 7. p. 353-389.

RAJESWARI, K.; SANKAR, G.; RAO, A.; RAO, J. A new spectrophotometric method for the determination of entacapone in pure and tablet dosage form. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 4(3), p. 694-696, 2006. ChemPort Connection, 2006. Resumo.

RAMAKRISHNA, N.; VISHWOTTAM, K.; WISHU, S.; KOTESHWQRA, M.; CHIDAMBARA, J. High-performance liquid chromatography method for the quantification of entacapone in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 823(2), p. 189-194, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, I.M.; MOORE, P. K. Distúrbios neurodegenerativos. In: _____. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 567-571.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; MELO, L. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RIEDER, C.; ROTTA, F. Anitparkinsonianos . In: FUCHS, F.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B. (Ed). **Farmacologia Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 554-563.

ROHRS, B. Dissolution method development for poorly soluble compounds. **Dissolution Technologies**, aug.2001.

ROSSI, R.; DIAS, C.; DONATO, E.; MARTINS, L.; BERGOLD, A.; FRÖEHLICH, P. Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules

based on in vivo data. **International Journal of Pharmaceutics**, DOI 10.1016/j.ipharm.2007.01.036.

SAVOLAINEN, J.; LEPPÄNEN, J.; FORSBERG, M.; TAIPALE, H.; NEVALAINEN, T.; HUUSKONEN, J.; GYNTER, J.; MANNISTO, P.; JARVINEN, T. Synthesis and *in vitro/in vivo* evaluation of novel oral *N*-alkyl- and *N,N*-dialkyl-carbamate esters of entacapone. **Life Sciences**, v. 67, p. 205-216, 2000.

SCHAPIRA, A.; OBESO, J. The place of COMT inhibitors in the armamentarium of drugs for the treatment of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 55(11) Supl 4, p. S65-S68, 2000.

SHABIR, G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. Espectroscopia no infravermelho. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000, p. 67-135.

SKOOG, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOUG, J.; HALSTEAD, D.; THEIS, D.; FREEMAN, J.; FAGAM, D.; ROHRS, B. Roteiro para Desenvolvimento e Validação do Teste de Dissolução em Formas Farmacêuticas Sólidas para Uso Oral. **Pharmaceutical Technology**, abril, p. 34-43, 1997.

SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; GLAJCH. **Practical HPLC Method Development**. 2th. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 1997. p. 9, 18-19, 702-704, 711.

STANDAERT, D., YOUNG, A. Tratamento dos Distúrbios Degenerativos do Sistema Nervoso Central. In: Hardman, J.; Limbird, L (Ed). **Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapia**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. p. 411-419.

STOCCHI, F.; BARBATO, L.; NORDERA, G.; BOLNER, A.; CARACENI, T. Entacapone improves the pharmacokinetic and therapeutic response of controlled release levodopa / carbidopa in Parkinson's patients. **Journal of Neural Transmission**, v. 111, p. 173-180, 2004.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

THE MERCK Index. **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologics**. Version 12.3. New Jersey: Merck & Co. Inc., 2000. Entacapone. CD ROM.

THOMA, D. Photodecomposition and stabilization of compounds in dosage forms. In: TØNNESEN, H. (Ed.). **Photostability of drugs and drugs formulation**. 1. ed. London: Taylor & Francis, 1996. Cap. 6, p. 121-123.

-
- TØNNESEN, H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 225, p. 1-14, 2001.
- USP 30**. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 30th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- WATERS, C. Practical issues with COMT inhibitors in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 55(11), Supl 4, p. S57-S59, 2000.
- WATSON, G. D. Ultraviolet and visible spectroscopy. In: _____. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 2005a. Cap. 4, p. 75-96.
- WATSON, G. D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: _____. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 2005b. Cap. 7, p. 145-166.
- WATSON, G. D. High pressure liquid chromatography. In: _____. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 2005c. Cap. 12, p. 237-276.
- WEINER, W., SHULMAN, L. Doença de Parkinson. In: _____. **Neurologia para Não-Especialistas – Fundamentos Básicos da Neurologia Contemporânea**. 4. ed. São Paulo: Santos Editora, 2003. p. 129-141.
- WIKBERG, T.; VUORELA, A.; OTTOILA, P.; TASKINEN, J. Identification of major metabolites of the catechol-O-methyltransferase inhibitor entacapone in rats and humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 21, p. 81-92, 1993.
- YOSHIOKA, S.; STELLA, V. **Stability of Drugs and dosage forms**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2000. p. 268.
- ZHAO, Y., SUKBUNTHRNG, J.; ANTONIAN, L. Simultaneous determination of Z-SU5416 and its interconvertible geometric E-isomer in rat plasma by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 513-522, 2004.