



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA**



**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
DETERMINAÇÃO DE METILDOPA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

NATHÁLLIA VIEIRA DO NASCIMENTO

Macaé-RJ
Dezembro/2015

NATHÁLLIA VIEIRA DO NASCIMENTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
DETERMINAÇÃO DE METILDOPA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé, como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vítor Todeschini

CO-ORIENTADOR: Farmacêutica Primeiro-Tenente (RM2-S) Juliana Alvim Paixão Chaves

Macaé-RJ
Dezembro/2015

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus que me deu forças e saúde para trilhar este caminho e conseguir concretizar esse sonho.

Um agradecimento especial aos meus pais pelo apoio e carinho dedicados a mim durante toda essa caminhada, sem eles nada disso seria possível.

Aos colegas de curso de Farmácia que sempre caminharam ao meu lado e permitiram uma trajetória mais humana e animada, permitindo que vivêssemos ao longo desses anos, histórias incríveis.

A prof. Carolina Pupe que me abriu os olhos para um mundo enorme de possibilidades, e graças a ela busquei novos horizontes, conseguindo realizar minhas escolhas de forma mais consciente.

Ao prof. Vítor Todeschini por ter me acolhido em um momento de indecisão e com toda a sua sabedoria e dedicação conseguiu me guiar pelo melhor caminho para que fosse possível a realização deste trabalho.

Aos prof. Max e Marina pelo tempo dedicado na avaliação deste trabalho.

Ao Laboratório Farmacêutico da Marinha, em especial a farmacêutica Primeiro-Tenente (RM2-S) Juliana Alvim Paixão Chaves, a todos os funcionários e estagiários que lá trabalham que com suas contribuições possibilitaram a realização desta pesquisa. Tenho certeza que todo o conhecimento lá adquirido será fundamental no meu futuro como profissional, foi sem dúvidas uma experiência inesquecível.

RESUMO

A metildopa é um dos fármacos utilizados no tratamento da hipertensão, mais comumente nas síndromes hipertensivas gestacionais. Por ser um inibidor do sistema simpático de ação central, o fármaco impede a liberação de norepinefrina nas sinapses nervosas, diminuindo a pressão arterial através da redução da resistência periférica vascular, assim como podendo alterar a frequência e o débito cardíaco. No presente estudo foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação de metildopa em formulações farmacêuticas, objetivando sua utilização no monitoramento da estabilidade do produto. Durante o desenvolvimento metodológico as análises foram realizadas por CLAE em fase reversa, utilizando coluna Phenomenex C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5µm) mantida a 25°C. A fase móvel constituída por tampão fosfato pH 2,0 e metanol (70:30; v/v), sendo eluída sob um vazão de 0,8 mL/min e com detecção a 278 nm. O método foi validado em duas faixas de trabalho correspondente à determinação de teor (50 µg/mL) e produtos de degradação (0,5 µg/mL), avaliando-se os parâmetros preconizados internacionalmente, tais como a especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. Os parâmetros da validação para a determinação de teor, quanto à especificidade, nenhuma interferência foi detectada, a linearidade utilizada na faixa de 40–60 µg/mL ($r^2=0,9998$), precisão e exatidão com limites aceitáveis nas faixas investigadas, apresentando precisão abaixo de 5 % e exatidão entre 98-102 %. Nas modificações analisadas na robustez, apenas o fluxo apresentou DPR maior que 5%. Com relação à utilização deste método para a análise de produtos de degradação, os parâmetros de linearidade foram na faixa de 0,25-5 µg/mL ($r^2 = 0,9994$), limite de detecção de 0,000005 mg/mL e limite de quantificação de 0,000017 mg/mL. Dessa forma, o método proposto mostrou-se simples, eficiente e confiável tanto para a análise quantitativa de metildopa em comprimidos quanto para a avaliação de produtos de degradação do fármaco, contribuindo, assim, para o aprimoramento do controle da qualidade de produtos farmacêuticos.

Palavras-chave: Cromatografia líquida de alta eficiência, Metildopa, Produtos de degradação, Validação analítica.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Estrutura molecular da metildopa | 15 |
| FIGURA 2 – Esquema representando o preparo das soluções estoque de metildopa. | 28 |
| FIGURA 3 - Esquema representando o preparo das soluções amostra de metildopa. | 29 |
| FIGURA 4 - Cromatograma da solução padrão de metildopa (concentração 50 ug/mL) | 33 |
| FIGURA 5 - Espectro de absorção da solução do padrão de metildopa (concentração 50 ug/mL) | 33 |
| FIGURA 6 - Cromatograma obtido após análise da solução placebo em comparação com as soluções padrão e amostra na mesma concentração (50 ug/mL) | 35 |
| FIGURA 7 - Cromatograma obtido após exposição da solução amostra à condição alcalina (NaOH 0,1M) | 36 |
| FIGURA 8 - Cromatograma obtido após exposição da solução padrão à condição alcalina (NaOH 0,1M) | 37 |
| FIGURA 9 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição à condição ácida (HCL 1 M). | 38 |
| FIGURA 10 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição à condição oxidativa (H ₂ O ₂ 30 %). | 39 |
| FIGURA 11 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição a íons (CuSO ₂ 0,05M). | 40 |
| FIGURA 12 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição à câmara climática | 41 |
| Figura 13 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição à estufa (80 °C)..... | 42 |
| FIGURA 14 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição fotolítica (1.200.000 Lux/h 25°C) | 43 |
| FIGURA 15 - Gráfico da linearidade para avaliação de teor do fármaco na faixa de 0,04 a 0,06 mg/mL | 46 |
| FIGURA 16 - Gráfico da linearidade para avaliação dos produtos de degradação do fármaco na faixa de 0,00025 a 0,005 mg/mL. | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 1 - Classificação dos testes analíticos, de acordo com a sua finalidade.... | 18 |
| TABELA 2 - Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade. | 18 |
| TABELA 3 - Condições metodológicas para a análise de metildopa e de seus produtos de degradação. | 31 |
| TABELA 4 - Condições analíticas testadas no desenvolvimento do método. | 32 |
| TABELA 5 - Resultados do teste de degradação. | 43 |
| TABELA 6 - Modo de preparo das soluções para a curva resposta de teor. | 44 |
| TABELA 7 - Modo de preparo das soluções para a curva resposta de produtos de degradação. | 45 |
| TABELA 8 - Dados referente ao DPR entre as amostras de teor. | 48 |
| TABELA 9 - Avaliação da exatidão do método para análise do teor. | 49 |
| TABELA 10 - Avaliação da exatidão do método para análise dos produtos de degradação. | 49 |
| TABELA 11 - Fatores avaliados na análise de robustez do método. | 50 |
| TABELA 12 - Resultado das condições cromatográficas analisadas durante teste de robustez. | 500 |

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| DATASUS | Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde |
| DPR | Desvio Padrão Relativo |
| FB-5 | Farmacopéia Brasileira 5ª edição |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| HTA | Hipertensão Arterial |
| ICH | <i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> |
| IFA | Insumo Farmacêutico Ativo |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia |
| MS | Ministério da Saúde |
| r | Coefficiente de Correlação |
| r^2 | Coefficiente de Determinação |
| PE | Pré - eclâmpsia |
| SIM | Sistema de Informação sobre mortalidade |
| SQR | Substância Química de Referência |
| USP | <i>United States Pharmacopoeia</i> |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 | Objetivo geral | 13 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 13 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 3.1 | Hipertensão arterial (HTA) e síndromes hipertensivas gestacionais | 14 |
| 3.2 | Metildopa | 15 |
| 3.3 | Métodos analíticos para quantificação de metildopa | 16 |
| 3.4 | Validação de métodos analíticos | 17 |
| 3.4.1 | Especificidade | 19 |
| 3.4.2 | Linearidade | 19 |
| 3.4.3 | Limite de detecção | 20 |
| 3.4.4 | Limite de quantificação | 20 |
| 3.4.5 | Exatidão | 21 |
| 3.4.6 | Precisão | 21 |
| 3.4.7 | Robustez | 22 |
| 3.5 | Estudos de estabilidade e avaliação de produtos de degradação | 23 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 25 |
| 4.1 | MATERIAIS | 25 |
| 4.1.1 | Substâncias químicas de referência (SQR) | 25 |
| 4.1.2 | Produtos farmacêuticos | 25 |
| 4.1.3 | Solventes, utensílios e materiais de consumo | 25 |
| 4.1.4 | Equipamentos | 26 |
| 4.1.4.1 | Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) | 26 |
| 4.1.4.2 | Balança analítica | 26 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.1.4.3 | Banho Ultrassônico..... | 26 |
| 4.1.4.4 | Bomba de vacuo..... | 27 |
| 4.1.4.5 | pHâmetro..... | 27 |
| 4.2 | MÉTODOS..... | 27 |
| 4.2.1 | Preparo das soluções da substância química de Referência (SQR)..... | 27 |
| 4.2.2 | Preparo das soluções das amostras dos comprimidos..... | 28 |
| 4.2.3 | Preparo da solução do placebo..... | 29 |
| 4.2.4 | Preparo da fase móvel..... | 30 |
| 4.2.5 | Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 30 |
| 4.2.6 | Validação..... | 31 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 5.1 | DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO..... | 32 |
| 5.2 | VALIDAÇÃO..... | 34 |
| 5.2.1 | Especificidade..... | 34 |
| 5.2.2 | Linearidade..... | 44 |
| 5.2.3 | Limite de detecção e de quantificação..... | 46 |
| 5.2.4 | Precisão..... | 47 |
| 5.2.5 | Exatidão..... | 48 |
| 5.2.6 | Robustez..... | 49 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 52 |
| 7 | REFERÊNCIAS..... | 53 |

1 INTRODUÇÃO

No período gestacional, as mulheres podem desenvolver síndromes hipertensivas diversas, entre elas estão relacionadas hipertensão crônica, pré eclâmpsia/eclâmpsia, pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica e hipertensão gestacional (GIFFORD, 2000). Tais síndromes, se não tratadas, podem ocasionar altas taxas de mortalidade materna e fetal, sendo elas oriundas de doenças hipertensivas crônicas ou induzidas pela gestação. (HENRIQUE, 2006). Esses tipos de complicações que as gestantes estão predispostas a desenvolver podem provocar o deslocamento prematuro de placenta, coagulação intravascular disseminada, hemorragia cerebral, falência hepática e renal (GIFFORD, 2000).

Dentre os fármacos comumente utilizados na prevenção e controle da pressão arterial no período gestacional e suas complicações, a hidralazina e a metildopa possuem destaque, promovendo o relaxamento do músculo liso das arteríolas periféricas e a redução da resistência vascular (GUNENÇ *et al.*, 2002).

A metildopa, por ser um inibidor do sistema simpático de ação central, quando utilizada no tratamento de hipertensão gestacional contribui para a redução da resistência vascular uteroplacentária, provavelmente pelo fato das artérias radial e arqueada possuírem inervação adrenérgica (REY, 1992).

Para garantir a eficiência e segurança do tratamento e a diminuição de riscos envolvendo a produção deste tipo de medicamento, se faz necessário o controle por parte da indústria, especialmente envolvendo a determinação do teor do princípio ativo e da estabilidade desses medicamentos.

A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas, de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens (BRASIL, 2005). Sendo assim, para que todos os medicamentos produzidos por uma indústria farmacêutica apresentem a determinação correta do prazo de validade e, por conseguinte garanta sua eficácia no decorrer deste prazo, se faz necessária a quantificação destes fármacos através de métodos analíticos indicativos de estabilidade.

Apesar dos compêndios oficiais serem atualizados periodicamente, muitos fármacos não possuem condições de análise descrita em suas monografias. Além

disso, é constante na literatura especializada a descrição de metodologias demoradas e dispendiosas. Por isso, muitas empresas acabam por buscar métodos alternativos que se ajustam a sua realidade, levando a uma busca pela redução de gastos e de tempo entre as análises, otimizando assim o processo envolvido na regulamentação dos registros dos medicamentos produzidos. Para que esse novo método desenvolvido pela indústria responsável pela produção do medicamento seja aceito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), se faz necessária a validação do mesmo.

A validação é a ferramenta mais adequada para garantir a manutenção da confiabilidade tanto de uma instalação, de um processo produtivo, de equipamento novo e, inclusive, de metodologias analíticas, onde uma das principais preocupações da empresa é se a preservação da qualidade do produto fabricado está sendo mantida após a validação dos mesmos (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Devido à importância e versatilidade da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas análises farmacêuticas e inexistência de um método indicativo de estabilidade para avaliação de metildopa utilizando este equipamento na farmacopéia brasileira, pretende-se, através deste trabalho, otimizar e validar um método cromatográfico com esta finalidade. Destaca-se que o desenvolvimento metodológico teve como base as análises por CLAE já realizadas pelo Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM), que emprega essa técnica rotineiramente no controle de qualidade de diversos produtos.

Por essas razões, entende-se que este estudo contribuirá para o domínio tecnológico e científico, aprimorando a área de controle da qualidade e garantindo a segurança e a eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponibilizados para a população.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e a validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação de metildopa em formas farmacêuticas e análise de seus produtos de degradação formados em diferentes condições de armazenamento.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolvimento de método por CLAE, buscando-se característica indicativa de estabilidade;
- Conhecer condições favoráveis de degradação forçada referentes à metildopa;
- Validação da metodologia desenvolvida segundo guias nacionais e internacionalmente aceitos;
- Aplicação da metodologia à análise dos produtos farmacêuticos contendo metildopa.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Hipertensão Arterial (HTA) e síndromes hipertensivas gestacionais

No período gestacional, a mulher enfrenta várias modificações hormonais e físicas. Tais modificações podem ser tanto benéficas quanto causadora de riscos para a saúde da mãe e do feto, dentre essas possíveis modificações, destaca-se a hipertensão arterial (HTA) que pode ser adquirida nesse período.

A HTA na gravidez altera o quadro de 6 a 8% das gestações, trazendo complicações com riscos de moderado a grave nesse período. Existem 4 principais formas de apresentação: HTA crônica, que antecede a gravidez ou é documentada antes das 20 semanas de gestação; pré-eclâmpsia (PE) / eclâmpsia, HTA crônica com PE sobreposta e HTA gestacional. A HTA gestacional define-se como uma elevação significativa da pressão arterial após as 20 semanas de gestação, em gestantes previamente normotensas, atingindo valores superiores a 140/90 mmHg e normalmente desaparece após 10 dias de parto. Quando os valores de pressão arterial se mantêm acima de 160/110 mmHg de forma sustentada, é considerada grave. As síndromes hipertensivas da gravidez encontram-se entre as principais causas de morbimortalidade materno-fetal, sendo que a terapêutica anti-hipertensora faz parte do arsenal terapêutico utilizado na prevenção das suas graves complicações (BARRA *et al.*, 2012).

Segundo dados do Departamento de informática do Sistema Único de Saúde, (DATASUS) a HTA gestacional é a primeira causa de morte materna no Brasil, especialmente quando instalada na sua forma mais grave. Conforme dados do Sistema de Informação sobre mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde (MS) a HTA é responsável por cerca de 20% da taxa de 77.0 mortes materna/100.000 nascidos vivos (DATASUS, 2010).

Como descrito na literatura, em análise dos casos de óbito materno ocorridos no Município do Rio de Janeiro no período de 1993 a 1996, a causa de morte mais comum segue mantendo a proporção nacional, sendo a hipertensão arterial, com 32% dos óbitos (THEME-FILHA, *et al.*, 1999).

Dentre os medicamentos utilizados na HTA durante o período gestacional, a utilização da metildopa possui grande impotância. O fármaco diminui o espasmo

vascular uteroplacentário na artéria uterina, não interferindo na resistência da artéria umbilical nem nos parâmetros fetais (GUNENÇ *et al.*, 2002). Assim, o medicamento não interfere ou altera parâmetros relacionados exclusivamente ao feto, apresentando modificações apenas com relação à melhora do índice de resistência ao fluxo sanguíneo na artéria cerebral das pacientes (HENRIQUE *et al.*, 2006).

A utilização da metildopa por longo período unido a ausência de efeitos adversos aumentam seu grau de confiabilidade. Visto que através de estudos realizados por Redman & Ounsted, permitiu o acompanhamento ao longo de sete anos, a crianças cujas mães foram tratadas com metildopa no período gestacional, não sendo evidenciado nenhum tipo de alteração no desenvolvimento neuro-motor dos mesmos (REDMAN; OUNSTED, 1982).

3.2 Metildopa

A metildopa trata-se de um fármaco anti-hipertensivo que apresenta como características físicas ser um pó cristalino branco ou branco amarelado; ou na forma de cristais incolores ou quase incolores. Sendo pouco solúvel em água, ácido acético glacial e metanol, muito pouco solúvel em etanol, praticamente insolúvel em éter etílico e solúvel em soluções diluídas de ácidos minerais (FB 5, 2010). A metildopa se apresenta na forma sesquihidratada com fórmula molecular $C_{10}H_{13}NO_4 \cdot 1\frac{1}{2} H_2O$, massa molecular de 238,2 g/mol. Além disso, o fármaco apresenta valores de pKa básico de 9,85 e pKa ácido de 1,73 (DRUGBANK, 2015). A estrutura química da metildopa está representada na Figura 1.

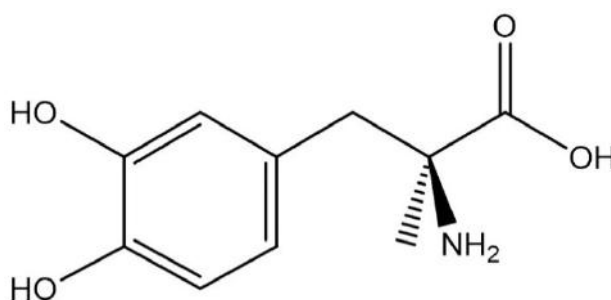


FIGURA 1 – Estrutura química da Metildopa

Este fármaco pertence a uma grande família de anti-hipertensivos, os inibidores do sistema nervoso simpático, sendo a subclassificação agonista alfa 2-adrenérgico, atua atravessando a barreira hemato-encefálica e inibe o efluxo

simpático nos centro vasomotores cerebrais, principalmente por impedir a liberação de norepinefrina nas sinapses nervosas (TAVARES; PLAVNIK, 1998).

A metildopa é um análogo da L-dopa que é convertida a alfa-metildopamina e posteriormente a alfa-metilnorepinefrina. A alfa-metilnorepinefrina, assim como a norepinefrina, age como potente agonista dos receptores alfa 2. Esse agonismo aos receptores alfa 2 adrenérgicos pré-sinápticos inibe a liberação de norepinefrina, impedindo assim a transmissão nervosa, diminuindo o efluxo simpático para a periferia (FROHLICH, 1980).

Apresenta como medicamento de referência o ALDOMET nas dosagens de 250mg e 500mg produzidos pela indústria farmacêutica Aspen Pharma (ANVISA, 2015). Sua ação é atribuída ao seu isômero L, sendo um dos poucos fármacos comercializados na forma enantiomericamente pura (HYNECK; DENT; HOOK, 1990).

3.3 Métodos Analíticos para quantificação de metildopa

De acordo com Farmacopéia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010) e a United States Pharmacopoeia na 36ª edição (USP 36, 2013), o método analítico para quantificação de metildopa é descrito através da espectrometria de absorção no visível, baseado na reação da metildopa com tartarato ferroso em tampão acetato de amônio pH 8,5 e leitura da absorvância em 520 nm. Uma desvantagem sobre a utilização deste método em particular, está na instabilidade da solução de tartarato ferroso, devendo ser preparada apenas no momento da análise (BUENO; PEREIRA, 2015).

Na literatura, encontram-se descrito outros métodos para determinação quantitativa de metildopa como a titulometria (AMIN, 1986), flourimetria (SALEM, 1993), voltametria (MOLAAKBARI; MOSTAFABI; BEITOLLAHI, 2014), potenciometria (REZAEI; ASKARPOUR; ENSAFI, 2013) e CLAE (TING; 1983).

O método titulométrico de catecolaminas e seus compostos relacionados baseia-se na oxidação brômica destes compostos (adrenalina, noradrenalina, L-dopa, dopamina e metildopa) e benzoquinonas correspondentes. As benzoquinonas oxidam o iodeto e libertam quantidades estequiométricas de iodo, o que pode ser determinado por titulação com solução de tiosulfato, utilizando amido como indicador (AMIN,1986).

O método espectrofluorométrico depende da intensidade da cor de laranja produzida pelas catecolaminas quando reagem com a solução etanólica de o-fenilenodiamina podendo ser medidas nas faixas de 490 nm; e a 560, 410 nm de emissão máxima quando utilizado a solução de 2-aminofenol (SALEM, 1993).

No método de voltametria, descreve-se a criação de um novo sensor eletroquímico que consegue detectar metildopa na presença de ácido fólico e glicina (MOLAAKBARI; MOSTAFAVI; BEITOLLAHI, 2014).

No caso da potenciometria, um eletrodo modificado foi utilizado como sensor para a determinação de metildopa em amostras farmacêuticas e em urina humana, apresentando resultados satisfatórios (REZAEI; ASKARPOUR; ENSAFI, 2013).

Um dos primeiros métodos já desenvolvido de CLAE que consta na literatura, envolve a determinação da combinação de metildopa, hidroclorotiazida e clorotiazida, em comprimidos e suspensões orais usando uma coluna de fase reversa C18, fase móvel composta por ácido acético:metanol:água, com detecção a 280 nm. A mistura destas 3 fármacos é eluída em menos de 8 minutos (TING, 1983).

Um método mais recente já desenvolvido de CLAE que consta na literatura, envolve a determinação da combinação de levodopa, carbidopa, entacapone, tolcapone, 3-o-metildopa e dopamina, em plasma humano utilizando uma coluna C8, fase móvel composta por um gradiente de água e acetronitrila:metanol (90:10 v/v), contendo 0.1% de ácido fórmico (RIBEIRO, 2015).

3.4 Validação de métodos analíticos

A necessidade da validação dos métodos analíticos desenvolvidos existe no sentido de demonstrar que os resultados das análises obtidas permitem uma avaliação correta dos parâmetros específicos da qualidade do produto, assegurando tanto a implantação do método como a confiabilidade dos resultados analíticos (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Conceitualmente, a validação deve garantir através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, para tal, a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 redigida pela ANVISA apresenta um Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Estas diretrizes são importantes para orientar testes relacionados aos parâmetros preconizados como especificidade,

linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, sempre adequados à cada análise pretendida (BRASIL, 2003).

Para direcionar os parâmetros que devem ser analisados, a própria resolução classifica os métodos analíticos em quatro categorias (Tabela 1), e dispõe de acordo com a categoria em que se encaixa, o conjunto de testes exigidos para determinada classificação (Tabela 2).

TABELA 1 - Classificação dos testes analíticos, de acordo com a sua finalidade

| Categoria | Finalidade do teste |
|------------------|--|
| I | Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas; |
| II | Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas; |
| III | Testes de desempenho; |
| IV | Testes de identificação. |

Fonte: BRASIL, 2003.

TABELA 2 - Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

| Parâmetro | Categoria I | Categoria II | | Categoria III | Categoria IV |
|-------------------------|----------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| | | Quantitativo | Ensaio limite | | |
| Especificidade | Sim | Sim | Sim | * | Sim |
| Linearidade | Sim | Sim | Não | * | Não |
| Intervalo | Sim | Sim | * | * | Não |
| Precisão | Repetibilidade | Sim | Sim | Sim | Não |
| | Intermediária | ** | ** | ** | Não |
| Limite de detecção | Não | Não | Sim | * | Não |
| Limite de quantificação | Não | Sim | Não | * | Não |
| Exatidão | Sim | Sim | * | * | Não |
| Robustez | Sim | Sim | Sim | Não | Não |

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Fonte: BRASIL, 2003.

3.4.1 Especificidade

A especificidade do método analítico indica sua capacidade de diferenciar e quantificar o analito, mesmo na presença de outros constituintes da amostra que inclusive poderiam interferir na sua determinação, como adjuvantes, impurezas, produtos de degradação ou mesmo outra substância ativa (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005; VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007). É um parâmetro primordial a ser analisado no desenvolvimento e validação de um método analítico, devendo ser avaliada continuamente durante a utilização do método.

Uma forma de verificar a especificidade do método é observar a ausência de picos em amostras isenta da substância de interesse ou placebo (GRANGEIRO JÚNIOR *et al.*, 2004). Outras formas de avaliação podem ser conduzidas através da comparação do placebo com a substância padrão adicionada a matriz isenta, bem como pela análise de impurezas e produtos de degradação, realizadas através do estudo de degradações forçada, expondo o fármaco a condições extremas de exposição ácida, alcalina, oxidativa, íons metálicos, térmicas entre outras possibilidades. Nesses casos, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (ICH,1995; SHABIR, 2003; SWARTZ,1998)

3.4.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de um intervalo especificado. Esse parâmetro assegura que a resposta medida pelo equipamento seja representativa da concentração do analito em pesquisa (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005; SHABIR, 2003).

A linearidade pode ser confirmada com a regressão linear dos métodos dos mínimos quadrados dos pontos médios com no mínimo 5 pontos em concentrações previamente definidas (SOARES SOBRINHO *et al.*, 2005).

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (CUSTODIO *et al.*, 1997). Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r (CHUI *et al.*, 2001). Este parâmetro permite uma

estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.(NETO *et al*, 2001). A seguir a descrição da fórmula da equação da reta:

$$y = a + bx.$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

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

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade (BRASIL, 2010).

A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

3.4.3 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) corresponde à menor concentração da substância em análise que pode ser detectada com confiabilidade, porém não necessariamente quantificada (BRASIL, 2003).

O limite de detecção (LD) pode ser expresso baseado em parâmetros da curva analítica, utilizando a fórmula:

$$LD = \frac{3 \times DP}{b}$$

Onde:

DP = estimativa do desvio-padrão do coeficiente linear da curva analítica;

b = coeficiente angular da curva analítica

3.4.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003). Da mesma

forma que o LD, o LQ pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e calculado, sendo expresso pela equação a seguir:

$$LQ = \frac{10 \times DP}{b},$$

Onde:

DP = desvio-padrão do coeficiente linear da curva analítica;

b = coeficiente angular da curva analítica

3.4.5 Exatidão

A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico (BRASIL, 2003). Sendo sempre considerada dentro de certos limites, e a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão.

Pode ser determinada através várias metodologias tais como: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão. (THOMPSON *et al.*, 1999)

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada (BRASIL, 2003). A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{EXATIDÃO \%} = \frac{\text{Concentração Média Experimental} \times 100}{\text{Concentração Teórica}}$$

3.4.6 Precisão

A precisão mede quanto os resultados obtidos de uma mesma amostra, em uma série de medidas, sobre as mesmas condições de análise, se aproximam entre si. A precisão é geralmente expressa através do coeficiente de variação (CV), ou

desvio padrão relativo (DPR), de uma série de medidas, ambos expressos em percentual (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005; SHABIR, 2003). Esta é considerada em três níveis, porém neste caso só será realizadas os níveis de repetibilidade e precisão intermediária, que consistem em:

- Repetibilidade: concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003);

-Precisão intermediária: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003). Esta medida de dispersão pode ser calculada pela seguinte equação:

$$CV = DPR = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

onde:

CV = coeficiente de variação

DPR = desvio padrão relativo

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada (BRASIL, 2003).

3.4.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A avaliação deste parâmetro visa controlar e prevenir variações que possam interferir no resultado final (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005; SHABIR, 2003).

Os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método, quando se trata da cromatografia líquida, seriam: uma possível variação do pH da fase móvel; da composição da fase móvel; diferentes lotes ou fabricantes de colunas; temperatura e fluxo da fase móvel (BRASIL, 2003).

No Brasil, além da resolução 899/2003 da ANVISA, existe um documento de caráter orientativo (DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre validação de métodos analíticos) que está na 4ª revisão – JUL/2011, desenvolvido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) no qual também traz orientações para validação de procedimentos analíticos, com campo de aplicação voltado aos laboratórios acreditados ou postulantes a acreditação, e aos avaliadores e especialistas na área de laboratórios de ensaios, como o próprio documento diz, que também pode ser utilizado nos casos de validações em geral, assim como os guias internacionais descritos pelo ICH (International Conference on Harmonization), disponível pelo *Food and Drug Administration* (FDA).

3.5 Estudos de estabilidade e avaliação de produtos de degradação

A ANVISA determinou, desde 2005, que seja feito o estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos descritos na resolução nº1/05, que, além da validade, também determina a avaliação dos produtos de degradação e o método analítico correspondente. Tal resolução resultou na publicação de um Informe Técnico nº 1/2008, com o objetivo de esclarecer procedimentos nos casos em que a impureza ou o padrão do produto de degradação não estão disponíveis. Estes procedimentos envolvem a realização de testes de estresse sob condições variadas (BRASIL, 2008).

Por definição, o estudo de degradação forçada, é um estudo que permite a geração de produtos de degradação através da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica e oxidação, entre outras. Este estudo permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, bem como fornecer informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (BRASIL, 2013). Cabe destacar que estes ensaios podem apresentar diferenças no modo de serem realizados, pois cada fármaco possui características físicas, químicas e estruturais que devem ser consideradas no momento do estresse da amostra em questão.

Sendo assim, os estudos de degradação forçada e desenvolvimento do método analítico indicativo de estabilidade devem ser realizados ou aprimorados de

acordo com a indústria farmacêutica que produz o medicamento, as características do fármaco em estudo e disponibilidade de infraestrutura laboratorial.

Ainda nesse sentido, no ano de 2013 e baseado nos guias do ICH, a ANVISA, publicou a RDC nº 58/2013 que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares. Ficam estabelecidos, portanto, parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento (BRASIL, 2013).

Cabe destacar que os resultados dos ensaios devem servir de suporte para o desenvolvimento e validação da metodologia de análise do(s) produto(s) de degradação formado(s), para a análise crítica do perfil de degradação do medicamento, bem como para subsidiar os estudos de estabilidade (BRASIL, 2013).

O estudo de estabilidade completo, que inclui a estabilidade de curta duração, longa duração e acompanhamento, deve ser conduzido segundo o Guia para Realização de Estudos de Estabilidade, publicada na Resolução n.º 01, de 29 de julho de 2005. Esses estudos são de grande importância uma vez que uma possível instabilidade no produto final no decorrer dos meses pode estar relacionada à perda do efeito terapêutico ou à exposição do consumidor a efeitos tóxicos de possíveis produtos de degradação. A realização desse estudo se faz necessária toda vez que é realizada um pedido de registro de um medicamento novo ou a renovação do mesmo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR)

O padrão analítico de metildopa, com pureza de 100,1% foi obtido do INCQS/Fiocruz (Rio de Janeiro, Brasil), Lote: 1056. Para o desenvolvimento dos testes de degradação forçada, foi utilizado IFA (insumo farmacêutico ativo) de metildopa adquirido pelo fornecedor Zhejiang Wild Wind de origem chinesa, padronizado frente ao padrão analítico já mencionado.

4.1.2 Produtos farmacêuticos

Os comprimidos contendo 500 mg de metildopa e excipientes (celulose microcristalina 102, crospovidona, polivinilpirrolidona K30, metabissulfito de sódio, edetato de sódio diidratado, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, corante amarelo nº6 laca, opadry II White 85F18422), foram adquiridos da própria produção do Laboratório Farmacêutico da Marinha.

4.1.3 Solventes, utensílios e materiais de consumo

4.1.3.1 Solventes

- Metanol com grau analítico P.A (99,9 %) - VETEC QUÍMICA[®]
- Fosfato de Sódio Monobásico - VETEC QUÍMICA[®]
- Ácido Fosfórico 88% - VETEC QUÍMICA[®]
- Acetonitrila - VETEC QUÍMICA[®]
- Água UltraPurificada MiliQ
- Hidróxido de Sódio - VETEC QUÍMICA[®]
- Ácido Clorídrico - VETEC QUÍMICA[®]
- Peróxido de Hidrogênio 30% – Êxodo[®] Científica
- Sulfato Cúprico Pentahidratado – MP Biomedicals, LLC.

4.1.3.2 Utensílios

Para o preparo das soluções utilizou-se balança analítica, vidraria analítica incluindo balões e pipetas volumétricas, automática e pasteur, previamente calibradas. Além de béqueres de diversos volumes.

4.1.3.3 Materiais de consumo

- Para a filtração da fase móvel, utilizou-se uma bomba de vácuo e filtro de membrana MCE, 47 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm da marca Sorbline.
- Para a trituração dos comprimidos utilizou-se gral de porcelana, pistilo e espátula.
- Para as filtrações das amostras utilizou-se filtros de seringa da marca Clarinet™ Syring Filters, contendo membrana de *celulose regenerada* com poro de 0,45 µm e 25mm de diâmetro, seringas e vials.

4.1.4 Equipamentos

As análises qualitativas e quantitativas por CLAE foram realizadas no Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM), localizado na Av. Dom Hélder Câmara, 315 – Benfica, Rio de Janeiro.

4.1.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para as análises de separação cromatográfica das amostras foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de ultra performace (UHPLC) Shimadzu Nexera X2, constituído dos módulos LC-30AD (bomba); SIL-30AC (autoinjeter); CTO-20AC (forno de coluna); SPD-M20A (detector); CBM-20A (módulo de controle).

4.1.4.2 Balança analítica

As pesagens foram realizadas em balança analítica digital do modelo Shimadzu AUX220 da Empresa Shimadzu®.

4.1.4.3 Banho ultrassônico

Amostras foram homogeneizadas em equipamento de banho ultrassônico da marca QUIMIS®.

4.1.4.4 Bomba de vácuo

Para filtrar a fase móvel foi utilizada uma bomba de vacuo modelo SL-60 da Empresa Solab Científica.

4.1.4.5 pHâmetro

A fase móvel foi verificada e ajustada para pH 2,0. Utilizando pHâmetro TECNOPON modelo: mPA 210.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das soluções da substância química de Referência (SQR)

Para o preparo das soluções estoques para a análise do teor, foram pesados cerca de 28 mg da SQR de Metildopa sesquihidratada, equivalente a 25 mg de Metildopa. O padrão do INCQS foi transferido para balão volumétrico de 50 mL, adicionando um volume de fase móvel (tampão fosfato, metanol – 70:30) e com auxílio de um banho ultrassônico por aproximadamente 10 minutos para ajudar na homogeneização, em seguida avolumou-se com fase móvel obtendo-se uma concentração final de 0,5 mg/mL. Para análise cromatográfica foi retirado uma alíquota de 2 mL para balão de 20 mL e avolumado com fase móvel, obtendo-se assim uma concentração final de trabalho de 0,05 mg/mL. A solução resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm e transferida para o vial para injeção no CLAE.

Para a realização dos estudos de degradação forçada e análise dos produtos de degradação, utilizou-se uma solução estoque mais concentrada, repetindo o mesmo procedimento anterior, porém, sem retirar uma alíquota para diluição. A solução obteve a concentração final de 0,5 mg/mL. A Figura 2 demonstra o preparo das soluções estoque.

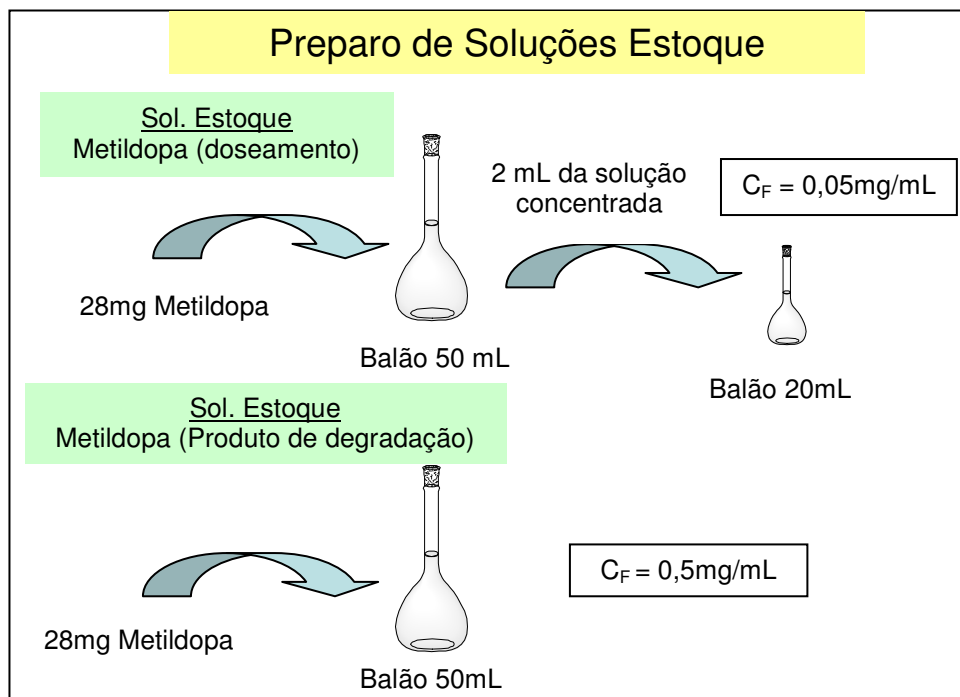


FIGURA 2 – Esquema representando o preparo das soluções estoque de metildopa.

4.2.2 Preparo das soluções das amostras dos comprimidos

Foram pesados 20 comprimidos, triturados em gral e calculados seu peso médio (aproximadamente 764,2 mg). Dissolveram-se cerca de 38,2 mg do pó triturado em balão volumétrico de 50 mL com fase móvel e auxílio de banho ultrassônico, homogeneizou-se por aproximadamente 10 minutos. Logo em seguida foi avolumado com fase móvel apresentando uma solução concentrada no valor de 0,5 mg/mL, sendo esta utilizada nas análises dos produtos de degradação.

Para as análises do teor, utilizou-se uma solução amostra diluída. Para prepara-la, foi retirado uma alíquota de 2 mL da solução amostra concentrada (0,5 mg/mL) para o balão de 20 mL e avolumado com fase móvel. Filtrou-se em membrana de 0,45 μm e logo em seguida foi transferido uma alíquota para o vial para ser injetado no CLAE.

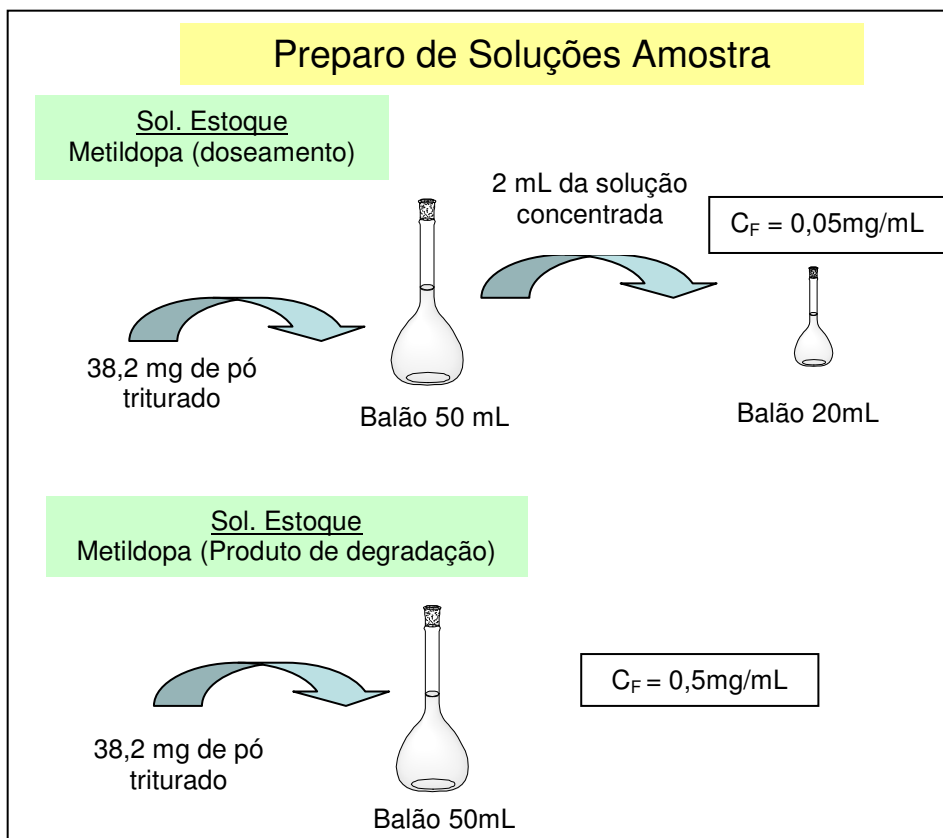


FIGURA 3 - Esquema representando o preparo das soluções amostra de metildopa.

4.2.3 Preparo da solução do placebo

O placebo foi preparado com os excipientes da formulação disponibilizada pelo LFM, de acordo com as concentrações preconizadas e informadas na ordem de produção e embalagem (OPE). Conforme a bula do medicamento, os excipientes presentes na formulação são: celulose microcristalina 102, polivinilpirrolidona K30, metabissulfito de sódio, edetato de sódio diidratado, crospovidona, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, corante amarelo nº6 laca. Opadry II White 85F18422.

O placebo participa apenas com 26,19 % na formulação da forma farmacêutica final, enquanto 73,81 % são referentes ao fármaco.

A solução do Placebo foi produzida através da pesagem de 10mg do pó de Placebo, dissolvido em fase móvel e diluído em balão de 50 mL, com o auxílio do banho ultrassônico por 10 minutos e em seguida, avolumado com fase móvel.

4.2.4 Preparo da fase móvel

Para a preparação da fase móvel foi dissolvido 2,7 g de fosfato de sódio monobásico em 600 mL de água purificada e em seguida ajustado o pH para 2,0 com ácido fosfórico 85 %, completou-se o volume para 700 mL e foi adicionado 300 mL de metanol, em balão de 1000 mL e homogeneizado. Filtrado em membrana de celulose 0,45 µm com auxílio de bomba a vácuo e desgaseificado por 15 minutos em banho ultrassônico.

4.2.5 Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE)

CLAE é uma técnica que permite realizar separações e quantificar compostos presentes em vários tipos de amostras com alta eficiência, resolução e detectabilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). O princípio da separação cromatográfica é baseado nas interações entre soluto e fase estacionária e nas características físico-químicas de cada composto. A obtenção de uma separação mais adequada depende da natureza, polaridade, caráter iônico e massa molecular do composto e do tipo de interação deste com as fases móvel e estacionária (CASS; DEGANI, 2001). Os modos de separação existentes são a cromatografia de fase reversa e a de fase normal. A primeira consiste em uma fase estacionária de baixa polaridade e uma fase móvel de maior polaridade. Já na segunda, essas polaridades são invertidas (TONHI *et al.*, 2002).

Sendo um método físico-químico de separação, a mistura de compostos é eluída através de uma coluna cromatográfica ao qual cada componente da mistura sai da coluna em tempos diferentes, devido as diversas formas de interações que podem ocorrer entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna a cromatografia uma técnica extremamente versátil e de vasta aplicação (CASS; DEGANI, 2001).

Técnicas de separação, como CLAE, destacam-se na química analítica pela capacidade de realizar análises quali-quantitativas em amostras farmacêuticas (RIBANI *et al.*, 2004) sendo freqüentemente utilizadas para determinação de fármacos em formulações farmacêuticas, especialmente nas que contêm mais de um constituinte ativo (KAPOOR *et al.*, 2006). No método proposto, os parâmetros

utilizados para a análise de metildopa e de seus produtos de degradação estão descritos na Tabela 3, a seguir:

TABELA 3 - Condições metodológicas para a análise de metildopa e de seus produtos de degradação.

| Parâmetros | Condições otimizadas |
|--------------------------------|--|
| Detector | UV a 278nm |
| Coluna | C18 (4,6mm x 250 mm, 5µm) |
| Fase móvel | Tampão Fostato pH 2,0 e metanol (70:30; v/v) |
| Fluxo | 0,8mL/min |
| Temperatura da coluna | 25°C |
| Volume de injeção | 10 µL |
| Tempo de retenção da metildopa | 4,23 min |
| Tempo de análise | 15 minutos |

4.2.6 Validação

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Assim, a validação do método proposto por CLAE foi efetuada através da avaliação dos parâmetros de especificidade, exatidão, linearidade, precisão e robustez, seguindo parâmetros preconizados pela legislação (BRASIL, 2003) e guias internacionalmente aceitos (ICH, 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

Durante o desenvolvimento do método, vários testes foram realizados a fim de se obter a melhor definição do pico representativo do fármaco e a melhor afinidade da coluna e fase móvel com o analito em questão. Para isso, inicialmente foi utilizado como base uma metodologia disponível na literatura que descrevia um método que poderia ser utilizado para análise da metildopa, porém muito antigo. Nesta, a fase móvel é constituída por metanol/água (20:80, v/v), juntamente com 2 % ácido acético e 0,005 M heptanosulfonato de sódio. A coluna utilizada foi a Phenomenex CN (250 mm x 4,6 mm), utilizando-se um fluxo de 1,6 mL/min e detecção de 280 nm (METWALLY,1991).

Ao analisar a metodologia, algumas modificações foram conduzidas para a otimização do método, porém sem sucesso. Assim, diversos experimentos foram realizados na busca por fases móveis compatíveis com as propriedades químicas da metildopa, proporcionando alguns tipos de combinações apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições analíticas testadas no desenvolvimento do método.

| Fase Móvel | Vazão | Coluna | Temperatura |
|---|--------------|---|-------------|
| Isocrática; Metanol/H ₂ O (20:80); 2% ácido acético; 0,005M heptanosulfonato | 1,600 mL/min | CN 250 mm x 4,6 mm I.D.Phenomenex 5 µm | 30°C |
| Isocrática; Acetonitrila/ H ₂ O (20:80); 0,1% ácido trifluoracético | 1,000 mL/min | CN 250 mm x 4,6 mm I.D.Phenomenex 5 µm | 30°C |
| Isocrática; Tampão fosfato/Metanol (70:30) pH 2,0 | 0,800 mL/min | Luna C18 250 mm x 4,6 mm Phenomenex 5 µm | 25°C |

Ótimos resultados foram obtidos utilizando coluna Luna Phenomenex C₁₈ 250 mm x 4,6 mm com 5 µm de tamanho de partícula, mantida a 25 °C. A fase móvel consistiu de tampão fosfato pH 2,0 (ajustado com ácido fosfórico) e metanol (70:30). A vazão foi mantida a 0,8 mL/min em modo isocrático. O volume de injeção foi de 10 µL, com detecção em 278 nm. As Figuras 4 e 5 demonstram o cromatograma da solução de Metildopa de acordo com o método descrito e seu espectro de absorção.

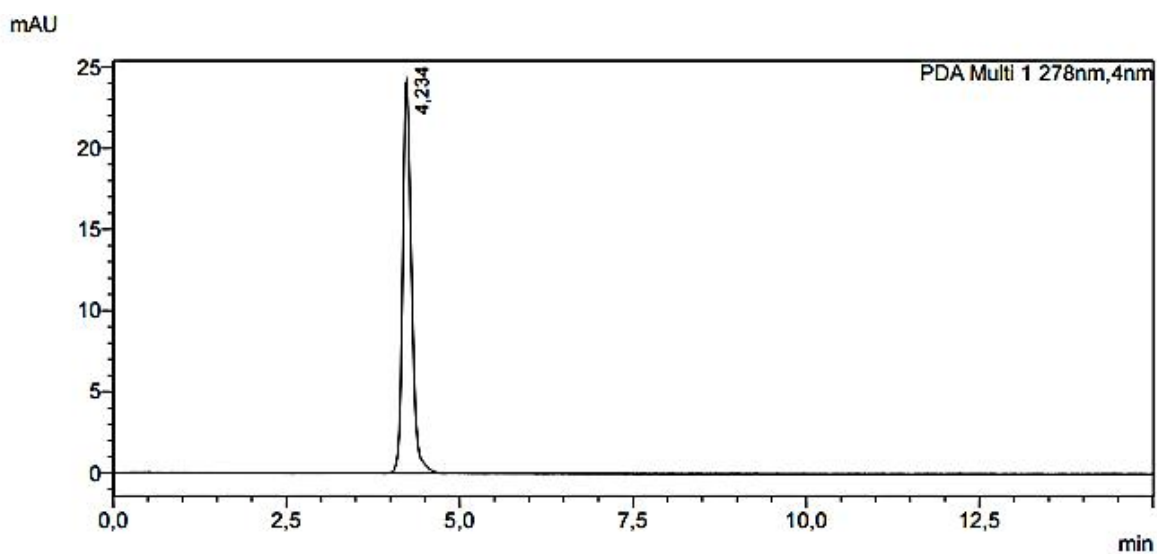


FIGURA 4 - Cromatograma da solução padrão de metildopa (concentração 50 µg/mL)

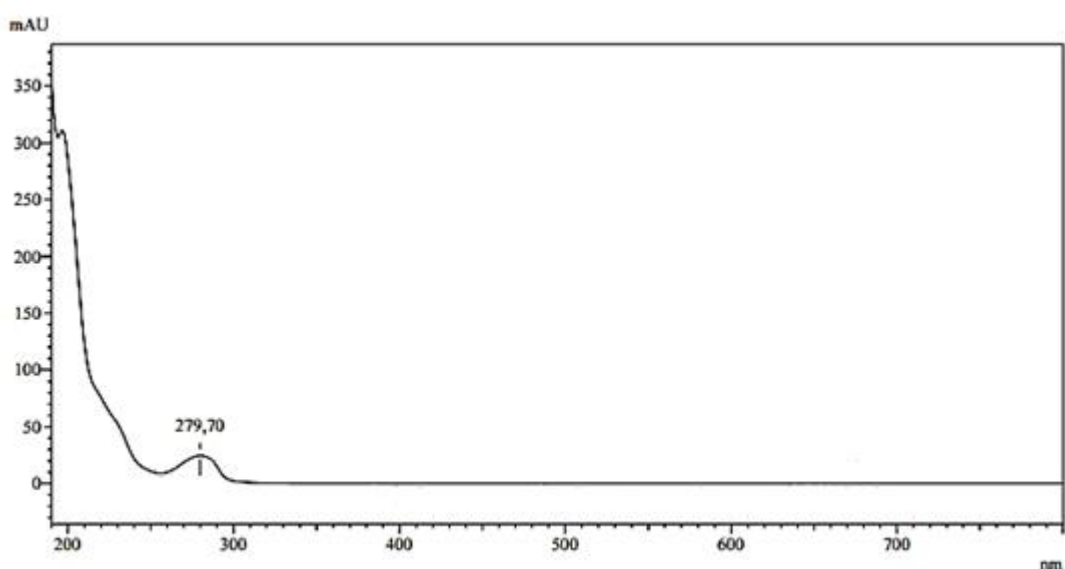


FIGURA 5 - Espectro de absorção da solução do padrão de metildopa (concentração 50 µg/mL)

5.2 VALIDAÇÃO

Após a obtenção de resultados satisfatórios durante o desenvolvimento do método e delineamento experimental, foi iniciado o processo de validação do mesmo. No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados parâmetros como especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão, robustez (BRASIL, 2003).

5.2.1 Especificidade

A especificidade corresponde à capacidade do método analisar o composto de interesse mesmo na presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação, componentes da matriz, excipientes ou mesmo outras substâncias ativas (BRASIL, 2003). Assim, a especificidade da presente metodologia foi avaliada através da comparação de substâncias de referência com amostras do simulado de excipientes e de amostras armazenadas sob condições de estresse, incluído luz, calor, umidade, hidrólise ácido-básica e oxidação.

5.2.1.1 Estudo da interferência do placebo

Conforme anteriormente relatado, a solução placebo foi preparada e injetada no cromatografo sob as mesmas condições analíticas. Através da comparação entre os cromatogramas da solução placebo e solução padrão (Figura 7), pode-se observar que a solução placebo não apresenta picos coeluinto no tempo de retenção do fármaco. Demonstrando, assim, que o método proposto é específico, não sendo afetado pelos excipientes utilizados no processo de fabricação do comprimido revestido.

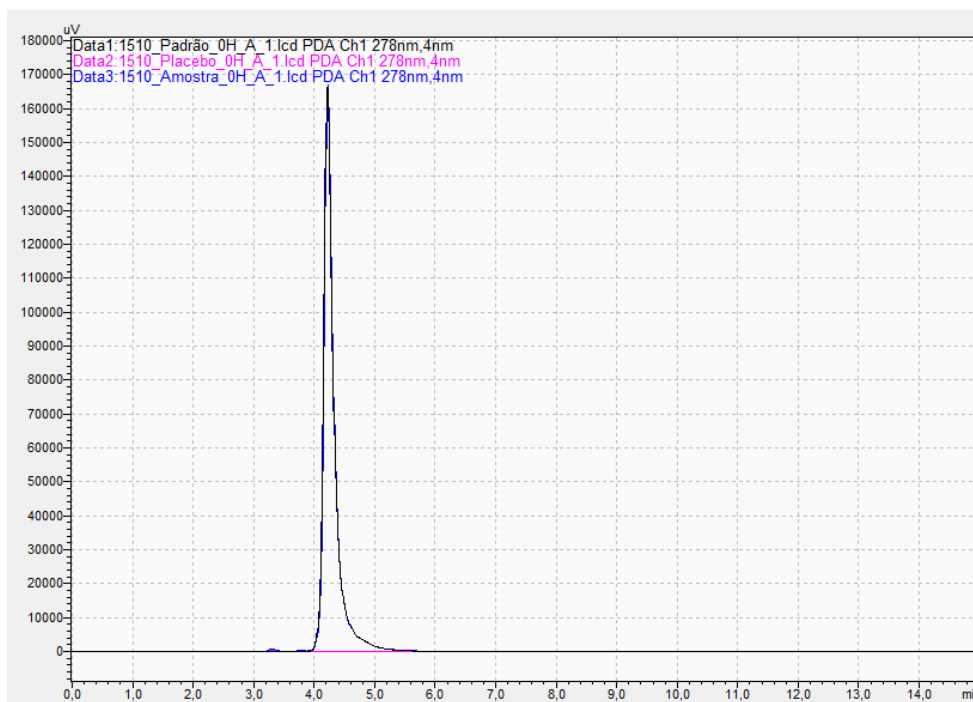


FIGURA 6 - Cromatograma obtido após análise da solução placebo em comparação com as soluções padrão e amostra na mesma concentração (50 µg/mL)

5.2.1.2 Estudos de degradação forçada

5.2.1.3 Estudo de degradação alcalina

Para a degradação alcalina, foram devidamente pesados 10 mg do placebo, 28 mg de IFA (padrão) e 38 mg do produto acabado (amostra) e expostos à 5 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M em balões de 50 mL. Após 5 min, 10 min, 15 min, 30 min e 1 hora de exposição as soluções eram neutralizadas com 5mL de ácido clorídrico 0,1M e cada balão foi avolumado com fase móvel e injetado no CLAE.

Quando comparadas com uma solução amostra não submetida à condição de estresse, os cromatogramas apresentaram o surgimento de produtos de degradações do fármaco ao decorrer dos tempos de análise (5 min = 21,87 %; 10 min = 31,91 %; 15 min = 35,84 %; 30 min = 40,65 %; 1h = 59,88 %). O mesmo ocorre quando os cromatogramas do padrão são comparados, obtendo (5 min = 10,91 %; 10 min = 13,42 %; 15 min = 20,26 %; 30 min = 36,58 %; 1h = 41,29 %).

Cabe destacar que não houve co-eluição entre os picos cromatográficos (Figura 7 e 8), fato este confirmado pela análise da pureza de pico.

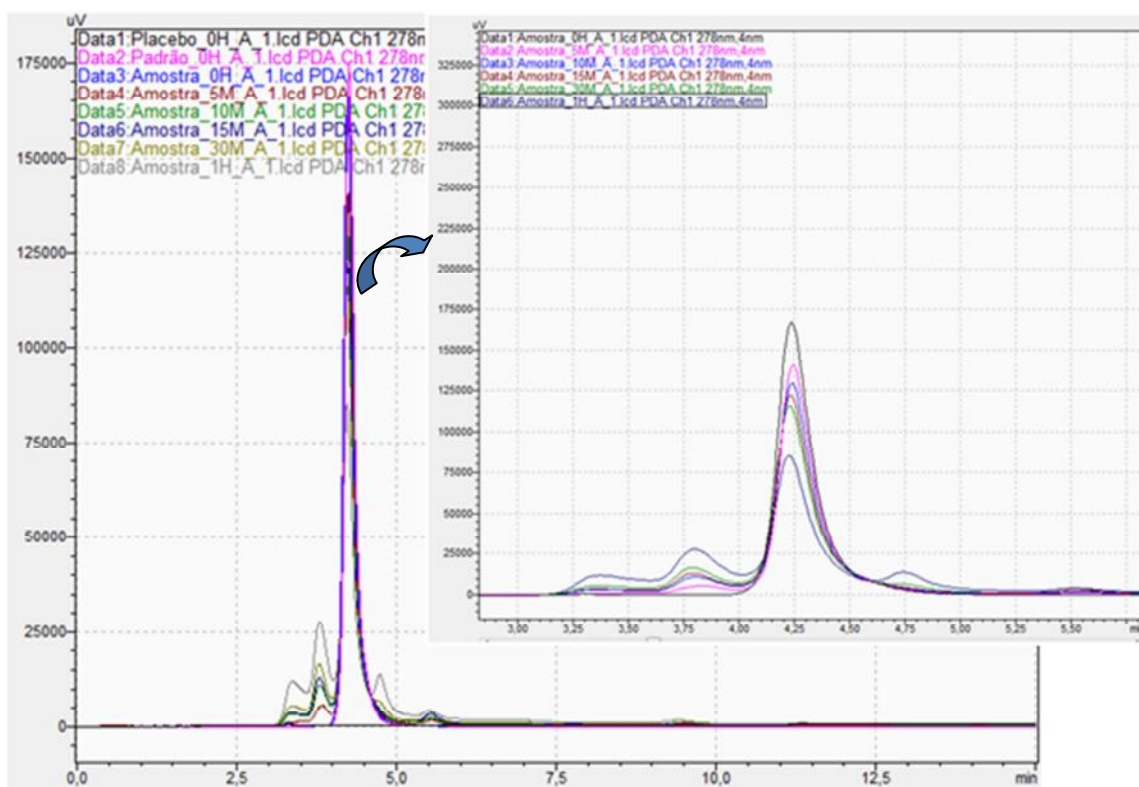


FIGURA 7 - Cromatograma obtido após exposição da solução amostra à condição alcalina (NaOH 0,1M)

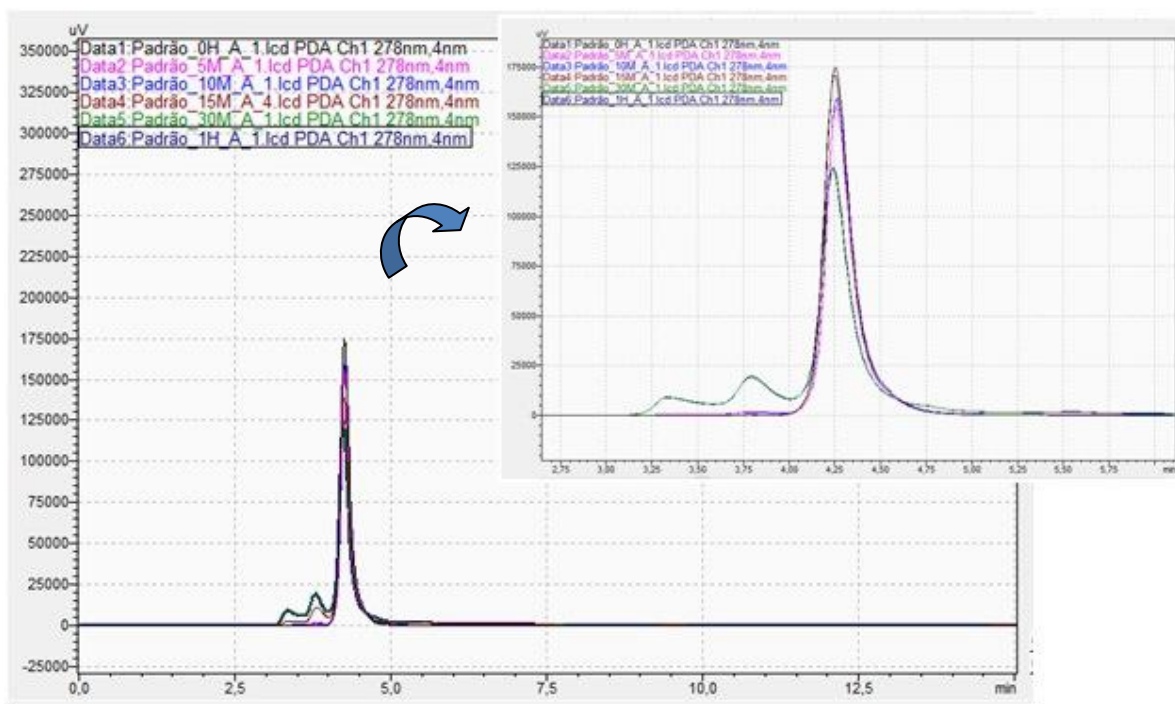


FIGURA 8 - Cromatograma obtido após exposição da solução padrão à condição alcalina (NaOH 0,1M)

5.2.1.4 Estudo de degradação ácida

O mesmo procedimento realizado na degradação alcalina foi reproduzido nesta condição de estudo, porém a solução de exposição utilizada foi ácido clorídrico (HCl) 0,1M, não observando degradação nas amostras no período de 1 hora de exposição. Uma condição mais drástica foi empregada, expondo o placebo, padrão e amostra a uma solução de HCl 1M por um período de 48 h, também não observando-se o surgimento de picos extras, conforme Figura 9. Destaca-se que ocorreu uma queda de 0,03 % no teor do fármaco na amostra analisada.

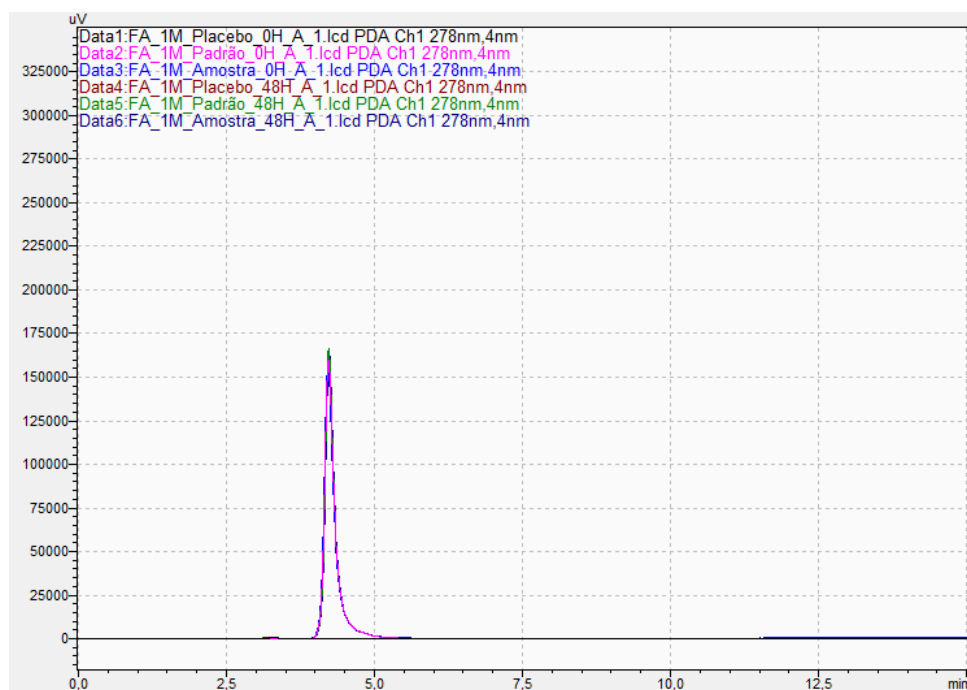


FIGURA 9 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição à condição ácida (HCL 1 M).

5.2.1.5 Estudo de degradação oxidativa

Para a degradação oxidativa foram devidamente pesados 10 mg do placebo, 28 mg de IFA (padrão) e 38 mg do produto acabado (amostra) e expostos à 5 mL de peróxido de hidrogênio 30 % em balões de 50 mL. Após 48 h de exposição os balões foram avolumados com fase móvel, e as amostras filtradas e injetadas. De acordo com os cromatogramas na figura 10 foi observado apenas um pico anterior a metildopa, que quando comparado com um cromatograma apenas de peróxido de hidrogênio, foi constatado ser um pico do mesmo. Após a realização da comparação entre as áreas da amostra exposta ao peróxido e sem exposição, uma degradação de 1,65 % foi observada, enquanto que a solução padrão (IFA) sofreu uma degradação de 15,36 %. Constatando que a IFA sozinha sofre uma degradação razoável enquanto que em mistura com o placebo, que contém antioxidante na sua formulação, ocorreu uma proteção maior contra degradação.

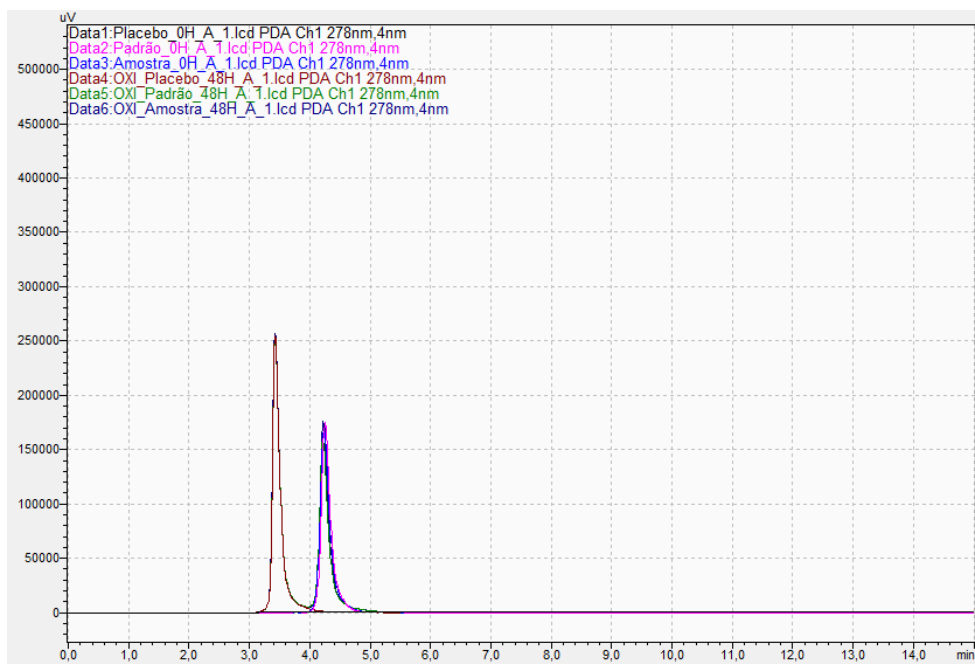


FIGURA 10 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição à condição oxidativa (H_2O_2 30 %).

5.2.1.6 *Estudo de degradação íons metálicos*

Para a degradação com íons metálicos foi escolhido o sulfato de cobre. As amostras foram devidamente pesadas conforme o item 5.2.1.5 à 5 mL de solução de sulfato de cobre 0,05M em balões de 50 mL. Após 48 h de exposição os balões foram avolumados com fase móvel, e as amostras filtradas e injetadas. De acordo com os cromatogramas na Figura 11 foi observado apenas um pico anterior a metildopa, que quando comparado a um cromatograma apenas de sulfato de cobre, foi constatado ser um pico do mesmo. Não ocorrendo degradação no período observado.

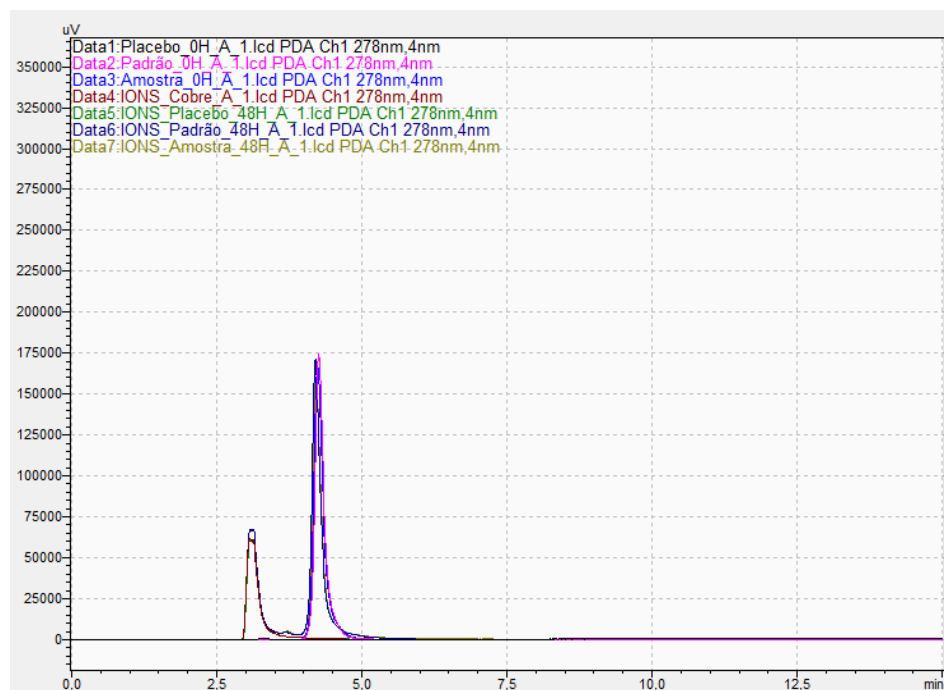


FIGURA 11 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição a íons (CuSO_2 0,05M).

5.2.1.7 Estudo de degradação térmica em câmara climática

Este estudo de degradação foi conduzido expondo os pós triturados de placebo, padrão e amostra a câmara climática nas condições de 75% de umidade e 45°C, por 48 h. Após a exposição, os materiais foram pesados e transferidos para balão de 50 mL onde foram diluídos e avolumados com fase móvel em seguida filtrados e injetados. Conforme Figura 12, não houve o surgimento de novos picos cromatográficos, apenas um pequeno deslocamento no tempo de retenção do fármaco e um decaimento de área da amostra de 7,11 % e de 5,35 % do padrão, após a comparação de áreas.

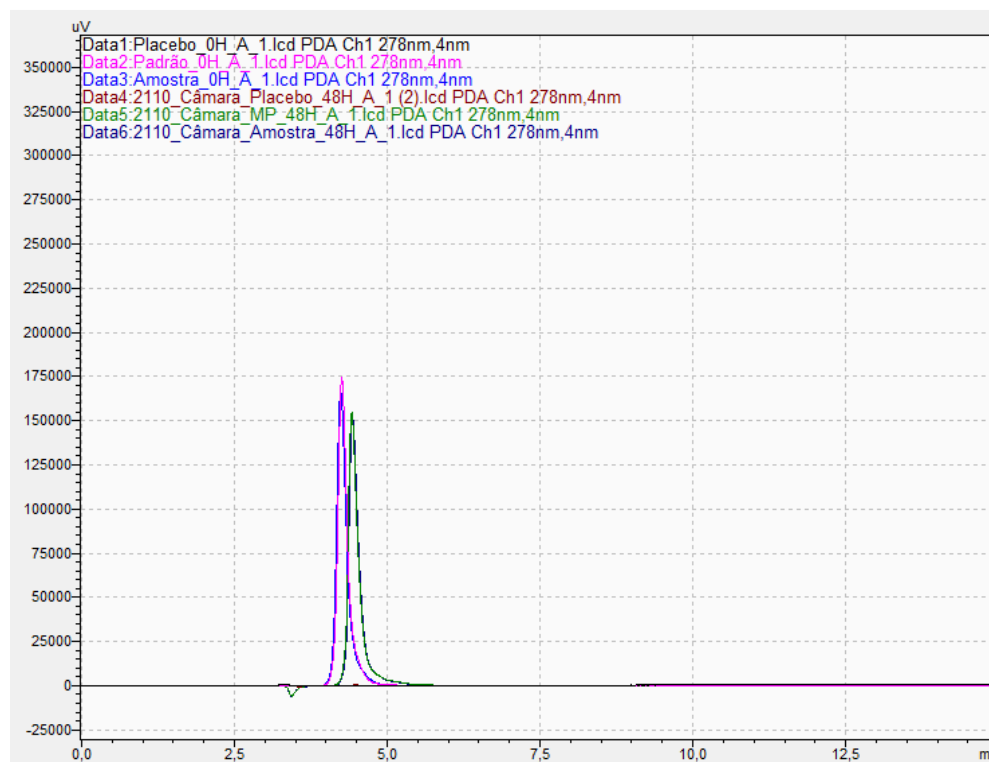


FIGURA 12 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição à câmara climática (75 % / 45 °C)

5.2.1.8 Estudo de degradação térmica em estufa

Este estudo de degradação foi conduzido expondo os pós triturados de placebo, padrão e amostra a estufa a 80°C, por 48 h. Após a exposição, os materiais foram pesados e transferidos para balão de 50 mL onde eram diluídos e avolumados com fase móvel, em seguida filtrados e injetados. Não apresentando o surgimento de novos picos conforme Figura 13, apenas um pequeno deslocamento no tempo de retenção do fármaco e um decaimento de área de 5,21 % da amostra, enquanto que o padrão sofreu uma redução de 4,06 % de área quando comparados com as áreas das amostras sem degradação.

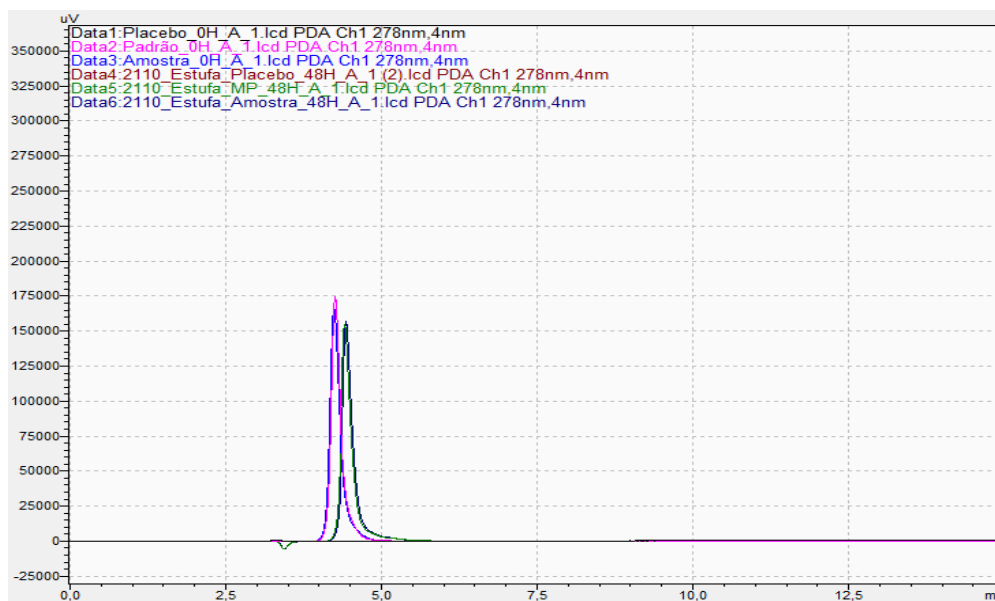


Figura 13 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição à estufa (80 °C)

5.2.1.9 Estudo degradação fotolítica

Para o estudo do comportamento da metildopa em exposição a luz visível, foi utilizada uma câmara fotolítica na qual foram expostos placebo, padrão e amostra. Esta câmara transmite 1.200.000 Lux/h a uma temperatura constante estipulada, neste caso para 25°C, por um período também determinado de 48 h. Após essa exposição, os materiais foram devidamente pesados conforme o item. 5.2.1.4, filtrados e injetados. A comparação dos materiais não expostos com os expostos pode ser visualizados na Figura 14, e de acordo com a comparação entre áreas, o padrão teve uma redução de 4,91 % enquanto que a amostra teve uma redução de área de 6,65 %.

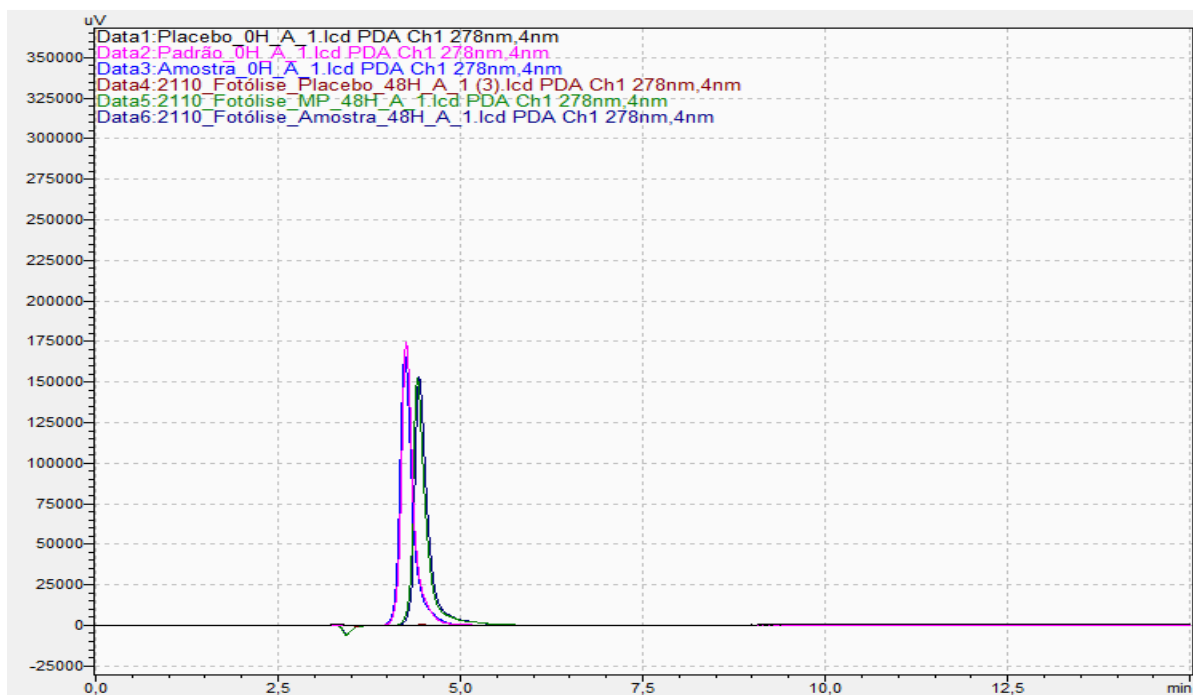


FIGURA 14 - Cromatograma obtido após 48 h de exposição fotolítica (1.200.000 Lux/h 25°C)

A condução dos testes de degradação forçada permitiu conhecer o comportamento da metildopa as diferentes condições de armazenamento. Destaque especial deve ser dada a condição alcalina, a qual apresentou a formação de produtos de degradações detectáveis no UV. Já nas condições térmicas e oxidativa houve um decaimento da concentração do fármaco, entretanto não observando-se a presença de produtos de degradação. Tal fato pode ser devido a ausência de cromóforos dos produtos, inviabilizando a detecção dos mesmos. A Tabela 5, apresentada a seguir, busca sintetizar os resultados obtidos durante os testes de degradação realizados.

TABELA 5 – Resumo dos resultados do teste de degradação.

| Condição | % Degradado | | | |
|---|----------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
| | Amostra (Formulação) | Surgimento de novos picos | Padrão (IFA) | Surgimento de novos picos |
| Hidrólise ácida (HCl 1M) | 0,03 | Não | - | Não |
| Hidrólise alcalina (NaOH 0,1M) | 59,88 | Sim | 41,29 | Sim |
| Oxidação (H ₂ O ₂ 30 %) | 1,65 | Não | 15,36 | Não |
| Câmara Climática (75 %/45 °C) | 7,11 | Não | 5,35 | Não |
| Íons metálicos (CuSO ₄ 0,05 M) | - | Não | - | Não |
| Estufa (80 °C) | 5,21 | Não | 4,06 | Não |
| Foto (1.200.000 Lux/h 25 °C) | 6,65 | Não | 4,91 | Não |

Outro dado que também deve ser levado em consideração é tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico, através de um detector de arranjo de fotodiodos é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003). Destaca-se, portanto, que a pureza de pico foi devidamente acompanhada e preservada ao longo dos testes realizados, confirmando a especificidade da metodologia.

5.2.2 Linearidade

A linearidade é a habilidade que um método analítico tem em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, entre uma dada faixa de concentração. A linearidade foi analisada por meio da construção de uma curva analítica a partir de 5 concentrações diferentes (para teor) e 6 concentrações diferentes (para análise dos produtos de degradação), diluindo-se as soluções juntamente com a solução placebo.

O preparo das soluções para avaliação da linearidade do método preconizando a análise de teor foi baseada na concentração da solução estoque de 0,5 mg/mL. A partir desta, as soluções para a curva de respostas foram preparadas utilizando uma faixa de trabalho de 0,04 mg/mL (80%) a 0,06 mg/mL (120%) e, diluindo a solução estoque de metildopa e placebo com fase móvel, como indicado na tabela 6 a seguir:

TABELA 6- Modo de preparo das soluções para a curva resposta de teor.

| Volume da Solução Estoque de Metildopa (mL) | Volume da Solução Estoque de Placebo (mL) | Volume final (mL) | Concentração de metildopa (mg/mL) | %* |
|--|--|--------------------------|--|------------|
| 2 | 2 | 25 | 0,040 | 80 |
| 2,25 | 2,25 | 25 | 0,045 | 90 |
| 2,5 | 2,5 | 25 | 0,050 | 100 |
| 2,75 | 2,75 | 25 | 0,055 | 110 |
| 3,0 | 3,0 | 25 | 0,060 | 120 |

*Porcentagem em relação à concentração de metildopa na solução estoque.

O preparo das soluções para avaliação da linearidade do método preconizando a análise dos produtos de degradação foi construída da mesma maneira, entretando em uma faixa mais sensível. Assim, as soluções para a curva de respostas foram preparadas utilizando a faixa de trabalho de 0,00025 mg/mL (0,05 %) a 0,0005 mg/mL (1,0 %), diluindo a solução a 100 % preparada para a curva de teor, com fase móvel, como indicado na Tabela 7 a seguir:

TABELA 7 - Modo de preparo das soluções para a curva resposta de Produtos de degradação.

| Volume da Solução Estoque de 0,050 mg/mL (100%) (mL) | Volume final (mL) | Concentração de metildopa (mg/mL) | %* |
|---|--------------------------|--|-----------|
| 0,5 | 100 | 0,00025 | 0,05 |
| 1 | 100 | 0,0005 | 0,1 |
| 1 | 25 | 0,002 | 0,4 |
| 1,25 | 25 | 0,0025 | 0,5 |
| 2 | 25 | 0,004 | 0,8 |
| 2,5 | 25 | 0,005 | 1 |

*Porcentagem em relação à concentração de metildopa na solução estoque (0,050 mg/mL) a 100 %.

Dispondo dos resultados da análise, construiu-se 2 curvas de calibração (Figuras 15 e 16) obtendo-se um coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9998 para determinação do teor e de r^2 igual a 0,9994 para análise de produtos de degradação. Deste modo, o método proposto apresenta-se adequado, pois seus coeficientes de determinação, r^2 , estão acima do que é preconizado para a aceitação, ou seja, maiores que 0,99 (BRASIL, 2003).

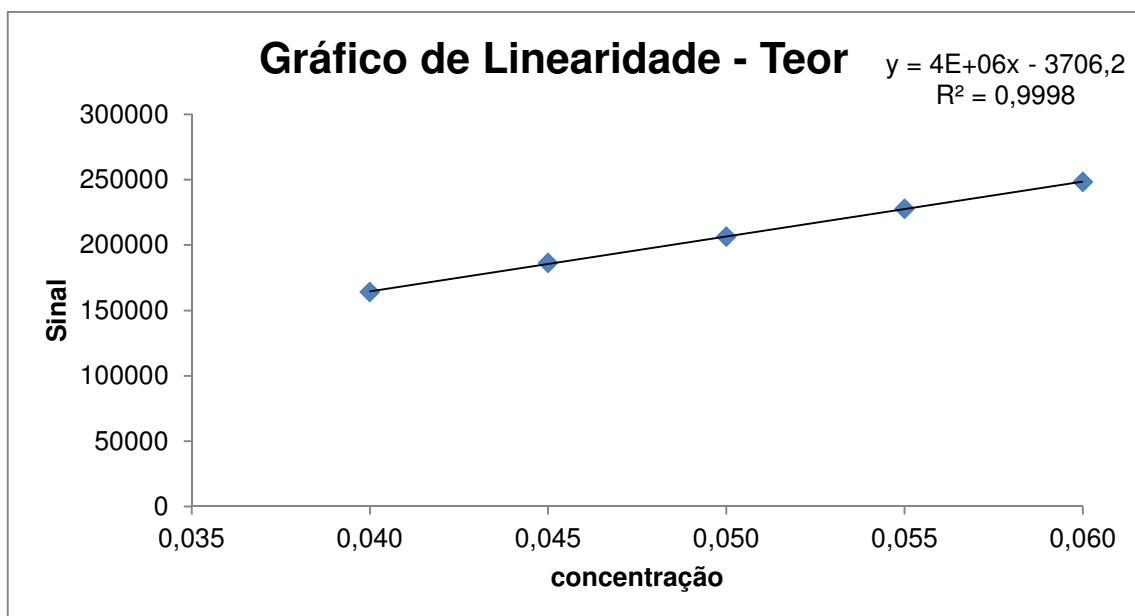


FIGURA 15 - Gráfico da Linearidade para avaliação de teor do fármaco na faixa de 0,04 a 0,06 mg/mL

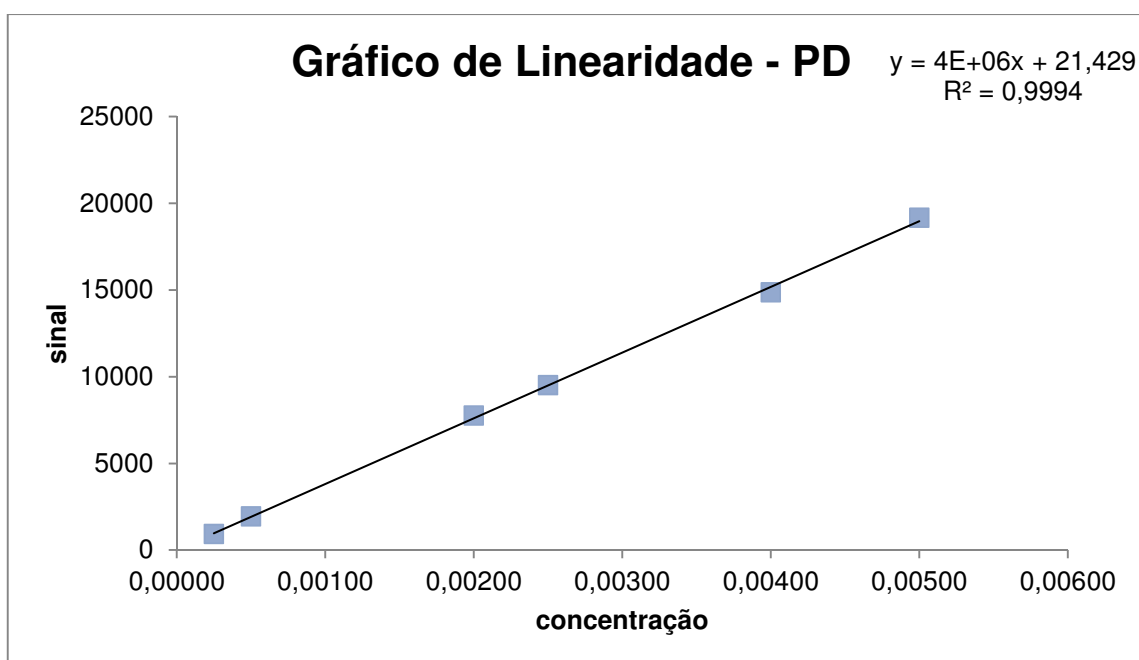


FIGURA 16 - Gráfico da Linearidade para avaliação dos produtos de degradação do fármaco na faixa de 0,00025 a 0,005 mg/mL.

5.2.3 Limite de detecção e de quantificação

Conceitualmente o limite de detecção (LD) é o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método, mas não necessariamente

quantificado e que o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade.

Utilizando a solução preparada para avaliação da linearidade para análise de produtos de degradação e considerando como nível de relato das substâncias relacionadas o valor de 0,05 %, foi avaliada a relação sinal/ruído do pico referente à metildopa em uma solução para análise de teor na concentração de trabalho (0,05 mg/mL).

Quando se trata dos dados relacionados a faixa de concentração de avaliação dos produtos de degradação (0,00025 mg/mL), o limite de detecção obtido foi de 0,000005 mg/mL e o limite de quantificação de 0,000017 mg/mL.

5.2.4 Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade, onde as amostras foram avaliadas no mesmo dia (precisão intradia) e a precisão intermediária, onde as amostras são analisadas em dias diferentes (precisão interdia), podendo ser conduzida por diferentes analistas e usualmente sendo expressas pelo desvio-padrão relativo (DPR%) (BRASIL, 2003).

As soluções foram preparadas conforme a avaliação da linearidade, nas duas faixas de análise, ou seja, soluções a 0,04 mg/mL (80 %), 0,05 mg/mL (100 %) e 0,06 mg/mL (120 %) para análise de teor e soluções a 0,00025 mg/mL (0,05 %), 0,0005 mg/mL (0,1 %) e 0,005 mg/mL (1,0 %) para análise dos produtos de degradação. As soluções foram injetadas em triplicata, obtendo-se os desvio padrões relativos (DPR) entre as respostas de cada concentração, conforme demonstrado na Tabela 8.

TABELA 8 - Dados referente ao DPR entre as amostras de Teor.

| Concentração % | DPR % (média, n=3) | | | |
|----------------|--------------------|-------|-------------|-------|
| | Analista A | | Analista B | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 1 | Dia 2 |
| 80 | 0,9 | 0,6 | 0,7 | 0,2 |
| 100 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,7 |
| 120 | 0,3 | 0,9 | 0,9 | 0,8 |
| DPR% | 1,0 | | 1,1 | |
| F calc | 1,60 | | 1,37 | |

* Calculado através das correções de cada dia.

** F tab = 3,44

Para as concentrações de 80% a 120% (faixa do teor) o valor do DPR deve ser igual ou menor que 2%, e em relação ao máximo da especificação de produtos de degradação no produto devem ser igual ou menor que 5%. Dessa forma, o método proposto se manteve preciso para ambos os casos, visto que todos os DPRs ficaram inferiores a 2%. Além disso, a precisão intermediária foi analisada utilizando a análise de variância (ANOVA), calculado-se o valor de F para comparação das variâncias dos resultados obtidos entre dias e por analistas diferentes [1,57 (F calc) < 3,44 (F tab)]. Se $F_{calc} < F_{tab}$, as variâncias são homogêneas, logo não há variação devido à mudança de analistas.

Em relação a precisão voltada para a análise dos produtos de degradação, as análises foram realizadas utilizando os mesmos critérios descritos para o teor, utilizando uma faixa mais sensível, porém obtendo-se resultados dentro do preconizado.

5.2.5 Exatidão

A exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão pode ser expressa como a percentagem de recuperação do analito (BRASIL, 2003).

Para análise da exatidão foram utilizadas as amostras nas mesmas concentrações da precisão, destacando-se que foram analisadas e comparadas amostras contaminadas com o placebo e sem adição do placebo. Uma vez

preparadas, as soluções foram injetadas em triplicata e a recuperação de metildopa ficou entre os limites estabelecidos de 98 % a 102 % para a faixa de trabalho da análise de teor e 90 % a 107 % para a faixa de trabalho da análise dos produtos de degradação.

Também se calculou o DPR entre as respostas de cada concentração. Para as concentrações de 80 % a 120 % (faixa do teor) o valor do DPR foi menor que 2 % e o DPR em relação ao máximo da especificação de produtos de degradação no produto (faixa de degradação) foi menor que 5 %. Os resultados da análise da exatidão podem ser visualizados nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 9 - Avaliação da exatidão do método para análise do teor.

| Concentração % | Concentração teórica (mg/mL) | Concentração real (mg/mL) | % de recuperação (média, n=9) | DPR (%) |
|----------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------|
| 80 | 0,04 | 0,0398 | 98,3 | 0,8 |
| 100 | 0,05 | 0,0500 | 99,0 | 0,4 |
| 120 | 0,06 | 0,0603 | 99,4 | 0,2 |

TABELA 102 - Avaliação da exatidão do método para análise dos produtos de degradação.

| Concentração % | Concentração teórica (mg/mL) | Concentração real (mg/mL) | % de recuperação (média, n=9) | DPR (%) |
|----------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------|
| 0,05 | 0,00025 | 0,00024 | 98,6 | 3,9 |
| 0,1 | 0,0005 | 0,00044 | 99,1 | 4,5 |
| 1 | 0,005 | 0,0051 | 101,7 | 2,9 |

5.2.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. O teste indica a confiabilidade do método durante o uso normal (BRASIL, 2003). Os parâmetros que foram avaliados seguem os requisitos estabelecidos na Resolução em vigor e estão dispostos na Tabela 11 a seguir:

TABELA 11 - Fatores avaliados na análise de robustez do método.

| Fatores avaliados na robustez | | |
|--------------------------------------|--|--|
| Composição da fase móvel | 630 mL Tampão Fosfato pH 2,0 + 370 mL de Metanol (B) | 770 mL Tampão Fosfato pH 2,0 + 230 mL de Metanol (C) |
| Temperatura | 23 °C | 27 °C |
| Fluxo | 0,7 mL/min | 0,9 mL/min |

As análises foram conduzidas nas concentrações normais para análise de teor quanto na concentração para análise de produtos de degradação (0,05 mg/mL e 0,0005 mg/mL), comparando-se os resultados após modificações com as condições normais da metodologia.

De acordo com a Tabela 12, pode-se observar que o método só não se manteve robusto quando ocorreu a modificação em seu fluxo, sendo um fator crítico que deve ser sinalizado, não podendo sofrer alterações mínimas. Porém, nas outras situações o método se manteve robusto, apresentando variação nas áreas de metildopa menores que 5,0% em relação à condição controle.

TABELA 12 - Resultado das condições cromatográficas analisadas durante teste de robustez

| Parâmetros Variáveis | Faixa Analisada | Áreas de metildopa | DPR (%) em relação ao padrão | Condição |
|-----------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| Fase Móvel | Fase Móvel B | 7343,148 | 0,6 | Atende |
| | Fase Móvel C | 7156,320 | 0,8 | Atende |
| Temperatura | 23°C | 7249,250 | 0,3 | Atende |
| | 27°C | 7205,455 | 0,5 | Atende |
| Fluxo | 0,7 ml/min | 8265,328 | 7,0 | Não Atende |
| | 0,9 ml/min | 6493,414 | 6,2 | Não Atende |

A partir da análise dos resultados obtidos, o método proposto cumpriu com os parâmetros de validação, mostrando-se adequado para análise de metildopa em comprimidos. Desca-se que as soluções estoques foram analisadas quanto ao seu armazenamento em geladeira e bancada, mostrando-se estáveis durante 08 dias, permitindo assim a análise de diversos materiais nesse tempo, garantindo a qualidade mesmo utilizando tais soluções por mais de um dia, reduzindo os custos com padrão utilizado e agilizando o processo de análise em grande escala.

6 CONCLUSÕES

A preocupação em produzir medicamentos com qualidade, segurança e eficácia comprovadas deve ser uma tônica de todas as empresas farmacêuticas. Neste sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas para o controle de qualidade dos medicamentos, bem como para avaliação de produtos de degradação.

Dentre os diversos medicamentos produzidos pelo LFM, o presente estudo teve como foco a metildopa em comprimidos, por apresentar características relevantes, como a necessidade da realização do estudo de estabilidade e a inexistência de um método de análise de teor específico e que também possa ser utilizado para analisar seus produtos de degradação através de CLAE. Outro fator que despertou o interesse é por ainda não ter nenhum método utilizando CLAE descrito na farmacopéia brasileira.

O método quantitativo desenvolvido por CLAE cumpriu com os parâmetros de validação preconizados para métodos analíticos e apresenta-se como uma alternativa simples e econômica para a análise de metildopa em comprimidos. Além disso, os resultados aqui apresentados comprovam a aplicabilidade da metodologia na avaliação de produtos de degradação do fármaco, permitindo acompanhar a sua estabilidade. Dessa forma, o presente estudo estabelece procedimentos importantes para aprimorar o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos, garantindo sua segurança e eficácia terapêutica.

7 REFERÊNCIAS

AMIN, D. **Titrimetric determination of catecholamines and related compounds via bromine oxidation and substitution.** *Analyst*, v. 111, n. 2, p. 255-257, 1986.

BARRA, S *et al.* **Hipertensão arterial na grávida: o atual estado da arte.** *Revista Portuguesa de Cardiologia*, v. 31, n. 6, p. 425-432, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade.** 2005. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>> Acesso: 25/05/15

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008 - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, que trata do Guia para realização dos estudos de estabilidade.** 2008. Disponível em: <<http://www.sindusfarma.org.br/informativos/BBPAF03808.doc>> Acesso: 25/05/15

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 58, de 20 de dezembro de 2013.** Resolução para regulamentação da notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. 2013. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>> Acesso: 09/06/15

BRASIL. Ministério da Saúde, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.** Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da União, Brasília-DF, 02/06/2003. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=56&data=02/06/2003>>. Acesso em:15/09/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS)**, 2010. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>> Acesso em: 15/11/2015

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos.** Revisão 3, 2010. Disponível em: <www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/.../DOQ-CGCRE-8_03.pdf> Acesso em: 10/07/2014.

BUENO, N; PEREIRA, A. **Determinação espectrofotométrica de metildopa em ensaio de dissolução de comprimidos utilizando extrato de rabanete como fonte de peroxidase.** *Revista Química Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-5, 2015

CASS, B.; DEGANI, A. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação.** EdUFSCar, São Carlos, 2001.

CHUI, SH *et al.* **Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama.** *Química Nova*, v. 24, n. 3, p. 374-380, 2001.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia.** Ed. Unicamp, Campinas, São Paulo, 290p, 2006.

CUSTODIO, R *et al.* **O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais.** *Revista Química Nova*, v. 20, p. 219-225, 1997.

DRUGBANK, **Open data drug & drug target database - Drugbank Methyldopa (DB00968)**, v. 19. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00968>>, Acesso em: 20/07/2015.

Farmacopeia Brasileira, 5a. ed., ANVISA: Brasília, Brasil, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm> Acesso em: 12/07/2015

FROHLICH, ED. **Methyldopa mechanisms and treatment 25 years later.** *Arch Intern Med* pág. 140 – 954, 1980.

GIFFORD RW. **Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy.** *Am J Obstet Gynecol*, v.183, p.1 – 22, 2000.

GRANGEIRO JÚNIOR, S. *et al.* **Validação da metodologia analítica de comprimido à base de nevirapina.** *Controle de Contaminação, São Paulo*, n. 65, p. 24-28, set. 2004.

GUNENÇ, O *et al.* **The effect of methyldopa treatment on uterine, umbilical and fetal middle cerebral artery blood flows in preeclamptic patients.** *Arc Gynecol Obstet*, v.266, p.141-144, 2002.

HARRIS, D.C. **Espectrometria de massas.** *Análise Química Quantitativa 5ª edição*, p. 507, 2005.

HYNECK, M; DENT, N.; HOOK, J. **Chirality: pharmacological action and drug development.** Londres, Academic Press, 1990.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2B. *ICH (CPMP/ICH/281/95)*, 1995.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, 2005.

KAPOOR, N *et al.* **Simultaneous determination of lamivudine, stavudine and nevirapine in antiretroviral fixed dose combinations by high performance liquid chromatography.** *Analytica Chimica Acta*, v. 570, n. 1, p. 41-45, 2006.

METWALLY, Mohammed El-Sayed. **Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay for α -methyldopa in sustained-release capsules.** *Journal of Chromatography A*, v. 549, p. 221-228, 1991.

MOLAAKBARI, E; *et al.* **First report for voltammetric determination of methyldopa in the presence of folic acid and glycine.** *Materials Science and Engineering: C*, v. 36, p. 168-172, 2014.

NETO, B. Barros; *et al.* **Como fazer experimentos.** *Ed. Unicamp*, Campinas, São Paulo, 2001.

REDMAN, CWG; OUNSTED, MK. **Safety for the child of drug for hypertension in pregnancy.** *Lancet* 1982, v.8283 p1237, 1982.

REY E. **Effects of methyldopa on umbilical and placental artery blood flow velocity waveforms.** *Obstet Gynecologic* V.80, p.783-787,1992.

REZAEI, B; ASKARPOUR, N; ENSAFI, A. **Adsorptive stripping voltammetry determination of methyldopa on the surface of a carboxylated multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode in biological and pharmaceutical samples.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 109, p. 253-258, 2013.

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

RIBEIRO, R.; *et al.* **Simultaneous determination of levodopa, carbidopa, entacapone, tolcapone, 3-O-methyldopa and dopamine in human plasma by an HPLC-MS/MS method.** *Bioanalysis*, v. 7, n. 2, p. 207-220, 2015.

SALEM, F. **Spectrophotometric and fluorimetric determination of catecholamines.** *Analytical letters*, v. 26, n. 2, p. 281-294, 1993.

SHABIR, G. A. **Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization.** *Journal of chromatography A*, v. 987, n. 1, p. 57-66, 2003.

SWARTZ, M. E.; *et al.* **Validation of chromatographic methods.** *Pharmaceutical technology*, v. 22, n. 3, p. 104-120, 1998.

SOARES SOBRINHO, J. L. *et al.* **Validação de metodologias analíticas no mercado farmacêutico: Caso paracetamol.** *Controle de Contaminação, São Paulo*, n. 73, p. 35-41, maio. 2005.

TAVARES, A; PLAVNIK, F. **Inibidores do sistema simpático.** *Rev. bras. hipertens*, v. 5, n. 2, p. 91-6, 1998.

THEME-FILHA MM, RI; NORONHA CP. **Mortalidade materna no Município do Rio de Janeiro, 1993 a 1996.** *Cad Saúde Pública*; 15:397-403, 1999.

THOMPSON, M; *et al.* **Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement.** *Pure and applied chemistry*, v. 71, n. 2, p. 337-348, 1999.

TING, S. **Liquid chromatographic determination of methyldopa and methyldopa-thiazide combinations in dosage forms.** *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, v. 66, n. 6, p. 1436-1442, 1983.

TONHI, E; *et al.* **High performance liquid chromatography stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica. I. Physical and chemical characterization.** *Journal of Chromatography A*, 948, 97-107, 2002.

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