Universidade Federal de Santa Catarina
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção

ATRIBUTOS DA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DO CAPTOPRIL NUM PROGRAMA DE GARANTIA DE QUALIDADE

Dissertação de Mestrado

Sóstenes Rosa Valentini

Florianópolis
2002

Universidade Federal de Santa Catarina
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção

ATRIBUTOS DA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DO CAPTOPRIL NUM PROGRAMA DE GARANTIA DE QUALIDADE

Sóstenes Rosa Valentini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia da Produção da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Produção.

Florianópolis
2002

Sóstenes Rosa Valentini

ATRIBUTOS DAVALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DO CAPTOPRIL NUM PROGRAMA DE GARANTIA DE QUALIDADE

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Produção no Programa de Pós-Gradução em Engenharia de Produção** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 15 de Fevereiro de 2002.

_____

Prof. Ricardo Miranda Barcia, Ph.D.
Coordenador do Curso

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Willy Arno Sommer, Dr.
Orientador

_____

Profa. Graciette Matioli, Dra.

_____

Prof. Álvaro Guillermo Rojas Lezana, Dr.

À minha família, Genésio, Maria Aparecida, Salete, Lucila, Gener, João e Daniela que sempre me deram amor, carinho, apoio, incentivo, admiração e respeito.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade que me foi concedida.

Ao meu orientador, Professor Dr. Willy Arno Sommer, pela dedicação e presteza, que foram fundamentais para o início e término da dissertação.

À minha amiga e co-orientadora, Prof[a] Dr[a] Graciette Matioli, pelo incansável carinho, apoio, incentivo e credibilidade em todos os momentos.

Aos amigos do LEPEMC e da Farmácia Industrial que colaboraram, profissional e pessoalmente através de sua compreensão e amizade para o desenvolvimento desta dissertação.

À todos os meus amigos que souberam me compreender, com sua paciência e carinho.

E, principalmente, a Deus que me possibilitou ter e estar entre a minha família e os meus amigos.

“A vida não é um corredor reto e tranquilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída. Porém, se tivermos ***fé****, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.”*
A.J. Cronin

Sumário

Lista de Figuras ..... **ix**
Lista de Tabelas ..... **x**
Lista de Reduções ..... **xi**
Resumo ..... **xii**
Abstract ..... **xiii**
1 INTRODUÇÃO **14**
1.1 Justificativa **15**
1.2 Objetivos **16**
1.2.1 Objetivo Geral 16
1.2.2 Objetivos Específicos 16
1.3 Limitações do Trabalho **17**
1.4 Estrutura do Texto **17**
2 REFERENCIAL TEÓRICO **19**
2.1 Considerações sobre Qualidade **19**
2.2 Garantia da Qualidade e os Produtos Farmacêuticos **21**
2.3 Fundamentos da Validação da Metodologia Analítica **22**
2.4 Elementos Requeridos para a Validação do Doseamento **27**
2.5 Generalidades sobre o Captopril **29**
2.6 Métodos Empregados no Doseamento do Captopril **34**
2.6.1 Método Titulométrico 34
2.6.2 Método Espectrofotométrico 36
2.6.3 Método Cromatográfico 37
2.7 Estatística **38**
3 METODOLOGIA DO DOSEAMENTO **40**
3.1 Proposição do Trabalho **40**
3.2 Parte Experimental **40**
3.2.1 Padrões 41
3.2.2 Amostras 41
3.2.3 Reagentes e Equipamentos 42
3.3 Doseamento por Método Analítico **43**
3.3.1 Método Analítico Titulométrico 43
3.3.2 Método Espectrofotométrico 44
3.3.3 Método Cromatográfico 45

3.4 Validação de Métodos Analíticos.....46
3.4.1 Testes dos Atributos dos Programas de Validação.....46
4 RESULTADOS 51
4.1 Método Titulométrico 51
4.2 Método Espectrofotométrico.....55
4.3 Método Cromatográfico 58
4.4 Análise Comparativa entre os Métodos 62
4.4.1 Exatidão 62
4.4.2 Precisão 63
4.4.3 Linearidade 63
4.5 Discussão 65
4.6 Diagnóstico.....66
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES 70
6 FONTES BIBLIOGRÁFICAS.....73
6.1 Referências Bibliográficas 73

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química do fármaco Captopril.....**Erro! Indicador não definido.**
Figura 2: Substrato do Captoril.....33
Figura 3: Desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico..... 47
Figura 4: Desenho esquemático da precisão em relação a média, erro padrão e desvio-padrão das concentrações segundo o operador e o dia para o método titulométrico..... 53
Figura 5: Reta de regressão linear entre a concentração obtida e a concentração teórica do método tittulométrico..... 54
Figura 6: Desenho esquemático da precisão em relação a média, erro padrão (EP) e desvio-padrão (DP) das concentrações segundo o operador e o dia para o método espectrofotométrico..... 57
Figura 7: Reta de regressão linear entre a concentração obtida e a concentração teórica para método espectrofotométrico..... 57
Figura 8: Desenho esquemático da precisão em relação a média, erro padrão (EP) e desvio-padrão (DP) das concentrações segundo o operador e o dia para o método cromatográfico..... 60
Figura 9: Reta de regressão linear entre a concentração obtida e a concentração teórica para método cromatográfico..... 62
Figura 10: Comparação dos métodos titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico para o atributo exatidão..... 63
Figura 11: Comparação do atributo precisão entre os métodos titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico..... 64
Figura 12: Comparativo entre os métodos titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico referente ao atributo linearidade..... 64

Lista de Tabelas

Tabela 1: Elementos de Dados Requeridos para Validação de Doseamentos 28
Tabela 2: Relação dos laboratórios farmacêuticos que produzem medicamentos contendo Captopril e suas respectivas apresentações e concentrações 34
Tabela 3 :Constituintes da Formulação do Captopril do LEPEMC..... 42
Tabela 4: Valores de exatidão obtidos com a titulação por óxido-redução..... 51
Tabela 5: Resultados da precisão obtidos através do desvio-padrão e coeficiente de variação 52
Tabela 6: Resultados da especificidade obtidos através do análise titulométrica.....53
Tabela 7: Valores de exatidão obtidos com a análise espectrofotométrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteau..... 55
Tabela 8: Resultados da precisão obtidos através do desvio-padrão e coeficiente de variação 56
Tabela 9: Resultados obtidos para as análises do placebo e das amostras, em relação a especificidade 57
Tabela 10: Valores da exatidão obtidos com a análise cromatográfica 59
Tabela 11 : Resultados da precisão obtidos através do desvio-padrão e coeficiente de variação 59
Tabela 12: Resultados obtidos para as análises do placebo e das amostras, em relação a especificidade 61

Lista de Reduções

ABNT/NBR = Associação Brasileira de Normas Técnicas/Norma Brasileira Regulamentadora

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CQT = Controle de Qualidade Total

CV = Coeficiente de Variação

DP = Desvio Padrão

EP = Erro Padrão

FDA = Food Drug Administration

LEPEMC = Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Medicamentos e Cosméticos

r = coeficiente de determinação

SV = Solução Volumétrica

UEM = Universidade Estadual de Maringá

USP = United States Pharmacopeia

Resumo

VALENTINI, Sóstenes Rosa. **Atributos da validação da metodologia analítica do Captopril num programa de garantia de qualidade.** Florianópolis, 2002. 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, UFSC, 2002.

Atualmente quando todos os caminhos levam à busca da qualidade total, torna-se indispensável conhecer perfeitamente cada fase de um processo produtivo. Neste caso, a validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de instalação de um processo produtivo, de equipamento novo e, inclusive, da metodologia analítica, seja do setor farmacêutico, alimentício, informática microeletrônico ou qualquer outra área onde a qualidade do produto fabricado é uma das principais razões da existência da empresa. O presente trabalho teve por objetivo analisar os principais aspectos da validação de métodos analíticos, buscando demonstrar que os resultados das análises executadas permitem uma avaliação dos parâmetros específicos da qualidade do produto, assegurando tanto a implantação do método como a confiabilidade dos resultados analíticos. A metodologia utilizada foi a revisão bibliográfica, pesquisas na Internet e desenvolvimento de uma parte experimental. A escolha de uma metodologia é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica. Porém, ao se validar um método analítico, não significa que este possa ser aplicado sem restrições para diferentes medicamentos com o mesmo princípio ativo, uma vez que os resultados das análises são influenciados por inúmeros fatores como a estrutura química do fármaco, o nível das doses terapêuticas e as diferenças nas fórmulas de um laboratório para outro. Para cada caso há necessidade de resultados experimentais evidentes que garantam a funcionalidade do método, bem como, do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação. Para cada metodologia foram estudadas a exatidão, a precisão, a linearidade, a sensibilidade e a robustez com as devidas considerações estatísticas. Considerando os atributos da validação estudados neste trabalho, o método cromatográfico demonstrou ser o mais adequado para as análises de comprimidos de Captopril enquanto que os métodos espectrofotométrico por Folin-Ciocalteau e titulométrico por oxido-redução também demonstraram valores que satisfazem os critérios de aceitação, porém com maior variabilidade e menor sensibilidade.

PALAVRAS CHAVES: validação, garantia de qualidade e metodologia analítica.

Abstract

VALENTINI, Sóstenes Rosa. **Validation attributes of the analytic methodology of the Captopril in the quality assurance program.** Florianópolis, 2002. 75f. Dissertation (Master Degree Course in Production Engineering). Program of Post-Graduation in Production Engineering, UFSC, 2002.

Actually when all the ways take to the search of the total quality, it becomes indispensable to know each phase of a productive process perfectly. In this case, the validation is the tool appropriated to guarantee the installation reliability of a productive process, of new equipment and, besides, of the analytic methodology, in various sectors where the quality of the manufactured product is one of the main reasons of the company existence. The present work had as objective to analyze the main aspects of the analytic methods validation, looking for to demonstrate that the results of the executed analyses allow an evaluation of the specific parameters of product quality, assuring the implantation of the method so much as the reliability of the analytic results. The used methodology was the bibliographical revision, researches in the Internet and development of an experimental part. The choice of a methodology is of fundamental importance for the procedure of the quality control of an active substance of pharmaceutical form. Even so, when validating an analytic method, it doesn't mean that this can be applied without restrictions for different medicaments with the same active principle, once the results of the analyses are influenced by countless factors as the pharmaco chemical structure, the therapeutic doses level and the differences in the formulas from a laboratory to another. For each case there is need of evident experimental results that they guarantee the functionality of the method, as well as of the appropriate analytic treatment, of the statistical evaluation of the results and of the acceptance approaches definition. For each methodology they were studied the accuracy, the precision, the linearity**,** the sensibility and the robustness with the due statistical considerations. Considering the attributes of the validation studied in this work, the chromatographic method demonstrated to be more appropriated for the analyses of Captopril tablets while the spectrophotometric methods Folin-Ciocalteau and titulometric for oxide-reduction also demonstrated values that satisfy the acceptance approaches, even so with larger variability and smaller sensibility.

Key words: validation, quality assurance and analytic methodology.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, quando todos os caminhos levam à busca da qualidade total, torna-se indispensável conhecer perfeitamente cada fase de um processo produtivo. Neste caso, a validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de instalação de um processo produtivo, de equipamento novos e, inclusive, de metodologia analítica, seja do setor farmacêutico, alimentício, informática, microeletrônico ou qualquer outra área onde a qualidade do produto fabricado seja uma das principais razões da existência da empresa (Athaide, 2000).

Quando se trata de medicamento, por exemplo, qualquer falha mínima no processo pode acarretar sérios prejuízos à saúde dos consumidores e ao nome da indústria no mercado. Nos últimos anos, muito se tem falado sobre validação, certificação e qualificação de instalação, equipamento, processo e metodologia analítica, porém a falta de uma padronização de linguagem do setor cria uma barreira para o entendimento total dos termos (Athaide, 2000).

Assim, validar um processo, equipamento, sistema ou metodologia é tornar legítimo, através do estabelecimento de documentações, tudo que envolve o processo de produção e controle de qualidade, desde as condições do ambiente, até os insumos e matérias-primas que entram em sua composição. Em outras palavras, validar significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância rigorosamente pré-estabelecidos (Athaide, 2000; Moretto, 2000; Emanuelli, 2000).

Segundo Moretto (2000, p.44) o termo validação foi introduzido nas áreas produtivas afim de “entender o processo de fabricação, assegurando que estes sejam realizados dentro dos limites de parâmetros estabelecidos, com o propósito claro de obter produtos que apresentam uma qualidade consistente”.

1.1 Justificativa

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica, como tratada neste trabalho. Espires (1998, p. 1) relata que a aplicabilidade dos métodos oficiais na análise de medicamentos nem sempre é possível de ser realizada, considerando a grande diversificação nas formulações farmacêuticas. Assim, ao se validar um método analítico não significa que este possa ser aplicado sem restrições para diferentes medicamentos com o mesmo princípio ativo, uma vez que os resultados das análises são influenciados por inúmeros fatores como a estrutura química do fármaco, o nível das doses terapêuticas e as diferenças nas fórmulas de um laboratório para outro. Para cada caso há necessidade de resultados experimentais evidentes, que garantam a funcionalidade do método, bem como do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação.

A validação da metodologia analítica constitui-se em atividade essencial e inicial de um programa de garantia de qualidade bem estruturado, sendo que esta é um fator crítico na validação do processo produtivo (Moretto, 2000). Assim, existem várias propostas nesta área descrevendo quais os parâmetros principais que devem ser considerados para avaliação e desempenho de um método analítico dentro do programa de validação (Pasteelnick,1993;Pecora, 2000).

De acordo com a United States Pharmacopeia 24 (1995, p.2149), validação de métodos analíticos “é o processo pelo qual é estabelecido, por estudos de laboratório, que as características executadas do método satisfazem os requisitos para as aplicações analíticas praticadas”. As características analíticas típicas usadas na validação de métodos são: exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, intervalo

de aceitação, robustez ou resistência e conformidade do sistema (Espires, 1998; Pecora, 2000).

A realização da validação deve ser executada sempre que: i) de forma direta ou indireta o processo de fabricação tenha sido alterado; ii) quando a qualidade final do produto for duvidosa; iii) em equipamentos novos e iv) em caso de implantação de um processo ou método analítico novo (Emanuelli, 2000; Pasteelnick,1993). Segundo Espires (1998, p.1), mesmo para um método já validado há necessidade de novos estudos em função de algumas alterações que podem ocorrer. Podemos exemplificar com a mudança na composição química do medicamento e variação na escala de produção do lote de medicamentos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Analisar os principais aspectos da validação de métodos analíticos do fármaco Captopril, buscando demonstrar que os resultados das análises asseguram tanto a implantação do método como a confiabilidade dos resultados analíticos.

1.2.2 Objetivos Específicos

Através da revisão bibliográfica da área e com base no modelo de metodologias já existentes, proceder a validação destas utilizando o produto acabado Captopril produzido no LEPEMC/UEM (Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Medicamentos e Cosméticos – Universidade Estadual de Maringá), buscando:

- Melhorar o entendimento do processo;
- Conhecer o potencial de falhas;
- Adotar medidas preventivas;
- Assegurar o cumprimento das normas regulatórias.

1.3 Limitações do Trabalho

A primeira, e talvez a mais forte limitação deste trabalho decorre do LEPEMC estar inserido dentro de uma Universidade, empresa estatal. Este fato dificulta a aquisição de equipamentos e materiais utilizados no processo da validação, bem como na contratação de terceiros para execução de tarefas. Uma vez que todo material adquirido pela Instituição necessita de licitação e para todo pessoal contratado exigi-se teste seletivo ou concurso, tais circunstâncias atrasam o processo inviabilizando o programa.

A inexistência de equipamentos do tipo Cromatógrafo Líquido nas dependências do LEPEMC, foi outra limitação para a realização deste trabalho, sendo necessário o desenvolvimento das análises cromatográficas em outro ambiente de rotina.

1.4 Estrutura do Texto

Este trabalho está estruturado em cinco capítulos. Este primeiro capítulo, dedica-se aos seguintes itens: conceito, justificativa, objetivos e dificuldades de se trabalhar com o tema Garantia de Qualidade/ Validação.

O capítulo 2 abordará o referencial teórico do tema validação. Conceituará as caraterísticas do assunto, discorrerá sobre o fármaco Captopril, suas ações, seus usos e quais os métodos de análise utilizados na sua quantificação.

O capítulo 3 refere-se a metodologia utilizada no trabalho. Neste, estão descritos os materiais, reagentes e equipamentos utilizados, e a técnica realizada para cada teste do programa de validação. Também estão descritos os três métodos analíticos (titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico), que serão utilizados para a quantificação do Captopril.

A aplicação da metodologia proposta e os seus resultados serão demonstrados no capítulo 4, no qual os dados serão analisados e interpretados, avaliando-se as características da validação.

O presente trabalho finaliza-se com a conclusão no capítulo 5, seguido de algumas sugestões para futuros trabalhos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações sobre Qualidade

Os últimos anos têm presenciado o crescimento de um gênero novo e sem precedentes de mercado mundial com relação a volume, variação e qualidade. A amplitude e a complexidade dessas exigências compreendem o espectro total dos problemas gerenciais – estrutura do preço e redução do custo, relações industriais e desenvolvimento organizacional, mudança tecnológica e mecanização ou venda e introdução de novos produtos. Tudo isto ocorrendo dentro de uma estrutura na qual empresa e governo estão caminhando para relações inteiramente novas (Feigenbaum, 1994).

Do mesmo autor (1994, p.45),

> " Soluções efetivas para muitos dos problemas atuais não pertencem a questões de gerenciamento tradicional e metodologia da engenharia. Elas são problemas decisivamente importantes quanto ao novo gerenciamento e significado da engenharia, como: gerenciar para garantir produtividade de *todos* na companhia e não apenas da mão-de-obra direta, gerenciar de modo que funcionários, cientistas e engenheiros sejam uma *soma* e não uma *diferença,* gerenciar de modo positivo a aproximação de consumismo, gerenciar lembrando a necessidade de conservação de energia e materiais, com redução de desperdícios e utilização mais adequada dos recursos e gerenciar em termos internacionais e não somente para o mercado nacional, apenas observando outros mercados."

Assim, em nenhuma outra área a necessidade de aperfeiçoamento se faz mais evidente do que na da qualidade em produtos e serviços. Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT/NBR ISO 8402 (1994,

p.11), o termo qualidade é definido como a “totalidade de características de uma entidade que lhe confere a capacidade de satisfazer as necessidades explícitas e implícitas”, e para a obtenção da qualidade satisfatória há o envolvimento das fases do ciclo da qualidade como um todo, que são: a qualidade devido à definição das necessidades, a qualidade devido ao projeto do produto, a qualidade devido à conformidade e a qualidade devido à assistência ao produto ao longo do seu ciclo de vida.

Em 1957 surge o conceito de Controle de Qualidade Total, criado pelo Dr. Armand V. Feigenbaum, sendo definido (*apud* Ishikawa, 1993 p.93) como:

“sistema eficiente para a integração do desenvolvimento de qualidade, da manutenção de qualidade e dos esforços de melhoramento de qualidade dos diversos grupos em uma organização, para permitir produção e serviços aos níveis mais econômicos, que levem em conta a satisfação total do consumidor.”

O controle de qualidade total (CQT) exige a participação de todas as divisões e para alcançar a qualidade em todos os setores da empresa de forma eficaz é utilizado inicialmente o círculo do PDCA (Plan- Planejar, Do- Fazer, Check- Checar, Act- Agir), girando repetidamente para evitar a reincidência de defeitos.

O controle de qualidade total é iniciado (CQT) após o uso do PDCA, sendo definido de uma forma mais ampla, incluindo além dos produtos manufaturados, questões relativas a atividades de vendas, contratos e novos serviços.

Com a implantação do CQT surge a necessidade de se buscar a Garantia da Qualidade. Uma infra-estrutura apropriada ou “sistema da qualidade”, englobando a estrutura organizacional, os procedimentos, os processos e os recursos e ações sistemáticas precisas para assegurar a confiança necessária de que determinado produto ou serviço satisfaça as exigências quanto à sua

qualidade. A totalidade dessas ações é chamada de *Garantia da Qualidade* (Moretto, 1999).

2.2 Garantia da Qualidade e os Produtos Farmacêuticos

Segundo Moretto (1999, p.10) o conceito de Garantia de Qualidade é definido como sendo:

A totalidade das providências tomadas com o objetivo de garantir que os produtos farmacêuticos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, para que possam ser utilizados para os fins aos quais tenham sido propostos, englobando ainda as questões que individual ou coletivamente influem na qualidade de determinado produto.

Um programa apropriado de garantia de qualidade, aplicado à fabricação de produtos farmacêuticos, deverá assegurar que :

- Estes produtos sejam projetados e desenvolvidos de forma que levem em consideração as necessidades das boas práticas de Fabricação, boas práticas de Laboratório e de boas práticas Clínicas;

- As operações de produção e controle sejam claramente especificadas por escrito e que as exigências de boas práticas de Fabricação sejam adotadas;

- As responsabilidades gerenciais estejam claramente especificadas na descrição dos serviços;

- Sejam tomadas providências quanto à fabricação, ao suprimento e a utilização correta das matérias-primas e materiais de embalagem;

- Todos os controles necessários sobre as matérias-primas, produtos intermediários, produtos a granel e outros controles em processo, além das calibrações e das validações, sejam realizados;

- produto acabado seja corretamente processado e conferido segundo procedimentos definidos;

- Os produtos farmacêuticos não sejam vendidos ou fornecidos antes que o pessoal autorizado ateste que cada lote tenha sido fabricado e controlado de acordo com os requisitos do registro e os regulamentos relevantes quanto à sua produção, controle e liberação;

- Sejam tomadas as providências necessárias para garantir, tanto quanto possível, que os produtos farmacêuticos sejam armazenados pelo fabricante, distribuídos e consequentemente manuseados de forma que a qualidade dos mesmos seja mantida por todo o prazo de validade.

- Haja procedimento de auto-inspeção e/ou auditoria da qualidade, que avaliem regularmente a efetividade e a aplicação do sistema de garantia da qualidade.

- Exista a validação de metodologias analíticas, processos, limpeza e equipamentos dentro da empresa.

2.3 Fundamentos da Validação da Metodologia Analítica

A temática da qualidade, segundo Moretto (2000, p.44), tem sofrido evolução sem precedentes e reconhece quatro eras: i) era da qualidade da inspeção, ii) era da qualidade do controle estatístico, iii) era da qualidade da garantia e iv) era da qualidade da gestão estratégica. Nos últimos 15 a 20 anos

tem sido possível identificar a quinta era da qualidade: era da validação, sendo este trabalho coerente com a mesma.

De acordo com Moretto (1999, p.12) a indústria farmacêutica deve se responsabilizar pela qualidade dos produtos farmacêuticos, assegurando a adequabilidade dos mesmos com relação aos fins para os quais tenham sido produzidos, e cumprir com as exigências relativas ao registro, não colocando os pacientes em risco, em função de sua inadequabilidade em termos de segurança, qualidade ou eficácia. Assim, para se conseguir alcançar o objetivo da qualidade de forma confiável, é necessário a implantação de um sistema de garantia de qualidade, que incorpore as normas de boas práticas de Fabricação e de Laboratório, no qual os estudos da validação constituem parte essencial destas normas.

O conceito do termo validação era utilizado em análises na Química Analítica Inorgânica, a fim de assegurar que o elemento químico analisado correspondia ao da questão. A capacidade de fornecer dados oportunos, exatos e confiáveis é parte central do papel da Química Analítica e isto é especialmente verdadeiro na descoberta, desenvolvimento e fabricação de produtos farmacêuticos. Os dados analíticos são usados na seleção de candidatos a drogas potenciais, no auxílio do desenvolvimento de sínteses de drogas, nos estudos de apoio de formulações, no monitoramento da estabilidade de fármacos em volume e nos produtos formulados e nos testes de produtos acabados para liberação.

A qualidade dos dados analíticos representa um fator chave no sucesso de um programa de desenvolvimento de uma droga. O processo do desenvolvimento e validação do método tem impacto direto na qualidade desses dados. Assim, a metodologia analítica que já envolvia a exatidão, precisão e especificidade, se expandiu para as atividades industriais e está agora sob o enfoque da validação (Moretto, 2000).

De acordo com Moretto (2000, p.44) o primeiro registro que se tem do uso oficial do termo validação, encontra-se nas Good Manufacturing Products - GMPs, as quais foram publicadas na Food and Drug Administration – FDA (edição 1978), porém somente em 1980 recebeu a seguinte definição: “Validação é o estabelecimento da evidência documentada de que o desenvolvimento de um processo específico permite cumprir com o objetivo para o qual foi desenhado”. Em 1983, a FDA define validação de processos como “um programa documentado que proporciona um alto grau de segurança de que um processo específico produzirá uma forma farmacêutica que satisfaz as especificações e atributos de qualidade pré-determinados ”. Em 1992, a validação de métodos e processos foi adotada nas GMPs da Organização Mundial da Saúde – OMS.

Segundo a última revisão da Farmacopéia Americana (1999, p.2150), os analistas não são obrigados a validar sua metodologia analítica, simplesmente devem verificar se a metodologia é adequada as suas condições de uso. Porém, se não houver um método ou série de métodos devidamente adequados para a avaliação da qualidade dos produtos, o programa de validação terá valor limitado (Pasteelnick, 1993).

O fato de validar uma metodologia, não significa que esta possa ser usada indiscriminadamente, como por exemplo, na determinação de um mesmo princípio ativo em diferentes apresentações de diferentes laboratório. Para cada caso há necessidade de resultados experimentais e respectiva análise estatística, assim como o estabelecimento de aceitação para garantir o emprego seguro da metodologia em questão (Garfield, 1994).

Com relação a validação de métodos, Espires (*apud* Garfield, 1994) relata que esta pode ser definida como “o processo pelo qual atributos ou figuras de mérito são determinados e avaliados, sendo estes importantes partes de um programa de garantia de qualidade“, tendo como objetivo principal assegurar que determinado procedimento analítico selecionado dê resultados

reprodutíveis e confiáveis, que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado.

Os atributos normalmente recomendados nos programas de validação de metodologia analítica são: exatidão (acuracidade), precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, consistência, robustez e teste de conformidade do sistema, além da seletividade e a sensibilidade do método (Emanuelli, 2000).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados por ele obtidos comparado ao valor verdadeiro (Emanuelli, 2000). Estes resultados são calculados através da diferença entre o valor da concentração considerado como verdadeiro e o valor experimental, obedecendo intervalos de segurança (USP, 1999).

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicado repetidamente à várias amostragens de uma mesma amostra. A partir dos valores obtidos, é calculado a média e o Desvio Padrão (DP), determinando-se o Coeficiente de Variação (CV), expresso em termos de percentagem de uma série de medidas, nas quais duas delas podem ser a reprodutibilidade e a repetibilidade do método analítico sob condições normais de operação. Neste contexto, a reprodutibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos em diferentes laboratórios, diferentes analistas e em diferentes dias, enquanto que a repetibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos num curto espaço de tempo utilizando os mesmos analistas e os mesmos equipamentos. Para inúmeros propósitos, a repetibilidade é o critério que interessa em um método analítico oficial(USP, 1999).

Segundo Pasteelnick (1993, p.412), a exatidão e a precisão são importantes atributos da validação de metodologia analítica. O primeiro deles pressupõe que não existe erros sistemáticos inerentes ao processo, enquanto que o segundo reflete a dispersão dos vários resultados individuais do doseamento

em relação ao valor médio estando ou não próximo do valor verdadeiro. Porém, existem inúmeros fatores que podem comprometê-los causando erros ocasionais, por exemplo, a calibração de equipamentos, habilidade e capacitação do analista, temperatura irregular do laboratório, umidade, componentes da amostra.

Outra característica da validação da metodologia analítica é a especificidade ou seletividade. Este atributo é definido como sendo a capacidade de medir exata e especificamente o fármaco na presença de outros constituintes da amostra (USP, 1999). Pode ser demonstrada comparando os resultados dos testes de amostras contendo impurezas ou produtos de degradação, ou ainda através do placebo, com valores encontrados após análise da amostra sem os interferentes.

O limite de detecção e quantificação são outros dois atributos da validação analítica. O primeiro refere-se a menor quantidade de uma substância presente em uma amostra que possa ser detectado, porém sem quantificá-lo. É expresso em percentual ou partes por bilhão. O segundo, está relacionado a menor quantidade de um composto presente em uma amostra que possa ser determinado com precisão e acuracidade aceitáveis sob condições experimentais declaradas (USP, 1999).

A linearidade é a habilidade que o método tem de produzir resultados que são diretamente, ou através de transformações matemáticas, proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de uma variação determinada. Este atributo da validação pode ser estabelecido pela avaliação visual de um diagrama de sinais em função da concentração ou conteúdo analisado. Havendo uma relação linear, os resultados da análise devem ser avaliados com base em apropriados métodos estatísticos, como por exemplo, o método dos quadrados mínimos (FDA, 1996).

A variação refere-se ao intervalo entre o maior e o menor nível de quantidade da substância presente na amostra. Deriva geralmente dos estudos

da linearidade e depende da aplicação do procedimento. Confirma que o procedimento analítico fornece um aceitável grau de exatidão, precisão e linearidade quando aplicados em amostras que contém quantidades variáveis do analisado, dentro ou nos extremos da variação especificada (FDA, 1996; Emanuelli, 2000).

A consistência do método é o grau de reprodutibilidade dos resultados obtidos das análises de mesmas amostras sob várias condições, por exemplo: laboratórios diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes, dias diferentes. Esta característica é expressa como a falta de conhecimento nos resultados operacionais e variações do meio ambiente dos métodos analíticos (USP, 1999).

Segundo a mesma referência (1999, p.2160), a robustez do método é a medida da capacidade que o método apresenta em se manter inalterável através de pequenas, mas deliberadas modificações em seus parâmetros e fornecer indicações de segurança durante o uso normal.

2.4 Elementos Requeridos para a Validação do Doseamento

Na literatura oficial, para o ensaio de doseamento podem ocorrer grandes variações nas suas determinações, desde determinações analíticas altamente exatas até avaliação subjetiva de atributos. Considerando esta variedade de doseamentos, diferentes métodos necessitam de diferentes programas de validação. Desta forma, a United States Pharmacopeia 24, (1999, p. 2152) classifica os métodos analíticos em quatro categorias:

Categoria I: Métodos analíticos para a quantificação do maior componente de uma grande quantidade de substâncias químicas ou ingrediente ativo em produto farmacêutico final.

Categoria II: Métodos analíticos para a determinação de impurezas em uma grande quantidade de substâncias químicas ou compostos de degradação em produto farmacêutico final. Estes métodos incluem doseamentos quantitativos e testes limites.

Categoria III: Métodos analíticos para a determinação de características de desempenho.

Categoria IV: São os testes de identificação.

De acordo com a categoria do doseamento, há necessidade de se realizar diferentes análises. A tabela 1 lista os elementos que normalmente são requeridos para cada uma das categorias dos doseamentos.

Tabela 1: Elementos de Dados Requeridos para Validação de Doseamentos

Características de Desempenho Analítico	Doseamento Categoria I	Doseamento Categoria II		Doseamento Categoria III	Doseamento Categoria IV
		Testes Quantitativos	Testes Limites		
Acuracidade	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite de Detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Variação	Sim	Sim	*	*	Não

* Pode ser requerido dependendo da natureza do teste específico
Fonte: United States Pharmacopeia XXIV (1999)

Considerando a tabela 1, o presente trabalho encontra-se classificado na categoria I.

2.5 Generalidades sobre o Captopril

A hipertensão arterial segundo Magalhães (1998, p.647), é o agravo mais comum na população adulta em todo o mundo e um fator de risco muito importante para as doenças cardiovasculares, destacando-se o acidente vascular cerebral (AVC). Cerca de 50 milhões de pessoas nos Estados unidos da América têm pressão sangüínea sistólica e diastólica acima de 140/90, respectivamente (Jackson, 1996), enquanto que na Bahia estimativas indicaram a ocorrência de aproximadamente 950.000 pessoas adultas hipertensas no ano de 1995. Destas, 40% têm a consciência do problema, sendo que 15% estão sob tratamento e controle (Magalhães, 1998).

A pressão arterial elevada provoca alterações patológicas nos vasos sanguíneos e hipertrofia do ventrículo esquerdo. Como conseqüência, a hipertensão é a principal causa de AVC, levando a doenças das artérias coronárias com infarto do miocárdio e morte cardíaca súbita. É também a principal contribuinte para insuficiência cardíaca, renal e aneurisma dissecante da aorta (Jackson, 1996).

As maiores dificuldades em se conseguir manter um indivíduo hipertenso com níveis pressóricos normais são a ausência de sintomas, ausência de "cura", necessitando de tratamento para toda a vida, com mudança drástica de estilo de vida. Isto envolve educação da condição de pessoas não pacientes e a presença de uma equipe multidisciplinar. Mesmo assim, tratar a hipertensão arterial faz-se exigir, pois de acordo com a conclusão de 14 grandes estudos metodologicamente seguros realizados com 36.908 pessoas por um período de cinco anos, o tratamento eficaz da hipertensão reduz os acidentes cerebrovasculares em 42% e eventos coronários em 33% (Magalhães, 1998).

A hipertensão é definida de forma convencional como sendo a pressão arterial sistólica igual ou superior a 140 mm Hg (milímetro de mercúrio) por uma pressão arterial diastólica igual ou superior a 90 mm de Hg em pelo menos

duas tomadas em momentos distintos. Isto serve para caracterizar um grupo de pacientes com risco de doença cardiovascular relacionada à hipertensão alto o suficiente para merecer atenção médica (Jackson, 1996).

Existem dois tipos de hipertensão: a essencial ou idiopática, correspondente a 97% dos casos, e a secundária. Nas hipertensões essenciais as causas podem ser multifatoriais, como por exemplo, hereditariedade, obesidade, inatividade física, ingesta de álcool e stress. Na secundária sua causa pode ser vascular, neurológica ou endócrina podendo ser identificada e tratada com especificidade. Assim, qualquer adição de medicação poderá ser ineficaz para o controle pressórico do indivíduo se não se tratar a causa pertinente a cada caso (Magalhães, 1998).

Os agentes anti-hipertensivos podem ser classificados de acordo com seus locais ou mecanismos de ação como: i) diuréticos; ii) agentes simpatolíticos; iii) vasodilatadores; iv) bloqueadroes dos canais de Cálcio; v) inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) e antagonistas do receptor da angiotensina II. O Captopril, fármaco estudado neste trabalho, é classificado como inibidor da ECA.

No início da década de 70 descobriu-se que os polipeptídeos inibiam a formação ou bloqueavam os receptores da angiotensina II - octapeptídeo responsável pela constrição das arteríolas, produzindo imediata elevação da pressão sangüínea. Estudos experimentais realizados com estes inibidores revelaram importantes papéis fisiológicos e fisiopatológicos para o sistema renina-angiotensina. Com estes resultados foi possível o desenvolvimento de uma classe nova e muito eficaz de agentes anti-hipertensivos, os inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Posteriormente foram realizados estudos experimentais e clínicos com estes inibidores que revelaram papéis adicionais para o sistema renina-angiotensina na fisiologia da hipertensão, insuficiência cardíaca, vasculopatia e insuficiência renal, favorecendo o desenvolvimento de classes adicionais de agentes que inibiam o sistema (Jackson, 1996).

O sistema renina-angiotensina é um importante elemento na regulação, a curto e a longo prazo, da pressão sangüínea arterial. Fatores que reduzem a pressão arterial causada por uma dieta hipossódica, diuréticos, perda sangüínea ou através de reduções na resistência periférica total provocada por vasodilatadores, ativam a liberação de renina pelos rins. A renina é uma enzima que atua no seu substrato, o angiotensinogênio, catalisando a formação do decapeptídeo angiotensina I. Este por sua vez é clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) produzindo o octapeptídeo angiotensina II, um potente vasoconstritor endógeno que também etimula a secreção de aldosterona do córtex da adrenal, contribuindo para a retenção de sódio e fluídos, provocando o aumento da pressão arterial por diferentes mecanismos (Jackson,1996; Drugs Facts and Comparisons, 1996; Magalhães, 1998):

- Ação vasoconstritora direta;
- Interação com o sistema simpático por vários mecanismos e locais;
- Exacerbação da reposta ao estímulo alfa adrenegércio;
- Estímulo à produção de aldosterona, levando à retenção de sódio e água;
- Crescimento das células musculares lisas devido a hipertrofia vascular.

Os inibidores ECA impedem a formação de angiotensiona II, bloqueando o sistema renina-angiotensina, e podem ser classificados em três grandes grupos, de acordo com sua estrutura química: i) inibidores ECA contendo sulfidril estruturalmente relacionados ao Captopril; ii) inibidores ECA contendo dicarboxil com estrutura relacionada ao enalapril e iii) inibidores ECA contendo fósforo com estrutura relacionada ao fosinopril (Jackson, 1996), distinguindo-se um do outro pela presença ou ausência do grupo sulfidril.

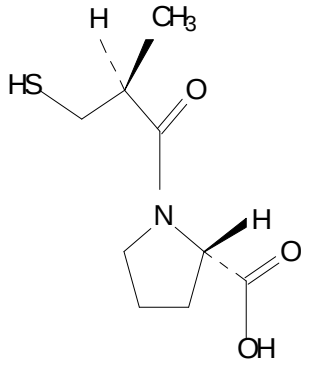
Não existe um motivo que favoreça a utilização de um inibidor ECA sobre o outro, pois todos bloqueiam de forma eficaz a conversão de angiotensina I em angiotensina II, sendo que todos possuem a mesma indicação terapêutica, perfis de efeitos adversos e contra-indicação semelhantes. Porém, o Captopril apresenta menor custo e efeito mais favorável sobre a qualidade de vida.

Considerando que a hipertensão costuma exigir tratamento para toda a vida, este efeito melhora a obediência do paciente (Jackson, 1996).

O Captopril foi o primeiro fármaco de inibidores da ECA desenvolvido para o tratamento da hipertensão. Seu nome e fórmula química é 1-[(2S)-3-Mercapto-2metilpropionil]-L-prolina e $C_9H_{15}NO_3$ S, respectivamente. Tem um peso molecular de 217,29 e apresenta a estrutura química representada na Figura 1 (Merck & CO, 1996).

Este fármaco constitui-se em um pó cristalino, branco ou levemente amarelado, com leve odor característico de sulfeto, facilmente solúvel em água, etanol, clorofórmio e metanol. Apresenta um ponto de fusão entre 104 a 110°C e é solúvel em soluções alcalinas (The Pharmaceutical Codex, 1994; European Pharmacopeia, 1997).

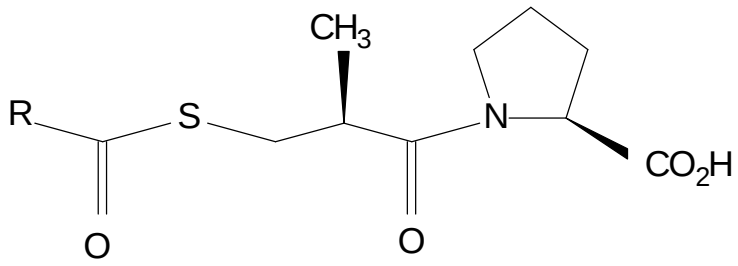
Figura 1: Estrutura química do fármaco Captopril



Fonte: United States Pharmacopeia, The National Formulary, 23ª ed, 1994.

A síntese do Captopril é descrita em vários trabalhos. Segundo a patente da E.R Squibb & Sons, Inc. sob o número 4,046,889, seu processo inicia-se a partir do substrato conforme demonstra a Figura 2.

Figura 2: Substrato do Captopril



Fonte: E. R. Squibb & Sons, 1990.

A letra R representa um grupamento alquil de baixo peso molecular. Neste processo, o substrato é primeiramente tratado com um hidróxido de metal básico aquoso capaz de formar um sal do substrato solúvel em água, onde o hidróxido de metal básico apresenta uma concentração de 4 molar ou mais. O substrato é então neutralizado, preferencialmente com um ácido mineral. Por este processo, o Captopril pode ser obtido através da cristalização direta com solução aquosa, evitando o uso de solventes orgânicos e tratamento com zinco para reduzir os níveis de sulfeto e disulfeto como impurezas respectivamente. Em uma alternativa de incorporação, a neutralização é carreada pelo fornecimento de hidrogênio através da resina de troca iônica.

Segundo Korolkovas (1988, p.384-392), já no ano de 1988 existiam no Brasil aproximadamente cerca de 7 milhões de hipertensos, e, nos Estados Unidos 23 milhões. De fato, a hipertensão essencial aflige 10% da população mundial e constitui 80% do total de casos de hipertensão.

Sendo o Captopril um dos medicamentos anti-hipertensivos mais consumido no Brasil, é possível verificar a relação de laboratórios que o produz na Tabela 2.

Tabela 2: Relação dos laboratórios farmacêuticos que produzem medicamentos contendo Captopril e suas respectivas apresentações e concentrações.

Laboratório	Apresentação	Concentração
Bristol-M-Squibb	comprimido	12,5 ; 25 e 50 mg
Cibran	comprimido	12,5; 25 e 50 mg
Legrand	comprimido	12,5 e 25 mg
Medley	comprimido	12,5; 25 e 50 mg
Sanval	comprimido	25 e 50 mg

Fonte: BPR – Guia de medicamentos,1998.

2.6 Métodos Empregados no Doseamento do Captopril

2.6.1 Método Titulométrico

Na análise titulométrica ou titulometria, o constituinte desejado é determinado medindo sua capacidade de reação frente a um reagente adequado usado na forma de solução com concentração conhecida, denominada solução padrão ou solução titulante. Esta solução é adicionada progressivamente ao constituinte, até completar a capacidade de reação deste. Este procedimento é realizado utilizando-se uma bureta e denomina-se titulação. A quantidade do constituinte é encontrada em função do volume ou peso da solução padrão, gasto na titulação. Portanto, existem duas técnicas titulométricas utilizadas na química analítica quantitativa: a titulometria volumétrica, que mede o volume gasto na titulação e a titulometria gravimétrica, que mede o peso da solução padrão consumida. A técnica utilizada neste trabalho foi a titulometria volumétrica, também denominada de análise volumétrica ou volumetria (Basset, 1981; Ohlweiler, 1985).

A etapa considerada a mais crítica da titulação é a parte final, em que um sinal qualquer deve indicar que a capacidade de reação do constituinte esgotou-se. Esta etapa é denominada de ponto de equivalência ou ponto final teórico, e corresponde a adição do reagente titulante em quantidade exatamente equivalente a quantidade do constituinte originariamente presente.

Para facilitar a visualização do ponto de equivalência é adicionado ao sistema um reagente auxiliar denominado de indicador, capaz de produzir uma mudança de coloração muito próxima do ponto final da titulação (Ohlweiler, 1985).

Os métodos analíticos volumétricos são classificados de acordo com as reações que ocorrem no sistema. Há as reações de: i) neutralização, ii) precipitação e formação de complexos, iii) oxidação – redução e iv) substância que não participa diretamente da reação de titulação. Neste trabalho iremos tratar especificamente da titulometria de oxidação – redução, em especial da iodatometria, pelo fato do fármaco necessitar desta metodologia.

Segundo Vogel (1981, p.73), a titulometria de oxidação-redução, também chamada de oxi-redução, baseia-se na transferência de elétrons do agente redutor para o agente oxidante. Em todos os processos de oxidação-redução, existirá um reagente que se oxida e um que se reduz porque as duas reações são complementares uma da outra e ocorrem simultaneamente, ou seja, uma não pode processar sem que a outra processe.

Ohlweiler (1985, p.125) descreve que a iodatometria faz uso de solução padrão de iodato de potássio, baseando-se na redução de íon iodato à iodo unipositivo:

$$IO_3^- + 6H^+ + 4e^- \longleftrightarrow I^+ + 3H_2O$$

Para que a redução do íon iodato possa se processar de maneira indicada, as condições do meio devem assegurar a estabilidade do iodo unipositivo, que é conseguida através da adição de ácido clorídrico concentrado - método de Andrews (Ohlweiler, 1985).

Análises volumétricas usando métodos titulométricos são muito baratas e simples. Atualmente tem sido possível automatizar estes métodos, reduzindo os erros de operador e aumentando a amostragem. Estes métodos são utilizados na determinação quantitativa de pequenas concentrações de substâncias. Exatidão, precisão e robustez são problemas freqüentes em análises volumétricas (Lough, 1995).

2.6.2 Método Espectrofotométrico

Quando a energia eletromagnética luminosa atravessa uma solução contendo átomos e moléculas, parte desta radiação é absorvida e o restante é transmitido. A radiação absorvida, por sua vez, depende da quantidade de moléculas presente, ou seja, da concentração da solução e da estrutura destas moléculas. Ao estudo desta dependência entre átomos e moléculas de substância e a natureza e quantidade de radiação eletromagnética absorvida por elas, denomina-se espectrofotometria de absorção (Ohlweiler, 1985; Farmacopéia Brasileira, 1996).

A radiação eletromagnética consiste de energia propagada na forma de ondas. Estas, por sua vez, apresentam comprimento de onda característico, ou seja, distância linear entre dois pontos correspondentes localizados sobre duas ondas adjacentes. Estes comprimentos são expressos em nanômetros (nm) e variam na região do visível de 380 a 780 nm, e no ultravioleta de 100 a 380 nm (Farmacopéia Brasileira, 1996).

Conforme a peculiaridade da técnica, dos equipamentos e do intervalo de freqüência da energia eletromagnética aplicada, a espectrofotometria de absorção enquadra-se nas regiões ultravioleta, visível, infravermelho do

espectro de luz e também a atômica. Esta técnica é utilizada na identificação e quantificação de substâncias (Farmacopéia Brasileira, 1996).

O método espectrofotométrico está fundamentado na absorção molecular nas regiões do ultravioleta e do visível do espectro e depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado (Silverstein, 1994) .

No caso da espectrometria na região do visível, método utilizado neste trabalho para o medicamento Captopril, tem como princípio a relação proporcional existente entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da solução da substância.

2.6.3 Método Cromatográfico

Entre os métodos de análise, a cromatografia ocupa um lugar principal pois apresenta facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, tanto por si mesma quanto em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, que ocorre através da distribuição destes componentes entre duas fases que estão em íntimo contato. Uma destas fases permanece estacionária enquanto que a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre estas duas, de forma que cada um dos componentes seje seletivamente retido pela fase estacionária resultando em migrações diferenciais destes componentes (Collins, 1990).

O termo cromatografia surgiu em 1903 pelo botânico russo Michael Semenovich Tswett e deriva do grego “chrom” que significa cor e “graphe” que

significa escrever, todavia o método não depende da cor, apenas facilita a identificação dos componentes separados (Logh, 1995).

Existem várias formas de se realizar um processo cromatográfico. Uma delas é através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A CLAE usa coluna metálicas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel líquida sob condição de altas pressões. Estas pressões são obtidas com auxílio de uma bomba de alta pressão que pode empurrar a fase móvel com vazão mais rápida, na qual sua característica mais importante é a elevada eficiência atingida na separação (Collins, 1990). Neste trabalho faremos uso deste tipo de cromatografia.

2.7 Estatística

Serão definidos neste item, conceitos relacionados as análises estatísticas utilizadas para a avaliação e interpretação dos resultados dos métodos titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico, segundo Triola (1999, p. 32, p.38, p.129, p. 236):

Média Aritmética: é de modo geral, a mais importante de todas as mensurações numéricas descritivas e é definida como sendo o valor obtido somando-se todo os valores de um conjunto e dividindo-se o total pelo número de valores.

Desvio padrão: o desvio padrão é a mais importante e mais útil medida de variação. Ele leva em conta todos os valores. Assim, desvio-padrão de um conjunto de valores amostrais é uma medida da variação dos valores em relação à média.

Erro padrão: É a medida de variabilidade para distribuição da média de todas as amostrais aleatórias possíveis de tamanho *n*. É dado pela divisão do desvio-padrão sobre a raiz de *n* .

Boxplot: Também denominado Diagrama em Caixas, é definido como sendo um gráfico de dados que consiste em uma reta que se prolonga do menor ao maior valor, e um retângulo com retas traçadas no primeiro quartil Q_1 , na mediana e no terceiro quartil Q_3. Este é usualmente conhecido por Boxplot dos quartis. No Boxplot para a média é substituído o valor mediano pela média, os valores máximos e mínimos por $\pm$ Dp e os quartis Q_1 e Q_2 por $\pm$ Ep.

Coeficiente de Correlação linear *r* : o significado de correlação diz que existe uma correlação entre duas variáveis, quando uma delas está, de alguma forma, relacionada com a outra, assim, o coeficiente de correlação linear *r* mede o grau de relacionamento linear entre os valores emparelhados x e y em uma amostra.

Este capítulo apresentou uma revisão de literatura que visou a formulação do referencial teórico necessário para a realização da pesquisa. Desta forma, foram abordadas algumas considerações sobre qualidade, garantia da qualidade e os produtos farmacêuticos, enfatizando a utilização da validação da metodologia analítica. Para tal metodologia foi escolhido o fármaco Captopril, e algumas generalidades foram discorridas a seu respeito, bem como os métodos empregados na sua quantificação.

No próximo capítulo, será apresentado a metodologia utilizada para a validação da metodologia analítica do Captopril utilizando três diferentes métodos de doseamento do referido fármaco.

3 METODOLOGIA DO DOSEAMENTO

3.1 Proposição do Trabalho

Foi realizada uma análise crítica de três métodos analíticos para o doseamento do Captopril em medicamentos. Estes métodos foram avaliados considerando os atributos normalmente exigidos no programa de validação de metodologia analítica no controle de qualidade de medicamentos. Assim, o presente trabalho foi planejado de maneira a cumprir as seguintes fases:

a) preparação de uma amostra padronizada de comprimidos contendo Captopril;

b) estudo do doseamento do Captopril presente na amostra padronizada e no placebo através dos métodos:

- volumétrico através da óxido-redução;
- espectrofotométrico na região do visível;
- cromatográfico através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

3.2 Parte Experimental

A metodologia de pesquisa adotada neste trabalho foi composta de uma parte experimental, onde avaliou-se os métodos de quantificação do Captopril, desenvolvidos por empresas e também presentes na literatura.

Os materiais utilizados nas análises referem-se a padrões, amostras, reagentes químicos e equipamentos.

3.2.1 Padrões

As substâncias químicas de referência primária – Captopril e dissulfeto de Captopril identificadas respectivamente com número de lotes 09120 e 09122 USP e apresentando um grau de pureza de 99,99% e 99.99%, foram adquiridas da United States Pharmacopeia, através do Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Medicamentos e Cosméticos – LEPEMC da Universidade Estadual de Maringá. A substância química de referência secundária identificada com número de lote 249/00 e apresentando grau de pureza igual a 98,90% foi gentilmente cedida pela Fundação do Remédio Popular do Estado de São Paulo – FURP.

3.2.2 Amostras

A amostra da matéria-prima Captopril identificada com número de lote 00141 B e apresentando grau de pureza 99,64% foi prontamente cedida pela empresa Royton Indústria Farmacêutica, de São Paulo.

A partir desta amostra e das substâncias de grau farmacêutico, procedentes da distribuidora Forlab e utilizadas na manipulação da formulação da matriz, preparou-se uma amostra padronizada de comprimidos, simulando formulações encontradas no comércio e desenvolvidas por este laboratório, conforme Tabela 3.

Foi preparado também um placebo da amostra padronizada de comprimidos nas mesmas quantidades estabelecidas na fórmula descrita acima, com exceção do Captopril.

As amostras de comprimidos contendo 25 mg de Captopril foram manipuladas no LEPEMC com diferentes concentrações as quais variaram de 40 a 120%.

Tabela 3 : Constituintes da Formulação do Captopril do LEPEMC

Constituinte	Quantidade (mg)
Captopril	25,00
Celulose Microcristalina MC 101	42,5
Lactose	45,73
Amido de Milho	10,00
Dióxido de Silício	1,3
Glicolato de Amido Sódico	1,3
Estearato de Magnésio	3,9
Talco	2,6
Total	132,33

Fonte: LEPEMC,2001.

3.2.3 Reagentes e Equipamentos

Utilizou-se para as análises do Captopril reagentes de grau farmacêuticos e puros, enquanto que o equipamento utilizado nas análises espectrofotométricas foi um Espectrofotômetro UV-Vis e nas análises cromatográficas foi um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência.

a) Método Titulométrico por Óxido-Redução

Solução de Iodato de Potássio 0,1 N SV

Solução de Ácido Sulfúrico 3,6 N

Goma de Amido 1%

Iodeto de Potássio

Bureta de 25 mL

Balança Analítica 200

b) Método Espectrofotométrico com Reagente de Folin-Ciocalteau

Padrão secundário de Captopril

Reagente de Folin-Ciocalteau (Reagente FC)

Balão volumétrico de 50 mL

Solução de Carbonato de Sódio a 10%

Espectrofotômetro UV/Vís

Cubetas de acrílico de 1 cm

Balança Analítica

c) Método Cromatográfico por CLAE

Metanol

Padrão primário de Captopril

Padrão primário de Disulfeto de Captopril

Cromatógrafo Líquido

Detector 220 nanômetros

Coluna de Fase Reversa L1

Balança Analítica

3.3 Doseamento por Método Analítico

3.3.1 Método Analítico Titulométrico por Óxido-Redução

O procedimento analítico utilizado para as análises das amostras foi adaptado da monografia oficial descrito na Farmacopéia Americana, referente à matéria-prima do Captopril.

Foi preparada uma solução de iodato de potássio 0,1N em água destilada e padronizada com solução de permanganato de potássio 0,1N S.V. Procedeu-se a determinação do peso médio de cada comprimido e 3 alíquotas do pó desta amostra, equivalente a 300 mg de capotpril, foram pesadas. Cada tomada de ensaio foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados 1g de iodeto de potássio, 100 mL de água destilada, 10 mL de ácido sulfúrico 3,6 N e 2 mL de goma de amido 1%. Realizou-se a titulação utilizando iodato de potássio 0,1 N S.V. até coloração azul persistente por 30 segundos.

Foram pesadas 3 alíquotas, sendo que cada alíquota apresentava cerca de 300 mg de padrão secundário de Captopril e procedeu-se a titulação das mesmas. Um branco foi preparado nas mesmas condições que a amostra, com exceção do Captopril, sendo também este titulado.

Para avaliação do placebo (formulação sem o ativo - Captopril), foram pesadas 3 alíquotas do pó, com peso equivalente as tomadas de ensaio do pó dos comprimidos da amostra padronizada, descontando-se as 300 mg de Captopril, as quais foram submetidas as mesmas condições da análise anterior.

O cálculo foi efetuado considerando que cada mL de iodato de potássio 0,1N equivale a 21,73 mg de Captopril, segundo a United States Pharmacopeia XXIV (1999, p.263).

Os atributos da validação descritos nos itens 3.4.1.a ao 3.4.1.e foram analisados titulometricamente..

3.3.2 Método Espectrofotométrico

Segundo o trabalho de RAGHUVEER (1991, p.117-118), o método se baseia na reação do Captopril com o reagente de Folin-Ciocalteau (reagente FC). O fármaco interage com o reagente na presença da solução de carbonato de sódio formando uma coloração azul cromógeno, o qual é exibido em uma

absorção máxima de 670 nm. O cromógeno é estável por uma hora e a lei de Beer's é obedecida na concentração média de 10-100 mcg/mL.

Utilizou-se para a determinação espectrofotométrica do Captopril um espectrofotômetro UV-Vís Cary 50 conc. O reagente FC foi diluído 1:2 e a solução a 10% de carbonato de sódio foi preparada usando como diluente água destilada. Uma solução padrão USP de Captopril foi preparada dissolvendo 50 mg deste em 50 mL de água destilada em frasco calibrado. Vinte comprimidos de Captopril foram pesados e triturados, sendo que 50 mg deste pó foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL, dissolvidos em água destilada e após completado o volume do balão a solução foi filtrada.

O procedimento do método foi realizado utilizando um volume de 2,5 mL da solução do fármaco em frasco volumétrico de 25 mL e adicionando-se 6 mL da solução de carbonato de sódio 10%. A mistura foi agitada por dois minutos sendo posteriormente adicionados 4 mL de reagente FC sobre a mesma. O tempo de reação permitido foi de quinze minutos e, em seguida completou-se o volume do frasco de 25 mL com água destilada. A solução foi medida em 670 nm frente a um branco, o qual foi preparado com todos os reagentes, porém sem o princípio ativo - Captopril.

Os atributos da validação descritos nos itens 3.4.1.a ao 3.4.1.e também foram analisados espectrofotometricamente.

3.3.3 Método Cromatográfico

A metodologia utilizada segue a descrita na United States Pharmacopeia XXIV (1999, p. 2149-2163). Para a fase móvel preparou-se uma mistura de 550 mL de metanol e 450 mL de água contendo 0.50 mL de ácido fosfórico, fazendo ajustes se necessário. O padrão foi preparado utilizando 10,7 mg de padrão Captopril e 0,05 mg de disulfeto de Captopril em fase móvel, obtendo assim uma solução com concentração conhecida de 1,07mg/mL e 0,05 mg/mL, respectivamente.

O doseamento foi realizado transferindo um mínimo de 20 comprimidos para um balão volumétrico com capacidade de 25 mL onde foi adicionado a fase móvel até a sua metade e agitado por cerca de 15 minutos. Em seguida, foi completado o volume do frasco volumétrico com fase móvel, sendo o material posteriormente centrifugado. Quando necessário, diluiu-se quantitativamente o material com a fase móvel, obtendo-se assim uma solução com concentração de cerca de 1 mg/mL de Captopril.

Também neste caso os atributos da validação, descritos nos itens 3.4.1.a ao 3.4.1.e foram analisados cromatograficamente.

3.4 Validação de Métodos Analíticos

A validação de um método é uma etapa muito importante e necessária para que o método desenvolvido possa ser utilizado. A Figura 3 mostra um esquema das etapas envolvidas no processo de desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico.

3.4.1 Testes dos Atributos dos Programas de Validação

Os métodos titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico utilizados para a quantificação do princípio ativo Captopril, nas análises referentes aos testes dos atributos do programa de validação, estão descritos nos itens 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3, respectivamente.

a) Teste de Exatidão (Acuracidade)

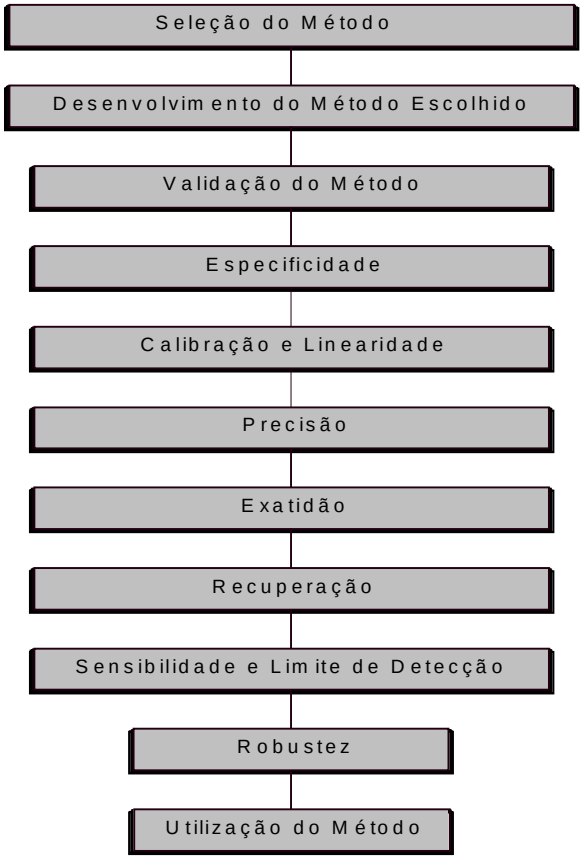
A exatidão foi verificada adicionando-se quantidades conhecidas do princípio ativo à formulação placebo em três concentrações diferentes: 80, 100 e 120% cobrindo a faixa especificada do produto que varia de 90 a 110%. Também a exatidão foi avaliada para o placebo e para o padrão. As análises

foram realizadas em 3 replicatas para as concentrações de 80% e 120%, bem como para o placebo e padrão. Para a concentração de 100% foram realizadas em 6 replicatas (FDA, 1996).

A reportagem dos resultados se deu através do cálculo da porcentagem de exatidão, através do ensaio da quantidade conhecida do Captopril, adicionada à amostra. Para o cálculo dos resultados de cada análise foi usada a seguinte equação (Cass, 2001):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração obtida x } 100\%}{\text{concentração teórica}}$$

Figura 2: Cronograma do Desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico.



Fonte: Cass, 2001.

b) Teste de Precisão

O teste de precisão avalia os critérios de repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade. Neste trabalho será avaliado o critério repetibilidade, considerado o mais importante pela United States Phamacopeia XXIV (1999, p.2150).

Para a realização do referido teste utilizou-se de uma formulação a 100% de Captopril como amostra. Segundo a metodologia de Pecora (2000, p.1-45) foram efetuadas análises por dois operadores: A e B. O operador A realizou por quatro dias consecutivos, 6 replicatas da amostra 100%, enquanto que o operador B realizou análises de 6 replicatas da mesma amostra por um período de 6 dias consecutivos, sendo que este iniciou suas análises na mesma data que o operador A.

A precisão de um método é avaliada através do desvio-padrão e/ou coeficiente de variação das medidas obtidas, onde o coeficiente de variação não deve ultrapassar 15%.

Foram calculadas as medidas estatísticas de tendência central (média), de variabilidade (desvio-padão, coeficiente de variação) e as medidas de posição (máximo e mínimo) através do programa Microsoft Excel versão 97.

c) Teste de Especificidade

A especificidade é habilidade de um método separar, do composto de interesse, componentes que estão presentes na amostra. O teste assegura que o procedimento não é afetado pela presença de impurezas ou excipientes (Cass, 2001). Assim, para este atributo foi realizado uma análise geral dos métodos de doseamento. No caso dos métodos volumétrico e espectrofotométrico realizou-se uma análise de um placebo que foi comparado com uma amostra, enquanto que no cromatográfico foi realizada uma análise

de um padrão que comparou-se com uma amostra, demonstrando assim, se havia ou não interferência com o princípio ativo em questão.

d)Teste de Linearidade e Variação

No critério de linearidade foram utilizadas cinco concentrações diferentes que variaram de 80 a 120% da concentração do teste, ou seja, dentro e nos extremos da faixa de aceitação do produto, tanto para o padrão quanto para amostra.

Foram utilizadas para a realização do teste 3 replicatas das concentrações 40, 60, 80 e 120% e 6 replicatas da concentração 100% do teor declarado para o padrão. Também foram realizadas 3 replicatas das concentrações 80, 90, 110 e 120% e 6 replicatas da concentração de 100% do teor declarado para a amostra.

A avaliação estatística dos resultados se baseou no trabalho de Pecora (2000, p.1-45), e se deu através da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados, verificando-se o quanto esta reta descreve os pontos por intermédio de seu coeficiente de correlação (r). Valores de $r > 0,99$ são aceitáveis na maioria dos métodos analíticos.

e) Robustez

Capacidade que o método apresenta em fornecer resultados inalterados quando sujeito a pequenas mudanças como: diferentes analistas, dias alternados, temperatura do ambiente, entre outros. Portanto, foi utilizado para avaliação deste teste, condições de analistas e dias diferentes.

Este capítulo apresentou a metodologia utilizada no presente estudo, bem como uma descrição detalhada dos atributos da validação. A pesquisa apresentou enfoque experimental qualitativo e quantitativo, sendo as análises voltadas para o enfoque quantitativo .

O capítulo seguinte mostrará os resultados encontrados com a realização da pesquisa, através das análises quantitativas dos métodos titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico no doseamento do Captopril.

4 RESULTADOS

4.1 Método Titulométrico

A titulação do Captopril padrão secundário com iodato de potássio 0,1N forneceu resultados compatíveis com os limites de aceitação farmacopeicos. A média das três titulações foi de 99,57%. Os resultados da titulação do placebo da amostra padronizada foram praticamente iguais aqueles obtidos com a titulação do branco do solvente, ou seja, 0%.

A Tabela 4 apresenta os resultados com a titulação por óxido-redução da amostra padronizada dos comprimidos de Captopril, para o atributo da *exatidão.* Este atributo foi determinado segundo a equação 3.4.1.a.

Tabela 4: Valores de exatidão obtidos com a titulação por óxido-redução.

AMOSTRA (An)	CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS					
	80 mg		100 mg		120 mg	
	Concentração obtida (mg)	Valores da exatidão (%)	Concentração obtida (mg)	Valores da exatidão (%)	Concentração obtida (mg)	Valores da exatidão (%)
A1	79,02	98,77	98,62	98,62	119,6	99,66
A2	79,62	99,52	99,25	99,25	117,83	98,19
A3	79,07	98,83	99,02	99,02	119,68	99,73
A4	78,06	97,57	98,04	98,04	117,49	97,90
A5	78,02	97,52	99,06	99,06	117,93	98,27
A6	78,09	97,61	98,45	98,45	118,2	98,50

Fonte: LEPEMC, 2001.

A *precisão* do método titulométrico foi avaliada através do desvio-padrão (DP) e do coeficiente de variação (CV) conforme Tabela 5.

Tabela 5: Resultados da precisão obtidos através do desvio-padrão e coeficiente de variação .

Amostra (An)	Operador A	Operador B	Operador A	Operador B	Operador A	Operador B	Operador B	Operador B
	Dia 02	dia 02	dia 03	Dia 03	dia 04	dia 04	dia 05	dia 06
A1	97,23	97,70	101,07	98,12	98,02	99,70	98,52	97,93
A2	98,04	97,72	100,69	98,25	98,78	99,89	98,24	98,02
A3	98,05	97,51	100,94	99,45	98,39	98,76	97,65	98,49
A4	98,73	98,53	99,62	98,34	99,61	99,29	98,42	98,73
A5	98,47	99,08	99,86	98,50	98,97	98,51	96,91	98,18
A6	97,44	98,55	100,92	98,04	98,93	99,20	98,52	97,99
Média	97,99	98,18	100,52	98,45	98,94	99,23	98,04	98,22
Máx.	98,73	99,08	101,07	99,45	99,61	99,89	98,52	98,73
Mín.	97,23	97,51	99,62	98,04	98,39	98,51	96,91	97,93
DP	**0,577**	**0,626**	**0,619**	**0,516**	**0,441**	**0,529**	**0,644**	**0,320**
CV	**0,590**	**0,640**	**0,620**	**0,520**	**0,450**	**0,530**	**0,660**	**0,330**

Fonte: LEPEMC, 2001.

A figura 4 demonstra que a precisão obtida através da média dos valores encontrados com o método titulométrico se concentraram abaixo do valor teórico (100 mg). Os desvios-padrões variaram do mínimo de 0,320 observado no operador B dia 6 até o desvio-padrão máximo de 0,626 no operador B dia 2. Nota-se que os valores medidos não convergiram a uma só medida, variando de acordo com o operador e o dia.

Para a observação da *especificidade* do método, verificou-se que não há interferência dos excipientes da formulação com o princípio ativo da mesma, independentemente da sua concentração, de acordo com os dados apresentados na Tabela 06.

Figura 3: Desenho esquemático da precisão em relação a média, erro padrão e desvio-padrão das concentrações segundo o operador e o dia para o método titulométrico.

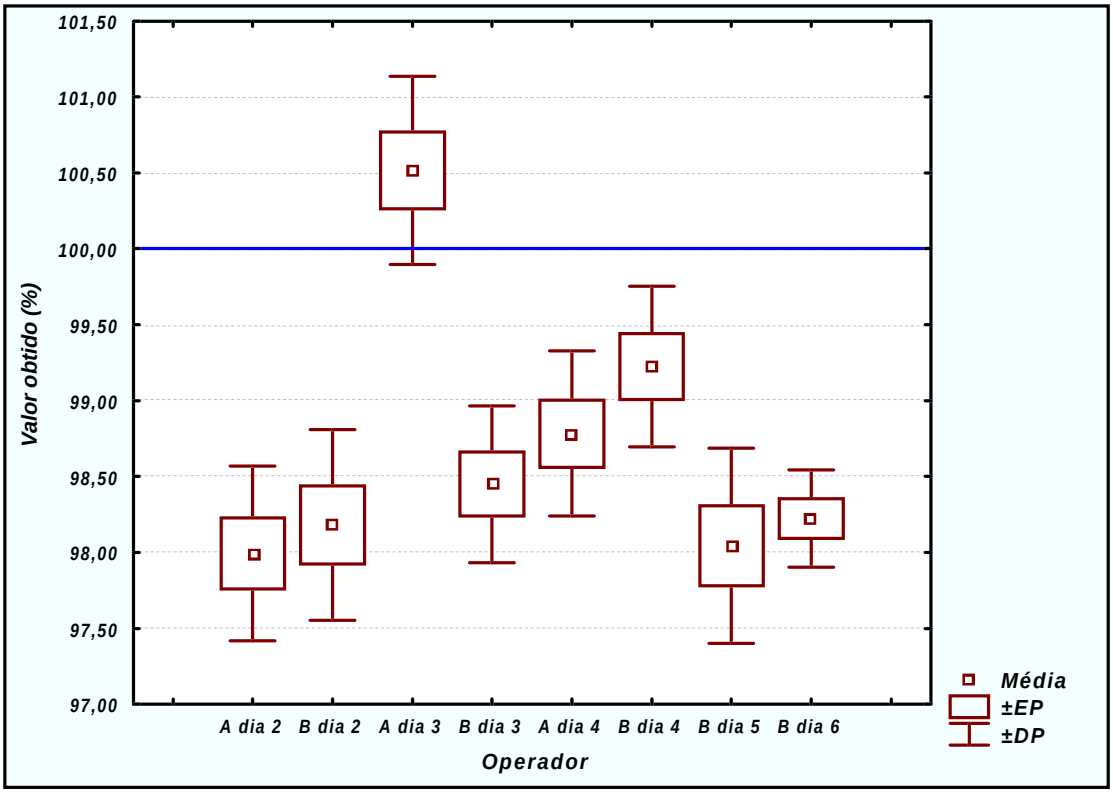


Tabela 6: Resultados da especificidade obtidos através do análise titulométrica.

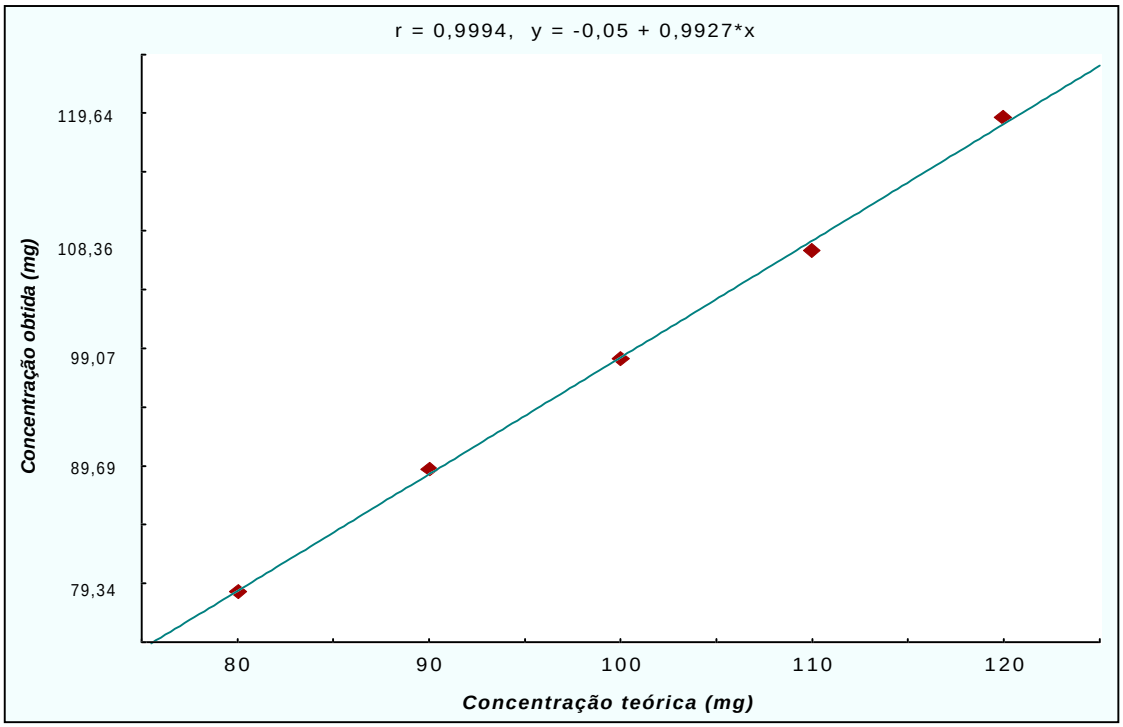
Concentração (mg)	Placebo (%)	Amostra (%)
80	0	78,06
80	0	78,02
80	0	78,09
100	0	99,62
100	0	100,69
100	0	100,94
120	0	118,53
120	0	119,75
120	0	117,49

Fonte: LEPEMC, 2001.

Nas experiências para a determinação da *linearidade,* os ensaios com a amostra padronizada de placebo mostraram que não houve reação colorimétrica. Quando foram adicionadas quantidades sucessivas de amostra de Captopril neste placebo, a reação desenvolveu-se normalmente com a formação do produto colorido. Na Figura 5 está ilustrado o resultado obtido para a amostra padronizada de comprimidos após o teste de linearidade.

Com um coeficiente de correlação (*r*) de 0,9994, a correlação se apresenta praticamente perfeita, ou seja, os valores crescem no mesmo sentido e estão muito próximos de 1. A variação Y em função de X pode ser explicada pelo modelo linear Y= -0,05 + 0,9927*X.

Figura 4: Reta de regressão linear entre a concentração obtida e a concentração teórica para o método titulométrico.



Quando o método titulométrico foi submetido a aplicação do atributo *robustez*, verificou-se que com a inserção de pequenas e deliberadas mudanças, este pode sofrer algum tipo de alteração, como por exemplo, variação na quantificação do princípio ativo do comprimido quando executado por outro analista.

4.2 Método Espectrofotométrico

O doseamento do padrão secundário de Captopril com o reagente de Folin-Ciocalteau forneceu resultados compatíveis com os limites de aceitação farmacopeicos. Foram realizadas três análises espectrofotométricas e a média foi de 99,85%. Os resultados das análises do placebo foram praticamente 0%.

Para o atributo da *exatidão,* os resultados obtidos com a análise espectrofotométrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteau da amostra padronizada de comprimidos de Captopril estão apresentados na Tabela 7. A equação apresentada no item 3.4.1.a foi usada na determinação da exatidão das amostras.

Tabela 7: Valores de exatidão obtidos com a análise espectrofotométrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteau.

AMOSTRA (An)	CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS					
	80 mg		100 mg		120 mg	
	Concentração obtida (mg)	Valores da exatidão (%)	Concentração obtida (mg)	Valores da exatidão (%)	Concentração obtida (mg)	Valores da exatidão (%)
A1	79,67	99,58	101,10	101,10	120,30	100,25
A2	84,17	105,21	103,17	103,17	115,61	96,34
A3	84,75	105,93	100,81	100,81	115,07	95,89
A4	75,16	93,95	102,07	102,07	120,97	100,80
A5	81,15	101,43	100,46	100,46	116,94	97,45
A6	81,94	102,42	101,27	101,27	115,40	96,16

Fonte: LEPEMC, 2001.

A *precisão* do método espectrofotométrico foi avaliada através do desvio-padrão e do coeficiente de variação conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados da precisão obtidos através do desvio-padrão e coeficiente de variação.

Amostra (An)	Operador A	Operador B	Operador A	Operador B	Operador A	Operador B	Operador B	Operador B
	Dia 02	dia 02	dia 03	dia 03	dia 04	dia 04	dia 05	dia 06
A1	101,27	99,50	98,61	100,90	98,47	98,81	97,19	97,12
A2	101,81	100,95	99,82	101,40	98,61	101,00	100,20	101,40
A3	101,28	102,57	98,31	99,50	99,50	101,40	99,82	100,20
A4	100,81	99,82	99,55	99,82	99,27	97,02	101,50	99,82
A5	98,31	100,30	99,27	97,02	101,00	102,10	102,20	101,50
A6	101,10	99,55	104,80	98,12	100,30	99,01	97,76	102,20
Média	100,76	100,45	100,06	99,46	99,73	99,88	99,77	100,37
Máx.	101,81	102,57	104,80	101,40	101,00	102,10	102,20	102,20
Mín.	98,31	99,50	98,31	97,02	98,61	97,02	97,19	97,12
DP	**1,245**	**1,173**	**2,379**	**1,651**	**0,913**	**1,919**	**1,976**	**1,809**
CV	**1,24**	**1,17**	**2,38**	**1,66**	**0,92**	**1,92**	**1,98**	**1,80**

Fonte: LEPEMC, 2001.

Com relação a precisão do método espectrofotométrico, observa-se que apesar da média deste se encontrar ao redor do valor teórico, a variabilidade dos valores encontrados são bem superiores ao método titulométrico, como pode ser observado na Figura 6.

Na determinação da *linearidade,* os ensaios apresentaram o mesmo comportamento do Método Titulométrico, ou seja, para os ensaios com a amostra padronizada de placebo não houve reação colorimétrica, e quando adicionada de quantidades sucessivas de Captopril houve a formação do produto colorido. Este resultado pode ser observado na Figura 7.

Figura 5: Desenho esquemático da precisão em relação a média, erro padrão (EP) e desvio-padrão (DP) das concentrações segundo o operador e o dia para o método espectrofotométrico.

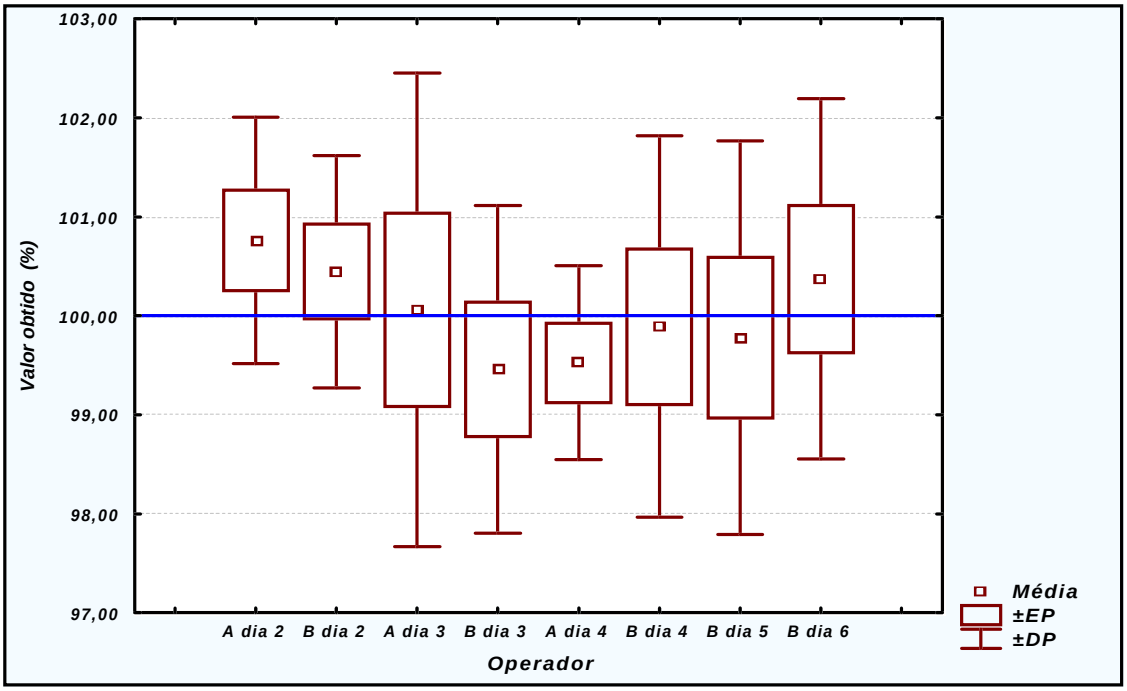
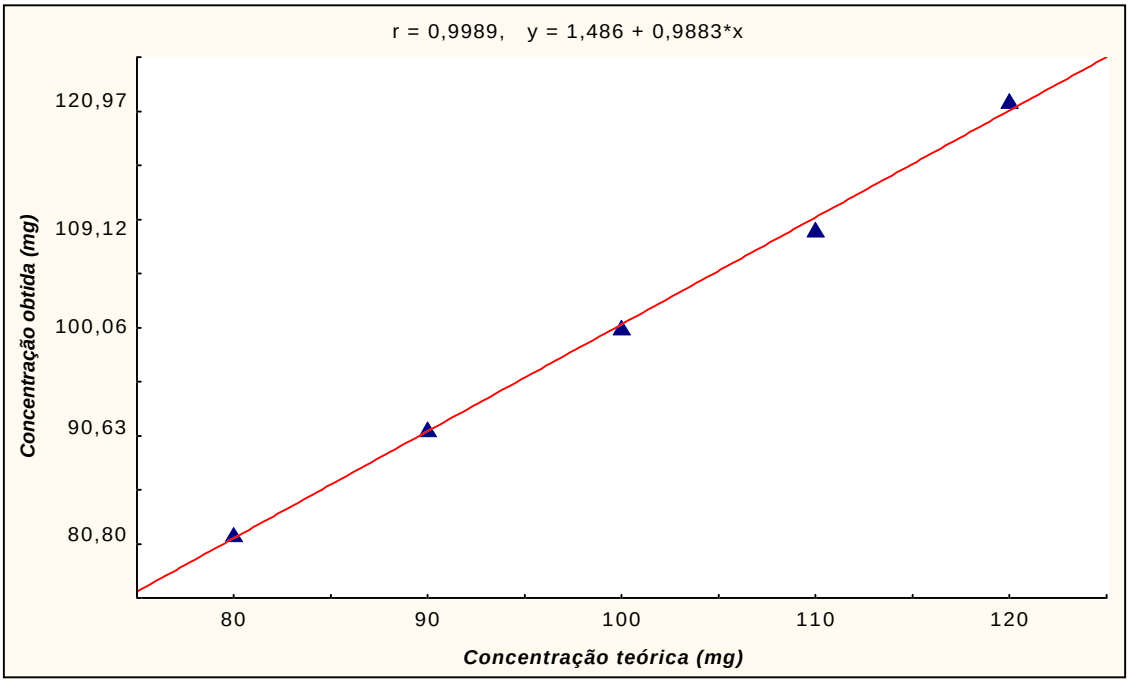


Figura 6: Reta de regressão linear entre a concentração obtida e a concentração teórica para o método espectrofotométrico.



Na observação da *especificidade* do método, demonstrou-se que não há interferência dos excipientes da formulação com o princípio ativo da mesma, independentemente da sua concentração, de acordo com os dados apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados obtidos para as análises do placebo e das amostras em relação a especificidade.

Concentração (mg)	Placebo (%)	Amostra (%)
80	0	81,94
80	0	81,15
80	0	81,42
100	0	101,10
100	0	103,77
100	0	100,81
120	0	120,30
120	0	120,97
120	0	116,94

Fonte: LEPEMC, 2001.

A correlação entre as duas variáveis foi quase perfeita positiva (r = 0,9989). O modelo linear proposto foi Y= 1,486 + 0,9883*X (Observar Figura 7).

Na aplicação do atributo *robustez,* as análises espectrofotométricas demonstraram idêntico comportamento às análises titulométricas, ou seja, verificou-se que com pequenas mudanças o método pode sofrer variação. Como exemplo, pode-se citar a variação de temperatura do ambiente.

4.3 Método Cromatográfico

O padrão primário de Captopril USP – United States Pharmacopea, apresenta um teor de 100%, valor este compatível com os limites de aceitação farmacopeicos. As análises cromatográficas do placebo apresentaram resultados que foram praticamente nulos.

Os resultados da *exatidão*, obtidos com a análise cromatográfica da amostra padronizada de comprimidos de Captopril estão na Tabela 10. A equação que se encontra no item 3.3.1.a foi aplicada para determinação deste atributo nas amostras.

Tabela 10: Valores da exatidão obtidos com a análise cromatográfica.

AMOSTRA (An)	CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS					
	80 mg		100 mg		120 mg	
	Concentração obtida (mg)	Valores da exatidão (%)	Concentração obtida (mg)	Valores da exatidão (%)	Concentração obtida (mg)	Valores da exatidão (%)
A1	79,37	99,21	100,71	100,71	120,09	100,75
A2	83,61	104,51	98,81	98,81	120,13	100,10
A3	75,97	94,96	99,84	99,84	120,66	100,55
A4	85,86	107,32	99,91	99,91	122,57	102,14
A5	86,82	107,90	100,34	100,34	119,75	99,79
A6	83,54	104,42	99,64	99,64	124,48	103,73

Fonte: LEPEMC, 2001.

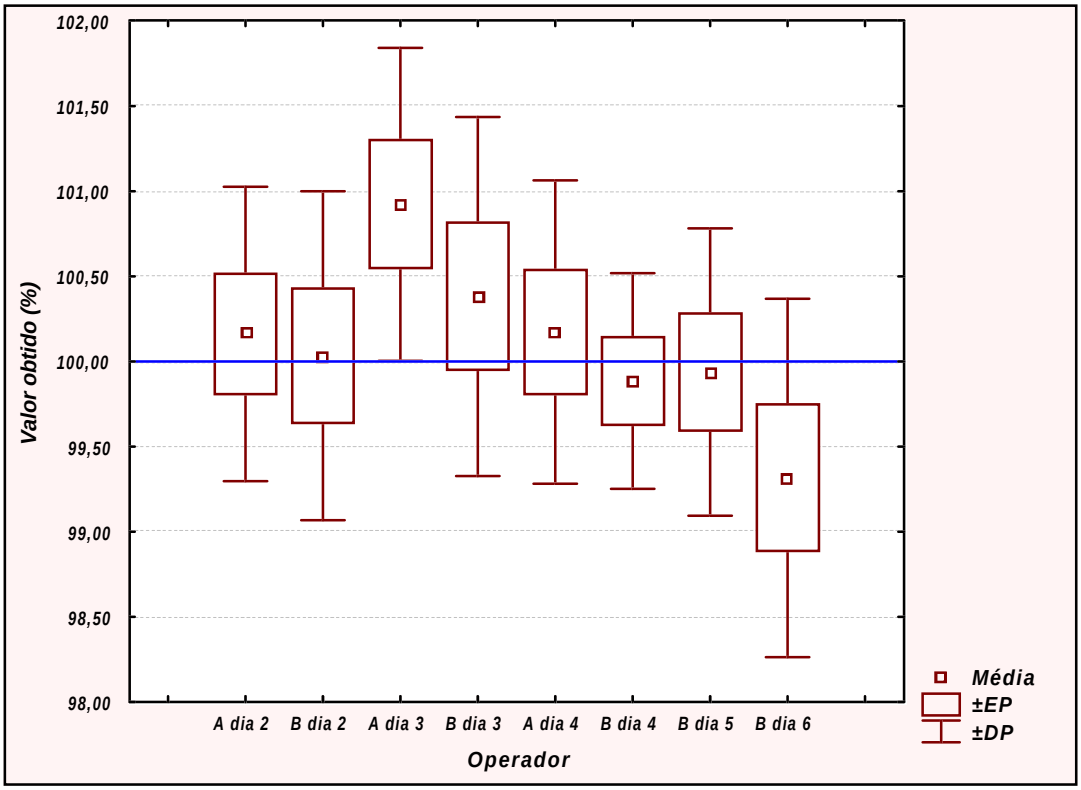
Para o atributo da *precisão* utilizou-se uma avaliação através do desvio-padrão e do coeficiente de variação das análises cromatográficas, conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 : Resultados da precisão obtidos através do desvio-padrão e coeficiente de variação.

Amostra (An)	Operador A Dia 02	Operador B dia 02	Operador A dia 03	Operador B dia 03	Operador A Dia 04	Operador B dia 04	Operador B dia 05	Operador B dia 06
A1	100,71	98,81	100,88	100,79	99,13	99,91	100,72	98,81
A2	101,35	99,91	100,01	99,13	100,01	100,71	100,20	97,81
A3	98,81	99,13	102,59	101,81	101,14	100,34	99,13	99,15
A4	99,84	101,35	100,2	99,13	100,72	99,84	100,88	99,13
A5	99,91	100,20	100,72	100,71	100,90	98,86	99.91	100,20
A6	100,34	100,79	101,14	100,72	99,13	99,64	98,78	100,79
Média	100,16	100,03	100,92	100,38	100,17	99,88	99,94	99,315
Máx.	101,35	101,35	102,6	101,8	101,14	100,7	100,88	100,79
Mín.	98,81	98,81	100,00	99,13	99,13	98,86	98,78	97,81
DP	**0,865**	**0,966**	**0,919**	**1,055**	**0,813**	**0,633**	**0,844**	**1,053**
CV	**0,86**	**0,97**	**0,91**	**1,05**	**0,81**	**0,63**	**0,84**	**1,06**

De acordo com a Figura 8, os valores obtidos pelo método cromatográfico centraram em tordo do valor teórico (100%), exceto para os dias 3 e 6, onde as médias encontradas pelo operadores assumiram valores dispersos do restantes dos dias. Percebe-se ainda que a variabilidade (desvio-padrão) oscilou de 0,633 a 1,055.

Figura 7: Desenho esquemático da precisão em relação a média, erro padrão (EP) e desvio-padrão (DP) das concentrações segundo o operador e o dia para o método cromatográfico.



Conforme pode-se observar, a determinação da *especificidade* do método apresenta o mesmo comportamento do Método Titulométrico e Espectrofotométrico, ou seja, não ocorre influência dos excipientes da formulação com o princípio ativo da mesma, independentemente da sua concentração. Estes dados estão apresentados na Tabela 12 e Anexos 7.1, 7.2 e 7.3.

Tabela 12: Resultados obtidos para as análises do placebo e das amostras, em relação a especificidade.

Concentração (mg)	Placebo (%)	Amostra de Captopril (%)	Amostra de Disulfeto de Captopril (%)
80	0	79,37	0,1315
80	0	83,61	0,1226
80	0	75,97	0,1065
100	0	100,72	0,1868
100	0	100,01	0,1708
100	0	100,20	0,1476
120	0	119,75	0,2152
120	0	120,09	0,1674
120	0	121,42	0,2118

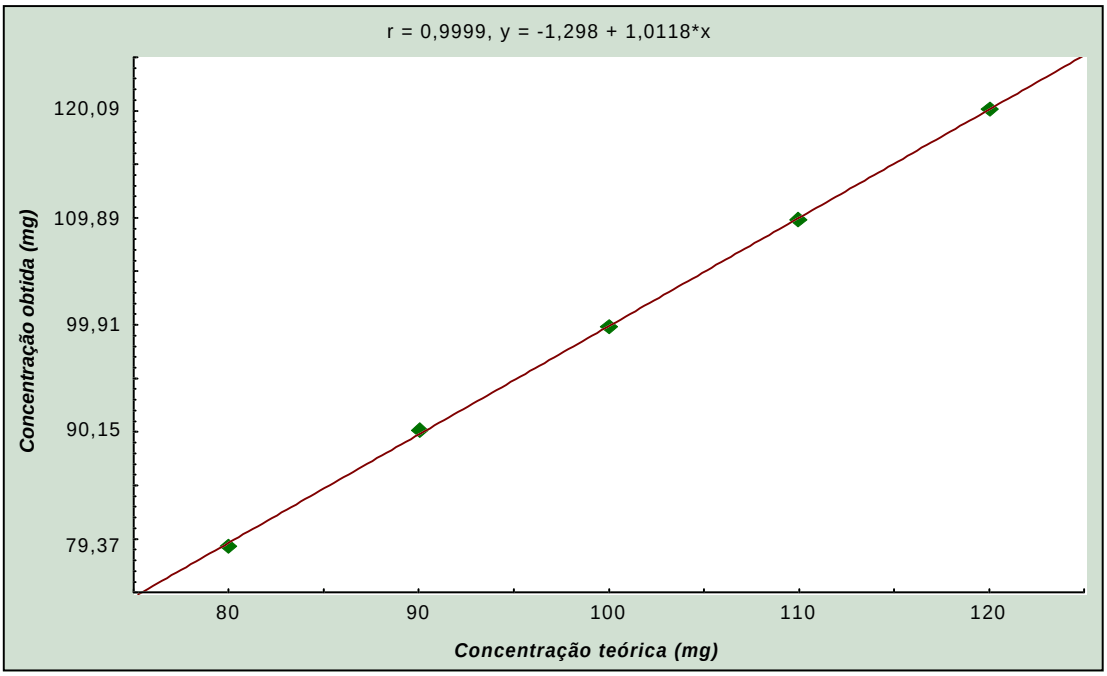
Fonte: LEPEMC, 2001.

Nos ensaios com a amostra de placebo para a determinação do atributo da *linearidade,* foi possível observar o mesmo comportamento dos Métodos Titulométrico e Espectrofotmétrico, ou seja, não houve a quantificação e identificação do princípio ativo, porém quando da adição do mesmo, a reação desenvolveu-se normalmente. O resultado obtido está ilustrado na Figura 9.

A correlação entre a concentração teórica e o valor encontrado tendeu para uma correlação perfeita positiva (r = 0,9999) e o modelo linear pode ser dado pela equação Y= -1,298 + 1,0118*X.

Na aplicação do atributo *robustez,* as análises cromatográficas demonstraram o idêntico comportamento dos Métodos Titulométrico e Espectrofotométrico. Assim, verificou-se que pequenas mudanças como analistas diferentes, temperatura variada, podem influenciar o método.

Figura 8: Reta de regressão linear entre a concentração obtida e a concentração teórica para o método cromatográfico.



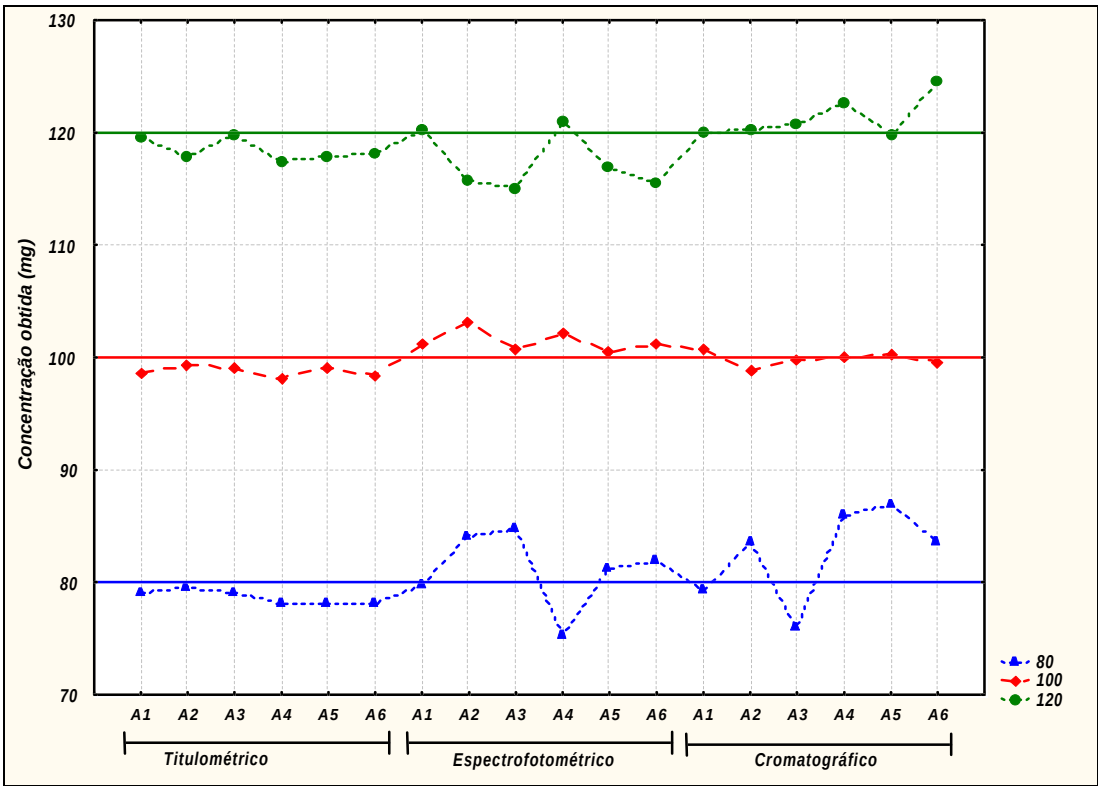
4.4 Análise Comparativa entre os Métodos

4.4.1 Exatidão

Observando a Figura 10, percebe-se que as amostras de concentração 100% foram melhores medidas em relação a outras concentrações, independente do método, cujo os valores encontrados são os que mais se aproximam do valor teórico.

Com relação ao método utilizado, tem-se que o método titulométrico foi o melhor na medição de amostras com diferentes concentrações, sendo que apresenta uma maior exatidão para as concentrações 80 e 100mg. O método espectrofotométrico foi o que demonstrou valores mais distantes da concentração teórica com grande variação. O método cromatográfico, por sua vez, apresentou para a concentração de 100 mg os melhores resultados (bem próximos ao valor teórico), porém, o método não teve a mesma exatidão para as demais concentrações.

Figura 9: Comparação dos métodos titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico para o atributo exatidão.



4.4.2 Precisão

O método titulométrico teve uma baixa variabilidade dos valores encontrados, porém com uma menor precisão, dado que a média está afastada do valor teórico de 100%. O método espectrofotométrico apresenta uma média mais próxima do valor teórico, porém com uma alta variabilidade dos valores encontrados. De acordo com a Figura 11, o melhor método em relação ao atributo da precisão foi o método cromatográfico, onde obteve uma média bem próxima do valor teórico, com a vantagem da menor variabilidade entre os três métodos.

4.4.3 Linearidade

Em relação ao atributo linearidade não percebe-se diferenças notáveis entre os métodos, todas com forte correlação linear entre a concentração obtida com a concentração teórica, pórem, observando o coeficiente *r*, nota-se que o método cromatográfico foi o que apresentou maior correlação linear, e pode-se destacar

também, que dentro dos limites é possível se fazer uma interpolação, não justificando uma extrapolação das análises, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 10: Comparação do atributo precisão entre os métodos titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico.

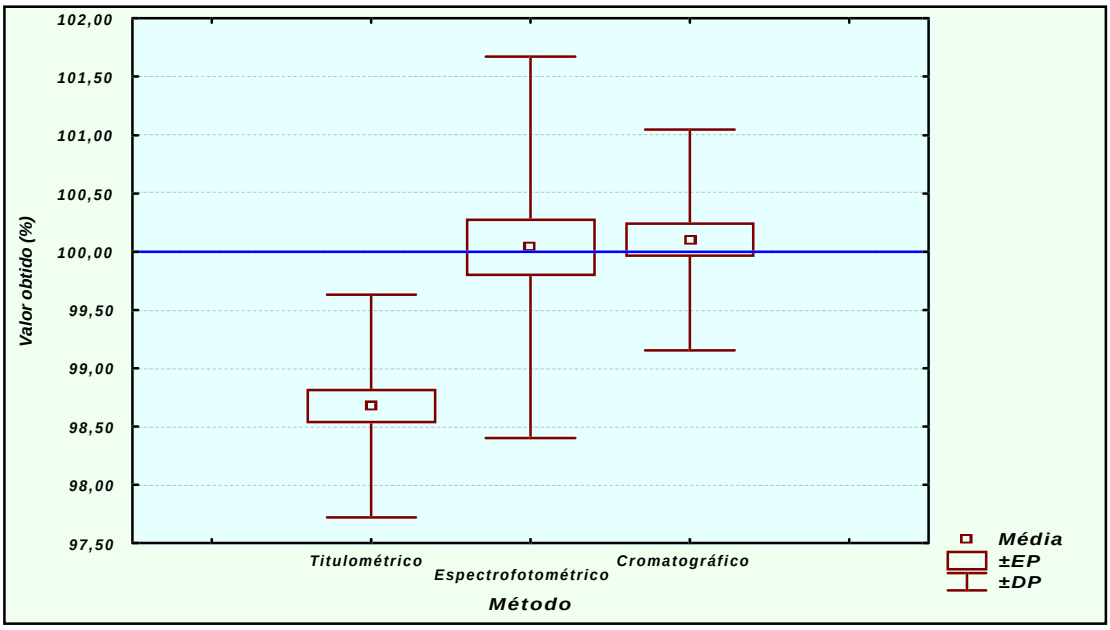
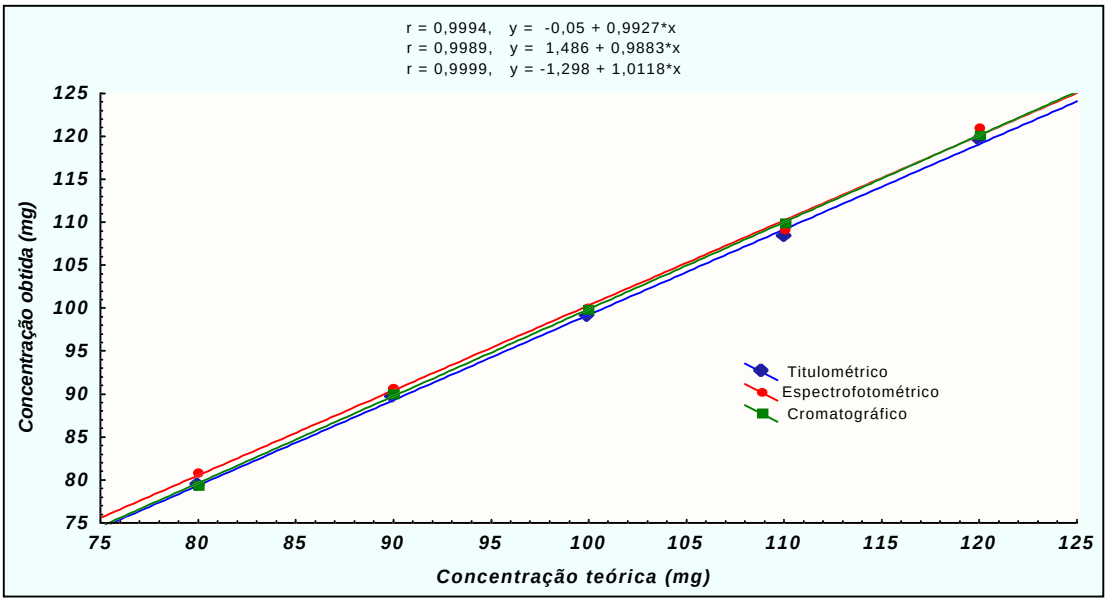


Figura 11: Comparativo entre os métodos titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico referente ao atributo linearidade.



4.5 Discussão

Para a apresentação de uma metodologia analítica por códigos oficiais é necessário que esta tenha sido devidamente validada a partir de uma amostra preparada especificamente para este fim. Neste trabalho, uma vez selecionada a substância (Captopril) que serviria de suporte para o estudo da validação, preocupou-se em analisar três métodos com características de qualidade e custo diferentes para os laboratórios farmacêuticos.

Toda e qualquer mudança na fórmula, no processo de fabricação ou na troca de reagentes para as análises quantitativas do medicamento é fator determinante para a revalidação do método. Assim, a amostra padronizada e preparada para este trabalho é provavelmente diferente daquela utilizada para a validação da metodologia oficial, necessitando desta forma nova validação. Além deste fator, o LEPEMC também está validando as metodologias analíticas que poderão ser utilizadas na quantificação do produto Captopril fabricado por este laboratório. Como demonstrado, uma amostra de placebo também foi analisada pelos três métodos, para a observação de possíveis interferências dos excipientes. A quantificação do placebo foi praticamente nula, valor este suficiente para inferir que não houve a necessidade de estudo mais detalhado dos métodos.

Dispondo de uma amostra adequada, o analista deve dar atenção a questão da escolha da técnica ou técnicas mais apropriadas às determinações de seu produto. Uma das decisões mais importantes a tomar é a escolha do processo mais eficaz para a análise. Para poder chegar a uma decisão correta, o analista deve estar familiarizado com os detalhes práticos de várias técnicas e com os princípios sobre os quais elas estão baseadas: exatidão, precisão e linearidade, conhecendo em quais condições e qual método é confiável. Deve-se também levar em consideração o tempo e o custo da análise. Pode acontecer que o método mais exato para determinação de análise seja demorado ou requeira reagentes e equipamentos caros, como por exemplo a CLAE. Nestes casos, pode ser indicado a escolha de um outro método, que embora um pouco menos exato, produza resultados satisfatórios

num intervalo de tempo razoável e sendo ainda econômico, como é o caso da titulometria e da espectrofotometria.

4.6 Diagnóstico

Os métodos titulométricos são, via de regra, susceptíveis de precisão (uma parte em mil), apresentam aparelhagem simples e são de rápida execução, porém a sua reação deve ser simples e praticamente instantânea ou com grande velocidade. Apresentam como desvantagem o ponto final da titulação, que na maioria das vezes é realizada através de mudança de cor verificada através do olho humano.

Os métodos espectrofotométricos são largamente utilizados nas análises quantitativas de fármacos por apresentarem bom nível de exatidão e precisão. Muitos autores admitem que estes métodos, quando bem conduzidos, apresentam valores de exatidão e precisão compatíveis com os níveis de exigência adotados nos códigos oficiais. Além disto, este método é caracterizado por sua ótima sensibilidade, permitindo trabalhar na quase totalidade das análises de fármacos e medicamentos. Em relação a sensibilidade, pode ser feita certa restrição devido a imensa diversificação das estruturas químicas encontradas entre os fármacos. O uso de equipamentos simples e a utilização da água, como solvente para a determinação das análises espectrofofométricas, junto à facilidade de execução, constituem vantagens complementares que justificam o largo emprego do método no controle de qualidade. A estes fatores somam-se o custo relativamente baixo.

Entre os métodos modernos de análise e de utilização considerada indispensável por laboratórios, a cromatografia ocupa lugar de destaque, devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas. Dentre os diversos tipos existentes, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das mais utilizadas, devido a sua característica mais importante que é a elevada eficiência atingida.

A CLAE utiliza equipamentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Apresenta capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta exatidão, precisão e sensibilidade. A CLAE pode ser aplicada tanto para compostos orgânicos, como para inorgânicos. As amostras podem ser líquidas ou sólidas, porém os gases são as únicas amostras que não podem ser determinadas por este tipo de cromatografia.

Mesmo apresentando tantas vantagens, a CLAE também tem algumas restrições, como por exemplo, o alto custo na aquisição da instrumentação nem sempre compensador para alguns laboratórios, devido a um número reduzido de análises a serem realizadas e também na manutenção das fases móveis de alto grau de pureza, das fases estacionárias e das colunas.

O método analítico titulométrico para o produto acabado Captopril, foi adaptado da matéria-prima Captopril referendada na United States Pharmacopeia - USP XXIV (1999). A técnica pode ser considerada simples, levando em consideração a utilização de reagentes fáceis de serem obtidos, não havendo a necessidade de tratamento da amostra. Porém, a mesma também pode ser considerada como não sendo sensível, uma vez que não consegue quantificar seu produto de degradação que é o Disulfeto de Captoril, devido a sua pequena quantidade. Com relação ao método espectrofotométrico, sua grande e fácil utilização envolvendo a técnica selecionada e o uso do equipamento, justifica seu emprego. O método cromatográfico também apresenta execução de técnica simples e têm um diferencial: pode ser considerado o método com melhor sensibilidade, porém de custo elevado.

Com relação a exatidão dos métodos titulométrico, espectrofotométrico e cromatográfico os resultados foram aceitos, pois o atributo correspondeu em todos os casos, ficando somente para quatro amostras valores acima de 105%, que mesmo assim estão dentro da faixa de especificação determinada pela metodologia seguida – USP XXIV (90 a 110%). Contudo, quando se analisa estatisticamente os

métodos em relação aos valores que mais se aproximaram de 100%, o espectrofotométrico e o cromatográfico são os que apresentaram maior variabilidade. Pode-se inferir que tal acontecimento deve-se justamente por estes métodos apresentarem maior sensibilidade, necessitando assim que o analista tenha maior critério na execução das análises.

Os valores encontrados para a precisão nos três métodos foram considerados precisos, pois todos apresentaram um coeficiente de variação menor que 15%, ressaltando o método cromatográfico que apresentou melhor resultado. Neste atributo também pode-se observar que a medida que o método tornou-se mais sensível, maior a necessidade do operador em realizar a técnica com afinco, de trabalhar com reagentes puros, de se controlar a temperatura e a umidade da sala e do equipamento, evitando todo e qualquer tipo de interferente na análise.

Com os dados da linearidade foi possível observar que os três métodos quantificaram concentrações diferentes, apresentando coeficiente de correlação (r) maior que 0,99, significando assim, que os métodos podem ser considerados lineares.

Em relação a especificidade, o método que melhor expressou tal atributo foi o cromatográfico, pois se conseguiu identificar e quantificar mínimas quantidades do produto de degradação (Disulfeto de Captopril) presente no comprimido de Captopril, enquanto que no método titulométrico e espectrofotométrico somente foi possível verificar a presença ou não de Captopril através da análise de placebo.

No atributo da robustez pôde-se verificar que, independente do método, ocorreu pequenas variações quando se mudou de analista ou de reagentes, porém estas alterações não comprometeram a qualidade do método.

Desta forma, nas condições do presente trabalho, pode-se avaliar que a titulação do Captopril com iodato de potássio forneceu resultados satisfatórios para a maioria dos atributos da validação, devendo-se levar em consideração que o presente método não conseguiu quantificar o disulfeto de Captopril, devido a pequena quantidade presente na amostra.

Neste capítulo foram apresentados os resultados obtidos com a pesquisa experimental, a qual foi realizada através de análises titulométrica, espectrofotométrica e cromatográfica do fármaco Captopril, presente nas amostras de comprimidos produzidos no LEPEMC.

No capítulo seguinte serão apresentadas as conclusões finais do presente estudo e algumas sugestões para futuros estudos.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

Na constante busca pela satisfação dos clientes, internos e externos, destacam-se as empresas voltadas para o programa de Qualidade Total, cuja a qualidade do processo é uma das características de destaque. Para que o processo possa resultar em produto ou serviço que corresponda a uma necessidade, utilização ou aplicação que satisfaça o cliente, este deve atender as especificações, estar disponível e proporcionar lucro. Desta forma, foi definido com objetivo geral deste trabalho a análise dos principais atributos da validação de metodologia analítica do Captopril, assegurando tanto a implantação como a confiabilidade dos resultados analíticos

A validação é um dos principais instrumentos da garantia de qualidade, tornando-se ultrapassado o conceito de apenas controla-la. Com este intuito, este trabalho proporcionou condições para se ter uma visão mais ampla da validação, em particular da validação de metodologia analítica, em fase de implantação no LEPEMC, bem como sua importância para outros setores da empresa.

Através da revisão bibliográfica, constatou-se que a validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de instalação de um processo produtivo, de equipamento e, inclusive de metodologia analítica, nos diversos setores onde a qualidade do produto fabricado seja uma das principais razões da existência da empresa.

O modelo proposto e realizado através da parte experimental possibilitou atingir os objetivos específicos do trabalho, definidos como: melhorar o entendimento do processo; conhecer o potencial de falhas e adotar medidas preventivas. Com estas características alcançadas, pode-se assegurar o

cumprimento das normas regulatórias. Os resultados dos métodos foram conclusivos e concretos, aumentando a credibilidade do departamento do controle de qualidade, da produção e da garantia da qualidade.

De uma maneira geral, os três métodos analíticos poderiam ser adotados pelo LEPEMC como métodos de quantificação do Captopril, pois todos os atributos da validação analisados proporcionaram bons resultados. Também, estes mesmos atributos possibilitaram sugerir que o método cromatográfico pode ser considerado o melhor, tendo em vista que este foi o único método que conseguiu quantificar o produto de degradação (Disulfeto de Captopril), presente na forma farmacêutica comprimidos.

Avaliando os resultados obtidos da validação da metodologia analítica do Captopril, pôde-se verificar que mais de um analista, mais de um laboratório e as inúmeras análises, dificultam a implantação do programa. Haverá a necessidade de deslocar funcionários do controle de qualidade somente para a realização da validação, deixando este departamento sem o seu quadro normal de funcionários, além do aumento do custo de produção. Porém, se a alta administração não estiver consciente da necessidade do programa de validação, este pode correr o risco de deixar de existir.

5.2 Sugestões

Dentro da validação de metodologia analítica sugere-se o estudo de novas metodologias espectrofotométricas, como apresentadas por Raggi, Cavrini Pietra e Lacché (1998, p. 19-22) e El Ashry e Ibrahim (1192, p. 1657-1672) na quantificação do Captopril.

Considerando que este trabalho apresenta a utilização da validação de metodologia analítica para o Captopril, poderia ser realizada a validação analítica das matérias primas e produtos acabados que compõe a linha farmacêutica do LEPEMC.

Outro estudo importante a ser realizado é a implantação da validação nos processos produtivos e de limpeza, ou seja, em todas as etapas que compõem a produção do produto. Garantindo a validação no processo como um todo, estará ocorrendo uma interatividade entre diversos setores da empresa.

6 FONTES BIBLIOGRÁFICAS

6.1 Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR ISO 6023, ago.2000.

ATHAIDE, A. Validação comprova e documenta qualidade dos produtos e equipamentos. **Controle de Contaminação**, São Paulo, p.16-22, maio/jun. 2000.

BASSET, J.; DENNEY, R. C.; JEFFERY, G. H.; MENDHAM, J. **Análise inorgânica quantitativa Vogel.** Rio de Janeiro: Guanabara Dois , 1981.

COLLINS, C. H. **Introdução a métodos cromatográficos.** São Paulo: Unicamp, 1990. p. 11-26.

DESENVOLVIMENTO de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e Validação. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Ed. UFSCar. Universidade Federal de São Carlos, Série apontamentos, São Paulo: 2001.

DRUG facts and comparisons. 45. ed. Facts and comparisons division. J.B. Lippincott Company, 1991. p.735-741.

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

ESPIRES, Regina C. **Aspectos da metodologia analítica do metronidazol.** São Paulo, 1998. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

EUROPEAN pharmacopeia. 3. ed. Council of Europe, 1997. p. 535-536.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. v.1, p. v.2.14–v.2.14.4.

FEIGENBAUM, A. V. **Controle da qualidade total.** São Paulo: Makrons Books, v.1, 1994. 205p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Conferência Internacional sobre harmonização, minuta de diretriz sobre a validação de procedimentos**

analíticos: Metodologia, disponibilidade, notificação. Departamento de saúde e serviços humanos, p. 20-44, mar. 1996.

GARFIELD, F. M. **Quality assurance principles for analytical laboratories.** Arlington: Association of Official Analytical Chemistry International, 220 p.

E. R. SQUIBB & SONS, INC. Aplicação de Patente Européia (New Jersey). Neal G. Anderson, Alan F. Feldman; David A. Lust; Robert E. Polomski; Barbara J. Bennett. **Process for direct isolation of captopri.** EP n.PI 0 42743 A1, 06 nov. 1989, 29 oct. 1990. Disponível em: <http// pt.espacenet.com>. Acesso em 26 abril 2001.

ISHIKAWA, K. **Controle de qualidade total: à maneira japonesa.** 6. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1993. 221p.

JACKSON, E. K.; GARRISON, J. C. Renina e angiotensina. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** McGraw-Hill Interamericana,1996. cap. XX.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1988. p. 384-392.

LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. **High performance liquid chromatography:** Fundamental Principles and Practice**.** London, Blackie Academic & Professional, Inprint Chapman & Hall, 1995. p. 1-14.

MAGALHÃES, L. B. N. Anti-hipertensivos. In : SILVA, P. **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 66, p.647-657.

MORETTO, L. D. **Supervisão da Produção.** 3. ed. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1998. 129p.

MORETTO, L.. D.; SHIB M. A era da validação. **Pharmaceutical Technology**, São Paulo, v.4, n.4, p.44-48, ago. 2000.

OHLWEILER, O. A. **Química analítica quantitativa.** Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos, 1985.

PASTEELNICK, L. A. Analytical methods validation. In: BERRY, I. R.; NASH, R. A. **Pharmaceutical process validation.** New York: Marcel Dekker, 1993. cap. 13, p.411-428.

PECORA, M. **Validação de métodos analíticos.** São Paulo, novembro/2000. Apostila**,** p. 1-45.

SILVA, E. L.; MENEZES, E. M. **Metodologia da pesquisa e elaboração de dissertação.** 2. ed. Florianópolis: Laboratório de Ensino a Distância da UFSC, 2001, 118p.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SLACK, N.; CHAMBERS, S.; HARLAND, C.; HARRISON, A.; OHNSTON, R. **Administração da produção.** São Paulo: Atlas 1997, 726p.

THE Index merck. 20. ed. Merck & CO., Inc, Pan-americana copyright convention, 1996. p. 288-289.

THE Pharmaceutical codex. 20. ed. Principles and pratice of pharmaceutics, London: The Pharmaceutical Press, 1994. p. 772-775.

TRIOLA, M. F. **Introdução à Estatística.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1999, 410p.

UNITED States pharmacopeia. 23. ed. Rockville U.S.: Pharmacopeial Convention, 1994. p. 263, 264, 1982-1984.

UNITED States pharmacopeia. 24. ed. Rockville U.S.: Pharmacopeial Convention, 1999. p. 2149-2163.

VALIDATION of analytical procedures: methodology. VICH GL2 (Validation Methodology) Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, July ,1999. p.1-13.