BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Recebido em 25/05/01
F. H. S.

NÃO ULRCS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

**DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES EM
CONTRACEPTIVOS ORAIS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

NÁJLA MOHAMAD KASSAB

Dissertação para obtenção de
MESTRE

Orientadora:

Prof^a Dr^a Maria Inês Rocha Miritello Santoro

SÃO PAULO

2001

16.766

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

**DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES EM
CONTRACEPTIVOS ORAIS POR CROMATOGRAPHIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

NÁJLA MOHAMAD KASSAB

Dissertação para obtenção de
MESTRE

Orientadora:

Prof^ª Dr^a Maria Inês Rocha Miritello Santoro

SÃO PAULO

2001

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

K19d Kassab, Nájla Mohamad
Determinação de hormônios esteróides em contraceptivos orais
por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) / Nájla
Mohamad Kassab. -- São Paulo, 2001.
lv. (várias paginações)

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Santoro, Maria Inês Rocha Miritello

I. Toxicologia 2. Medicamentos : Controle de qualidade 1. T.
II. Santoro, Maria Inês Rocha Miritello, orientador.

615.9 CDD

NÁJLA MOHAMAD KASSAB

DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES EM
CONTRACEPTIVOS ORAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Prof^ª Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro
Orientadora/Presidente

Prof^ª Titular Érika Maria Rosa Kedor
1º Examinador

Prof^ª Dr^ª Regina Lúcia Moraes Moreau
2º Examinador

São Paulo-SP, 30 de janeiro de 2001.

The difference

*God grant me the serenity to
accept the things*

*I cannot change:
the courage to change*

*The things I can:
And the wisdom to know*

The difference...

A Deus,

*"Por que Dele, por Ele e para Ele
são todas as coisas; glória a Ele eternamente".*

(Romanos 12.36)

*A minha querida avó pela sua sabedoria e experiência de vida, aos meus
pais e irmãos pela confiança e crédito na minha pessoa.*

*À prof^a Maria Inês Rocha Miritello Santoro
pela orientação, incentivo e apoio
profissional e pessoal durante a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Aos colegas e amigos da Seção de Farmácia (SEFA) do Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU), pelo apoio, incentivo, colaboração e compreensão dispensados desde o início para realização desta Pós-Graduação.

À coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À prof^ª Elizabeth de Souza Nascimento pela valiosa colaboração na revisão e correção deste trabalho.

À prof^ª Regina Lúcia Morais Moreau pelas sugestões e apoio para a realização deste trabalho.

À prof^ª Érika Rosa Maria Kedor pelas sugestões.

Aos prof. Jorge Luís S. Martins e João Fernandes Magalhães pelo estímulo.

Aos colegas do Curso de Toxicologia.

Aos colegas do laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico: Adriana Osório, Andréia C. Peraro, Elizangela A. Dutra, Fátima Cristina F. E Silva Ixis Ivete T. Hidalgo, Maria S. Aurora Prado, Martin Steppe e em especial aos amigos Anil K. Singh e Maya Hasegawa.

Às funcionárias Iria R. da Silva e Regina M. Rojas pelo companheirismo

Aos bibliotecários Adriana De Almeida Barreiros, Ângelo Antônio pelo auxílio bibliográfico.

À bibliotecária Leila A. Bonadio pela cuidadosa revisão das referências bibliográficas.

Aos laboratórios fornecedores de amostras e padrões.

Ao meu esposo Marcos Serrou do Amaral pela valiosa colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao PICDT-CAPES pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

A todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1. HORMÔNIOS ESTERÓIDES	8
2.1.1. Estrogênios.....	10
2.1.1.1. Estrogênios naturais.....	10
2.1.1.2. Estrogênios sintéticos	12
2.1.1.3. Mecanismo de ação.....	13
2.1.1.4. Ações fisiológicas e farmacológicas dos estrogênios.....	14
2.1.1.5 Ações metabólicas	15
2.1.1.5.1 Efeito dos estrogênios sobre o esqueleto	16
2.1.1.5.2. Efeito dos estrogênios sobre a deposição de proteínas	16
2.1.1.5.3. Efeito dos estrogênios sobre o metabolismo dos	
carboidratos e deposição de gordura.....	17
2.1.1.6. Aplicações terapêuticas.....	18
2.1.1.6.1. Terapia de reposição hormonal (TRH)	18
2.1.1.6.2. Outros usos terapêuticos.....	23
2.1.1.7. Toxicidade dos estrogênios	24
2.1.1.7.1. Ação carcinogênica	25
2.1.1.7.2. Efeitos sobre o sistema cardiovascular	28
2.1.1.7.3. Efeitos sobre o sistema cérebro-vascular	29
2.1.1.8. Mutagenicidade	30
2.1.1.9. Outros efeitos indesejáveis e contra-indicações.....	30

2.1.2. Progestogênios	32
2.1.2.1. Progestogênios naturais : progesterona.....	32
2.1.2.2. Progestogênios sintéticos	33
2.1.2.3. Mecanismo de ação.....	35
2.1.2.4. Ações fisiológicas e farmacológicas dos progestogênios..	36
2.1.2.4.1. Efeitos sobre o aparelho reprodutor.....	37
2.1.2.4.2. Efeitos sobre as mamas	37
2.1.2.4.3. Efeitos sobre o SNC.....	38
2.1.2.4.4. Efeitos sobre o metabolismo	38
2.1.2.5. Aplicações terapêuticas.....	39
2.1.2.5.1. Contracepção.	39
2.1.2.5.2. Terapia de reposição hormonal (TRH).	40
2.1.2.5.3. Usos para diagnósticos.....	40
2.1.2.5.4. Outros usos.	40
2.1.2.6. Toxicidade dos progestogênios	41
2.1.2.6.1. Ação carcinogênica	41
2.1.2.6.2. Mutagenicidade/tumorigenicidade.....	42
2.1.2.6.3. Efeitos sobre a gravidez e feto.....	43
2.1.2.7. Contra-indicações	43
2.2. CONTRACEPTIVOS HORMONAIS.....	44
2.2.1. Tipos de anticoncepcionais hormonais de uso oral	45
2.2.1.1. Anticoncepcionais orais combinados	45
2.2.1.2. Anticoncepcionais – “minipílulas”.....	47
2.2.1.3. Outros tipos de contraceptivos hormonais	47
2.2.2. Mecanismos de ação.....	48
2.2.3. Farmacocinética	49
2.2.3.1. Estrogênios.....	49
2.2.3.2. Progestogênicos.....	50
2.2.4. Uso clínico e benefícios à saúde	52
2.2.5. Interações com outros fármacos.....	54
2.2.6. Considerações sobre os efeitos nocivos dos anticoncepcionais	56
2.2.6.1. Avaliação do efeito carcinogênico	57

2.2.7. Distúrbios vasculares.....	61
2.2.8. Alterações metabólicas e endócrinas.....	68
2.2.8.1. Efeitos sobre o metabolismo dos lipídeos.....	69
2.2.8.2. Efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos.....	69
2.2.9. Alterações genéticas na hemostase	70
2.3. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES	72
2.3.1. Informações gerais sobre os hormônios estudados –	
Propriedades Físico-Químicas	72
2.3.1.1. Etinilestradiol	72
2.3.1.2. Levonorgestrel.....	73
2.3.1.3. Desogestrel	74
2.3.1.4. Gestodeno	74
2.3.2. Métodos de determinação empregando a cromatografia líquida de alta eficiência.....	75
2.3.2.1. Etinilestradiol	75
2.3.2.2. Levonorgestrel.....	77
2.3.2.3. Desogestrel e gestodeno.....	79
3. OBJETIVOS	80
4. PLANEJAMENTO DA PESQUISA.....	82
5. MATERIAL E MÉTODOS	83
5.1. MATERIAL	83
5.1.1. Reagentes e solventes	83
5.1.2. Fármacos empregados como substâncias químicas de referência	84
5.1.3. Soluções padrão	84
5.1.3.1. Soluções estoque	84
5.1.3.2. Soluções intermediárias de trabalho	85

5.1.4. Amostras	85
5.1.5. Placebos	88
5.1.6. Equipamentos, acessórios e vidraria	88
5.2 MÉTODOS.....	90
5.2.1. Padronização das condições cromatográficas para a análise das amostras comerciais e simuladas	90
5.2.1.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos.....	90
5.2.2. Padronização do procedimento para a análise das amostras comerciais e simuladas	91
5.2.2.1. Construção das curvas de calibração	91
5.2.2.2. Linearidade.....	93
5.2.2.3. Interferência dos excipientes.....	94
5.2.2.4. Teste de recuperação - Exatidão.....	94
5.2.2.4.1. Preparação das soluções padrão.....	95
5.2.2.4.2. Preparação das amostras comerciais.....	96
5.2.2.4.3. Preparação das amostras simuladas	97
5.2.2.5. Precisão	97
5.2.2.6. Execução do teste de recuperação	98
5.2.2.7. Determinação dos teores percentuais das amostras comerciais	100
5.2.2.7.1. Análise das amostras do Grupo 1	100
5.2.2.7.2. Análise das amostras do Grupo 2	100
6. RESULTADOS	101
6.1. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	101
6.2. PADRONIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA A ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS E SIMULADAS	102
6.2.1. Análise da combinação ETE + LEVO pelos Métodos A e B ..	103
6.2.2. Análise da combinação ETE + GEST	103
6.2.3. Análise da combinação ETE + DESO.....	104

6.2.4. Análise das amostras comerciais do Grupo 1	104
6.2.5. Análise das amostras comerciais do Grupo 2.....	104
6.2.6. Análise das amostras comerciais do Grupo 3	105
6.2.7. Curvas de calibração.....	105
6.2.8. Linearidade	105
6.2.9. Interferência dos excipientes.....	106
6.2.10. Precisão	106
6.2.11. Teste de recuperação - Exatidão.....	106
6.2.12. Determinação dos teores percentuais das amostras dos Grupos 1 e 2	106
7. DISCUSSÃO.....	137
8. CONCLUSÕES.....	148
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
ANEXOS.....	182

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química do colesterol.	9
FIGURA 2 – Estrutura química básica dos estrogênios esteróides.	11
FIGURA 3 – Estrutura química da progesterona.	32
FIGURA 4 – Estrutura química da testosterona.	35
FIGURA 5 – Estrutura química do etinilestradiol.	73
FIGURA 6 – Estrutura química do levonorgestrel.	73
FIGURA 7 – Estrutura química do desogestrel.	74
FIGURA 8 – Estrutura química do gestodeno.	75
FIGURA 9 – Espectros de absorção no UV: GEST e DESO.	107
FIGURA 10 – Espectros de absorção no UV: ETE e LEVO.	108
FIGURA 11 – Cromatograma da separação de padrões de etinilestradiol 30,0µg/mL + levonorgestrel 150,0µg/mL, sob “varredura” de comprimentos de onda UV, obtido do cromatógrafo líquido Hewlett Packard® modelo 1100. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5µm, 125x4mm); fase móvel constituída de MeCN:H ₂ O (60:40 v/v); vazão de 0,8ml/min; detecção de 190 a 400nm e temperatura de 30°C.	109
FIGURA 12 – Cromatograma da separação de padrões de etinilestradiol 30,0µg/mL + desogestrel 150,0µg/mL sob “varredura” de comprimentos de onda UV, obtido do Cromatógrafo líquido Hewlett Packard® modelo 1100. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5µm, 125x4mm); fase móvel em gradiente, sendo 0 a 3,5 min MeCN:H ₂ O (40:60)(v/v), de 3,5 a 10 min MeCN:H ₂ O (85:15)(v/v), de 11 a 12 min MeCN:água (40:60)(v/v); vazão de 0,8ml/min; detecção de 190 a 400nm e temperatura de 30°C.	110

- FIGURA 13 - Cromatograma da separação de padrões de etinilestradiol 30,0µg/mL + gestodeno 75,0µg/mL, sob “varredura” de comprimentos de onda UV, obtido do Cromatógrafo líquido Hewlett Packard® modelo 1100. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5µm, 125x4mm); fase móvel constituída de MeCN:H₂O (50:50) (v/v), em pH = 7,5; vazão de 0,8ml/min; detecção de 190 a 400nm e temperatura de 30° C.111
- FIGURA 14 – Cromatogramas das soluções padrão de etinilestradiol 30,0µg/mL + levonorgestrel 150,0µg/mL, analisadas pelos Métodos A e B.112
- FIGURA 15 – Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol 30,0µg/mL + gestodeno 75,0µg/mL. Condições cromatográficas: coluna LiChrocart® 100 RP-8 (5µm, 125x4mm); fase móvel constituída por MeCN:H₂O água (50:50) (v/v); pH = 7,5; vazão de 0,8ml/min; detecção em 215nm e temperatura ambiente de 24°C ± 1° C.113
- FIGURA 16 – Cromatogramas das soluções padrão de etinilestradiol 30,0µg/mL + desogestrel 150,0µg/mL. Condições cromatográficas: coluna LiChrocart® 100 RP-8 (5µm, 125x4mm); vazão de 0,8ml/min; detecção em 205nm e temperatura ambiente de 24°C ± 1° C.114
- FIGURA 17 – Cromatogramas desenvolvidos em gradiente de eluição, empregando solução padrão de etinilestradiol 30,0µg/mL + desogestrel 150,0µg/mL, obtidos no cromatógrafo líquido Hewlett Packard® modelo 1100. Os números 1 e 2 correspondem aos picos de etinilestradiol e desogestrel respectivamente. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5µm, 125x4mm); vazão de 0,8ml/min; detecção em 205nm e temperatura ambiente de 24°C ± 1° C.115
- FIGURA 18 – Comparação entre os cromatogramas de duas amostras do Grupo 1. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5µm, 125x4mm); fase móvel constituída por MeCN:H₂O (60:40) (v/v) ; vazão de 0,8ml/min; detecção em 215nm e temperatura ambiente de 24°C ± 1° C.116
- FIGURA 19 – Cromatograma representativo das amostras do Grupo 2. Condições cromatográficas: coluna LiChrocart® 100 RP-8 (5µm, 125x4mm); fase móvel constituída por MeCN:H₂O (50:50) (v/v); pH = 7,5; vazão de 0,8ml/min; detecção em 215nm e temperatura ambiente de 24°C ± 1° C.117

- FIGURA 20 – Cromatogramas resultantes da análise de duas amostras do Grupo 3, contendo etinilestradiol 30,0 μ g/mL + desogestrel 150,0 μ g/mL (laboratório J) e 20,0 μ g de etinilestradiol + 150,0 μ g de desogestrel (laboratório I). Condições cromatográficas: coluna LiChrospher[®] RP-8 (5 μ m, 125x4mm); fase móvel constituída por MeCN:H₂O (70:30) (v/v); vazão de 0,8ml/min; detecção em 205nm e temperatura ambiente de 24°C $\pm$ 1° C.118
- FIGURA 21 – Curvas de calibração: (a) etinilestradiol e (b) levonorgestrel obtidas em coluna LiChrospher[®] 100 RP-18, fase móvel MeOH:H₂O (70:30) (v/v), vazão de 0,8ml/min e detecção em 215nm.119
- FIGURA 22 – Curvas de calibração: (a) etinilestradiol e (b) levonorgestrel obtidas em coluna LiChrospher[®] 100 RP-8, fase móvel MeCN:água (60:40) (v/v); vazão de 0,8ml/min e detecção em 215nm.120
- FIGURA 23 – Curvas de calibração: (a) etinilestradiol e (b) gestodeno obtidas em coluna LiChrospher[®] 100 RP-8, fase móvel MeCN:H₂O (50:50) (v/v) em pH = 7,5; vazão de 0,8ml/min e detecção em 215nm.121

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Interações entre contraceptivos orais com o fumo e outros fármacos.....	55
TABELA 2 – Métodos analíticos para determinação de etinilestradiol por CLAE.	76
TABELA 3 – Métodos analíticos para determinação de levonorgestrel e/ou norgestrel por CLAE.	78
TABELA 4 – Métodos analíticos para determinação de desogestrel e gestodeno por CLAE.....	79
TABELA 5 - Principais contraceptivos de uso oral monofásicos de baixa dosagem comercializados no mercado nacional.....	86
TABELA 6 – Teste de recuperação para amostra do Grupo 1.....	98
TABELA 7 – Teste de recuperação para amostra do Grupo 2.....	99
TABELA 8 – Comparação entre os parâmetros cromatográficos obtidos pela aplicação dos Métodos A e B, empregando solução padrão de etinilestradiol + levonorgestrel nas concentrações de 30,0µg/mL e 150,0 µg/mL, respectivamente.....	122
TABELA 9 – Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração de ETE e LEVO (Método A), pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, fase móvel MeOH:H ₂ O (70:30).	123
TABELA 10 – Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração de ETE e LEVO (Método B), pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-8, fase móvel MeCN:H ₂ O (60:40).	124
TABELA 11 – Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração de ETE e GEST, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-8, fase móvel MeCN:H ₂ O (50:50), pH = 7,5.....	125

TABELA 12 – Dados empregados para o cálculo do coeficiente de variação de uma amostra do grupo 1 (ETE + LEVO), analisada pelo método padronizado (Método B). Coeficientes de variação: 0,47% (ETE) e 0,38% (LEVO).	126
TABELA 13 – Dados empregados para o cálculo do coeficiente de variação de uma amostra do grupo 2 (ETE + GEST), analisada pelo Método padronizado. Coeficientes de variação: 0,39% (ETE) e 0,44% (GEST).	127
TABELA 14 – Resultados obtidos no teste de recuperação de uma amostra do Grupo 1 (lote A) empregando-se o método padronizado (Método A).	128
TABELA 15 – Resultados obtidos no teste de recuperação de uma amostra do Grupo 1 (lote A) empregando-se o método padronizado (Método B).	129
TABELA 16 – Resultados obtidos no teste de recuperação de uma amostra do Grupo 2 (lote A) empregando o método padronizado.	130
TABELA 17 – Resultados obtidos no teste de recuperação da amostra simulada para o Grupo 1 empregando-se o método padronizado (Método B).	131
TABELA 18 – Resultados obtidos no teste de recuperação da amostra simulada para o Grupo 2 empregando-se o Método padronizado.	132
TABELA 19 – Resultados obtidos na determinação dos teores dos hormônios presentes nas formulações farmacêuticas das amostras do Grupo 1, analisadas pelo Método B.	133
TABELA 20 – Resultados obtidos na determinação dos teores dos hormônios presentes nas formulações farmacêuticas das amostras do Grupo 2, analisadas pelo método padronizado.	134
TABELA 21 – Resultados estatísticos obtidos nas análises dos lotes das formulações farmacêuticas dos Grupos 1 e 2, empregando-se os método padronizados.	135
TABELA 22 – Exemplos de alguns sistemas eluentes isocráticos testados para a padronização dos Métodos analíticos empregados para a análise dos hormônios esteróides contidos nas formulações de COs, em coluna RP-8 e RP-18.	136

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC: acidente vascular cerebral, ataque cerebral ou derrame cerebral

CBG: globulina de ligação do cortisol

CHC: carcinoma hepatocelular

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

COs: contraceptivos orais

DES: dietilestilbestrol

DESO: desogestrel

ETE: etinilestradiol

FSH: hormônio folículo estimulante

GEST: gestodeno

HDL: lipoproteína de alta densidade

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LEVO: levonorgestrel

LH: hormônio luteinizante

MeCN: acetonitrila

MeOH: metanol

PCa: proteína C ativada

SHBG: globulina de ligação dos hormônios sexuais

SNC: sistema nervoso central

SSBG: globulina de ligação dos esteróides sexuais

TBG: globulina de ligação de tiroxina

TEP: tromboembolismo pulmonar

TEV: tromboembolismo venoso

THF: tetrahidrofurano

TRH: terapia de reposição hormonal

TVP: trombose venosa profunda

RESUMO

Os contraceptivos ou anticoncepcionais orais (COs) são medicamentos constituídos por hormônios sexuais utilizados para prevenção da gravidez. São comercializados dois tipos de preparações contraceptivas de uso oral: as preparações combinadas que contêm estrogênio associado a progestogênio e as preparações contendo apenas progestogênio, conhecidas como "minipílulas".

O objetivo da pesquisa foi validar um método analítico quantitativo para a determinação dos hormônios etinilestradiol (ETE), levonorgestrel (LEVO), gestodeno (GEST) e desogestrel (DESO), em combinações de COs, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para as amostras do Grupo 1 (ETE + LEVO) foram padronizados dois métodos (métodos A e B). Foram analisadas 9 amostras desse Grupo, empregando-se apenas o método B em coluna RP-8 e acetonitrila/água (60/40 v/v) como fase móvel. As amostras do Grupo 2 (ETE + GEST) foram analisadas em coluna RP-8, fase móvel acetonitrila/água (50/50 v/v) em pH 7,5, ajustado com NH_4OH a 0,02M. A vazão imprimida para todas as análises foi de 0,8mL/min e a detecção efetuada em 215nm.

Verificou-se que três lotes das amostras do Grupo 1 apresentaram baixos teores de ETE, enquanto que em vários outros lotes, o conteúdo de progestogênio excedeu as especificações. Com relação às amostras do Grupo 2, pôde-se observar que apenas uma delas apresentou o conteúdo de estrogênio e progestogênio acima do declarado.

Sabendo-se que os principais efeitos tóxicos ocasionados por estes hormônios podem estar diretamente relacionados à susceptibilidade individual e à dosagem dos progestogênios, os dados obtidos na presente pesquisa indicam um aumento do risco associado ao uso destes COs.

ABSTRACT

The hormone contraceptive pharmaceuticals are constituted of sexual hormones used to prevent pregnancy. Commercially, two types of oral contraceptive (OCs) are available: the associated preparations contain estrogen along with progestogen and other type containing progestogen alone, popularly known as mini-pills.

The objective this work was to developed and validated quantitative method for determination of ethinylestradiol (ETE), levonorgestrel (LEVO), gestodene (GEST) and desogestrel (DESO), in associated OCs, through high performance liquid chromatography (HPLC).

For samples of group 1 (ETE + LEVO), two methods were validated, namely, method A and method B. The samples of group 1 (9 samples) were analyzed utilizing method B, RP-8 column and acetonitrile/water (60/40 v/v) as mobile phase. The samples of group 2 (ETE + GEST) were analyzed utilizing RP-8 column and acetonitrile/water (50/50 v/v) as mobile phase at pH 7.5 adjusted with 0.02M NH_4OH . The flow rate was 0.8mL/min for both method and detection was made at 215nm.

Among samples of the group 1, it was verified that 3 batches presented low ETE content, while in several other batches, the progestogen content exceeded the specifications. Only one sample of group 2 presented estrogen and progestogen level above the permitted limit.

The main toxic effects caused by these hormones are directly related to the individual susceptibility and the dose of the progestogen. The data obtained in the present research indicates an elevated level of risk associated with the use of these OCs.

1. INTRODUÇÃO

Os estrogênios e os progestogênios são hormônios endógenos que desempenham muitas funções fisiológicas na mulher. O uso terapêutico desses hormônios é extremamente disseminado e suas ações farmacológicas refletem principalmente a extensão de suas atividades farmacológicas⁵⁵, como a terapia de reposição hormonal e a contracepção oral^{46,55}.

O controle eficaz da contracepção trouxe à sociedade um avanço incontestável, na medida em que facilitou a emancipação da mulher e sua participação no mercado de trabalho e ainda permitiu às famílias, mediante planejamento, a adequação entre número de filhos e suas condições econômicas. Também acarretou mudanças de mentalidade e costumes como a liberdade da prática sexual, paradoxalmente isso não se traduziu maior controle da natalidade, mas sim por aumento de gravidezes não desejadas ou aborto entre adolescentes¹⁶⁵.

Existem muitos métodos de contracepção praticados por mulheres e homens. Porém, o uso de contraceptivos orais (COs) é prática amplamente realizada no mundo inteiro por mulheres com vida sexual ativa^{14,165}.

Na atualidade dispõe-se para uso clínico, de um grande número de anticoncepcionais orais contendo estrogênios e progestogênios. Estas preparações variam quimicamente e, como era de se esperar, exibem algumas diferenças bem definidas, embora apresentem muitas propriedades em comum⁵³.

Logo que a anticoncepção hormonal foi liberada, milhares de mulheres passaram a usar os anticoncepcionais orais e, relatos freqüentes de efeitos indesejáveis começaram aparecer na década de 70. O reconhecimento de que esses efeitos eram doses-dependentes e a percepção de que os estrogênios e os progestogênios inibiam sinergicamente a ovulação, levou à redução das doses e ao desenvolvimento dos chamados anticoncepcionais de baixas doses.

Os COs foram classificados em gerações conforme foram sendo introduzidos na terapêutica. Atualmente, a 3ª geração de COs, também chamadas de “pílulas modernas” ou de “baixa dosagem”, é amplamente prescrita para a maioria das mulheres em idade reprodutiva. Embora, essa 3ª geração de COs tenha sido introduzida na década de 80, ainda hoje muitos estudos clínicos continuam sendo desenvolvidos com o intuito de investigar a relação dos COs com o surgimento de inúmeras doenças cardiovasculares, cânceres e alterações metabólicas.

Existem no comércio nacional muitas marcas de COs monofásicos de baixa dosagem comercializadas no mercado nacional disponíveis, produzidos por diferentes laboratórios.

Os COs de 2ª e 3ª geração apresentam baixas dosagens dos conteúdos estrogênico e progestogênico exigindo, portanto, metodologias analíticas sensíveis para quantificá-los com precisão e exatidão. Por estes motivos, no presente estudo escolheu-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para se determinar o teor de hormônios nas amostras de COs.

É sabido que muitos efeitos tóxicos estão relacionados com a susceptibilidade individual, o uso prolongado e com a dosagem dos componentes hormonais. Desse modo, a determinação dos teores nas formulações comerciais é requerida como parâmetro de qualidade e segurança às usuárias de COs, de modo a reduzir e/ou minimizar os riscos associados ao uso e ao mesmo tempo, é importante o desenvolvimento de métodos analíticos precisos, exatos e sensíveis para avaliar se os laboratórios farmacêuticos realizam controle de qualidade adequado às dosagens declaradas nos rótulos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HORMÔNIOS ESTERÓIDES

Por definição, hormônios são substâncias secretadas tanto por glândulas endócrinas, quanto por tecidos. São liberados na corrente sanguínea e transportados para outros tecidos, onde se ligam seletivamente a receptores específicos em células alvos^{54, 96, 152}.

Apresentam diversas influências sobre o organismo humano, como por exemplo, no desenvolvimento infantil, na lactação de gestantes, na ativação da hipófise para a liberação de gonadotrofinas, entre outras. Podem pertencer a várias classes químicas¹⁵² como:

- **Proteínas:** hormônio do crescimento, prolactina, insulina, hormônio da paratireóide.
- **Glicoproteínas:** hormônio folículo-estimulante, hormônio luteinizante, hormônio estimulante da tireóide.
- **Poli-peptídeos:** hormônio liberador de tirotropina, ocitocina, hormônio antidiurético, calcitocina, corticotropina, hormônio hipotalâmico, somatostatina.
- **Derivados de aminoácidos:** epinefrina, tiroxina, melatonina.
- **Esteróides:** estrogênio, progesterona, testosterona, cortisol.

Os hormônios esteróides constituem um grande grupo de substâncias que apresentam estrutura básica comum, o ciclopentano-peridrofenantreno. Estão inseridos entre os lípides, em razão das suas origens metabólicas e algumas propriedades em comum, como por exemplo a solubilidade²². Os hormônios esteróides são classificados em três grupos: estrogênios, que possuem 18 átomos de carbono, faltando o radical metila em C10; androgênios constituídos de 19 átomos de carbono; e corticosteróides, que possuem uma cadeia lateral em C17 e são conhecidos como C21 ou grupo do pregnano^{10, 22}.

Pela redução do colesterol (*Figura 1*), e ação enzimática da desmolase (ou simplesmente liase), que quebra a ligação C-C nas vizinhanças de um carbono terciário, são formados os esteróides mais importantes para o ser humano. É assim obtido um grande número de compostos C21 (pregna), tais como os glico e mineralocorticóides, além dos compostos progestacionais, quando a quebra efetuada pela enzima ocorre entre os C20 e C22. A modificação estrutural final para formação das estruturas básicas dos hormônios esteróides ocorre, nos compostos C19, no carbono C10, dando origem aos compostos C18 (estrana), que têm a estrutura dos hormônios estrogênicos (5).

Figura 1 – Estrutura química do colesterol.

Dentre os hormônios esteróides há duas principais classes de hormônios sexuais femininos: os estrogênios e os progestogênios^{46, 53, 55}.

Os progestogênios são também chamados, por alguns autores, de progestinas^{46, 53, 113} ou progestagênios^{96, 139}.

2.1.1. ESTROGÊNIOS

A atividade estrogênica é compartilhada por um grande número de substâncias químicas. Além dos estrogênios esteróides derivados de fontes animais, foram sintetizados numerosos estrogênios não-esteróides. Muitos fenóis são estrogênicos e a atividade estrogênica já foi identificada em diversas formas de vida, como aquelas encontradas nos sedimentos dos mares e em certas espécies de trevo⁵³.

2.1.1.1. Estrogênios naturais

Os estrogênios esteróides são sintetizados principalmente pelo ovário, a partir da androstenediona ou testosterona como precursores imediatos⁵⁵, mas também em quantidades relativamente grandes, pela placenta, e em menores quantidades pelos testículos, córtex adrenal^{54, 96, 139}. Alguns outros tecidos como fígado, músculo, tecido adiposo, também podem converter os precursores de esteróides em estrogênios^{46, 139}.

Durante a primeira fase do ciclo menstrual os estrogênios são produzidos no ovário pelas células da teca do folículo de Graff, estimuladas pelo hormônio folículo estimulante (FSH). Depois da ovulação, os estrogênios, como também os progestogênios, são sintetizados pelas células granulosas do corpo lúteo. Durante a gravidez a placenta desenvolve funções hormonais e, junto com o feto, sintetizam grandes quantidades de estrogênios e progestogênios^{46, 53, 139}.

Existem três principais estrogênios endógenos no ser humano: o estradiol, a estrona e estriol. Todos apresentam 18 átomos de carbono, com um anel A aromático com um grupo hidroxil em C3, um grupamento metila em C13 e um grupamento cetona ou β -hidroxila na posição C17, conforme podem ser observados na *Figura 2*^{46,55}.

Figura 2 – *Estrutura química básica dos estrogênios esteróides.*

O estradiol é o mais potente e principal estrogênio secretado pelo ovário. Sua potência estrogênica é 12 vezes maior que a da estrona e 80 vezes maior que a do estriol. O estriol é um estrogênio fraco; é um produto oxidativo derivado do estradiol e da estrona⁶⁰. No fígado, o estradiol é convertido em estrona, que pode ser transformada em estriol. O fato de a estrona estar em equilíbrio com o estradiol, sugere que esta substância seja uma forma de armazenamento dos hormônios¹³⁹.

Em mulheres normais, o estradiol tem sua taxa de produção variável durante o ciclo menstrual. Variando desde níveis muito baixo, ou seja, 50pg/mL, no início da fase folicular, até níveis muito alto como 350 – 850 pg/ml, no pico da pré-ovulação^{53, 55}.

Os estrogênios conjugados – eqüilina e eqüilenina – são diretamente preparados a partir da urina de éguas prenhes para fornecer estrogênio e sulfato de eqüilina, os quais são usados com finalidades terapêuticas^{46, 53, 97}.

2.1.1.2. Estrogênios sintéticos

Foram efetuadas diversas modificações químicas nas moléculas dos estrogênios naturais, com o intuito de aumentar a eficácia, quando administrados oralmente. Outras alterações foram efetuadas visando a obtenção de compostos não esteróides, com atividade estrogênica, também para serem usados clinicamente⁵³.

O etinilestradiol e o mestranol são estrogênios esteróides sintéticos⁴⁶ ou também chamados de semi-sintéticos^{10, 96}, ativos por via oral e empregados predominantemente em anticoncepcionais orais combinados. Apresentam um grupamento etinila em C17, que os protege contra a inativação pelo fígado. O mestranol é inativo até ser convertido no fígado em etinilestradiol⁴⁶.

O cipionato de estradiol, valerato de estradiol e o fosfato de poliestradiol são esteróides sintéticos administrados por via parenteral.

Os estrogênios sintéticos não-esteróides incluem o dietilestilbestrol, o clorotrianiseno e o dienestrol^{46, 53}.

O dietilestilbestrol (DES) foi um dos primeiros estrogênios não-esteróides a serem sintetizados. Apresenta estrutura química semelhante a do estradiol, quando na conformação *trans*. O DES é tão potente quanto o estradiol. É ativo por via oral e apresenta meia vida mais longa no organismo⁵⁵. Atualmente seu uso é restrito^{53,96}, mas foi importante historicamente, pois foi introduzido como estrogênio ativo por via oral, em uma época em que produtos naturais eram escassos. Este hormônio foi considerado como medicamento para terapia endócrina eficaz⁵⁵. Porém, seu potencial carcinogênico restringiu seu uso.

Os compostos não-esteróides com atividade estrogênica ou antiestrogênica ocorrem naturalmente em plantas e fungos. Numerosos agentes sintéticos, inclusive pesticidas, plastificantes e vários outros produtos químicos, também tem atividade hormonal ou anti-hormonal. Muitos destes compostos, são policíclicos, ou seja, contêm um anel fenólico que simula o anel A dos esteróides. No entanto, a bioacumulação no tecido adiposo e a persistência no ambiente, geraram preocupações com relação à toxicidade potencial para os seres humanos e para os animais⁵⁵.

2.1.1.3. Mecanismo de ação

Todos os hormônios esteróides parecem atuar através de mecanismos semelhantes, agindo principalmente, como reguladores da expressão do gene⁵⁵. Após ter sido distribuído para o tecido alvo, o hormônio livre, que é lipofílico, difunde-se passivamente através da membrana para o interior da célula, aonde liga-se a um receptor, presente no núcleo, que é específico para os esteróides^{46, 53, 55, 139}.

Estes receptores encontram-se previamente ligados a diversas proteínas, denominadas proteínas de choque térmico, as quais se dissociam do receptor quando este se liga ao estradiol. O complexo receptor-ligante forma um homodímero que se liga ao elemento de resposta estrogênica do gene e interage com proteínas celulares específicas (fatores de transcrição), para ativar a transcrição e regular a formação de RNA-mensageiro⁵³.

O controle da capacidade do tecido em responder de forma específica ao hormônio específico ocorre, no mínimo em três níveis. Em primeiro lugar, a célula deve expressar o receptor apropriado. Em segundo, o gene deve apresentar um elemento de resposta hormonal que sirva de alvo para o hormônio. Em terceiro, o gene-alvo deve apresentar um acervo adequado de proteínas cromatínicas e de fatores de transcrição para que a transcrição seja regulada naquele sítio⁴⁶.

Um dos principais efeitos dos estrogênios no DNA é a indução à síntese de receptores de progesterona em tecidos alvos¹³⁹. Concentrações elevadas de progesterona reduzem as concentrações de receptores estrogênicos que, por sua vez, conduzem a uma redução das concentrações de receptores de progesterona⁴⁶.

2.1.1.4. Ações fisiológicas e farmacológicas dos estrogênios

A função principal dos estrogênios é causar a proliferação celular e o crescimento dos tecidos dos órgãos sexuais e de outros tecidos relacionados com a reprodução⁶⁰. Os estrogênios coordenam as respostas sistêmicas durante o ciclo ovulatório, incluindo a regulação das vias reprodutivas, da hipófise, das mamas e de outros tecidos⁴⁶.

São responsáveis pelas alterações que ocorrem na puberdade das meninas e pelas características sexuais secundárias das mulheres adultas^{46, 53, 55, 60}. Assim, estes hormônios promovem:

- O desenvolvimento da vagina, útero, tubas uterinas e genitália externa;
- O desenvolvimento mamário através do aumento do crescimento ductal e do estroma ;
- O aumento do depósito de gorduras nas mamas, nádegas e coxas, o que caracteriza o biótipo feminino;
- O crescimento rápido dos ossos longos e o fechamento das epífises;
- A síntese de prolactina a partir dos lactofos hipofisários;
- O crescimento dos pêlos axilares e pubianos e a pigmentação mais proeminente dos mamilos, auréola e região genital .

2.1.1.5 Ações metabólicas

Os estrogênios afetam muitos tecidos e têm inúmeras ações importantes nos seres humanos e em animais. Não está claro se os efeitos resultam diretamente das ações dos hormônios no tecido em questão ou secundariamente às suas ações em outros locais, mas é sabido que muitos tecidos não reprodutivos como ossos, endotélio vascular do fígado, sistema nervoso central e coração expressam baixos níveis de receptores do estrogênio⁵⁵.

Os efeitos dos estrogênios em determinados aspectos, no metabolismo mineral, lipídico, dos carboidratos e das proteínas, são os mais importantes^{53, 55}.

2.1.1.5.1 Efeito dos estrogênios sobre o esqueleto

Os estrogênios têm efeitos positivos na massa óssea. Seu principal efeito é diminuir a taxa de reabsorção óssea ao antagonizar o efeito do hormônio paratiroidiano sobre o osso. No entanto, não estimulam a formação óssea⁵³.

Normalmente, o osso sofre um processo contínuo de remodelamento, envolvendo o equilíbrio entre produção e reabsorção do tecido mineralizado. Em relatos recentes, foi sugerido que os hormônios esteróides podem provocar pequenos aumentos na massa óssea⁵⁵.

Na puberdade, quando a mulher entra nos anos reprodutivos, os estrogênios apresentam atividade osteoblástica aumentada, sendo que a taxa de crescimento permanece aumentada por vários anos⁶⁰.

Os ossos contêm poucos receptores estrogênicos funcionais, sugerindo que pelo menos algumas ações hormonais sejam diretas⁵⁵.

Os estrogênios também têm efeitos sistêmicos no metabolismo mineral, o que contribui para a manutenção do balanço positivo de cálcio⁵⁵.

2.1.1.5.2. Efeito dos estrogênios sobre a deposição de proteínas

Os estrogênios provocam discreto aumento da proteína corporal total, o que é evidenciado por um discreto equilíbrio positivo de nitrogênio, quando estes hormônios são administrados⁶⁰.

No fígado, as alterações metabólicas são particularmente importantes, com conseqüente nível circulante maior de proteínas, como a globulina de ligação ao cortisol (CBG ou transcortina); globulina de ligação de tiroxina (TBG); globulina de ligação dos hormônios sexuais (SHBG), também chamada de globulina de ligação de esteróides sexuais (SSBG); transferrina; substrato da renina e fibrinogênio^{53, 55}.

Os estrogênios aumentam a capacidade de coagulação sangüínea, embora alguns autores discordem, pois acreditam que os estrogênios em doses fisiológicas não interfiram com as proteínas da coagulação⁵⁵. No entanto, foram relatadas numerosas alterações nos fatores que influenciam a coagulação, incluindo aumento nos níveis circulantes dos fatores II, VII, IX e X e diminuição da antitrombina III. Foram também observados aumentos nos níveis de plasminogênio e redução da adesividade plaquetária⁵³. Outros autores relatam que, dentre os fatores da coagulação, apenas os fatores II e X são aumentados pelos estrogênios, além da agregação plaquetária¹³⁹.

2.1.1.5.3. Efeito dos estrogênios sobre o metabolismo dos carboidratos e deposição de gordura

Os estrogênios têm muitos efeitos no metabolismo lipídico, principalmente sobre as lipoproteínas e triglicerídeos séricos. Em geral os estrogênios aumentam levemente os triglicerídeos séricos e reduzem os níveis de colesterol total. Todavia as alterações mais importantes são observadas nas lipoproteínas.

Após a absorção, os estrogênios na sua forma livre estão aptos a exercer efeitos benéficos ou não sobre o organismo¹⁶⁵. Alguns autores observaram aumento nos níveis séricos das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e redução nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ^{53, 55, 139}.

Além desses efeitos, foi também observado que os estrogênios podem diminuir os níveis de glicose e da insulina, em pacientes de jejum. Contudo não parecem exercer grandes efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos^{55, 139}.

2.1.1.6. Aplicações terapêuticas

Os estrogênios estão entre os fármacos mais comumente prescritos nos Estados Unidos⁵⁵. São indicados principalmente como anticoncepcional oral e para a terapia de reposição hormonal em mulheres pós-menopausa^{46, 53, 55, 113, 139, 165}.

2.1.1.6.1. Terapia de reposição hormonal (TRH)

O declínio na secreção do estrogênio pelo ovário é um processo lento e gradual que se prolonga por alguns anos após a menstruação ter cessado⁵⁵.

Define-se menopausa como a cessação do sangramento menstrual, que ocorre em média entre 45 e 55 anos na mulher¹⁶⁵, e resulta da falência ovariana que acompanha esgotamento dos folículos ovarianos funcionais. Este fato gera redução da produção de estrogênios e progesterona, causando diversas alterações fisiológicas e psicológicas⁴⁶.

Além dos sinais e sintomas que acompanham a interrupção da função ovariana normal, os sintomas vasomotores, a atrofia genitourinária, a osteoporose e a doença cardiovascular nas mulheres menopáusicas podem ser substancialmente reduzidas, quando a terapia de reposição estrogênica é adotada no início da menopausa^{46, 53}.

Os estrogênios conjugados são os agentes mais comumente usados na pós-menopausa⁵⁵. Consistem na associação de sais sódicos dos ésteres sulfato de estrogênios, principalmente estrona e eqüilina⁹⁷.

A reposição hormonal em mulheres pós-menopausa apresenta muitas vantagens. Algumas delas são apresentadas a seguir:

- ***Prevenção das alterações osteoporóticas:***

Osteoporose é um termo que denota aumento da porosidade do esqueleto resultando em redução da massa óssea, que pode localizar-se em certos ossos ou envolver o esqueleto inteiro²⁶.

Este distúrbio no esqueleto está associado com a perda da hidroxiapatita (complexos de fosfato e cálcio) e da matriz protéica ou colóide^{55,60}, o que resulta no afinamento e enfraquecimento dos ossos podendo levá-los a fraturas, especialmente das vértebras, dos quadris e dos punhos^{46,53,60}.

A patogênese da osteoporose está relacionada com fatores hereditários. Ambos os sexos são afetados igualmente, porém em indivíduos brancos mais do que negros. As raças caucasianas ou asiáticas são as mais susceptíveis^{26, 53, 165}. Além disso o tabagismo, o consumo abusivo de álcool ou cafeína parece aumentar o risco de desenvolvimento da osteoporose¹⁶⁵.

De acordo com as novas descobertas da biologia molecular, o gene receptor da molécula de vitamina D é responsável por aproximadamente 75% do pico de massa óssea que é alcançado na idade adulta. Acredita-se que o polimorfismo no receptor esteja associado com aumento ou diminuição dessa massa, e que o aumento dos níveis de paratormônio tem pouca significância no papel de desenvolvimento da osteoporose²⁶.

A quantidade de osso presente é máxima no adulto e começa a declinar na meia idade, em ambos os sexos^{53, 113}, apesar de que na mulher o fator de risco é maior devido à perda acelerada em consequência da menopausa¹¹³. A perda relacionada com a idade pode alcançar em média 0,7% ao ano, ou até 1%^{48, 53}, sendo considerada um fenômeno biológico normal. Já uma década após a menopausa, a redução de massa óssea atinge de 2 a 9%, sendo que em algumas mulheres a perda pode chegar a 35% da camada cortical óssea e 50% da trabecular²⁶.

A reposição estrogênica corresponde ao método mais eficaz para a prevenção da osteoporese em mulheres pós-menopausa, podendo também auxiliar em casos estabelecidos de perdas óssea¹¹³. Os estrogênios exógenos administrados como TRH previnem a redução da massa óssea^{20, 143}, e estão associados com a diminuição do risco de fraturas de bacia^{119, 120}.

O mecanismo primário pelo qual os estrogênios agem é pela redução da reabsorção óssea^{55, 165}. São mais eficazes se o tratamento tiver início antes que ocorra perda significativa. Os efeitos benéficos exigem uso contínuo, pois a perda recomeça quando o tratamento é suspenso⁵⁵.

Os efeitos dos estrogênios na massa óssea são mediados por citocinas, secretadas pelos monócitos e medula óssea. Estas citocinas são potentes estimuladores da atividade osteoclástica. Contudo a atividade osteoblástica compensatória ocorre, mas não com mesma velocidade. Observou-se também que os osteoblastos de indivíduos mais velhos têm atividade e biossíntese reduzida, quando comparados com osteoblastos de indivíduos mais jovens²⁶.

A atividade física, o esforço muscular e a dieta com ingestão adequada de cálcio complementam os efeitos dos estrogênios^{26,55}. Existem, ainda, evidências de que o fluoreto de sódio, associado a TRH, estimula a formação óssea^{39,55,117,142}.

- ***Alívio de sinais e sintomas vasomotores***

Com o declínio da função ovariana na menopausa, há uma queda muito acentuada das concentrações de estrogênios, levando em algumas mulheres, ao aparecimento de sintomas climatéricos, que podem iniciar-se antes durante ou após a menopausa. Estes sintomas podem manifestar-se de forma aguda ou em longo prazo¹¹³.

Os sintomas agudos podem incluir instabilidade vasomotora caracterizada por ondas de calor (fogachos), alternados com frio, sudorese excessiva, parestesias e palpitações^{55,113,139}, os quais comprometem a qualidade de vida de cerca de 50% das mulheres¹⁶⁵. Além destes, outros sintomas foram relatados como secura vaginal, urgência miccional, atrofia mamária, uretrites, infecção urinária de repetição^{113,165} e sintomas mentais incluindo cansaço, falta de concentração, irritabilidade, depressão e perda da libido¹¹³.

Já, os sintomas em longo prazo estão relacionados com o desenvolvimento de osteoporose e doenças cardiovasculares¹⁶⁵. Para tanto, existem hoje estrogênios comercializados para serem administrados com estas finalidades¹³⁹.

- ***Prevenção de doenças cardiovasculares***

Foi constatado que nos Estados Unidos, a principal causa de morte em mulheres acima de 65 anos é devida a doenças cardiovasculares, sobretudo o infarto do miocárdio⁵⁵.

A mortalidade por doenças cardiovasculares é altamente prevalente entre mulheres pós-menopáusicas. Durante os anos reprodutivos, as mulheres apresentam cerca de um quinto da mortalidade, devido a moléstias cardiovasculares, em relação a de homens de mesma idade. Após a menopausa, a taxa de mortalidade eleva-se exponencialmente até igualar-se a dos homens¹⁶⁵.

Vários estudos indicaram que houve redução no risco de doenças cardiovasculares em mulheres pós-menopáusicas, tratadas com estrogênios, em relação às não tratadas^{136, 167}. Mesmo mulheres que haviam aderido à terapia de reposição hormonal por determinado tempo e posteriormente pararam o tratamento, apresentaram metade do risco para doenças coronarianas quando comparado com mulheres que nunca optaram pela terapia¹⁶⁸.

O efeito protetor dos estrogênios está associado, em parte, às ações sobre lipídeos e lipoproteínas, garantindo um perfil menos aterogênico^{16,165}. Com o uso terapêutico dos estrogênios observou-se uma redução nos níveis de colesterol total, fração LDL e apolipoproteína B, ao mesmo tempo verificou-se um aumento de cerca de 10% nos níveis de HDL, especialmente da fração HDL₂¹¹¹.

O efeito da terapia de reposição com estrogênios sobre os lipídeos e sobre as lipoproteínas circulantes, está associado à redução de infarto de miocárdio em torno de 50% e de acidentes vasculares fatais em até 40%⁵³.

2.1.1.6.2. Outros usos terapêuticos

Hipogonadismo primário: quando administrados na idade entre 11 e 13 anos (com progestogênios) estão indicados para estimular os caracteres secundários, a menstruação e a fase de crescimento, a fim evitar as conseqüências psicológicas da puberdade tardia devido à insuficiência primária dos ovários^{53, 139}.

Desordens de crescimento: algumas pesquisas mostraram que doses de estrogênios usadas para estimular o crescimento uterino são capazes de inibir o crescimento somático. O etinilestradiol tem sido usado para tratamento de acromegalias e também para frear o crescimento de meninas muito altas¹⁴⁶.

Sangramento uterino disfuncional: pode ocorrer durante ciclos menstruais irregulares, muitas vezes caracterizados por sangramentos prolongados⁴⁶. Também são utilizados para interromper sangramento excessivo devido à hiperplasia endometrial⁵³.

Tratamento de neoplasmas malignas: o DES tem sido usado no tratamento de carcinoma de próstata dependente de testosterona. A ação é devida à capacidade dos estrogênios em suprimir a secreção hipofisária do hormônio luteinizante (LH) através de efeitos de feedback negativos, causando, portanto, a inibição da produção de testosterona nos testículos^{53,55}.

Desordens mentais: há evidências de que certos tipos de demência como a doença de Alzheimer pode ser reduzida em mulheres pós-menopáusicas com a reposição estrogênica, obtendo-se resultados aparentemente benéficos¹³¹.

2.1.1.7. Toxicidade dos estrogênios

Foram relatados efeitos adversos de gravidade variável com o uso terapêutico dos estrogênios. Muitos outros efeitos relatados em associação ao uso de anticoncepcionais hormonais podem estar relacionados com seu conteúdo estrogênico⁵³. Estes efeitos serão discutidos mais adiante.

Os estrogênios são altamente eficazes para a maioria dos propósitos terapêuticos, portanto o risco-benefício deve ser avaliado para cada paciente. As principais preocupações quanto a seu uso são probabilidade de desenvolvimento de cânceres, doenças tromboembólicas, alterações no metabolismo dos carboidratos e dos lipídeos, hipertensão, doença da vesícula biliar, náuseas, enxaqueca, alterações do humor e vários outros efeitos menores⁵⁵.

2.1.1.7.1. Ação carcinogênica

A relação da estrogênio-terapia com o câncer continua sendo alvo de intensa investigação⁵³, sendo esta a principal preocupação em relação ao uso de estrogênios e dos anticoncepcionais⁵⁵.

Adenocarcinomas: na década de 50 costumava-se administrar DES, no primeiro trimestre de gravidez, em gestantes com história de abortos repetidos. Esse fármaco, no entanto, pode ocasionar displasia vaginal da lactente e um aumento da incidência de carcinoma vaginal, tanto em adolescentes como em mulheres durante a terceira década de vida^{55, 139}.

Existem diversos registros de adenocarcinoma de vagina em mulheres jovens cujas mães foram tratadas com altas doses de dietilestilbestrol no início da gravidez, todavia a incidência é baixa demais para estabelecer-se uma relação de causa e efeito⁵³. O fato pode ter sido resultado da incapacidade do feto em biotransformar o DES, levando ao acúmulo no organismo em formação⁵⁵, visto que os estrogênios podem atravessar a barreira placentária¹¹³.

Os estrogênios não devem ser administrados durante a gravidez, especialmente durante os primeiros meses da gestação, quando está ocorrendo a organogênese, pois podem apresentar efeitos nocivos no aparelho reprodutor de ambos os sexos^{55,139}. Além disso, não se sabe ainda se este efeito particular ocorre com todas preparações de estrogênio¹³⁹.

Câncer de mama: A questão relativa ao risco de câncer de mama associado à TRH estrogênica tem sido intensamente investigada, e ainda não foi esclarecida^{46,55}. Embora não tenha sido constatado qualquer efeito adverso da estrogenerioterapia, em curto prazo, sobre a incidência do câncer de mama, pode ocorrer pequeno aumento no aparecimento deste tipo de tumor pela terapia prolongada. Apesar do risco ser pequeno^{54,146}, o impacto é significativo, visto que este tumor ocorre em 10% das mulheres⁵³. Alguns estudos mostraram que este risco só é significativo quando a estrogenerioterapia for utilizada por tempo superior a 10 anos²¹.

Revisão e análises dos estudos publicados durante as décadas de 70 e 80 sobre o uso de estrogênio na TRH mostraram que existe um moderado aumento no fator de risco para câncer de mama entre mulheres usuárias quando comparado com as não usuárias^{38,74}.

Em estudo recente foi sugerido que a terapia combinada, isto é, estrogênios mais progestogênios não estava associada com aumento no risco de câncer de mama¹⁷⁰. No entanto, existem referências mostrando haver aumento no risco relativo associado ao câncer de mama, tanto em mulheres que faziam TRH com estrogênios somente, quanto nas que eram tratadas com estrogênios combinados com progestogênios²¹.

Câncer endometrial: muitos estudos demonstraram que pacientes sob a TRH apresentavam maior risco de carcinoma de endométrio. O risco parece variar com a dose e a duração do tratamento: 5 a 15 vezes maior em pacientes que receberam altas doses de estrogênios durante 5 ou mais anos, em contraste com o risco de 2 a 4 vezes maior em pacientes que receberam doses menores durante curtos períodos de tempo^{53,113}.

O risco de carcinoma de endométrio é elevado com o uso isolado de estrogênio, porém a associação com progestogênios confere efeito protetor à usuária⁴⁷. No entanto, não são todas as mulheres sob terapia exclusivamente estrogênica que desenvolvem câncer endometrial⁴⁶. Entretanto, como assinalado anteriormente, o uso concomitante de progestogênio não apenas evita este risco aumentado, como também reduz geralmente a incidência de câncer de endométrio para um nível abaixo daquele observado na população em geral^{26,53,113}.

2.1.1.7.2. Efeitos sobre o sistema cardiovascular

Os próprios estrogênios têm efeitos globais favoráveis nos perfis de lipoproteínas plasmáticas, apesar de que podem elevar levemente os triglicerídeos plasmáticos⁵⁵.

Mulheres que usam estrogênios associados a progestogênios (contraceptivos orais), podem apresentar risco de danos cardiovasculares devidos aos estrogênios. Por este motivo, tem-se procurado baixar as doses do conteúdo de estrogênio nas formulações farmacêuticas¹¹³.

Resultados conflitantes têm sido publicados com relação ao possível papel dos estrogênios em doenças cardiovasculares apresentadas por mulheres pós-menopáusicas. Diversos estudos indicaram um papel protetor destes hormônios, ao invés de provocar o aparecimento de efeitos adversos⁵.

STAMPFER et al.¹⁶⁸ observaram que mulheres pós-menopáusicas, inicialmente, sem diagnóstico de doenças coronarianas, após longo período de uso de TRH estrogênica, apresentaram pequeno risco para o desenvolvimento de doenças cardíacas vinculadas com a menopausa.

Em contraste, em outro estudo realizado em paralelo, chegou-se a resultados bastante diferentes. Observou-se aumento de até 50% no risco de morbidade cardiovascular e mais do que o dobro, para doenças cerebrovasculares. Nestas condições, o potencial efeito adverso deveria ser cuidadosamente considerado antes de se recomendar à terapia estrogênica a mulheres pós-menopáusicas²⁰³.

Todavia, estudos subseqüentes deram respaldo à terapia estrogênica. Foi constatado que o uso destes hormônios em mulheres pós-menopáusicas não acarretava o aumento do risco, ao contrário, foi observado efeito protetor sobre o sistema cardiovascular¹¹³.

Em virtude da possibilidade da terapia exclusivamente estrogênica aumentar o risco de câncer de endométrio, tem-se optado pela TRH combinada em mulheres pós-menopáusicas. Por outro lado, haveria uma redução do efeito protetor estrogênico sobre o sistema cardiovascular em função da diminuição das concentrações de HDL-colesterol plasmáticas, uma vez que os progestogênios agem de forma contrária aos estrogênios em relação às lipoproteínas^{26,46,113}.

2.1.1.7.3. Efeitos sobre o sistema cérebro-vascular

Foi realizado um estudo sobre acidentes vasculares cerebrais (AVC), ou derrames cerebrais, comparando usuárias de TRH estrogênica com não usuárias. O risco encontrado para AVC e redução de mortalidade, pela mesma causa, em mulheres pós-menopáusicas com TRH, foi de 31% e 63%, respectivamente⁴⁴.

Outros autores concluíram que o risco relativo para derrame cerebral foi de 0,97 comparado com àquelas pacientes que nunca haviam se submetido à TRH¹⁶⁷.

2.1.1.8. Mutagenicidade

Embora os estrogênios não sejam considerados como mutagênicos, pois não induzem mutação clássica em ensaios bacterianos e em célula mamária^{109,149}, evidências mais recentes demonstram um papel duplo dos estrogênios na carcinogênese como um hormônio estimulador de proliferação celular e como pró-carcinógeno de danos genéticos. Vários tipos de radicais livres são produzidos pelo estradiol que são capazes de induzirem danos diretos ou indiretamente ao DNA, além de induzirem também várias lesões genéticas e cromossômicas¹⁰⁹.

Estrogênios administrados em roedores resultaram em vários tipos de danos ao DNA e ainda em tumores em tecidos responsivos a estrogênios. ROY et al.¹⁴⁹, discutiram a indução de danos cromossômicos no DNA pelos estrogênios, envolvendo ligação covalente do metabólito estrogênico quinona com o DNA, geração de radicais livres entre quinona e hidroquinona, hidroxilação de bases purinas e outros. Concluíram, portanto, que os estrogênios são carcinogênicos completos capazes de iniciar um tumor pela potencialidade em atuar em genes críticos, além de que o efeito hormonal pode complementar o desenvolvimento de tumores.

2.1.1.9. Outros efeitos indesejáveis e contra-indicações

Náuseas e hipersensibilidade das mamas são comuns e podem ser minimizadas quando prescrito, a menor dose eficaz possível de estrogênio⁵³.

Entre outros dos efeitos indesejáveis dos estrogênios estão a retenção de sal e água resultando em edema, o risco aumentado de tromboembolismo e alterações no metabolismo dos carboidratos¹³⁹.

Um motivo de preocupação mais grave é o de que os estrogênios possam provocar fortes enxaquecas graves em algumas mulheres⁵⁵, bem como colestase, hipertensão e doenças da vesícula⁵³. Os estrogênios aumentam os níveis de colesterol na bile e provocam um aumento relativo de duas a três vezes de doenças da vesícula biliar⁵⁵.

São observados efeitos feminilizantes e ginecomastia em pacientes do sexo masculino que tomam o DES no tratamento do câncer de próstata, o que acarreta enorme desconforto ou perturbação para esses indivíduos⁵⁵.

Os estrogênios não devem ser administrados a pacientes com neoplasias estrogênio-dependentes como, carcinoma de endométrio, carcinoma de mama ou então a pacientes com alto risco de desenvolvimento desses efeitos^{53,113}.

Também é contra-indicado para indivíduos com diagnósticos prévios de desordens tromboembólicas, doenças cardiovasculares, tromboflebites, sangramento vaginal não diagnosticado, herpes gestacionais ou endometriose.

Uma vez que os estrogênios podem causar retenção hídrica, devem ser usados com cautela em pacientes com asma, epilepsia, enxaquecas, hipertensão, doenças cardíacas ou renais¹¹³.

2.1.2. PROGESTOGÊNIOS

Entre os progestogênios podem ser incluídos a progesterona natural (*Figura 3*) – com raro uso terapêutico – e numerosos compostos sintéticos com atividade gestacional, frequentemente usados. Estes agentes sintéticos são empregados em associação ou em combinação com os estrogênios para terapia de reposição hormonal nas mulheres após a menopausa, isolados ou em combinação com estrogênios como anticoncepcionais⁵⁵.

Figura 3 – *Estrutura química da progesterona.*

2.1.2.1. Progestogênios naturais : progesterona

A progesterona é o progestogênio mais importante nos seres humanos. Além dos seus efeitos hormonais essenciais, a progesterona atua como precursor de androgênios e esteróides córtico-supra-renais⁵³.

Na mulher normal não grávida, a progesterona é produzida em quantidades significativas após a segunda metade de cada ciclo ovariano, quando é secretada pelo corpo lúteo. Durante esta fase os níveis plasmáticos variam de 0,5 a mais de 2,0 µg/dL⁵³. Pequenas quantidades também são secretadas pelos testículos e pelo córtex adrenal em ambos os sexos¹³⁹.

Apenas quantidades ínfimas de progesterona aparecem no plasma durante a primeira metade do ciclo ovariano⁶⁰. Na gravidez a placenta também sintetiza e libera grande quantidade de progesterona^{46,53,60,139}, especialmente durante o quarto mês de gestação⁶⁰. Caso não haja gravidez, as concentrações plasmáticas de progesterona caem e levam à descamação do revestimento endometrial e a menstruação ocorre⁴⁶.

Igualmente aos estrogênios, a progesterona é também sintetizada nos ovários, sobretudo a partir do colesterol sangüíneo (*Figura 1*). Pequenas quantidades de outros progestogênios, como a 17α-, a 20α- e a 20β-hidroxiprogesterona, também são secretadas juntamente com a progesterona, mas apresentam atividades progestacionais fracas. Por este motivo a progesterona é considerada o único progestogênio importante^{46,60}.

2.1.2.2. Progestogênios sintéticos

Foram sintetizados diversos compostos progestacionais. Alguns se mostraram mais potentes que os derivados C21 e são mais ativos quando administrados por via oral⁵³.

Duas principais classes de progestogênios sintéticos foram usadas com finalidades terapêuticas, existindo diferenças importantes nas suas propriedades químicas e biológicas^{46,53,55} :

- ***Agentes semelhantes à progesterona (compostos com 21 carbonos)***

Nesta classe estão incluídos a hidroxiprogesterona, a medroxiprogesterona, o megestrol e a dimetisterona. Estes fármacos são altamente seletivos e apresentam um espectro de ação semelhante ao do hormônio endógeno. Tais compostos são freqüentemente empregados para terapia de reposição hormonal em mulheres após a menopausa e em outras situações onde se deseja um efeito progestogênico seletivo.

- ***Agentes semelhantes a 19-nortestosterona***

Estes compostos chamados "19-nor" não apresentam os carbonos C19, C20 e C21, encontrados na progesterona e assemelham-se à testosterona na proximidade do anel D (*Figura 4*). Compostos nesta categoria 19-nor, historicamente, são os compostos progestogênicos dos anticoncepcionais orais combinados. Incluem o levonorgestrel e o norgestrel sintético, uma mistura racêmica do levonorgestrel ativo e do estereoisômero inativo.

Um novo grupo de progestogênios sintéticos de 3ª geração está sendo objeto de estudos clínicos e vem sendo testados como componentes de anticoncepcionais orais. São os compostos esteróides 19-nor, com substituição 13-etil (gonanos) que incluem o desogestrel, gestodeno e o norgestimato. Acredita-se que estes compostos tenham menor atividade androgênica do que os progestogênios mais antigos.

Figura 4 – *Estrutura química da testosterona.*

2.1.2.3. Mecanismo de ação

Os progestogênios penetram nas células, graças ao caráter lipofílico que apresentam, e se ligam aos receptores de progesterona distribuídos no núcleo e no citoplasma, formando o complexo ligante-receptor, o qual se liga a um elemento de resposta, ativando a transcrição gênica. O elemento de resposta para a progesterona parece ser semelhante ao do corticóide, e a especificidade da resposta depende do tipo de receptor presente na célula, bem como de outros fatores específicos da célula. O complexo progesterona-receptor forma um dímero antes de se ligar ao DNA. Todavia, em contraste com o receptor de estrogênio, pode formar heterodímeros, bem como homodímeros⁵³.

Embora cada hormônio ligue-se firmemente ao seu próprio receptor com grande afinidade, a progesterona apresenta reação cruzada com receptores para glicocorticóides e androgênios. Essa reatividade cruzada pode explicar o porquê de alguns progestogênios serem capazes de desencadear respostas androgênicas¹⁶⁵.

O receptor da progesterona é expresso no aparelho reprodutor feminino, na glândula mamária, no sistema nervoso central (SNC) – inclusive na região do gerador de pulso no hipotálamo e na hipófise, mas geralmente apresenta distribuição tissular mais limitada do que dos receptores estrogênicos ou outros esteróides⁵⁵.

As concentrações dos receptores celulares são fortemente influenciadas pelo meio hormonal, como foi dito anteriormente. Os progestogênios podem regular as respostas estrogênicas, seja pela redução dos níveis de receptores estrogênicos⁴⁸, seja pelo aumento do metabolismo local dos estrogênios, em metabólitos menos ativos, ou pela indução de produtos genéticos que atenuem as respostas celulares aos agentes estrogênicos⁵⁵.

2.1.2.4. Ações fisiológicas e farmacológicas dos progestogênios

Como já foi dito anteriormente os estrogênios e os progestogênios são hormônios endógenos que produzem numerosas ações fisiológicas nas mulheres, incluindo ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, preparo cíclico do aparelho reprodutor e efeitos metabólicos⁵⁵.

2.1.2.4.1. Efeitos sobre o aparelho reprodutor

A função mais importante da progesterona é promover alterações secretoras no endométrio uterino, durante a segunda metade do ciclo sexual feminino mensal, preparando o útero para a implantação do embrião.

A progesterona também promove alterações secretoras no revestimento mucoso das trompas de Falópio. Estas secreções são necessárias para nutrir o ovo fertilizado, que se divide enquanto atravessa a trompa, antes da implantação^{60,113}.

A progesterona ajuda manter a gravidez, suprime a menstruação e a contração uterina. Estes efeitos de manutenção da gravidez levaram ao uso dos progestogênios como tratamento para as ameaças de aborto⁵⁵.

2.1.2.4.2. Efeitos sobre as mamas

A progesterona promove o desenvolvimento dos lóbulos e alvéolos das mamas, fazendo com que as células alveolares proliferem, aumentem e adquiram natureza secretora. No entanto, a progesterona não faz com que os alvéolos realmente secretem leite. Isso só acontece depois que a mama, já preparada, é estimulada pela prolactina⁶⁰.

Durante o ciclo menstrual normal, a atividade mitótica no epitélio da mama é muito baixa na fase folicular e depois atinge um máximo na fase lútea. Este padrão deve-se à progesterona, que deflagra um único surto de atividade mitótica no epitélio mamário. Ao contrário do endométrio, onde a proliferação é maior na fase folicular devido ao estímulo estrogênico, na segunda metade do ciclo é neutralizada pela progesterona, ou seja, o controle hormonal da proliferação é diferente nestes dois tecidos. Este fato deve ser lembrado quando os efeitos terapêuticos e indesejáveis dos dois agentes são interpretados⁵⁵.

2.1.2.4.3. Efeitos sobre o SNC

A progesterona é responsável pelo aumento da temperatura corporal basal observada na fase lútea^{46,189}, podendo notar-se um aumento em torno de 0,56°C no meio do ciclo. Este fato está correlacionado com a ovulação. A elevação da temperatura permanece pelo resto do ciclo até o início do fluxo menstrual⁵⁵. A progesterona estimula também os centros respiratórios, e em alguns casos, propicia alívio da dor¹⁸⁹. Possui também efeitos depressores e hipnóticos sobre o cérebro. Este efeito pode explicar relatos de sonolência após a administração de progesterona^{53,55}.

2.1.2.4.4. Efeitos sobre o metabolismo

A progesterona exerce poucos efeitos sobre o metabolismo das proteínas, mas estimula a atividade da lipoproteína lipase, favorecendo a deposição de gordura.

Os efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos são mais pronunciados. A progesterona aumenta os níveis basais de insulina e a resposta da insulina à glicose^{53,55}. Entretanto, a administração em longo prazo de progestogênios mais potentes, como norgestrel, reduz a tolerância à glicose⁵⁵.

Foi relatado que a progesterona e seus análogos não provocam nenhum efeito ou então que produzem leves reduções nos níveis séricos de HDL. Por outro lado, os 19-nor progestogênios provocam reduções mais acentuadas nos níveis de HDL, possivelmente devido à sua atividade androgênica. Esta constatação leva a crer que a progesterona possa reduzir os efeitos benéficos dos estrogênios no perfil lipídico sérico, quando os dois agentes são administrados conjuntamente⁵⁵.

A progesterona pode competir com a aldosterona no túbulo renal, provocando uma redução na reabsorção de sódio. Este processo resulta na secreção de aldosterona do córtex da supra-renal^{53,55,60}.

2.1.2.5. Aplicações terapêuticas

2.1.2.5.1. Contracepção: os hormônios progestacionais são empregados para a anticoncepção, isolados ou combinados com estrogênios^{46,53,55,113,139,165}.

2.1.2.5.2. Terapia de reposição hormonal (TRH): os progestogênios são freqüentemente empregados em combinação com estrogênios no monitoramento das desordens pós-menopáusicas, em mulheres com útero intacto. A adição do componente progestacional reduz o risco de hiperplasia e carcinoma endometrial, os quais podem ocorrer quando estrogênios são usados isoladamente por longo período de tempo, uma vez que os progestogênios modulam as respostas estrogênicas nos tecidos-alvos^{46,113,165}.

2.1.2.5.3. Usos para diagnósticos: a progesterona pode ser usada no diagnóstico da secreção estrogênica na resposta do endométrio. Após a administração de progesterona por 5 a 7 dias, em mulheres com amenorréia, ocorrerá um sangramento após a suspensão, se o endométrio tiver sido estimulado pelos estrogênios endógenos. As combinações de estrogênios com progestogênios podem ser usadas para testar a resposta do endométrio em pacientes com amenorréia^{53,55}.

2.1.2.5.4. Outros usos: os progestogênios também são empregados em vários quadros clínicos de supressão ovariana, como dismenorréia, endometriose, hirsutismo e sangramento uterino⁵³. Podem ainda ser empregados no caso de perda significativa de peso – caquexia associada a AIDS^{113,189} e como medida paliativa no carcinoma endometrial metastático, câncer de mama e de rim^{55,113,189}.

2.1.2.6. Toxicidade dos progestogênios

Assim como para os estrogênios, foram também relatados efeitos adversos, de grau variável, decorrentes do uso dos progestogênios, entre eles: distúrbios gastrintestinais, alterações no apetite ou no peso, retenção líquida, edema, acne, melasmas ou cloasmas, erupções cutâneas, urticária, depressão mental, mudanças na libido, alterações na função hepática, icterícia entre outros.

Alguns progestogênios, quando administrados durante a gravidez, podem causar virilização do feto feminino. Mas isso parece estar associado com a atividade androgênica que certos progestogênios sintéticos apresentam¹¹³.

Foram também notadas alterações nas lipoproteínas séricas, as quais podem estar associadas com alguns progestogênios, que parecem aumentar os níveis de LDL e reduzir os níveis de HDL. No entanto, ainda não ficou esclarecido, se os progestogênios realmente comprometem os efeitos cardioprotetores da terapia estrogênica^{46,53,113}.

2.1.2.6.1. Ação carcinogênica

Os progestogênios têm se mostrado benéfico na redução da hiperplasia e do câncer endometrial, quando associado a estrogênios na TRH.

Um estudo sobre o uso de medroxiprogesterona injetável em humanos, com finalidades contraceptivas, não indicou aumento no risco total para câncer de ovário, de fígado, de mama ou cervical, após um período de oito anos de uso. Este possível efeito protetor pode ser diminuído com o uso concomitante de estrogênio. Todavia, o risco de câncer endometrial não se mostrou alterado em mulheres com útero, que tomaram estrogênios associados com progestogênios, por um período de 10 a 20 anos¹⁸⁹.

2.1.2.6.2. Mutagenicidade/tumorigenicidade

A literatura consultada não apresentou estudos de mutagenicidade ou tumorigenicidade para hidroxiprogesterona, levonorgestrel, norgestrel, noretindrona e progesterona.

Em experimento realizado com cães *beagle*, foi administrado medroxiprogesterona nas doses de 30 e 75 mg/kg por 7 anos. Nódulos mamários malignos foram observados no grupo de cães que receberam a dose maior.

Em outro estudo, também realizado em cães *beagles*, o progestogênio megestrol foi administrado por mais de 7 anos. Observou-se aumento na incidência de ambos os tumores, maligno e benigno, em ratos. Ficou também demonstrado um aumento na incidência de tumores pituitários nestes animais.

Deve-se sempre tomar cuidado ao se extrapolar resultados de estudos realizados em animais para humanos, pois os cães, principalmente, biotransformam a medroxiprogesterona diferentemente dos humanos. Além disso, os cães são mais susceptíveis aos tumores de mama e os desenvolvem espontaneamente¹⁸⁹.

2.1.2.6.3. Efeitos sobre a gravidez e feto

Os progestogênios, em geral, não devem ser administrados durante a gravidez. No passado eram usados para evitar abortos. No entanto, não há evidências de que os progestogênios sejam eficazes para essa finalidade, devido aos potenciais riscos que oferecem ao feto^{55,113}.

Embora os progestogênios atravessem a barreira placentária¹⁸⁹, não se tem evidência de teratogenicidade quando ministrados no primeiro trimestre de gravidez. Entretanto há possibilidade de virilização e deformidades genitais em fetos expostos aos progestogênios^{55,113,189}.

2.1.2.7. Contra-indicações

Os progestogênios devem ser administrados com cautela em pacientes com insuficiência cardiovascular e renal, diabetes melitus, asma, epilepsia e enxaqueca, ou outras condições, nas quais podem agravar a retenção líquida. Também, devem ser usados com cuidado em pacientes com história de depressão mental.

Não se deve administrar progestogênios a pacientes com sangramento vaginal não diagnosticado, com histórico de doença arterial de alto risco e insuficiência hepática, a não ser que a paciente esteja fazendo uso desse medicamento terapia para tratamento de câncer de mama.

Atualmente os progestogênios estão contra-indicados como terapia de suporte hormonal durante o início da gravidez^{113,189}.

2.2. CONTRACEPTIVOS HORMONAIS

São medicamentos constituídos de hormônios sexuais utilizados para prevenção da gravidez. São chamados também de anticoncepcionais orais ou contraceptivos orais (COs), disponíveis apenas para as mulheres, embora estejam sendo estudadas preparações para homens^{113,189}. Atualmente, já se tem disponível, forma contraceptiva para implantes subcutâneos, dispositivos de liberação intra-uterina (DIU) de progestogênio e injeções intramusculares de longa duração^{53,55,113}.

O uso de anticoncepcionais é o método reversível mais eficaz para a prevenção da gravidez^{1,55,139}. A taxa de insucesso é inferior a 0,7% ao ano para as usuárias de anticoncepcionais de combinação oral⁴⁶.

Disponibilizados na década de 60, os COs influenciaram a vida de milhões de indivíduos e deram origem a um impacto revolucionário na sociedade global. Pela primeira vez na história, um método de anticoncepção conveniente, acessível e confiável estava disponível para o planejamento familiar e a prevenção de gravidez não-planejada. Assim, milhares de mulheres nos Estados Unidos e em outros países começaram a usar os anticoncepcionais orais. Desde a década de 70, relatos freqüentes de efeitos indesejáveis começaram a aparecer⁹⁴. Logo, com a percepção de que os efeitos adversos eram dose-dependentes, houve redução das doses dos hormônios nos anticoncepcionais^{53,113}. Na década de 80, o uso cada vez maior de preparados bifásicos e trifásicos, reduziu ainda mais as dosagens dos esteróides nos medicamentos. Atualmente, acredita-se que as doses nas preparações farmacêuticas disponíveis no mercado, são as menores doses possíveis para proporcionarem uma anticoncepção confiável⁵⁵.

2.2.1. Tipos de anticoncepcionais hormonais de uso oral

São comercializados dois tipos de preparações para contracepção oral. Os COs combinados que contêm estrogênio associado a progestogênio e os COs contendo apenas progestogênio chamado "minipílula" ^{53,55,113,139}.

2.2.1.1. Anticoncepcionais orais combinados

A combinação estrogênio-progestogênio foi introduzida através dos anos em três gerações sucessivas:

Primeira geração – introduzida na década de 60, incluía altas doses de um componente estrogênico (> 50.0 µg de mestranol ou estradiol) associado a um componente progestogênico do tipo noretindrona;

Segunda geração – introduzida na década de 70, foram desenvolvidas preparações farmacêuticas com doses menores de estrogênios (< 50,0 µg de etinilestradiol) e progestogênios (norgestrel);

Terceira geração – introduzida em 1980, contendo < 50,0µg de etinilestradiol mais um gonano progestogênio (desogestrel, gestodeno e norgestimato) ^{7,36,108,164,199}.

Os anticoncepcionais orais combinados encontram-se disponíveis como preparações monofásicas, difásicas ou trifásicas, em geral apresentados em pacotes para 21 dias. Para os agentes monofásicos, as mesmas doses de estrogênio e de progestogênio estão presentes em cada comprimido, que são tomados diariamente por 21 dias, seguida de um período de 7 dias sem medicação. Algumas preparações são apresentadas em embalagem para 28 dias, sendo que os comprimidos para os últimos 7 dias contêm apenas os ingredientes inertes.

As preparações bi- e trifásicas consistem na administração de dois ou três comprimidos diferentes, contendo quantidades variáveis de ingredientes ativos para serem tomados, em momentos diferentes, durante o ciclo de 21 dias^{55,165}. Este método reduz a dose total de esteróides administrada e se aproxima mais das proporções estrogênicas e progestogênicas que ocorrem durante o ciclo menstrual. Entretanto, os preparados bi-ou trifásicos não parecem apresentar nenhuma vantagem sobre os monofásicos¹⁶⁵.

As preparações em fases foram desenvolvidas na década de 80, principalmente para reduzirem as doses dos progestogênios nos anticoncepcionais orais, quando se observou que estes poderiam produzir efeitos cardiovasculares indesejáveis⁵⁵.

O conteúdo estrogênico das preparações atuais varia de 20 a 50µg, mas a maioria delas contém de 30 a 35µg. Em geral, as preparações que contêm 35µg ou menos de um estrogênio são chamadas "pílulas modernas" ou "de baixa dosagem". Já a dose do progestogênio é mais variável devido às diferenças nas potências dos compostos empregados. A maioria das preparações, no entanto, contém 1mg ou menos do estrogênio^{55,165} e existem estudos nos quais está demonstrado que os comprimidos de baixa dose são tão eficazes quanto os de doses maiores¹⁹³.

Grandes doses de estrogênios, isolados ou associados a progestogênios, têm sido utilizadas para impedir a gravidez, após coito sem proteção (“pílula do dia seguinte”). Quando o tratamento é iniciado dentro de 72 horas^{24,46,55,113,139,165,192}, mostra-se eficaz em 90 a 99% dos casos^{24,55,53}. O mecanismo de ação desses esquemas ainda é obscuro, mas acredita-se que atuem no transporte tubário do ovo ou no desenvolvimento de um endométrio hostil à implantação^{46,55}.

2.2.1.2. Anticoncepcionais – “minipílulas”.

As formulações que contêm apenas progestogênio foram desenvolvidas para contornar os efeitos adversos dos estrogênios presentes nos anticoncepcionais orais⁴⁶. As “minipílulas” têm maiores índices de falhas, apresentam 96 e 97,5% de eficácia^{46,55}, estando indicadas quando há intolerância ou contra-indicação formal ao uso de estrogênios^{53,165} e durante a amamentação, pois não inibem a produção de leite¹⁶⁵. Verifica-se uma alta incidência de sangramentos menstruais irregulares, que muitas vezes conduzem à suspensão da medicação^{46,53}.

2.2.1.3. Outros tipos de contraceptivos hormonais

A contracepção hormonal através de implantes subdérmicos de progestogênios já está disponível nos EUA⁵³. Este procedimento resulta numa ação anticoncepcional em longo prazo (acima de 5 anos)⁵⁵. As desvantagens incluem a necessidade de introdução e remoção cirúrgica do implante e a ocorrência de sangramento irregular em lugar de menstruações previsíveis⁵³.

O DIU é um método contraceptivo, com eficácia de 97 a 98%, programado para inserção anual, o qual libera localmente baixas quantidades de progestogênio⁵⁵; alguns aparelhos liberam 20µg de levonorgestrel em 24 horas¹¹³. Há modelos que utilizam substâncias não hormonais, mas mesmo assim possuem ação contraceptiva¹⁶⁶. A ação anticoncepcional dos DIU se deve a efeitos locais sobre o endométrio⁵⁵.

Pode-se obter também uma contracepção eficaz através da injeção intramuscular de acetato de medroxiprogesterona: 150 mg/mês⁵³, ou uma vez a cada 3 meses^{55,165}. Seu uso como anticoncepcional é aprovado em mais de 80 países. Porém, no EUA não foi aprovado em virtude da incidência aumentada de tumores mamários em cães *beagle*^{46,189}.

2.2.2. Mecanismos de ação

O modo de ação dos COs combinados parece ser o seguinte^{46,53,55,97,139,165,189}.

- O estrogênio inibe a liberação de FSH e, assim, suprime o desenvolvimento do folículo ovariano;
- O progestogênio inibe a liberação de LH e, assim, impede a ovulação, tornando também o muco cervical menos apropriado para a passagem do espermatozóide;

Juntos, alteram o endométrio de forma a desencorajar a implantação.

Também interferem nas contrações coordenadas da cérvix, útero e trompas de Falópio, que são consideradas necessárias para a fertilização e implantação bem-sucedidas. Quando a administração é suspensa após 21 dias, a retirada do progestogênio precipita a menstruação^{53,55,139}.

Os contraceptivos à base de progestogênios evitam a ovulação em 70 a 80% dos ciclos⁵⁵. Suprimem as concentrações de FSH e LH e a ovulação, em graus variáveis. Entretanto, essas ações não elucidam inteiramente o sucesso observado em contracepções entre 96 a 98%, sugerindo, então, que outros mecanismos estejam envolvidos nestas ações. Acredita-se que um espessamento do muco cervical para diminuir a penetração do espermatozoide e as alterações endometriais, contribuam de forma significativa para a eficácia^{46,55}, além de que os progestogênios diminuem a mobilidade tubária, impedindo a implantação do ovo^{139,165}.

2.2.3. Farmacocinética

2.2.3.1. Estrogênios ^{46,97,113,139,189}

- ***Etinilestradiol ou mestranol***

- São rapidamente absorvidos no trato gastrointestinal e também através da pele e mucosa. Apresentam biodisponibilidade relativa em torno de 83%. Ambos têm efeito de primeira passagem com recirculação entero-hepática e atingem concentrações similares no plasma em 1 a 2 horas;

- São amplamente distribuídos nos tecidos. Apresentam taxas de distribuição de 0,9% no útero, 8,8% no sangue e 28,2% no tecido adiposo;
- Ligam-se 97 a 98% à albumina, mas não à SHBG;
- 70% do mestranol é convertido em etinilestradiol por desmetilação;
- A meia vida varia de acordo com o progestogênio associado. Quando administrados isoladamente variam de 6 a 20 horas ou 13 a 27 horas;
- A excreção renal é de 22 a 58%, na forma de conjugado; a fecal, 30 a 53% e a biliar: 26 a 43%.

2.2.3.2. Progestogênicos

- ***Levonorgestrel ou norgestrel*** ^{97,169}
 - Atingem concentrações máximas dentro de 2 horas;
 - Não sofrem eliminação pré-sistêmica, isto é, efeito de primeira passagem, por isso são completamente biodisponível;
 - São amplamente distribuídos pelos tecidos e têm maior afinidade pelas SHBG do que pelas albuminas;
 - São biotransformados por redução seguida de conjugação;

- A meia vida biológica varia de 11 a 45 horas; quando associado ao etinilestradiol a eliminação plasmática varia de 8 a 13 horas;

- São principalmente eliminados por via renal como produtos inativos.

- ***Desogestrel***¹⁸⁹

- É primeiramente absorvido na forma ativa no intestino como 3-ceto-desogestrel, porém devido ao significativo efeito de primeira passagem, a biodisponibilidade relativa é de 83%;

- Apresenta elevado volume de distribuição;

- Liga-se tanto à albumina quanto à SHBG;

- A biotransformação ocorre em duas fases: na fase I, há a formação do 3-ceto-desogestrel e na fase II, a biotransformação se completa resultando em compostos conjugados polares, glicurônicos e sulfatos;

- A meia vida varia de 8 a 13 horas quando é administrado com etinilestradiol;

- É excretado pela via renal: 45%, dos quais 14 a 28% na forma não alterada; 38 a 61% são eliminados como conjugados glicuronídeos, e 23 a 39%, como sulfatos.

- **Gestodeno**^{31,35,129,178}

- A absorção é rápida e completa; provavelmente acontece no duodeno, em aproximadamente 1 hora;

- Apresenta alta ligação às proteínas plasmáticas: 75,3% às SHBG e 24,1% à albumina. Apenas 0,6% permanece na forma livre e, portanto, biologicamente ativa;

- Possui meia vida plasmática que varia de 1,5 a 18 horas;

- A biotransformação hepática é extensa, sendo que 50% é eliminado pela urina e 50% pelas fezes. Não há eliminação na forma inalterada.

2.2.4. Uso clínico e benefícios à saúde

A aplicação mais importante dos estrogênios e progestogênios em combinação são a contracepção oral⁵³ e em mulheres pós-menopáusicas como TRH^{21,46,47,170}.

Há mais de uma década, constatou-se que os COs de combinação trazem benefícios substanciais à saúde, além do uso como anticoncepcional⁵⁵.

Como foi anteriormente comentado, os estrogênios têm papel importante no tratamento da osteoporose. O uso de estrogênios exógenos antes da menopausa, como contraceptivos orais também têm efeito positivo na prevenção da diminuição da densidade óssea que é observada na menopausa^{25,29,120}. Alguns estudos avaliaram o efeito do uso dos COs sobre a densidade ou massa óssea, e encontraram resultados conflitantes^{76,120,140}. Todavia a maioria dos estudos conclui que as usuárias de COs têm um aumento significativamente maior de massa óssea quando comparado com mulheres que nunca usaram nenhum tipo de COs^{110,120,140}.

O efeito dos COs sobre os ossos parece ser mais evidente do que aqueles da TRH só com estrogênios, que provavelmente resulta da maior potência dos estrogênios sintéticos nos COs quando comparado com os estrogênios naturais na TRH. Um estudo recentemente publicado, comparou a eficácia dos COs e a TRH à base de estrogênios sobre a densidade mineral óssea. Outros autores concluíram que ambos são efetivos no aumento da densidade dos ossos da coluna espinhal e da bacia. No entanto, os COs reprimiram a perda óssea mais do que a TRH estrogênica¹⁷⁶.

Os anticoncepcionais orais são indicados para mulheres saudáveis, preferencialmente não-fumantes e com menos de 35 anos de idade nas quais a gravidez deve ser decididamente evitada¹⁶⁵.

O uso da pílula combinada diminui notavelmente a incidência de amenorréia, ciclos irregulares, cólicas menstruais¹, sangramento intermenstrual, anemia ferropriva e tensão pré-menstrual^{1,55,139}. Outros benefícios do uso dos anticoncepcionais em longo prazo incluem redução de 50% de doenças benignas de mama, redução de 10 a 70% na doença inflamatória pélvica^{1,46}, e câncer ovariano em 50%, após 6 meses de uso⁵⁵, além da redução de câncer de endométrio^{1,46,165}.

Considerando que a gravidez e o parto acarretam algum grau de morbidade (complicações pré ou pós-parto em 20% das gestantes) e mortalidade, 20 em cada 100.000 nascimentos em mulheres com menos de 35 anos, em países desenvolvidos, o uso de anticoncepcionais hormonal proporciona de forma segura, uma vida sexual ativa a mulheres que não desejam engravidar ou quando a gravidez é uma contra-indicação absoluta^{55,59,165}.

2.2.5. Interações com outros fármacos

Diversas interações entre os COs têm sido observadas, principalmente com relação a agentes antimicrobianos e anticonvulsivantes¹. Estes agentes reduzem a concentração plasmática dos anticoncepcionais por estimularem sua biotransformação hepática¹⁶⁵.

A *Tabela 1* mostra as principais interações entre os contraceptivos orais e outros fármacos^{1,67,113,189}.

Tabela 1 – Interações entre contraceptivos orais com o fumo e outros fármacos.

Agentes	Efeito Observado	Significância Clínica
Paracetamol	↓ efeito do acetoaminofeno	Pode ↑ efeitos adversos indesejáveis dos estrogênios ⁽¹⁾
Acetaminofeno	↑ concentração plasmática do etinilestradiol	Gravidez, irregularidades menstruais ⁽²⁾
Antimicrobianos	↓ efeito dos contraceptivos esteróides	Necessidade de adaptação de dosagem ⁽³⁾
Anticoagulantes orais	↓ diminui efeito do dicumarol	Gravidez, irregularidades menstruais ^(2,4)
Anticonvulsivantes	↑ aumenta efeito do acenocumarol	Maior risco de episódio de hipoglicemia ⁽⁵⁾
Hipoglicemiantes	↓ efeito dos contraceptivos	
	↓ diminui resposta aos antidiabéticos	
	↑ concentração sérica de alguns benzodiazepínicos	
Benzodiazepínicos	↑ efeito dos que sofrem biotransformação oxidativa	Necessidade de adaptação de dose
	↓ efeitos dos que sofrem conjugação com ácido glicurônico	
Cafeína	↑ da concentração plasmática de cafeína	↑ efeitos da cafeína no organismo, meia vida prolongada
Metoprolol	↑ da concentração plasmática de metoprolol	Possibilidade de resposta exagerada aos β-bloqueadores
Fumo	Alguns estudos mostraram inibição do metabolismo hepático do etinilestradiol (mecanismo pouco conhecido)	Maior risco de eventos cardiovasculares adversos ⁽⁶⁾

(↑) aumenta (↓) diminui

(1) Substituir o paracetamol.

(2) Indica que está havendo interação entre os fármacos com possível ineficiência dos COs, optar por formulações com dose maior de estrogênio⁸⁹, ou associar outro método contraceptivo, especialmente se o tratamento com antimicrobiano for maior que duas semanas.

(3) Monitorar paciente, se necessário fazer ajuste de dose ou retirar os COs.

(4) Estar alerta para evidência de efeitos aumentados da fenitoína e outros anticonvulsivos.

(5) Monitoração cuidadosa da paciente diabética.

(6) Orientar a paciente a deixar de fumar ou escolher outro método contraceptivo.

Adaptação da Tabela de Oga, S. e Basile, A.

2.2.6. Considerações sobre os efeitos nocivos dos anticoncepcionais

Apesar dos COs serem usados há cerca de 30 anos, ainda existe muita controvérsia com relação a seus riscos e benefícios, pois muitos estudos iniciais associavam os anticoncepcionais orais com efeitos tóxicos específicos, foram conduzidos com doses muito superiores às das formulações atuais. Estudos recentes com anticoncepcionais de baixa dosagem evidenciam menores efeitos^{26,46}. Estima-se que mais de 90 milhões de mulheres no mundo todo faz uso de contraceptivos orais combinados¹⁴. Embora se acredite que os anticoncepcionais atuais sejam relativamente seguros para a maioria das mulheres saudáveis, há situações que contra-indicam seu uso de forma absoluta¹⁶⁵.

Desde sua introdução na terapêutica, os COs sofreram diversas modificações em suas composições, como tentativa de reduzir os riscos associados ao uso^{36,164}. O reconhecimento de que eventos vasculares associados à terapia de COs estavam relacionados à dose, levou as companhias farmacêuticas a alterar o conteúdo hormonal das formulações, não apenas reduzindo o conteúdo estrogênico e progestogênico, mas também introduzindo novos progestogênios^{18,36,53,122,164}.

A primeira geração de contraceptivos orais é raramente usada atualmente. Até recentemente, o potencial trombótico dos anticoncepcionais de 3ª geração e de outros COs com baixa dose de estrogênios, era pouco pesquisado. Entretanto, diversos trabalhos vêm sendo publicados com relação aos riscos e à segurança de diferentes tipos de contraceptivos orais^{36,164}.

O impacto dos COs de baixa dosagem de estrogênio e a 3ª geração de anticoncepcionais orais, compostos pelos novos progestogênios desogestrel, gestodeno e norgestimato, vêm sendo o foco das investigações epidemiológicas de interesse grande em saúde pública, pois muitos estudos têm mostrado que os novos COs estão associados à série de efeitos não desejados, como doenças vasculares, vários tipos de cânceres e numerosos efeitos endócrinos e metabólicos^{36,55,122,164,199}.

2.2.6.1. Avaliação do efeito carcinogênico

Dados experimentais e epidemiológicos mostram forte relação entre a exposição excessiva de níveis de estrogênios e o desenvolvimento de câncer em vários tecidos²¹³.

- ***Carcinoma de mama***

A questão sobre o risco de câncer de mama é bastante controversa^{26,113,189}. Apesar da discordância de alguns autores^{46,53,55,63,89,101}, a opinião prevalecente é de que há um leve aumento no risco de câncer de mama, quando os contraceptivos são usados em mulheres com idade inferior a 45 anos, particularmente nulíparas, e em mulheres que iniciaram o uso de COs com idade inferior a 25 anos de idade^{14,26,91,100,109,121,166,187,188,198}.

- ***Câncer endometrial***

Existem evidências de risco, admitindo-se até que exerçam um efeito protetor. Muitos estudos mostraram que os COs combinados estão associados com a diminuição do risco de carcinoma endometrial^{26,47,53,65,86,90,113,197}.

- ***Câncer cervical***

A relação entre o câncer cervical e o uso de anticoncepcionais permanece controvertida⁵³. Parece que os COs acarretam algum aumento no risco, o qual estaria relacionado ao uso prolongado^{26,113,215}. Em um trabalho publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), foi apresentado um estudo de caso-controle, concluindo que os COs utilizados por mais de 5 anos estavam associados apenas a um modesto aumento do risco de carcinoma cervical de células escamosas²⁰⁶.

- **Câncer de ovário**

Alguns estudos provaram que os COs oferecem proteção contra o câncer de ovário. Ao longo do uso, a proteção aumenta e persiste por algum tempo após a suspensão do tratamento^{65,86,89,90,113,161,162,198}. Essa associação negativa dos COs com câncer de ovário, aparentemente está relacionada ao tipo de anticoncepcional empregado e com as quantidades de estrogênio e progestogênio presente na formulação¹¹³. No entanto, não existem dados disponíveis que forneçam evidências definitivas quando são empregadas formulações mais recentes com pequenas doses, levando-se em conta o tempo de uso⁹⁸. A maioria dos estudos é baseada em experiências com COs contendo pelo menos 30µg de etinilestradiol⁸⁹. Nenhum estudo analisou os efeitos de 20µg de etinilestradiol sobre o câncer de ovário^{62,144}. Não se sabe, portanto, se esse efeito profilático mantém-se quando o estrogênio da formulação é reduzido a quantidades inferiores a 30µg⁸⁹.

- ***Tumores hepáticos***

- **Carcinoma hepatocelular**

Os COs estão implicados no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC)^{28,73}. NUEBERGER et al¹³⁰ estudaram 26 mulheres com carcinoma hepatocelular, sendo que 18 haviam usado anticoncepcional. Os autores estimaram que o uso de COs por 8 anos não aumentava o risco, mas acima deste período o risco foi 4,4 vezes maior. De BENEDETTI et al.²⁸ analisaram 10 casos de CHC em mulheres com história de uso de COs. Os autores concluíram que os estrogênios contribuem para o desenvolvimento de CHC, primeiramente através da estimulação mitogênica e, secundariamente pela mutagênese via radical hidroxil produzido pelo metabolismo estrogênico²⁸. Este fato já havia sido observado anteriormente por YAGER et al.²¹³, onde ficou demonstrada a correlação entre o uso prolongado de COs e o desenvolvimento de câncer de fígado. Os pesquisadores concluíram que os estrogênios sintéticos são potentes promotores de hepatocarcinogênese em fêmeas de rato, provavelmente devido à genotoxicidade indireta mediada pelo ciclo redox e pela formação de bases hidroxiladas de DNA²¹³.

Em outro estudo foram apresentados 194 casos de CHC relacionados apenas com os progestogênios de 1ª e 2ª geração de Cos, mostrando que não houve evidência de tumores malignos associados ao desogestrel, gestodeno ou norgestimato¹³⁸.

- **Adenoma Hepático**

Existe pequena evidência para o aumento de adenoma hepatocelular em mulheres que usam COs modernos⁷¹. O adenoma hepatocelular é um tumor benigno e extremamente raro, potencialmente associado a longos períodos de uso de anticoncepcionais^{26,71}. HANNAFORD et al.⁶⁶ examinaram dois estudos baseados na observação, ao longo de 27 anos, sobre a relação COs e o risco de tumores hepáticos. Os autores concluíram que o risco de doenças hepáticas era aumentado em mulheres que tomavam COs com dose de estrogênio acima de 50µg .

2.2.7. Distúrbios vasculares

As três maiores doenças trombóticas que afetam as mulheres relacionadas com o uso de COs são: o tromboembolismo venoso (TEV) incluindo trombose venosa profunda (TVP) e tromboembolismo pulmonar (TEP), doença cardíaca isquêmica – infarto agudo de miocárdio (IAM) e acidente ou ataque vascular cerebral (AVC) ¹⁰⁸.

O tromboembolismo foi um dos primeiros efeitos graves, não previstos, a serem relatados e tem sido o mais exaustivamente estudado⁵³. Estudos relacionados à influência dos COs nas doenças trombóticas comprovaram que cada tipo de anticoncepcional oral combinado, era responsável por distúrbios específicos. A 1ª geração de COs aumentou significativamente o risco de IAM. A 2ª geração foi responsável pelo aumento no risco de ataque trombótico cerebral e a 3ª geração aumentou consideravelmente o risco de TEV ⁹⁵. Contudo outros estudos têm mostrado que os COs em baixas doses estrogênicas, associado aos novos progestogênios reduzem os riscos de distúrbios vasculares^{15,172}.

- ***Doença tromboembólica venosa***

Os COs empregados no passado foram claramente associados com um aumento no risco de TEV e TVP, devido às altas doses de estrogênios na formulação (mais de 50µg)^{14,18,26,69,165}, e não ao conteúdo de progestogênio⁵³. Por outro lado, CONARD²² observou que os progestogênios também desempenham papel importante. O aumento comprovado de risco de TEV induzido por COs foi estimado em 8 vezes.

Vários estudos publicados recentemente sugerem que a incidência de TEV é maior em mulheres que usam 3ª geração de COs do que as que usam os de 2ª geração^{19,82,72,102,164,190,198,199,207,208}.

Em 1995, a 3ª geração de COs foi alvo dramático da atenção pública, quando o Comitê Britânico sobre Segurança Médica (*Committee on Safety of Medicine*) recomendou que as mulheres que tomassem COs contendo desogestrel e gestodeno suspendesse seu uso ao término do ciclo, pois em trabalho recentemente publicado, foi apontado aumento do risco de TEV. Esta afirmação foi confirmada pela "*American College of Obstetricians and Gynecologic*" dos Estados Unidos. O Comitê Britânico, ao final de 1996, completou extenso estudo de revisão sobre o assunto e concluiu que as usuárias de COs de 3ª geração apresentavam um risco de tromboembolismo, não fatal, 3 vezes maior que o apresentado em usuárias de 2ª geração de COs^{198,199}.

Dois estudos colaborativos realizados pela OMS sobre doenças cardiovasculares e contracepção hormonal, investigaram o risco de TEV associado ao uso de COs combinados. No primeiro estudo foram incluídos 1143 casos de pacientes hospitalizados entre 20 e 44 anos de idade, admitidas com TVP e TEP, com história de uso de COs combinados e 2998 controles, de mesma faixa etária, admitidas com as mesmas patologias, porém não associada ao uso de anticoncepcionais combinados. O risco relativo estimado não foi afetado pelo tempo de duração do episódio de uso do anticoncepcional, pela idade, ou pela história de fumo ou de não gravidez associada à hipertensão. Não foram encontradas nestes estudos diferenças apreciáveis nos riscos estimados de TEV, em mulheres que tomaram COs combinados, contendo doses inferiores ou superiores a 50µg de estrogênios^{199,206}.

O primeiro estudo mostrou que a proporção de TEV para 71 mulheres que utilizaram COs de 3ª geração (< 50µg de estrogênios) foi maior do que para aquelas que usaram COs de 1ª e 2ª geração²⁰⁸.

O segundo estudo foi conduzido com base nos resultados do primeiro. Nesta pesquisa foram comparados os riscos de casos de TEV entre pacientes e controles hospitalizados, que tomaram dose de estrogênios inferiores a 35 µg contidos nos COs de 2ª geração de progestogênio (*levonorgestrel*) e 3ª geração (*desogestrel* ou *gestodeno*). Os resultados indicaram que a proporção de risco de TEV entre usuárias dos de 3ª geração e de 2ª geração, quando comparados com as não usuárias foi 3 vezes maior, sendo o risco relativo 9,1 e 3,1 respectivamente. Quando ajustado ao índice de massa corpórea, o risco estimado foi novamente de 2 a 3 vezes maior nas usuárias de COs de 3ª geração²⁰⁷.

JICK et al.⁸² encontraram resultados semelhantes aos apresentados pela OMS, isto é, o risco estimado para TEV não fatal para usuárias de desogestrel e gestodeno é quase 2 vezes maior do que o para usuárias de levonorgestrel.

SPITEZER et al.¹⁶⁴ compararam o risco de TEV de diferentes formulações de COs combinados, entre mulheres usuárias e não usuárias. O risco relativo estimado para usuárias de 2ª geração foi de 4,0 e o para usuárias de 3ª geração de COs foi de 4,8.

FARMER et al.⁴² e LEWIS et al.¹⁰⁴ consideraram que esses estudos foram provavelmente afetados pela susceptibilidade entre as usuárias, especialmente nos primeiros momentos de uso do anticoncepcional mais novo, quando comparado com os mais antigos^{36,199}. Um trabalho de re-análises recentemente publicado, concluiu que não há diferenças significantes no risco de doença trombótica venosa entre diferentes formulações de COs combinados²¹².

- ***Doença cardiovascular***

O IAM é uma rara condição entre mulheres jovens em idade reprodutiva^{14,26,155,209}. No entanto, a taxa de fatalidade é alta¹⁰³, podendo chegar a 30%. A presença de outros fatores como fumo, hipertensão, diabetes, conteúdo de estrogênio na formulação usada, presença ou ausência de fatores de riscos para aterosclerose, influenciam fortemente na patogênese das doenças cardiovasculares, especialmente no risco de IAM²⁶. No entanto, a maioria dos estudos afirma que as doenças cardiovasculares entre usuárias de COs são devidas à trombose e não à aterosclerose¹⁹.

A combinação de fumo e COs resulta em sinergismo, aumentando em 10 vezes a probabilidade de ocorrência desse evento, quando comparado com as não fumantes^{14,26}. Já na presença de hipertensão, o risco de IAM a mulheres, em idade reprodutiva, aumenta em 5 a 10 vezes, quando comparado o de mulheres que nunca usaram COs¹⁴. Até mesmo COs em baixas doses podem causar discreto aumento na pressão sanguínea²⁶. Não foi relatado aumento no risco de IAM associado ao tempo de uso de COs²⁶.

Parece que mulheres não fumantes, saudáveis com idade inferior a 45 anos de idade que usam as novas formulações, com baixa dose de estrogênio, não apresentam risco aumentado de doença cardíaca isquêmica^{19,26,36,155,181}. Outros estudos confirmaram que usuárias de COs com doses de estrogênio inferiores a 50µg não apresentam aumento do risco relativo de IAM^{83,159}.

Alguns estudos mostraram que não há evidência significativa no aumento do risco de IAM a usuárias de COs de 2ª e 3ª geração^{37,82,106}. LEWIS et al.¹⁰³ também concordam que os novos progestogênios, contendo desogestrel e gestodeno, não constituem fatores de risco para o sistema cardiovascular.

Foi comprovado que usuárias de COs contendo desogestrel e gestodeno apresentavam menor risco de IAM quando comparado com o de usuárias de preparações contendo levonorgestrel¹⁴.

Outros trabalhos foram publicados referentes à associação, COs e IAM^{105,106,159,209}. No entanto, a questão do benefício para usuárias de COs de 2ª e 3ª geração, em relação ao risco relativo de IAM, ainda não ficou bem resolvida. Portanto, pode-se dizer que o risco absoluto associado ao uso de COs é pequeno^{36,37,103,155}, e direcionado quase que exclusivamente para mulheres mais velhas com fatores de riscos para doenças cardiovasculares³⁶. SIDNEY et al.¹⁵⁹ estimaram que a incidência de IAM seria 5,2 casos por 10⁶ de usuárias de COs anualmente. A OMS afirma que os COs combinados estão associados a um aumento no risco de IAM entre mulheres com fatores de risco conhecidos. Apenas entre mulheres mais velhas e fumantes, o risco passa a ser consideravelmente aumentado, isto é, estima-se a ocorrência de 484,6 casos de IAM por 10⁶ de mulheres anualmente, sendo que 396,2 casos ocorrem com mulheres acima de 35 anos que tomam qualquer tipo de anticoncepcional oral combinado. Apenas 88,6 casos não estão relacionados com o uso de COs²⁰⁹.

Estudos epidemiológicos recentes têm evidenciado um aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares em pessoas com altos níveis de cobre sérico. O impacto dos COs sob o cobre sérico já fora anteriormente atribuído à liberação estrogênio-induzida de ceruloplasmina pelo fígado (proteína transportadora de cobre plasmático). BERG et al.⁷ verificaram que mulheres usuárias de qualquer tipo de anticoncepcionais orais apresentavam elevados níveis de cobre plasmático. Níveis mais pronunciados foram encontrados em mulheres que tomavam COs de 3ª geração contendo o progestogênio desogestrel. Investigações adicionais são necessárias a fim de esclarecer o possível papel de altas concentrações séricas de cobre aumentando o risco de doenças cardiovasculares e trombóticas, bem como os diferentes mecanismos pelos quais os COs afetam o sistema cardiovascular.

- ***Doença vascular cerebral***

Foi evidenciado um aumento na incidência de acidentes vasculares cerebrais (AVC) associado ao uso de COs, mas esse aumento não foi correlacionado de forma definitiva com os COs. A associação entre o uso de COs e hemorragia subaracnóide também parece controversa⁴⁶. Um trabalho mais recente sugere que os COs contribuem com um pequeno aumento do risco¹³⁷, enquanto que em outros é sugerido que esse risco é insignificante^{85,133,154,212}.

O AVC é freqüentemente dividido em duas categorias: ataque isquêmico ou trombótico e ataque hemorrágico^{14,137}.

O risco relativo de isquemia cerebral em mulheres com idade reprodutiva que tomam COs de baixa dose é extremamente reduzido. Existe uma persistente associação entre o uso de COs contendo doses de etinilestradiol superiores a 50µg de e o risco maior de AVC^{14,36,70,214}. O risco de AVC isquêmico parece ser, portanto, diretamente proporcional à dose do estrogênio contido no anticoncepcional oral combinado^{23,64,70,107,133,194}.

A hipertensão, o fumo e as dores de cabeça do tipo enxaqueca associados ao uso de COs aumenta substancialmente o risco de ataque isquêmico^{64,153,183,210}. Um ponto importante encontrado em alguns estudos foi que mulheres que tomaram doses inferiores a 50µg de estrogênio na formulação anticoncepcional, e eram normotensas, não apresentaram significativo aumento do risco de AVC isquêmico^{133,153,211}. Já o fumo é um forte fator aditivo até mesmo em baixas doses de estrogênio (iguais ou inferiores a 35µg)^{61,137,150,183}. Outras pesquisas enfocam o mesmo tema^{70,103,105,211}.

O risco de AVC hemorrágico em mulheres é baixo e não aumenta com o uso de COs, na ausência de fatores de risco^{23,64,133,154,180,194,211,214}. Embora o ataque hemorrágico, como causa de morte em mulheres jovens, seja raro, a mortalidade é próxima de 25%. A taxa de incidência de qualquer tipo de AVC, para usuárias de COs com 35 a 44 anos de idade é de 14 eventos por 100.000 mulheres por ano¹⁴.

A OMS informou que os COs são seguros com relação a doenças cérebro-vasculares e que o risco relativo para qualquer tipo de AVC foi de 1,41 (não significativo estatisticamente) para usuárias de COs em doses inferiores ou iguais a de 50µg de etinilestradiol, e 2,71 (estatisticamente significativo) para usuárias de COs com doses iguais ou superiores a 50 µg ou mais do mesmo estrogênio^{211,212}. BURKMAN^{14,15} afirmou que não existe relação entre o risco de AVC hemorrágico e os componentes dos COs.

2.2.8. Alterações metabólicas e endócrinas.

Muito se tem pesquisado com relação ao perfil bioquímico de mulheres sob tratamento com vários tipos de COs combinados associando os diversos efeitos dos anticoncepcionais orais a doenças vasculares cardíacas e cerebrais¹¹³.

Acredita-se que a incidência de efeitos androgênicos e alterações metabólicas com os COs de baixa dose, que contêm os novos progestogênios, sejam mínimas^{13,88,156,157,172,182}.

2.2.8.1. Efeitos sobre o metabolismo dos lipídeos

Como já foi apresentado, os estrogênios e progestogênios apresentam efeitos opostos sobre os níveis de HDL e LDL. O efeito total sobre as concentrações dessas lipoproteínas parece estar relacionado com as preparações usadas e, particularmente com a dose do progestogênio empregado²⁶. Todavia esses resultados são tidos contraditórios e conflitantes, em termos das diferentes composições e conteúdos dos estrogênios e progestogênios¹¹³.

WIEGRATZ et al.²⁰⁰ investigaram o efeito deletério dos COs de baixa dose sob o perfil das lipoproteínas plasmáticas e concluíram que os níveis de LDL foram significativamente diminuídos devidos ao componente estrogênico. BERGA et al.⁸ também encontraram resultados semelhantes com relação ao perfil das lipoproteínas, principalmente com relação ao aumento da HDL₂ e redução da LDL, em pacientes que tomavam COs de baixas doses contendo o progestogênio desogestrel .

2.2.8.2. Efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos

Além da influência sobre o metabolismo lipídico, os anticoncepcionais orais alteram o teste de tolerância à glicose¹⁶⁵. Altas doses de progestogênios resultam em provas de tolerância à glicose anormais em 4 a 16% das mulheres⁴⁶. Alguns autores relatam um discreto aumento nos níveis de glicose e insulina com os COs modernos^{8,156}. Outros, acreditam na diminuição desses níveis²⁷. Apesar desses efeitos, parece que os anticoncepcionais não aumentam o risco de desenvolvimento de diabetes melitus tipo 2 ^{113,156}. Relatos recentes a respeito do contraceptivo de baixa dose sugerem que pode haver aumento na resistência periférica à insulina que é contrabalançado por níveis hormonais pouco elevados, de forma que os níveis normais de glicose sejam mantidos⁵⁵.

2.2.9. Alterações genéticas na hemostase

Recentemente, novas pesquisas propõem um mecanismo de coagulação que poderia explicar o aumento da incidência de doenças tromboembólicas vasculares associadas com os novos progestogênios⁷.

Os COs podem induzir estado de hipercoagulabilidade pela via intrínseca ou extrínseca da coagulação^{69,204,214}, podendo responder por 35% das trombooses venosas cerebrais idiopáticas¹¹⁵, ou pela redução de antibrombina III^{69,214}. Podem induzir atividade antifibrinolítica pela redução espontânea da fibrinólise⁶⁹. Na verdade, acredita-se que mulheres que apresentam defeitos no sistema de regulação hemostático podem não ser capazes de ajustar o aumento da protrombina gerada pela indução dos COs^{93,204}.

Nos últimos anos a descoberta de dois pontos de mutações, um no gene que codifica o fator V⁹, responsável pela resistência à proteína C ativada (PCa), e outro no gene que codifica a protrombina¹³⁴, ampliaram o conhecimento da trombofilia inerente¹¹⁴. Atualmente a prevalência da mutação para o fator V (*fator Leiden*) é uma das mais comuns desordens trombofilicas conhecidas¹⁶⁰. A incidência varia de 3 a 5% na população em geral, sendo mais freqüente na população caucasiana^{41,141,145}.

A resistência do fator V *Leiden* à PCa, cria um desequilíbrio na cascata de coagulação, o qual predispõem os pacientes ao desenvolvimento de trombose. Antes de se descobrir a existência de pacientes resistentes à PCa, suspeitava-se de que os pacientes que apresentavam TVP, particularmente abaixo de 45 anos, tinham deficiência de proteína C, proteína S e antitrombina III ativas. Sabe-se hoje que estas deficiências estão associadas com um aumento no risco de TEV e AVC^{9,30,115,160,214}.

O uso de COs é também um forte e independente fator de risco para a doença tromboembólica venosa, e está associado com o aumento de 4 vezes no risco de trombose venosa, independente da presença de outros fatores de risco genético ou adquirido⁷².

Indivíduos portadores de mutação tipo *Leiden* apresentam o risco para TEV aumentado em cerca de 8 vezes, o que é sem dúvida, similar ao risco total apresentado com a 3ª geração de COs¹⁹⁰. ROSING et al.^{147,148} mostraram que mulheres que usam 3ª geração de COs adquirem um certo grau de resistência ao próprio sistema anticoagulante. Em contraste, mulheres usuárias de COs de 2ª geração apresentaram apenas metade desses efeitos¹⁹⁰. MARTINELLI et al.¹¹⁴ não encontraram associação entre trombozes e os tipos de COs, mas uma forte interação entre os anticoncepcionais orais combinados e defeitos genéticos.

A interação entre o fator V *Leiden* e os COs aumentam intensamente o risco de doenças trombóticas^{114,190,214}. Foi relatado que mulheres com mutação no fator V, que tomam COs, têm o risco para o desenvolvimento de TEV aumentado em 30 vezes¹⁹¹. Valores similares a este foram encontrados no estudo de MARTINELLI et al.¹¹⁴, para TEV, entre mulheres portadoras de mutação para protrombina, usuárias de COs¹¹⁴.

2.3. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES

Muitos métodos para a determinação de hormônios esteróides encontram-se disponíveis na literatura. Entre eles, destacam-se os colorimétricos^{6,57,132} os métodos espectrofotométricos no ultravioleta^{58,124,125,126}, os métodos fluorimétricos^{75,79,80,179}, os métodos por cromatografia em camada delgada^{40,95}, cromatografia gasosa^{3,158,169,177}, os métodos imunoenzimáticos^{128,169,196,205} e os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência que estão apresentados nas *Tabelas 2, 3 e 4*.

O método geral para a determinação quantitativa de esteróides, proposto pela Farmacopéia Americana^{184,185} emprega o azul de tetrazólio como reagente colorimétrico. O grupo α -cetol dos esteróides possui propriedades redutoras próprias desta função. Ao reagir com cloreto de trifeniltetrazólio alcalino, que é azul, é reduzido ao correspondente formazano, que é vermelho, cor cujo máximo de absorção ocorre em 490nm, medido espectrofotometricamente⁹⁵.

2.3.1. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE OS HORMÔNIOS ESTUDADOS – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

2.3.1.1. Etinilestradiol ^{6,40,51,113,118,186}

- *Nome químico:* (17- α)-19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ino-3,17-diol;
- *Fórmula molecular:* C₂₀H₂₄O₂;
- *Massa molecular:* 296,39;

- É um pó cristalino branco ou amarelo levemente claro, inodoro. Apresenta ponto de fusão entre 180 e 186°C. É praticamente insolúvel em água, solúvel em etanol 1:6 e éter 1:4. Solúvel em óleos vegetais e soluções alcalinas diluídas.

Figura 5 – Estrutura química do etinilestradiol.

2.3.1.2. Levonorgestrel^{6,40,51,118,188}

- *Nome químico:* (17 α)-(-)-18,19-dinorpregna-4-en-20-in-3-ona, 13-etil-17-hidroxi;
- *Fórmula molecular:* C₂₁H₂₈O₂;
- *Massa molecular:* 312,45;
- É um pó cristalino branco ou quase branco, apresenta ponto de fusão ao redor de 240°C, praticamente insolúvel em água, solúvel em clorofórmio, pouco solúvel em álcool, acetona e éter;

Figura 6 – Estrutura química do levonorgestrel.

2.3.1.3. Desogestrel ^{11,118}

- *Nome químico:* (13 β)-etil-11-metileno-18,19-dinor-17 α -pregna-4-en-20-in-17 β -ol;
- *Fórmula molecular:* C₂₂H₃₀O;
- *Massa molecular:* 310,48;
- É um pó cristalino branco, apresenta ponto de fusão entre 109 e 110°C, praticamente insolúvel em água, solúvel em n-hexano, pouco solúvel em etanol (96%) e acetato de etila;

Figura 7 – Estrutura química do desogestrel.

2.3.1.4. Gestodeno ^{31,118}

- *Nome químico:* (13 β)-etil-17-hidroxi-18,19-dinor-17 α -pregna-4,15-dieno-20-in-3-ona
- *Fórmula molecular:* C₂₁H₂₈O₂;
- *Massa molecular:* 310,44;

- É um pó cristalino branco ou levemente amarelado levemente claro, praticamente insolúvel em água. Possui alto coeficiente de partição octanol/água. Apresenta ponto de fusão entre 185 a 190°C.

Figura 8 – Estrutura química do gestodeno.

2.3.2. Métodos de determinação empregando a cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido empregada por diversos autores para a determinação de hormônios esteróides presentes em fluidos biológicos, alimentos, soluções padrão e formulações farmacêuticas. Alguns métodos, já publicados, para determinação de etinilestradiol, levonorgestrel estão apresentados nas *Tabelas 2 e 3* respectivamente. Na *Tabelas 4* estão ilustrados os métodos encontrados na literatura para análise de desogestrel e gestodeno.

2.3.2.1. Etinilestradiol

O etinilestradiol é o estrogênio mais estudado e com maior número de citações na literatura, como pode ser visto na *Tabela 2* a seguir:

Tabela 2 – Métodos analíticos para determinação de etinilestradiol por CLAE.

MATRIZ	COLUNA	FASE MÓVEL	FLUXO (mL/min)	DETECÇÃO (nm)	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO INTERNO	Ref.
Sangue	300x4,5 (5µm) Wakos [®] 15C18	MeOH: H ₂ O (90:10)	0,70	F ex 336 em 440 (a)	15,40	sec-butil p-hidroxibenzoato	87
Sangue	150x3,9 (4µm) Novapak [®] C18	MeCN:MeOH: tampão fosfato (35:15:50) pH = 3,6	1,60	(b)	2,94	—	43
Formulação farmacêutica	100x4,6 (3µm) Phenomenex [®] IB-Sil 3 C18	MeCN: H ₂ O (40:60) pH = 5,6	1,20	UV-200 (*)	9,50	—	32
Formulação farmacêutica	50x4,5 (5µm) IBM [®] C18	MeOH:THF: Água (10:25:65)	2,10	UV-230	3,50	Dibutilftalato	99
Formulação farmacêutica	250x3,2 Altex [®] RP-2 express series	MeCN: H ₂ O (38:62)	1,75	UV-210	3,85	BHT	17
Formulação farmacêutica	250x4,6 (10µm) LiChrosorb [®] RP8	MeOH: 50mM KH ₂ PO ₄ (3:2)	2,00	F ex 280 em 330 (c)	9,00	o-fenilfenol	171
Formulação farmacêutica	220x4,6 (5µm) Spheri [®] 5 C18	MeCN:tampão fosfato (35:65) pH = 6,0	1,5	UV-200	22,73	—	127
Formulação farmacêutica	125x4 (5µm) LiChrosorb [®] RP-18	MeOH: H ₂ O (70:30)	1,00	UV-212	4,35	—	151
Solução Padrão	250x4,6 (10µm) Nucleosil [®] C18	MeCN:THF:H ₂ O (12,9:22,4:64,7)	1,00	UV-240	14,00	—	50
Solução Padrão	250x4,6 (5µm) LiChrosorb [®] Si 60	Hexano:dioxano: Isopropanol (95:3:2)	1,00	UV-254	17,00	—	49
Solução Padrão	200x4 (5µm) Nucleosil [®] RP-8	MeCN:MeOH: Água (3:76:21)	1,00	UV-205	2,80	—	163
Solução Padrão	250x4 (10µm) LiChrosorb [®] RP-18	MeOH:água (70:30)	1,00	UV-280	9,00	—	56
Solução Padrão	50x4,6 (5µm) Supelcosil [®] LC-18	MeOH:THF: Água (10:20:70)	2,00	UV-220	8,80	—	173
Tecido	Technopak [®] 10 C18	MeOH: 0,5% (NH ₄)H ₂ PO ₄ (62:38) pH = 3,0	0,70	UV-280	24,00	—	201

(a) Fluorescência: excitação em 336nm e emissão em 440nm;

(b) Detecção eletroquímica: detector Waters modelo 464;

(c) Fluorescência: excitação em 280nm e emissão em 330nm;

(*) UV: Ultravioleta

2.3.2.2. Levonorgestrel

O levonorgestrel é um progestogênio amplamente empregado nos COs de 2ª geração. O levonorgestrel é o isômero ativo do norgestrel. A maioria dos trabalhos publicados empregando a CLAE não faz análise seletiva, isto é não indicam a coluna específica para cada isômero, apenas considera as semelhanças físico-químicas. Na *Tabela 3* estão apresentados alguns métodos analíticos empregados para análise de levonorgestrel e/ou norgestrel.

Tabela 3 – Métodos analíticos para determinação de levonorgestrel e/ou norgestrel por CLAE.

MATRIZ	COLUNA	FASE MÓVEL	FLUXO (mL/min)	DETECÇÃO (nm)	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO INTERNO	Ref.
Sangue	300x3,6 (10µm) µBondapak® C18	MeOH:H ₂ O (80:20)	1,0	UV-254 (*) RIE (b)	5,6	_____	205
Formulação farmacêutica	300x3,9 Novapak® C18	MeCN: H ₂ O (60:40)	2,0	UV-248	?	progesterona	48
Formulação farmacêutica	250x4,6 (5µm) Zorbax® ODS	MeOH:H ₂ O (75:25)	1,5	UV-240	5,9	_____	195
Formulação farmacêutica	125x4 (5µm) LiChrosorb® RP-18	MeCN:H ₂ O (70:30)	1,0	UV-212	5,7	_____	151
Solução padrão	250x4,5 (10µm) Hypersil® 10 C18	MeCN:H ₂ O (55:45)	1,5	UV-225	5,0	_____	135
Solução padrão	250x4 (10µm) LiChrosorb® RP- 18	MeOH: H ₂ O (70:30)	1,0	UV-240	9,0	_____	56
Solução padrão	50X4,6 (5µm) Supelco® ODS	MeOH:THF: H ₂ O (10:20:70)	2,0	UV-220	5,5	_____	174
Solução padrão	250x4,6 (10µm) Partisil® C18 ODS-3	MeCN:H ₂ O (50:50)	2,0	UV-243	6,0	_____	45
Solução padrão	250x4,6 (10µm) Nucleosil® C18	MeCN:THF:H ₂ O (12,9:22,4:64,7)	1,0	UV-240	13,0	_____	50
Solução padrão	250x4,6 (5µm) LiChrosorb® Si 60	Hexano:dioxano: isopropanol (95:3:2)	1,0	UV-254	13,0	_____	49
Solução padrão	250x4,6 µBondapak® C18	Dioxano: H ₂ O (50:50)	1,4	UV-254	?	_____	92
Meio de cultura	300x3,9 Technopak® 10 C18	MeOH:H ₂ O (70:30)	1,5	UV-240	5,0	_____	202
Tecido	300x3,9 Technopak® 10 C18	MeOH: 0,5% (NH ₄)H ₂ PO ₄ (62:38) pH = 3,0	1,5	UV-240	6,0	_____	201

(*) UV: Ultravioleta

(b) RIA: Radioimun-ensaio

2.3.2.3. Desogestrel e gestodeno

O desogestrel é um progestogênio da 3ª geração de COs. Embora a 3ª geração de COs tenha sido introduzida no mercado mundial desde 1980, seu uso nos Estados Unidos e no mercado nacional é relativamente recente¹⁹⁹. Foram encontrados apenas dois trabalhos publicados empregando a CLAE para determinação e quantificação do desogestrel e um para o gestodeno, os quais estão apresentados na *Tabela 4*.

Tabela 4 – Métodos analíticos para determinação de desogestrel e gestodeno por CLAE.

Hormônio	MATRIZ	COLUNA	FASE MÓVEL	FLUXO (mL/min)	DETECÇÃO (nm)	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO INTERNO	Ref.
Desogestrel	Fluido mucosal	100x8 μBondapak® C-18	MeCN:H ₂ O Gradiente (a)	—	UV-214	—	—	112
Desogestrel	Solução padrão	200x4 (5μm) Nucleosil® RP-8	MeCN:MeOH: água (3:76:21)	1,00	UV-205	7,00	—	163
Gestodeno	Formulação farmacêutica	15x3,9 C-18	MeCN:MeOH:H ₂ O (35:15:45)	1,00	UV-215	—	—	124

(a) inicia-se com a proporção (55:45) mantendo por 15 min. e termina com a proporção (100:0) mantendo por 30 min.

3. OBJETIVOS

Pesquisas recentes têm mostrado que ao lado dos efeitos farmacológicos, os contraceptivos orais podem estar associados a uma série de efeitos tóxicos, cujo grau de intensidade está relacionado, provavelmente, com a dose dos constituintes estrogênicos e progestogênicos das formulações farmacêuticas.

No Brasil existem muitos laboratórios farmacêuticos que produzem formulações contendo hormônios esteróides. Todavia, a qualidade dos produtos nem sempre é a melhor, já que para tanto, se faz necessário o emprego de técnicas analíticas específicas e sensíveis, as quais requerem equipamentos adequados e recursos humanos capacitados voltados tanto para o estudo e desenvolvimento de metodologias analíticas compatíveis, bem como para o manuseio dos equipamentos. A falta desses recursos, na grande maioria dos laboratórios nacionais, pode levar os usuários a correrem sérios riscos de saúde.

Considerando o uso prolongado desses hormônios e os riscos que oferecem em longo prazo, verificou-se a necessidade de quantificá-los em preparações farmacêuticas, com o intuito de prevenir e/ou reduzir os riscos associados ao seu uso.

Assim, este trabalho tem por objetivo a quantificação dos hormônios esteróides etinilestradiol, levonorgestrel, desogestrel e gestodeno, contidos em medicamentos comercializados no Brasil, através da padronização e validação de uma metodologia que emprega a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por ser uma técnica que possibilita a determinação quantitativa de tais substâncias com alto grau de confiabilidade.

4. PLANEJAMENTO DA PESQUISA

A pesquisa foi planejada para ser desenvolvida nas seguintes etapas:

- Revisar a literatura concernente ao emprego dos estrogênios, dos progestogênios e dos contraceptivos orais sob o ponto de vista terapêutico e toxicológico;
- Padronizar e validar um método analítico empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação dos hormônios esteróides como levonorgestrel, etinilestradiol, desogestrel e gestodeno;
- Aplicar o método analítico para quantificar os hormônios esteróides etinilestradiol, levonorgestrel, gestodeno e desogestrel contidos nos contraceptivos orais, comercializados no Brasil, com a finalidade de verificar se as quantidades destes compostos estão dentro das especificações.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. MATERIAL

5.1.1. Reagentes e solventes

Todos os reagentes empregados na pesquisa foram de grau analítico:

- Metanol (MeOH) para cromatografia, grau HPLC (Merck)[®]
- Acetonitrila (MeCN) para cromatografia, grau HPLC (Merck)[®]
- Etanol (EtOH) para cromatografia, grau HPLC (Merck)[®]
- Hidróxido de amônio (NH₄OH) (Merck)[®]
- Solução de NH₄OH 0,02 M
- Água purificada através do sistema Millipore[®]

5.1.2. Fármacos empregados como substâncias químicas de referência

Os seguintes fármacos empregados como substâncias químicas de referência foram gentilmente cedidos por laboratórios e empresas privadas, e foram utilizadas sem ulterior purificações.

- Etinilestradiol (ETE) – 96,9%
- Levonorgestrel (LEVO) – 98,8%
- Gestodeno (GEST) – 99,7%
- Desogestrel (DESO) – 99,9%

5.1.3. Soluções padrão

5.1.3.1. Soluções estoque

Foram preparadas analiticamente as soluções contendo as seguintes concentrações de hormônios:

- 60,0µg/mL e 300,0µg/mL de ETE e LEVO, respectivamente;
- 60,0µg/mL e 300,0µg/mL de ETE e DESO, respectivamente;
- 120,0µg/mL e 150,0µg/mL de ETE e GEST, respectivamente.

As soluções de ETE e LEVO foram preparadas em MeOH e MeCN e as demais soluções foram preparadas em MeCN

5.1.3.2. Soluções intermediárias de trabalho

Estas soluções foram preparadas a partir da diluição 1:1 das soluções estoque, onde foram submetidas a diversos sistemas eluentes:

- 30,0µg/mL e 150,0µg/mL de ETE e LEVO, respectivamente;
- 30,0µg/mL e 150,0µg/mL de ETE e DESO, respectivamente;
- 30,0µg/mL e 75,0µg/mL de ETE e GEST, respectivamente.

5.1.4. Amostras

O critério de seleção das amostras foi feito de acordo com sua disponibilidade no mercado nacional. A *Tabela 5* apresenta os principais COs monofásicos de baixa dosagem comercializados no Brasil. As amostras de COs combinados empregadas nesse trabalho de pesquisa foram cedidas por alguns laboratórios privados e outras foram adquiridas em farmácias do varejo, sendo que algumas delas são produzidas por empresas nacionais e outras, por multinacionais. Apenas uma marca, do Grupo 1 abaixo descrito, foi adquirida por doação, em virtude da sua comercialização ser exclusiva para órgãos públicos com distribuição gratuita em centros de atenção primária à saúde.

Tabela 5 - Principais contraceptivos de uso oral monofásicos de baixa dosagem comercializados no mercado nacional.

Laboratório*	Forma Farmacêutica	Apresentação
A, B,C,D,E	Comprimido	Etinilestradiol 30µg + levonorgestrel 150µg
C,E	Comprimido	Etinilestradiol 50µg + levonorgestrel 250µg
F	Drágea	Etinilestradiol 30µg + levonorgestrel 150µg
F	Drágea	Etinilestradiol 50µg + levonorgestrel 250µg
G, H	Comprimido	Etinilestradiol 20µg + gestodeno 75µg
F,E	Drágea	Etinilestradiol 20µg + gestodeno 75µg
F,E	Drágea	Etinilestradiol 30µg + gestodeno 75µg
I, J, L	Comprimido	Etinilestradiol 20µg + desogestrel 150µg
I	Comprimido	Etinilestradiol 30µg + desogestrel 150µg

* Os laboratórios foram identificados por letras, por motivos éticos

Essas amostras foram divididas em três Grupos:

- **Grupo 1:** COs contendo a associação ETE + LEVO. Incluiu-se nesse Grupo nove marcas comerciais monofásicas, sendo duas sob a forma de drágeas e sete na forma de comprimidos. Desse total, duas apresentações continham, declarados na bula, 50,0µg + 250,0µg de ETE+LEVO respectivamente por unidade de apresentação. Nas demais apresentações as quantidades declaradas eram conter 30,0µg + 150,0µg da associação ETE +LEVO por unidade da forma farmacêutica.

- **Grupo 2:** COs contendo a associação ETE + GEST. Foram encontradas seis marcas monofásicas, entre elas duas na forma de drágeas e quatro na forma de comprimidos. Quanto ao conteúdo desses componentes presentes, quatro formulações declaravam conter 20,0µg de ETE + 75,0µg de GEST por unidade, enquanto que as outras duas, a quantidade do componente estrogênico declarado era de 30,0µg e do progestogênico 75,0µg por unidade da forma farmacêutica.

- **Grupo 3:** COs contendo a associação ETE+DESO. Encontram-se disponíveis apenas quatro marcas comerciais contendo essa combinação na forma monofásica na forma de comprimidos. Desse total, em duas marcas o conteúdo declarado de estrogênio era igual a 20,0µg e em outras duas, igual a 30,0µg por drágea e/ou comprimido. Quanto ao conteúdo do componente progestogênico, todas as quantidades declaradas foram de 150µg por unidade da forma farmacêutica.

5.1.5. Placebos

Os comprimidos placebos empregados neste trabalho de pesquisa foram gentilmente cedidos por um laboratório farmacêutico privado.

5.1.6. Equipamentos, acessórios e vidraria

Além dos equipamentos comumente empregados em laboratório de controle farmacêutico, foram utilizados os seguintes:

- Cromatógrafo líquido, modelo CG-480C, isocrático, munido de injetor de "loop" fixo de 20 μ l;
- Detector ultravioleta, variável, CG-435;
- Integrador modelo CG-200;
- Cromatógrafo líquido Hewlett Packard® modelo 1100, equipado com detector UV/visível, acoplado a um computador modelo Vecha XM, série 4-5/150, com "Chemstation" para integração e processamento dos cromatogramas;
- Espectrofotômetro UV – Spectrophotometer DU-70 Beckman;
- Balança analítica – marca Sartorius, capacidade 100g, precisão $\pm 0,0001$;
- Colunas cromatográficas Merck LiChrospher® 100 RP-18 e RP-8 (5 μ m) em LichroCART®, medindo 4mm x 12,5 cm.;

- Banho de ultra-som Thorton, modelo T-14;
- Medidor de pH Digimed[®], modelo DMPH-2;
- Balões volumétricos âmbar de 10, 25, 50 e 100 mL
- Frascos graduados para centrifugação;
- Membrana de filtração Millipore[®] 0,45 µm;
- Membrana de filtração Millipore[®] 0,45 µm.

5.2 MÉTODOS

5.2.1. Padronização das condições cromatográficas para a análise das amostras comerciais e simuladas

5.2.1.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos

Com a finalidade de padronizar uma metodologia eficiente para a análise das formulações de COs, foram desenvolvidos alguns testes preliminares para a escolha do comprimento de onda mais adequado para cada formulação, escolha do sistema eluente, do pH e das concentrações dos padrões a serem empregados.

- **Determinação dos espectros de absorção:** foram determinados a partir das soluções padrão contendo 10,0µg/mL de levonorgestrel, gestodeno e desogestrel e 5,0µg/mL de etinilestradiol, solubilizados em acetonitrila, empregando o espectrofotômetro;

- **Detecção no ultravioleta:** foram definidos a partir dos espectros de absorção obtidos e a partir das análises dos cromatogramas tridimensionais desenvolvidos em cromatógrafo com detector “diode array”;

- **Fase móvel:** diversos sistemas eluentes binários e ternários foram testados em diferentes proporções empregando vários solventes, como MeCN, MeOH, ETOH, e água. Todas as fases móveis foram filtradas em membrana para filtração Millipore® de 0,5µm e desgaseificadas antes do uso;

- **Fluxo:** as vazões experimentadas foram àquelas compatíveis com a coluna empregada de modo a fornecer a melhor separação e resolução dos picos. O intervalo testado foi de 0,5mL/min a 1,0mL/min;

- **Temperatura:** a temperatura do local de trabalho $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;

- **Volume de injeção:** 20µl.

5.2.2. Padronização do procedimento para a análise das amostras comerciais e simuladas

5.2.2.1. Construção das curvas de calibração

Para a construção das curvas de calibração partiu-se das soluções padrão de cada hormônio, preparadas segundo suas solubilidades nos sistemas eluentes empregados. Foram injetados 20µl de cada concentração, sendo as áreas dos picos correspondentes aos pontos de cada curva foram representadas pelas médias aritméticas de 3 leituras. Assim, com os resultados obtidos, foram construídas as curvas de calibração, calculados os desvios padrão e os coeficientes de variação, parâmetros estes, importantes para a validação dos métodos¹²³.

- ***Curva de calibração para etinilestradiol + levonorgestrel (ETE + LEVO)***

Os padrões para os métodos A e B foram preparados nas mesmas proporções, mas diluídos em fases móveis diferentes. Para cada método foram pesados exatamente 12,0mg de etinilestradiol e 30,0mg de levonorgestrel os quais foram transferidos para balões volumétricos de 100mL e 50mL respectivamente. Para o Método A os balões foram completados com MeOH:H₂O (70:30) e para o Método B, MeCN:H₂O (60:40). Depois de completados os volumes, cada balão foi deixado no ultra-som por 15 minutos. Dessa forma, obteve-se as soluções nas concentrações de 120,0µg/mL de etinilestradiol e 600,0µg/mL de levonorgestrel respectivamente.

As soluções de etinilestradiol e levonorgestrel foram misturadas proporcionalmente, obtendo-se assim, o primeiro ponto da curva e, a partir deste, foram feitas diluições a fim de se obter os demais pontos da curva em intervalos de 2,4 a 60,0µg/mL e 12,0 a 300,0µg/mL de etinilestradiol e levonorgestrel, respectivamente.

- ***Curva de calibração para etinilestradiol + gestodeno (ETE + GEST)***

Foram pesados exatamente 6,4mg de etinilestradiol e 16,0mg de gestodeno. Transferiu-se cada massa para um balão de 50mL. O volume foi completado com a fase móvel MeCN:H₂O (50:50), em pH 7,5, ajustado com NH₄OH a 0,02M, e a solução foi mantida por 15 minutos no ultra-som. Assim, obtiveram-se as soluções nas concentrações 128,0µg/mL de etinilestradiol e 320,0µg/mL de gestodeno, respectivamente.

A partir da diluição 1:1 das soluções de etinilestradiol e de gestodeno obteve-se o primeiro ponto da curva e os demais pontos foram obtidos a partir da diluição desta última, com fase móvel, fornecendo assim, intervalos de concentração de 3,2 a 64,0µg/mL de etinilestradiol e 8,0 a 160,0µg/mL de gestodeno.

- ***Curva de calibração para etinilestradiol + desogestrel (ETE + DESO)***

A curva de calibração para etinilestradiol + desogestrel foi preparada de modo semelhante à curva de calibração para etinilestradiol e levonorgestrel, isto é, partiu-se de 12,0mg de etinilestradiol e 30,0 mg de desogestrel. As diluições dos padrões foram feitas com a fase móvel MeCN:água (70:30) de onde foram obtidas as soluções de partida contendo 120µg de etinilestradiol e 600,0µg/mL de desogestrel. A partir da diluição 1:1 das soluções de etinilestradiol e desogestrel, obteve-se o primeiro ponto da curva e, deste, os demais pontos nos intervalos de concentração de 2,4 a 60,0µg/mL e 12,0 a 300,0µg/mL de etinilestradiol e desogestrel respectivamente, em balões volumétricos de 10 e 25 mL.

5.2.2.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada através das áreas correspondentes aos pontos das curvas de calibração de cada hormônio, para definir o intervalo de concentração no qual a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional à concentração das substâncias analisadas.

5.2.2.3. Interferência dos excipientes

Com o objetivo de averiguar se há possível interferência dos excipientes nos métodos propostos, os comprimidos de placebo foram submetidos às mesmas condições analíticas empregadas nas amostras, verificando-se assim a especificidade de cada método.

5.2.2.4. Teste de recuperação - Exatidão

O teste de recuperação é efetuado para comprovar a exatidão do método. Consiste em adicionar à amostra quantidades conhecidas da substância padrão em estudo, empregando-se em seguida, o método proposto para análise verificando-se o percentual recuperado^{81,186}.

A recuperação do Método foi avaliada tanto em amostras comerciais quanto em amostras simuladas. O mesmo lote de amostra selecionado para o teste de precisão, foi também empregado para a realização do teste de recuperação. As amostras simuladas foram preparadas a partir de comprimidos placebos, adicionadas dos hormônios estudados na mesma quantidade em que são declarados na bula por unidades de comprimidos e/ou drágeas.

O percentual de recuperação (%R) foi calculado pela expressão seguinte, de acordo com a "ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL" (AOAC INTERNATIONAL)²:

$$\%R = \frac{(Ca - Cna)}{Cp} \times 100$$

Onde:

Ca = Concentração de hormônio encontrada na amostra adicionada de padrão;

Cna = Concentração de hormônio encontrada na amostra não adicionada de padrão;

Cp = Concentração de padrão.

5.2.2.4.1. Preparação das soluções padrão

O procedimento de preparo dessas soluções foi semelhante ao descrito para as curvas de calibração. Porém, neste caso, os padrões foram diluídos em MeOH ou em MeCN (conforme a combinação desses solventes na fase móvel empregada).

Foram preparadas analiticamente as soluções padrão contendo as seguintes concentrações:

- 100,0 μ g/mL de ETE + 500,0 μ g/mL de LEVO, para o teste de recuperação de uma amostra do Grupo 1 (Métodos A e B).
- 100,0 μ g/mL ETE + 250,0 μ g/mL de GEST, para o teste de recuperação de uma amostra do Grupo 2.

5.2.2.4.2. Preparação das amostras comerciais

De cada Grupo de amostras foi escolhida, aleatoriamente, uma para o teste de recuperação, do qual foram pesados em balança analítica 21 unidades da forma farmacêutica (correspondentes a uma cartela). Após determinação do peso individual de cada unidade, procedeu-se à trituração até a completa pulverização.

Para o teste de recuperação da amostra dos Grupos 1 e 3, tomou-se uma massa equivalente a 10 vezes o peso médio encontrado para cada amostra e transferiu-se, cada uma, para um frasco graduado, separadamente, onde foram adicionados 10 mL de MeOH (Método A) e 10mL de MeCN (Método B) para a amostra do Grupo 1; e para a amostra do Grupo 3 foi adicionado somente 10 mL de MeCN.

Para o teste de recuperação da amostra do Grupo 2, tomou-se uma massa equivalente a 5 vezes o peso médio encontrado por unidade, e transferiu-se para um frasco graduado, onde se adicionou 10 ml de MeCN.

Em seguida, as soluções foram levadas ao banho de ultra-som por 20 minutos e posteriormente, centrifugadas durante 15 minutos a 3000rpm. Os sobrenadantes foram filtrados em seringa de vidro contendo membrana Millipore® (0,45µm).

As concentrações finais esperadas para as amostras do Grupo 1 foram 30,0µg/mL ETE + 150,0µg/mL de LEVO, respectivamente. Para a amostra do Grupo 2 as concentrações esperadas eram de 15,0µg/mL ETE + 37,5µg/mL GEST.

5.2.2.4.3. Preparação das amostras simuladas

As amostras simuladas foram preparadas a partir de comprimidos placebos pulverizados, pela adição de quantidades conhecidas dos hormônios das amostras dos Grupos 1 e 2.

Para simular uma amostra de cada Grupo foram adicionadas em 21 comprimidos placebos, quantidades de hormônios equivalentes a contidas em 21 unidades da forma farmacêutica comercial. Os procedimentos adotados para a preparação das amostras simuladas foram idênticos aos descritos para as amostras comerciais.

5.2.2.5. Precisão

O teste de coeficiente de variação é realizado com o objetivo de se comprovar a precisão das leituras efetuadas, injetando-se no cromatógrafo 10 vezes seguidas cada uma das soluções obtidas das amostras.

Para o teste de precisão foi escolhido, aleatoriamente, um lote de cada amostra dos Grupos 1 e 2 e aplicados os Métodos padronizados.

5.2.2.6. Execução do teste de recuperação

O procedimento do teste de recuperação para as amostras comerciais e simuladas foi desenvolvido de forma semelhante, isto é, transferiram-se alíquotas das soluções da amostra e do padrão do Grupo 1 para balões volumétricos de 10 mL; e, do mesmo modo para a amostra e o padrão do Grupo 2, em balões volumétricos de 5 mL, conforme o esquema apresentado na *Tabela 6 e 7*, respectivamente. Os volumes dos balões foram completados com as devidas fases móveis e, em seguida, injetados no cromatógrafo, em triplicata, 20 μ L de cada solução, obtendo-se assim as respectivas concentrações.

Tabela 6 – Teste de recuperação para amostra do Grupo 1.

Balão Volumétrico	Concentrações iniciais		Volume final*** (mL)	Concentração final (μ g/mL)
	Amostra* (μ g/mL)	Padrão** (μ g/mL)		
1	ETE	—	10	3,0
	LEVO			15,0
2	ETE	100,0	10	13,0
	LEVO	500,0		65,0
3	ETE	200,0	10	23,0
	LEVO	1000,0		115,0
4	ETE	300,0	10	33,0
	LEVO	1500,0		165,0
5	ETE	100,0	10	10,0
	LEVO	500,0		50,0

* Concentração da amostra 30,0 μ g/mL de ETE + 150,0 μ g/mL de LEVO;

** Concentração do padrão 100,0 μ g/mL de ETE + 500,0 μ g/mL de LEVO;

***Completados com a fase móvel MeCN:H₂O (60:40).

Tabela 7 – Teste de recuperação para amostra do Grupo 2.

Balão volumétrico		Concentrações iniciais		Concentrações iniciais	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)
		Amostra* ($\mu\text{g/mL}$)	Amostra* ($\mu\text{g/mL}$)		
1	ETE	15,0	—	5	3,0
	GEST	37,5			7,5
2	ETE	15,0	100,0	5	23,0
	GEST	37,5	250,0		57,5
3	ETE	15,0	200,0	5	43,0
	GEST	37,5	500,0		107,5
4	ETE	15,0	300,0	5	63,0
	GEST	37,5	750,0		157,5
5	ETE	—	100,0	5	20,0
	GEST		250,0		50,0

* Concentração da amostra 30,0 $\mu\text{g/mL}$ de ETE + 37,5 $\mu\text{g/mL}$ de GEST;

** Concentração do padrão 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de ETE + 250,0 $\mu\text{g/mL}$ de GEST;

***Completados com a fase móvel MeCN:H₂O (50:50) pH 7,5.

5.2.2.7. Determinação dos teores percentuais das amostras comerciais

5.2.2.7.1. *Análise das amostras do Grupo 1*

De cada amostra comercial do Grupo 1 foram analisados dois lotes diferentes. A preparação das amostras foi semelhante ao descrito no item 5.2.2.4.2. sendo, neste caso, adotado o Método B.

5.2.2.7.2. *Análise das amostras do Grupo 2*

Foram analisados dois lotes diferentes de cada amostra desse Grupo. O procedimento de preparo das amostras foi semelhante ao descrito no item 5.2.2.4.2. Porém, neste caso tomou-se o correspondente a 10 vezes o peso médio por unidade de cada uma das amostras e transferiu-se, cada um, para frascos graduados separados. Em seguida, foram adicionados em cada frasco 10mL de MeCN.

6. RESULTADOS

6.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos

As condições cromatográficas para as análises das amostras dos Grupos 1, 2 e 3 foram estabelecidas, conforme descrito no item 5.2.1., e estão apresentadas abaixo:

- **Determinação dos espectros de absorção:** o intervalo de comprimento de onda empregado foi de 190 a 400 nm. As *Figuras 9 e 10* mostram os espectros de absorção dos hormônios estudados;

- **Deteção no ultravioleta:** os comprimentos de onda empregados foram 215nm para a análise da combinação ETE+LEVO, ETE+GEST e 205nm, para ETE+DESO. Os cromatogramas representados nas formas tridimensionais vistos nas *Figuras 11, 12 e 13* referem-se às combinações de ETE+LEVO, ETE+DESO e ETE+GEST respectivamente. As concentrações empregadas para cada hormônio foram àquelas correspondentes a soluções intermediárias de trabalho, isto é, 30,0µg/mL e 150,0µg/mL de ETE e LEVO, 30,0µg/mL e 150,0µg/mL de ETE e DESO e 30,0µg/mL e 75,0µg/mL de ETE e GEST;

- **Fase móvel:** a *Tabela 22* ilustra alguns exemplos de sistemas solventes testados para a padronização dos Métodos. Após estudo sistemático chegou-se aos seguintes sistemas eluentes: para a combinação ETE+LEVO foram padronizados dois métodos (Métodos A e B). Para o Método A, a fase móvel foi constituída de MeOH:H₂O (70:30), e é resultante da otimização do Método padronizado por SANTORO e colaboradores¹⁵¹. Para o Método B, padronizou-se a fase móvel MeCN:H₂O (60:40). Para a combinação ETE + GEST, chegou-se à fase móvel composta por MeCN:H₂O (50:50), em pH = 7,5, ajustada com solução de NH₄OH 0,02 M. Foram padronizados para análise da associação ETE + DESO, apenas em solução padrão, os seguintes sistemas eluentes: MeCN:H₂O (70:30), MeCN:MeOH:H₂O (70:5:25) e MeCN:MeOH (70:30);

- **Fluxo:** a vazão de 0,8 mL/min foi a que melhor se mostrou para a análise das amostras em todos os sistemas eluentes testados;

6.2. Padronização do procedimento para a análise das amostras comerciais e simuladas

Foram validados os métodos analíticos apenas para as amostras dos Grupos 1 (Métodos A e B) e 2. Como será visto na discussão, a padronização do Método para análise da amostra 3 ainda não está concluída. Portanto, não serão apresentadas as curvas de calibração, o teste de recuperação, bem como as análises estatísticas referentes à associação etinilestradiol + desogestrel.

6.2.1. Análise da combinação ETE + LEVO pelos Métodos A e B

Na *Figura 14* estão representados os cromatogramas das soluções padrão de 30,0µg/mL de ETE + 150,0µg/mL de LEVO, resultantes das análises realizadas pelos Métodos A e B padronizados. Foram comparados os seguintes fatores cromatográficos⁵²:

- Fator de retenção ou fator de capacidade: $k' = \frac{t_r - t_o}{t_o}$
- Fator de seletividade: $\alpha = \frac{t_{rB} - t_M}{t_{rA} - t_M} = \frac{k'_B}{k'_A}$
- Número de pratos teóricos: $N = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2$
- Resolução: $R_s = \frac{t_{rB} - t_{rA}}{0,5 \cdot (W_{bA} + W_{bB})}$

Os valores obtidos para cada sistema eluente estão apresentados na *Tabela 8*.

6.2.2. Análise da combinação ETE + GEST

O cromatograma ilustrado na *Figura 15*, corresponde à análise da solução padrão de ETE + GEST nas concentrações de 30,0µg/mL e 150,0µg/mL respectivamente, pelo método padronizado.

6.2.3. Análise da combinação ETE + DESO

Vários sistemas eluentes, isocráticos e por gradiente, foram testados para a análise da combinação ETE + DESO em solução padrão. As *Figuras 12 e 16* ilustram os cromatogramas, desenvolvidos com fases móveis isocráticas, padronizadas para a análise dessa associação em solução padrão. A *Figura 17* mostra um cromatograma desenvolvido por gradiente de eluição.

6.2.4. Análise das amostras comerciais do Grupo 1

As amostras do Grupo 1 foram analisadas pelo Método B, o qual empregou MeCN:H₂O (60:40) como fase móvel. Os perfis cromatográficos podem ser observados na *Figura 18*, onde àquelas amostras, sob a forma farmacêutica de drágea, apresentaram um pico correspondente ao(s) excipiente(s). Já as demais amostras sob a forma farmacêutica de comprimidos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes ao perfil obtido com a solução padrão.

6.2.5. Análise das amostras comerciais do Grupo 2

A *Figura 19* ilustra um cromatograma representativo das amostras do Grupo 2 analisadas. Independente da forma farmacêutica, todas as amostras apresentaram o mesmo perfil cromatográfico quando analisadas pelo Método proposto e validado.

6.2.6. Análise das amostras comerciais do Grupo 3

Os sistemas eluentes padronizados para a análise da solução padrão de ETE + DESO não se mostraram eficientes para a análise de nenhuma das amostras do Grupo 3. A *Figura 20* apresenta dois cromatogramas resultantes da análise de duas das amostras desse Grupo 3 (amostras A e B), obtidos com a fase móvel MeCN:água (70:30), que proporciona melhor separação. Porém, a interferência dos excipientes contidos em todas as formulações não permitiu a padronização do Método, já que os picos de tais interferentes apresentavam o mesmo tempo de retenção do etinilestradiol.

6.2.7. Curvas de calibração

Os valores obtidos das análises dos padrões ETE + LEVO pelos Métodos A e B encontram-se, respectivamente nas *Tabelas 9 e 10*. A *Tabela 11* apresenta os valores encontrados nas análises dos padrões de ETE + GEST. As retas de calibração resultantes desses valores experimentais podem ser vistas nas *Figuras 21, 22 e 23*.

6.2.8. Linearidade

A linearidade foi determinada pelos coeficientes de correlação (r^2) obtidos pelas curvas padrão, conforme ilustradas nas *Figuras 21, 22 e 23*.

6.2.9. Interferência dos excipientes

Não foi observado nenhum pico referente aos excipientes quando empregados os métodos padronizados no intervalo de 0 a 10 minutos.

6.2.10. Precisão

As *Tabelas 12 e 13* mostram os dados para os cálculos dos coeficientes de variação.

6.2.11. Teste de recuperação - Exatidão

Os resultados obtidos com o teste de recuperação podem ser vistos nas *Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18*.

6.2.12. Determinação dos teores percentuais das amostras dos Grupos 1 e 2

As *Tabelas 19 e 20* apresentam os resultados obtidos na determinação dos teores das amostras comerciais analisadas pelos Métodos padronizados para as amostras dos Grupos 1 e 2 respectivamente. Os resultados obtidos pelo tratamento estatístico dos valores experimentais para as amostras dos Grupos 1 e 2 encontram-se na *Tabela 21*.

(a)

(b)

Figura 9 – Espectros de absorção no UV:

(a) etinilestradiol (5,0µg/mL) em MeCN;

(b) levonorgestrel (10,0µg/mL) em MeCN.

(a)

(b)

Figura 10 – Espectros de absorção no UV:

(a) gestodeno (10,0µg/mL) em MeCN;

(b) desogestrel (10,0µg/mL) em MeCN.

Figura 11 – Cromatograma da separação de padrões de etinilestradiol 30,0µg/mL + levonorgestrel 150,0µg/mL, sob “varredura” de comprimentos de onda UV, obtido do cromatógrafo líquido Hewlett Packard® modelo 1100. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5µm, 125x4mm); fase móvel constituída de MeCN:H₂O (60:40 v/v); vazão de 0,8ml/min; detecção de 190 a 400nm e temperatura de 30°C.

- 1) Etinilestradiol (Tr = 2,89 min)
- 2) Impureza (Tr = 3,48 min)
- 3) Levonorgestrel (Tr = 3,92 min)

Figura 12 – Cromatograma da separação de padrões de etinilestradiol 30,0µg/mL + desogestrel 150,0µg/mL sob “varredura” de comprimentos de onda UV, obtido do Cromatógrafo líquido Hewlett Packard® modelo 1100. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5µm, 125x4mm); fase móvel em gradiente, sendo 0 a 3,5 min MeCN:H₂O (40:60)(v/v), de 3,5 a 10 min MeCN:H₂O (85:15)(v/v), de 11 a 12 min MeCN:água (40:60)(v/v); vazão de 0,8ml/min; detecção de 190 a 400nm e temperatura de 30°C.

1) Etinilestradiol (Tr = 2,85 min)

2) Desogestrel (Tr = 11,52 min)

Figura 13 - Cromatograma da separação de padrões de etinilestradiol 30,0µg/mL + gestodeno 75,0µg/mL, sob “varredura” de comprimentos de onda UV, obtido do Cromatógrafo líquido Hewlett Packard® modelo 1100. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5µm, 125x4mm); fase móvel constituída de MeCN:H₂O (50:50) (v/v), em pH = 7,5; vazão de 0,8ml/min; detecção de 190 a 400nm e temperatura de 30°C.

- 1) Etinilestradiol (Tr = 3,96 min)
- 2) Gestodeno (Tr = 4,62 min)

Figura 14 – Cromatogramas das soluções padrão de etinilestradiol 30,0µg/mL + levonorgestrel 150,0µg/mL, analisadas pelos Métodos A e B.

(a) Método A

- Coluna: RP-18 LiChrospher® (5µm, 125x4mm);
- Vazão: 0,8mL/min;
- Fase móvel: MeOH:H₂O (70:30);
- Temperatura: 24°C ± 1°C.
- λ = 215nm.
- 1)Etinilestradiol (Tr = 3,46min);
- 2)Levonorgestrel (Tr = 4,38min).

(b) Método B

- Coluna: RP-8 LiChrospher® (5µm, 125x4mm);
- Vazão: 0,8mL/min;
- Fase móvel: MeCN:H₂O (60:40);
- Temperatura: 24°C ± 1°C.
- λ = 215nm.
- 1)Etinilestradiol (Tr = 2,89min);
- 2)Impureza (Tr = 3,48 min);
- 3)Levonorgestrel (Tr = 3,92min).

Figura 15 – Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol 30,0 μ g/mL + gestodeno 75,0 μ g/mL. Condições cromatográficas: coluna LiChrocart® 100 RP-8 (5 μ m, 125x4mm); fase móvel constituída por MeCN:H₂O água (50:50) (v/v); pH = 7,5; vazão de 0,8ml/min; detecção em 215nm e temperatura ambiente de 24°C $\pm$ 1°C.

- 1) Etinilestradiol (Tr = 4,83min);
- 2) Gestodeno (Tr = 5,70min).

Figura 16 – Cromatogramas das soluções padrão de etinilestradiol 30,0µg/mL + desogestrel 150,0µg/mL. Condições cromatográficas: coluna LiChrocart® 100 RP-8 (5µm, 125x4mm); vazão de 0,8ml/min; detecção em 205nm e temperatura ambiente de 24°C ± 1°C.

(a) MeCN:H₂O (70:30)

- 1) Etinilestradiol (Tr = 2,17 min);
- 2) Desogestrel (Tr = 9,39 min).

(b) MeOH:MeCN:H₂O (70:5:25)

- 1) Etinilestradiol (Tr = 1,99 min);
- 2) Desogestrel (Tr = 7,21 min).

(c) MeCN:MeOH (70:30)

- 1) Etinilestradiol (Tr = 1,53 min);
- 2) Desogestrel (Tr = 2,18 min).

Figura 17 – Cromatogramas desenvolvidos em gradiente de eluição, empregando solução padrão de etinilestradiol 30,0µg/mL + desogestrel 150,0µg/mL, obtidos no cromatógrafo líquido Hewlett Packard® modelo 1100. Os números 1 e 2 correspondem aos picos de etinilestradiol e desogestrel respectivamente. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5µm, 125x4mm); vazão de 0,8ml/min; detecção em 205nm e temperatura ambiente de 24°C ± 1°C.

(a) Fase móvel empregada: MeCN:H₂O

0,0 a 4,0 min MeCN:H₂O (55:45);
4,0 a 6,0 min MeCN:H₂O (90:10);
6,0 a 10,0 min MeCN:H₂O (90:10);
10,0 a 11,0 min MeCN:H₂O (55:45).

(b) Fase móvel empregada: MeCN:H₂O

0,0 a 1,0 min MeCN:H₂O (60:60);
1,0 a 8,0 min MeCN:H₂O (85:15);
8,0 a 10,0 min MeCN:H₂O (60:40).

Figura 18 – Comparação entre os cromatogramas de duas amostras do Grupo 1. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5 μ m, 125x4mm); fase móvel constituída por MeCN:H₂O (60:40) (v/v) ; vazão de 0,8ml/min; detecção em 215nm e temperatura ambiente de 24°C $\pm$ 1°C.

(a) Drágea:

- 1) Excipientes;
- 2) Etinilestradiol (Tr = 2,86 min);
- 3) Levonorgestrel (Tr = 3,90 min).

(b) Comprimido:

- 1) Etinilestradiol (Tr = 2,81 min);
- 2) Impureza;
- 3) Levonorgestrel (Tr = 3,85 min).

Figura 19 – Cromatograma representativo das amostras do Grupo 2. Condições cromatográficas: coluna LiChrocart® 100 RP-8 (5 μ m, 125x4mm); fase móvel constituída por MeCN:H₂O (50:50) (v/v); pH = 7,5; vazão de 0,8ml/min; detecção em 215nm e temperatura ambiente de 24°C $\pm$ 1°C.

- 1) Excipientes;
- 2) Etinilestradiol (Tr = 4,85min);
- 3) Gestodeno (Tr = 5,72min).

Figura 20 – Cromatogramas resultantes da análise de duas amostras do Grupo 3, contendo etinilestradiol 30,0 μ g/mL + desogestrel 150,0 μ g/mL (laboratório J) e 20,0 μ g de etinilestradiol + 150,0 μ g de desogestrel (laboratório I). Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® RP-8 (5 μ m, 125x4mm); fase móvel constituída por MeCN:H₂O (70:30) (v/v); vazão de 0,8ml/min; detecção em 205nm e temperatura ambiente de 24°C $\pm$ 1°C.

(a) Formulação do laboratório J:

- 1) Excipientes;
- 2) Etinilestradiol (Tr = 2,20 min);
- 3) Desogestrel (Tr = 9,72 min).

(b) Formulação do laboratório I:

- 1) Excipientes;
- 2) Excipientes;
- 3) Etinilestradiol (Tr = 2,19 min);
- 4) Desogestrel (Tr = 9,69 min).

(a)

(b)

Figura 21 – Curvas de calibração: (a) etinilestradiol e (b) levonorgestrel obtidas em coluna LiChrospher® 100 RP-18, fase móvel MeOH:H₂O (70:30) (v/v), vazão de 0,8ml/min e detecção em 215nm.

Figura 22 – Curvas de calibração: (a) etinilestradiol e (b) levonorgestrel obtidas em coluna LiChrospher® 100 RP-8, fase móvel MeCN:água (60:40) (v/v); vazão de 0,8ml/min e detecção em 215nm.

(a)

(b)

Figura 23 – Curvas de calibração: (a) etinilestradiol e (b) gestodeno obtidas em coluna LiChrospher® 100 RP-8, fase móvel MeCN:H₂O (50:50) (v/v) em pH = 7,5; vazão de 0,8ml/min e detecção em 215nm.

Tabela 8 – Comparação entre os parâmetros cromatográficos obtidos pela aplicação dos Métodos A e B, empregando solução padrão de etinilestradiol + levonorgestrel nas concentrações de 30,0 µg/mL e 150,0 µg/mL, respectivamente.

Parâmetros	Sistemas Eluentes	
	MeOH: H ₂ O (70:30) (v/v)	MeCN: H ₂ O (60:40) (v/v)
Coluna	RP-18	RP-8
Vazão (mL/min)	0,8	0,8
λ (nm)	215	215
T ₀ (cm)	0,45	0,20
T ₁ (cm)	1,15	0,70
T ₂ (cm)	1,50	1,00
W ₁ (cm)	0,20	0,10
W ₂ (cm)	0,20	0,10
R	1,75	3,0
α	1,49	1,60
N (etinilestradiol)	529	784
N (levonorgestrel)	900	1600
K (etinilestradiol)	1,56	2,50
K (levonorgestrel)	2,33	4,00

Onde:

λ = comprimento de onda

T_i = tempos de retenção (i=0,1,2);

W_i = larguras da base (i=1,2);

R = resolução;

α = fator seletividade;

N = número de pratos teóricos;

K = fator capacidade.

Tabela 9 – Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração de ETE e LEVO (Método A), pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, fase móvel MeOH:H₂O (70:30).

Concentração esperada de ETE (µg/ml)	Concentração média encontrada de ETE *	Desvio padrão das concentrações encontradas de ETE	Coefficiente de variação das concentrações de ETE (%)
2,40	2,40	0,01	0,51
4,80	4,86	0,00	0,08
7,20	7,28	0,02	0,23
12,00	12,01	0,03	0,25
24,00	23,57	0,05	0,21
30,00	30,20	0,12	0,39
36,00	35,70	0,30	0,85
42,00	42,19	0,29	0,68
48,00	48,15	0,15	0,31
60,00	59,98	0,19	0,31

Concentração esperada de LEVO (µg/ml)	Concentração média encontrada de LEVO *	Desvio padrão das concentrações encontradas de LEVO	Coefficiente de variação das concentrações de LEVO (%)
12,00	12,48	0,06	0,45
24,00	25,03	0,08	0,32
36,00	37,47	0,07	0,19
60,00	61,52	0,15	0,24
120,00	119,15	0,18	0,15
150,00	151,47	0,53	0,35
180,00	178,73	1,56	0,87
210,00	209,35	0,94	0,50
240,00	235,65	0,49	0,21
300,00	303,72	0,80	0,26

* Média de três leituras

Tabela 10 – Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração de ETE e LEVO (Método B), pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-8, fase móvel MeCN:H₂O (60:40).

Concentração esperada de ETE (µg/ml)	Concentração média encontrada de ETE *	Desvio Padrão das concentrações encontradas de ETE	Coefficiente de variação das concentrações de ETE (%)
2,40	2,41	0,01	0,17
4,80	4,80	0,02	0,31
7,20	7,25	0,02	0,32
12,00	12,11	0,06	0,51
24,00	23,75	0,11	0,44
30,00	30,23	0,04	0,13
36,00	36,04	0,05	0,15
42,00	41,94	0,09	0,22
48,00	48,26	0,09	0,18
60,00	59,77	0,13	0,23

Concentração esperada de LEVO (µg/ml)	Concentração média encontrada de LEVO *	Desvio Padrão das concentrações encontradas de LEVO	Coefficiente de variação das concentrações de LEVO (%)
12,00	13,34	0,01	0,08
24,00	25,43	0,02	0,09
36,00	37,96	0,05	0,12
60,00	63,31	0,22	0,35
120,00	121,18	0,24	0,20
150,00	153,12	0,16	0,10
180,00	180,67	0,31	0,17
210,00	208,48	0,40	0,19
240,00	236,91	0,19	0,08
300,00	300,03	0,19	0,06

* Média de três leituras

Tabela 11 – Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração de ETE e GEST, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-8, fase móvel MeCN:H₂O (50:50), pH = 7,5.

Concentração esperada de ETE (µg/ml)	Concentração média encontrada de ETE *	Desvio Padrão das concentrações encontradas de ETE	Coefficiente de variação das concentrações de ETE (%)
3,20	2,72	0,02	0,71
6,40	6,10	0,03	0,55
12,80	13,90	0,05	0,33
19,20	19,43	0,02	0,09
25,60	25,93	0,19	0,75
32,80	33,08	0,16	0,50
38,40	37,45	0,01	0,02
44,80	44,48	0,45	1,00
51,20	51,90	0,13	0,25
64,00	63,73	0,05	0,08

Concentração esperada de GEST (µg/ml)	Concentração média encontrada de GEST *	Desvio Padrão das concentrações encontradas de GEST	Coefficiente de variação das concentrações de GEST (%)
8,00	9,09	0,03	0,33
16,00	16,56	0,05	0,30
32,00	34,87	0,04	0,12
48,00	48,91	0,02	0,04
64,00	65,86	0,29	0,44
80,00	82,54	0,10	0,13
96,00	94,02	0,21	0,22
112,00	110,95	0,35	0,31
128,00	128,21	0,19	0,15
160,00	158,79	0,28	0,18

* Média de três leituras

Tabela 12 – Dados empregados para o cálculo do coeficiente de variação de uma amostra do grupo 1 (ETE + LEVO), analisada pelo método padronizado (Método B). Coeficientes de variação: 0,47% (ETE) e 0,38% (LEVO).

Amostra (30,0µg/ml ETE + 150,0µg/mL LEVO)		Concentração (µg/ml)
Injeção n°		
1	ETE	27,74
	LEVO	159,95
2	ETE	27,82
	LEVO	160,68
3	ETE	27,91
	LEVO	160,47
4	ETE	27,78
	LEVO	160,45
5	ETE	27,75
	LEVO	160,10
6	ETE	27,92
	LEVO	161,09
7	ETE	27,65
	LEVO	159,95
8	ETE	28,03
	LEVO	161,62
9	ETE	28,07
	LEVO	161,62
10	ETE	27,90
	LEVO	160,63
Média	ETE	27,86
	LEVO	160,66

Tabela 13 – Dados empregados para o cálculo do coeficiente de variação de uma amostra do grupo 2 (ETE + GEST), analisada pelo Método padronizado. Coeficientes de variação: 0,39% (ETE) e 0,44% (GEST).

Amostra (30,0µg/ml ETE + 150,0µg/mL GEST)		Concentração (µg/ml)
Injeção nº.		
1	ETE	30,16
	GEST	78,17
2	ETE	30,21
	GEST	77,49
3	ETE	30,09
	GEST	77,63
4	ETE	30,14
	GEST	77,60
5	ETE	30,22
	GEST	77,66
6	ETE	30,34
	GEST	77,41
7	ETE	30,19
	GEST	77,72
8	ETE	30,42
	LEVO	78,50
9	ETE	30,19
	GEST	77,75
10	ETE	30,01
	GEST	77,42
Média	ETE	30,20
	GEST	77,74

Tabela 14 – Resultados obtidos no teste de recuperação de uma amostra do Grupo 1 (lote A) empregando-se o método padronizado (Método A).

	Concentração do padrão adicionado (µg/mL)	Concentração recuperada *	Recuperação (%)
	10,00	10,30	102,98
ETE	20,00	20,07	100,33
	30,00	29,62	98,74
	50,00	49,87	99,73
LEVO	100,00	100,51	100,51
	150,00	151,95	100,30

Recuperação média: 100,68% (ETE), 100,52% (LEVO).

* Média de 3 determinações.

Tabela 15 – Resultados obtidos no teste de recuperação de uma amostra do Grupo 1 (lote A) empregando-se o método padronizado (Método B).

	Concentração do padrão adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada *	Recuperação (%)
	10,00	10,56	105,60
ETE	20,00	20,73	103,65
	30,00	30,34	101,15
	50,00	50,22	100,45
LEVO	100,00	100,19	100,19
	150,00	152,58	101,72

Recuperação média: 103,46% (ETE), 100,78% (LEVO).

* Média de 3 determinações.

Tabela 16 – Resultados obtidos no teste de recuperação de uma amostra do Grupo 2 (lote A) empregando o método padronizado.

	Concentração do padrão adicionado (µg/mL)	Concentração recuperada * (µg/mL)	Recuperação (%)
ETE	20,00	20,58	102,90
	40,00	39,75	99,37
	60,00	60,24	100,41
GEST	50,00	58,20	104,39
	100,00	99,90	99,90
	150,00	149,70	99,80

Recuperação média: 100,89% (ETE), 101,37% (GEST).

* Média de 3 determinações.

Tabela 17 – Resultados obtidos no teste de recuperação da amostra simulada para o Grupo 1 empregando-se o método padronizado (Método B).

	Concentração do padrão adicionado (µg/mL)	Concentração recuperada *	Recuperação (%)
	10,00	10,91	109,10
ETE	20,00	19,45	97,25
	30,00	30,77	102,56
	50,00	54,29	108,58
LEVO	100,00	98,30	98,30
	150,00	151,58	101,05

Recuperação Média: 102,97% (ETE), 102,64% (LEVO).

* Média de 3 determinações.

Tabela 18 – Resultados obtidos no teste de recuperação da amostra simulada para o Grupo 2 empregando-se o Método padronizado.

	Concentração do padrão adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada *	Recuperação (%)
	20,00	20,35	101,75
ETE	40,00	38,90	97,25
	60,00	61,22	102,03
	50,00	51,14	102,28
GEST	100,00	107,21	107,21
	150,00	148,66	98,66

Recuperação média: 100,34% (ETE), 102,72% (GEST).

* Média de 3 determinações.

Tabela 19 – Resultados obtidos na determinação dos teores dos hormônios presentes nas formulações farmacêuticas das amostras do Grupo 1, analisadas pelo Método B.

Amostra	Lote	Quantidade declarada de ETE teórico (µg/ unidade)	Valor encontrado* (µg/unidade)	Quantidade declarada de LEVO teórico (µg/unidade)	Valor encontrado* (µg/unidade)	Teor de ETE (%)	Teor de LEVO (%)
1	A	30,00	29,53	150,00	163,49	98,46	108,99
	B	30,00	27,86	150,00	160,66	92,85	107,10
2	A	30,00	28,79	150,00	165,88	95,97	110,58
	B	30,00	29,39	150,00	176,97	97,97	117,99
3	A	50,00	46,52	250,00	270,52	93,05	108,21
	B	50,00	45,96	250,00	273,33	91,93	109,33
4	A	30,00	25,86	150,00	163,47	86,20	108,98
	B	30,00	31,77	150,00	173,67	105,89	115,77
5	A	50,00	49,39	250,00	295,26	98,79	118,10
	B	50,00	46,71	250,00	281,54	93,42	112,62
6	A	30,00	24,91	150,00	159,50	83,05	106,33
	B	30,00	27,23	150,00	166,25	90,79	110,83
7	A	50,00	51,13	250,00	281,37	102,25	112,55
	B	50,00	50,32	250,00	281,66	100,66	112,67
8	A	30,00	28,74	150,00	163,38	95,80	108,92
	B	30,00	26,60	150,00	157,12	88,67	104,74
9	A	30,00	28,15	150,00	164,75	93,82	109,83
	B	30,00	29,90	150,00	172,78	99,68	115,18

* Média de 5 determinações.

Tabela 20 – Resultados obtidos na determinação dos teores dos hormônios presentes nas formulações farmacêuticas das amostras do Grupo 2, analisadas pelo método padronizado.

Amostra	Lote	Quantidade declarada de ETE teórico (µg/ unidade)	Valor encontrado* (µg/unidade)	Quantidade declarada de GEST teórico (µg/unidade)	Valor encontrado* (µg/unidade)	Teor de ETE (%)	Teor de GEST (%)
1	A	20,00	21,76	75,00	82,84	108,84	110,4
	B	20,00	21,36	75,00	77,99	106,84	103,9
2	A	20,00	20,46	75,00	78,89	102,29	105,1
	B	20,00	18,73	75,00	79,88	93,64	106,5
3	A	20,00	19,99	75,00	76,89	100,25	102,5
	B	20,00	18,90	75,00	82,82	94,52	110,4
4	A	30,00	30,11	75,00	82,35	100,38	109,8
	B	30,00	30,20	75,00	77,74	100,65	103,6
5	A	30,00	30,14	75,00	74,42	100,50	103,2
	B	30,00	29,93	75,00	79,50	99,77	105,9
6	A	20,00	21,10	75,00	80,64	105,53	107,5
	B	20,00	25,03	75,00	97,60	125,12	130,1

* Média de 5 determinações

Tabela 21 – Resultados estatísticos obtidos nas análises dos lotes das formulações farmacêuticas dos Grupos 1 e 2, empregando-se os método padronizados.

Amostra		Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)	Intervalo de 95% de confiança do teor da amostra*
Grupo 1 (Método A)	ETE	0,07	0,30	105,38 $\pm$ 0,06
	LEVO	0,45	0,34	111,53 $\pm$ 0,38
Grupo 1 (Método B)	ETE	0,13	0,47	92,85 $\pm$ 0,11
	LEVO	0,62	0,38	107,10 $\pm$ 0,51
Grupo 2	ETE	0,11	0,39	100,65 $\pm$ 0,09
	GEST	0,34	0,44	103,64 $\pm$ 0,29

* Média de 10 determinações.

Tabela 22 – Exemplos de alguns sistemas eluentes isocráticos testados para a padronização dos Métodos analíticos empregados para a análise dos hormônios esteróides contidos nas formulações de COs, em coluna RP-8 e RP-18.

MeOH	ETOH	MeCN	H ₂ O
5	—	50	45
2	—	53	45
76	—	3	21
70	—	5	25
55	—	10	35
25	—	40	35
45	—	20	35
60	—	10	30
35	—	30	35
70	—	10	20
—	55	—	45
—	45	—	55
—	30	—	70
10	40	10	40
—	50	—	50
—	45	—	55
—	40	—	60
—	35	20	45
—	—	70	30
—	—	45	55
—	—	55	45
—	—	65	35
—	—	60	40
—	—	58	42
—	—	53	47

7. DISCUSSÃO

Apesar dos COs serem usados há várias décadas, ainda existem controvérsias com relação a seus riscos e benefícios. Fato este que se confirma com a introdução, ao longo dos anos, de novas gerações de COs.

Verificou-se que existe na literatura um número considerável de estudos sobre os COs relacionados a diversos efeitos tóxicos. Parece haver correntes distintas a favor e contra os COs de 3ª geração referentes a tais efeitos^{36,42,55,72,104,164,199,212}. Grande parte dos resultados clínicos é obtida de estudos do tipo caso-controle, ainda que nesses estudos a população alvo seja relativamente homogênea não são levada em consideração as suscetibilidades individuais frente aos diferentes tipos de COs, podendo assim, ter ocorrido falhas na interpretação dos resultados em vários estudos^{42,104,212}.

Nos últimos anos, alguns trabalhos^{9,114,134,148,160,190,191,199,214} têm relacionado às características individuais e as mutações genéticas com os mecanismos celulares e moleculares, através dos quais os COs exercem seus efeitos. Em futuro próximo espera-se compreender melhor essa relação, podendo então minimizar a taxa de risco, reduzir as dosagens dos hormônios nas formulações e aumentar os benefícios do uso desses compostos.

A quantificação de hormônios quer em formulações farmacêuticas, quer em fluidos biológicos, exige metodologias que, além de específicas, sejam precisas, sensíveis e exatas, pois geralmente são encontrados em pequenas quantidades.

Existem muitos métodos para a determinação de hormônios esteróides relatados em literatura, empregando as mais diversas técnicas, porém, muitas vezes, os procedimentos analíticos são trabalhosos, demandam muito tempo, além de serem inespecíficos⁵².

Conforme observado na literatura consultada, a CLAE é, atualmente, um dos métodos analíticos mais empregados para a análise de hormônios esteróides, independente do tipo de matriz a ser analisada, dada a especificidade, sensibilidade, exatidão e precisão inerentes à técnica^{32,50,105,112,124,151,163,201,202,205}. Por esses motivos, foi a escolhida para o presente trabalho.

Apesar de terem sido encontradas muitas referências sobre métodos analíticos quantitativos para hormônios estrogênios e progestogênios, como os apresentados nas *Tabelas 3, 4 e 5* verificou-se que poucas são as publicações desenvolvidas visando a análise simultânea dos hormônios esteróides contidos nas formulações farmacêuticas de COs.

Os dois hormônios esteróides mais estudados, sob o ponto de vista analítico, e com maior número de citações encontradas na literatura, são o etinilestradiol e o levonorgestrel em associação, que correspondem à 2ª geração de COs. A literatura, no entanto, é extremamente escassa no que se refere à determinação quantitativa, empregando a CLAE, para a análise dos progestogênios desogestrel, gestodeno, e norgestimato, ou seja, a 3ª geração de COs.

Alguns ensaios preliminares foram desenvolvidos, baseando-se nos métodos já publicados. Entretanto, nem todos se mostraram reprodutíveis^{112,124,163}.

A necessidade de sistemas solventes não isocráticos, terciários ou quaternários e equipamentos mais modernos como cromatógrafos dotados de 3 ou 4 bombas de injeção para eluições em gradiente, citadas por alguns métodos, limita sua aplicabilidade em muitos laboratórios. Além disso, muitos dos métodos discutidos na literatura consomem muito tempo para as análises, o que os tornam inviáveis para aplicação em rotina.

A faixa de comprimentos de onda na região do ultravioleta (UV) é a mais adequada para a detecção de substâncias esteroidais, quando se emprega a CLAE. A maioria dos trabalhos publicada utiliza para a detecção dos hormônios estrogênicos e progestogênicos diversos comprimentos de onda no ultravioleta. Alguns trabalhos empregam a detecção por fluorescência. Os métodos fluorimétricos não são empregados para análise simultânea dos hormônios estrogênicos e progestogênicos⁸⁴.

No presente trabalho, foram obtidos os espectros de absorção no UV para cada hormônio estudado (etinilestradiol, levonorgestrel, desogestrel e gestodeno), devido à necessidade de se determinar o comprimento de onda mais adequado para a análise de cada combinação de hormônios presentes nos COs. Além disso, tomou-se por base àqueles trabalhos que empregaram a CLAE na determinação de hormônios esteróides em formulações farmacêuticas, como por exemplo, o trabalho desenvolvido por SANTORO e colaboradores¹⁵¹.

Algumas análises, empregando as soluções padrão de cada combinação de hormônio estudada, foram realizadas no cromatógrafo com detector "diode array" na faixa do UV, que permitiu através das imagens tridimensionais dos cromatogramas desenvolvidos, determinar o comprimento de onda mais adequado para ser empregado na padronização dos métodos propostos.

Quando um novo método cromatográfico é desenvolvido, muito tempo é despendido na escolha e avaliação do desempenho das diversas colunas encontradas no mercado. Publicações recentes indicam que a fase estacionária tem um papel dominante no processo geral de retenção do analito^{33,34}. As Tabelas 2, 3, 4 e 5 mostram alguns tipos de colunas que podem ser empregadas para análise de hormônios esteróides. As propriedades físico-químicas do(s) analito(s) também influem na escolha da coluna a ser utilizada.

Para a padronização dos métodos foram avaliadas primeiramente, a eficiência das colunas cromatográficas RP-18 e RP-8 (LichroCART®, 4mm x 12,5 cm), de procedência da Merck®. Foram testados aproximadamente sessenta e cinco sistemas eluentes, isocráticos, em diferentes proporções de metanol, etanol, acetonitrila e água. Alguns deles estão apresentados na Tabela 22. Optou-se por estes solventes, por serem de baixo custo, compatíveis com as colunas de fase reversa, pela facilidade de obtenção e por apresentarem toxicidade relativamente menor quando comparada a outros solventes, como dioxano, hexano e tetraidrofurano, empregados em alguns dos métodos cromatográficos mencionados.

Atualmente, existem no mercado diversas formas farmacêuticas contendo hormônios esteróides, tanto para terapia de reposição hormonal como para o uso anticoncepcional. Optou-se pela análise dos hormônios estrogênios e progestogênios contidos em comprimidos e drágeas de uso oral, por constituírem as formas farmacêuticas mais utilizadas pelas usuárias de anticoncepcionais.

Foram padronizados dois métodos para a análise do contraceptivo oral composto pela associação de etinilestradiol + levonorgestrel (Métodos A e B). O Método A, o qual é resultante da otimização do método padronizado por SANTORO e colaboradores¹⁵¹ sofreu algumas modificações. As condições cromatográficas como vazão da fase móvel e comprimento de onda foram alterados. A vazão de 0,8mL/min permitiu maior resolução dos picos, quando comparada a 1,0mL/min. O comprimento de onda em 215nm, ao invés de 212nm, mostrou ser o mais adequado para a análise da combinação dos hormônios mencionados, por proporcionar maior absorbância tanto para o etinilestradiol quanto para o levonorgestrel. Este fato pode ser observado através dos cromatogramas desenvolvidos no cromatógrafo com detector "diode array".

A quantificação desses hormônios pelo Método B em relação ao método anteriormente proposto, também foi realizada de modo diferente, isto é, a curva de calibração e a preparação das amostras foram desenvolvidas objetivando a quantificação simultânea de ambos os hormônios da formulação, considerando que esses hormônios sempre se encontram associados nas formas farmacêuticas disponíveis.

Apesar do Método A apresentar especificidade, exatidão e precisão na análise da associação de etinilestradiol + levonorgestrel, o Método B deu origem a melhores parâmetros cromatográficos, como pode ser visto na *Tabela 8*. Além disso, a opção pelo método B se deu pela facilidade de permitir a análise de vários compostos na mesma coluna cromatográfica.

Para a preparação dos padrões para a curva de calibração e a preparação das amostras para as análises, tomou-se por base a quantidade dos hormônios estrogênicos e progestogênicos declarados nas amostras comerciais, de modo que as concentrações nos pontos intermediários das curvas de calibração correspondessem à diluição de uma unidade (comprimido e/ou drágea). Assim, o ponto médio da curva de etinilestradiol + levonorgestrel corresponde a 30,0µg/mL + 150,0µg/mL respectivamente, equivalentes a 30,0µg de etinilestradiol + 150,0µg de levonorgestrel por unidade declarada.

Os sistemas eluentes testados foram primeiramente aplicados em soluções padrão e, posteriormente às amostras. Porém, muitos dos que se mostraram eficientes com os padrões não o foram com as amostras, devido à interferência dos excipientes que apresentaram absorção no comprimento de onda empregado, ocasionando assim, picos não desejados. A associação etinilestradiol + desogestrel é um exemplo dessa situação. Muitas fases móveis testadas apresentaram bom desempenho para a análise da solução padrão, conforme pôde ser visto nos cromatogramas ilustrados nas *Figuras 16, 17 e 18*.

Ainda está sendo desenvolvido um método que permita analisar os COs orais contendo o progestogênio desogestrel. Até o momento os métodos propostos, ou demandam muito tempo, ou a presença dos excipientes contidos nas formulações testadas interferem com o pico de interesse.

O norgestimato, progestogênio pertencente a 3ª geração de COS, não foi abordado neste trabalho por não ser comercializado no mercado nacional.

Não foi empregado padrão interno nos métodos analíticos propostos, visto que a escolha exige algumas condições de similaridades, o que poderia dificultar as análises. Observou-se que são poucos os trabalhos que indicam o uso de padrão interno quando se trata de separação de dois hormônios^{17,48,87,99,171}. No entanto, são indicados quando se tratam de análises quantitativas de apenas um hormônio, ou estrogênio ou progestogênio. Além do mais, com a opção do uso do padrão externo para cada hormônio testado nessa pesquisa, foram obtidos excelentes resultados, conforme pode ser observado nas tabelas e cromatogramas apresentados.

A preparação dos padrões para o teste de recuperação e a solubilização dos hormônios das amostras foi feita com metanol e/ou acetonitrila, devido a maior solubilidade dos hormônios nesses solventes que na fase móvel. Já para as curvas de calibração, o padrão foi solubilizado na fase móvel, devido a ausência de interferentes e a menor quantidade de padrão necessário.

A linearidade do método foi determinada através da curva de calibração, na qual foi verificada a proporcionalidade entre a concentração do padrão e a leitura das áreas dos picos. Os resultados obtidos na padronização do método demonstraram que as soluções padrão dos hormônios ensaiados apresentaram boa correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações, indicando que os coeficientes de linearidade são adequados (0,9 a 1,0)¹¹⁶.

As equações das retas dos métodos propostos foram calculadas como sendo $y = b.x$. Os valores de a , que correspondem à intersecção das retas nas ordenadas, mostraram-se desprezíveis, indicando que as retas, em todos os casos, passam pela origem.

Os comprimidos de placebo foram avaliados com relação a possíveis interferentes nos métodos padronizados. Apenas um tipo de placebo foi disponível para essa avaliação e para o preparo das amostras simuladas. Para todos os sistemas eluentes propostos, incluindo aqueles promissores para desogestrel (*Figuras 16 e 17*), não se detectou nenhuma interferência. Porém, na *Figura 20* estão ilustrados os cromatogramas de duas formulações contendo a associação ETE + DESO, desenvolvidos no sistema eluente MeCN:H₂O (70:30), onde se pode observar que a presença de excipientes contidos nas formulações impediu que o método proposto fosse validado.

A exatidão dos métodos comprovada através dos testes de recuperação pode ser definida como a proximidade dos resultados experimentais obtidos com a dos valores nominais. As *Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18* mostram a porcentagem de recuperação das amostras. Os resultados obtidos estão dentro da faixa esperada para que o método seja considerado exato¹¹⁶.

A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV). Para que um método seja tido como preciso o CV deve ser menor que 1,5 %¹¹⁶. Portanto de acordo com os resultados expressos na *Tabela 12 e 13*, os métodos propostos são precisos.

Tanto a Farmacopéia Americana¹⁸⁶ quanto à "INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION" (ICH)^{77,78} reconhecem que não há necessidade de se avaliar todos os parâmetros de desempenho analítico. No caso de doseamento não é necessária a avaliação do limite de quantificação (LD) e do limite de detecção (LD), porque os componentes ativos se encontram em maior concentração em relação às impurezas. Por essa razão, esses parâmetros não foram determinados neste trabalho.

Há no mercado nacional um número considerável de COs contendo as associações dos hormônios estudados como mono, bi ou trifásicos e ainda, alguns associados a outros componentes não hormonais. Foram selecionados apenas os COs nas formas monofásicas, já que alguns pesquisadores afirmam que parece não haver vantagens no emprego das formas combinadas¹⁶⁵, além da análise ser tecnicamente pouco prática e dispendiosa.

A aquisição dos lotes de foi feita de forma aleatória, observando apenas a data de fabricação e prazo de validade. A escolha dos lotes foi feita conforme o método adotado por HEENAN et al⁶⁸, isto é, foram escolhidos dois lotes diferentes de cada grupo de amostras para cada análise.

De acordo com a Farmacopéia Americana¹⁸⁶, a associação de etinilestradiol com levonorgestrel não deve conter menos que 90% e não mais que 110% de um dos componentes. Baseando-se nessa informação observa-se na *Tabela 19*, que três lotes do Grupo 1 apresentaram o conteúdo de estrogênio abaixo do permitido. Quanto ao conteúdo de progestogênio, nesse mesmo grupo, 8 lotes estavam com as quantidades acima do permitido e dois lotes estavam no limite do teor aceitável.

Com relação às amostras do Grupo 2, pode-se observar na *Tabela 20* que apenas uma amostra estava com o conteúdo de estrogênio e progestogênio acima da média geral e além do permitido.

Todos os resultados apresentados foram previamente corrigidos, considerando-se o teor dos padrões empregados.

Os métodos cromatográficos dependem firmemente dos padrões de referências para fornecer dados exatos. Assim, a pureza dos padrões de referência é fundamental. Segundo o FDA, há duas categorias de padrões de referência: compendial e não compendial. Os padrões compendiais são obtidos de fontes como por exemplo, a Farmacopéia Americana, logo não necessitam de posterior caracterização. Os padrões de referência não compendial são aqueles com elevado teor de pureza, mas exigem caracterização cuidadosa para garantir sua identidade, potência e pureza¹⁷⁵.

Neste trabalho, os padrões de referência empregados não eram compendiais e o teor de pureza rotulado foi fornecido pelos laboratórios cedentes. Logo, não foi realizado nenhum teste de caracterização e comprovação da informação dada. Considerando que esta pesquisa não teve por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica quantitativa com fins de fiscalização de COs, mas sim uma análise do perfil das formulações hoje comercializadas no mercado nacional. A interpretação dos resultados obtidos para cada amostra pôde fornecer uma idéia de como está a qualidade desses medicamentos sob o ponto de vista teor e quais as implicações relacionadas com este aspecto.

Sabendo-se que muitos dos efeitos tóxicos estão relacionados também com a dosagem dos hormônios e o uso prolongado, cabe aqui questionar se os laboratórios farmacêuticos consideram esta questão, visto que envolve um problema de saúde pública, onde grande parte da população usuária de COs está exposta a um risco complementar, isto é, acima do inerente e previsível. Cabe, portanto, às autoridades competentes nesse âmbito, a fiscalização e a tomada das devidas providências.

8. CONCLUSÕES

Considerando-se as revisões da literatura e as condições experimentais em que foi realizado o presente trabalho, pode-se concluir que:

- Ao lado dos efeitos farmacológicos e benéficos dos contraceptivos orais, existe grande preocupação em relação os efeitos tóxicos;
- Os COs trouxeram benefícios incontestáveis as pessoas desde a sua incorporação na terapêutica, porém apesar de seguros existe uma série de efeitos não desejáveis associados ao uso que estão nos alvos de estudos no mundo todo;
- Existem muitas controvérsias em relação ao uso de COs com várias patogêneses e a opinião dos pesquisadores nessa área são divergentes;
- De acordo com a literatura consultada, os efeitos tóxicos dos COs podem estar relacionados à dosagem, ao tipo de progestogênio (gerações) e a susceptibilidade individual;
- Os hormônios esteróides etinilestradiol, levonorgestrel, gestodeno podem ser determinados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência;

- Os métodos propostos permitiram a análise quantitativa e simultânea das combinações de etinilestradiol + levonorgestrel e etinilestradiol + gestodeno, em formulações farmacêuticas – comprimidos e drágeas;
- O emprego da CLAE na análise quantitativa dos contraceptivos orais, permite monitorizar as quantidades dos hormônios nas formulações farmacêuticas estudadas;
- O metanol e a acetonitrila são solventes apropriados para a solubilização dos hormônios contidos nas formulações farmacêuticas de COs;
- Os excipientes contidos nas amostras 1 e 2 não interferiram nos métodos padronizados;
- Os métodos propostos para a análise da combinação etinilestradiol + desogestrel, em solução padrão, não foram adequados para a análise dessa mesma combinação em formulações farmacêuticas, uma vez os excipientes presentes interferiram nos métodos;
- As composições dos comprimidos placebos empregados para a avaliação de interferentes são diferentes daquelas que compõem as formulações do Grupo 3. É provável que grande parte dos interferentes detectados são formados por diferentes tipos de polivinilpirrolidona (PVP), uma vez que este composto é bastante empregado como excipiente de comprimidos. O PVP é um dos componentes das formulações sólidas que se apresenta em grande quantidade, é solúvel em compostos orgânicos e nos sistemas eluentes testados.

- Os métodos aqui padronizados podem ser aplicados na rotina diária de um laboratório;

- Os parâmetros estatísticos obtidos mostraram que os métodos têm boa correlação linearidade (variando entre 0,999 a 0,9999) os coeficientes de variação comprovaram a precisão dos métodos propostos e os testes de recuperação efetuados apresentaram resultados que comprovaram a exatidão;

- A determinação exata dos teores dos hormônios contidos nas formulações farmacêuticas de COs deve ser priorizada quando da produção, não apenas sob o ponto de vista do controle de qualidade, mas também sob o aspecto toxicológico, uma vez que os efeitos tóxicos e dosagem estão relacionados;

- A ingestão de doses acima dos limites permitidos pode significar uma exposição adicional do risco à saúde das usuárias de COs, o qual em função do tempo de exposição pode traduzir em consequências inesperadas como patologias diversas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. ALONSO, C.C. In: OGA, S., BASILE, A.C. **Medicamentos e suas interações**. São Paulo: Atheneu, 1994. p. 130-139.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15.ed. Arlington: AOAC, 1990, v.1, p.xvii.
3. AXELSON, M., SHUMACHER, G.S., JOVALL, J. Analysis of tissue steroids by liquid gel chromatography and computadorized gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v.12, p.535-540, 1974.
4. BARAN, DT. Magnitude and determinants of premenopausal bone loss. **Osteoporosis Int.**, Goldalming, v.4, suppl.1, p.31-34, 1994.
5. BARRETT, C.E., BUSH, T.L. Estrogen and coronary heart disease in women. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.265, p.1861-1867, 1991.
6. BASIC tests for pharmaceutical substances. Geneva: WHO, 1986. p. 75-76.

* As referências citadas estão de acordo com a norma NBR 6023/90 preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE. INDEX (CASSI) 1999.[CD-ROM].

7. BERG, G., KOHLMEIER, L., BRENNER, H. Effect of oral contraceptive progestins on serum copper concentration. **Eur. J. Clin. Nutr.**, London, v.52, n.10, p.711-715, 1998.
8. BERGA, S.L. Metabolic and endocrine effects of the desogestrel-containing oral contraceptive Mircette (TM). **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.179, n.1, p.9-17, 1998.
9. BERTINA, R.M., KOELEMAN, R.P.C., KOSTER, T., ROSENDAAL, F.R., DIRVEN, R.J., De RONDE, H., VAN DER VELDEN, P.A., REITSMA, P.H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**, London, v.369, p.64-67, 1994.
10. BRICARELLO, S. In: ZANINI, A.C., OGA, S. **Farmacologia aplicada**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1994. p.449-488.
11. BRITISH pharmacopoeia. [CD-ROM] London: Bristish Pharmacopoeia Commission, 1998. Version 2.1.
12. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stantionery Office, 1993. v.1, p.204-206, 263, 539-540, v.2, p.869, 906, 1070-1071.
13. BURKMAN, R.T. Lipid metabolism effects with desogestrel-containing oral contraceptives. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.168, p.1033-1040, 1993.
14. BURKMAN, R.T. Oral contraceptives: an update. **Drugs Today**, Barcelona, v.35, n.11, p.857-866, 1999.

15. BURKMAN, R.T. The estrogen component of OCs: cardiovascular benefits and risks. **Int. J. Fertil. Women's Med.**, Port Washington, v.42, p.145-157, 1997.
16. BUSH, T.L., COWAN, L.D., BARRET-CONNOR, E., CRIQUI, M.H., RIFKIND, B.M. Estrogen use and all cause mortality: preliminary results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.249, p.903-906, 1983.
17. CARIGNAN, G., LODGE, B.A., SKAKUM, W. Quantitative analysis of ethynodiol diacetate and ethynil estradiol/mestranol in oral contraceptive tablets by HPLC. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.71, n.2, p.264-266, 1982.
18. CARR, B.R., Ory, H. Estrogen and progestin components of oral contraceptives: relationship to vascular disease. **Contraception**, New York, v.55, n.5, p.267-272, 1997.
19. CASTELLI, W.P. Cardiovascular disease: Pathogenesis, epidemiology, and risk among users of oral contraceptives who smoke. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.180, n.6, p.349-356, 1999.
20. CHRISTIANSEN, C., LINDSAY, R. Estrogen, bone loss and preservation. **Osteoporosis Int.**, Goldalming, v.1, p.7-13, 1990.
21. COLDITZ, G.A., HANKINSON, S.E., HUNTER, D.J., WILLETT, W.C., SPEIZER, F.E. The use of estrogens and progestins and risk of breast cancer in postmenopausal women. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.332, p.1589-1592, 1995.

22. CONARD, J. Biological coagulation findings in third-generation oral contraceptives. **Hum. Reprod. Update**, Oxford, v.5, n.6, p.672-680, 1999.
23. Consensus conference on combination oral contraceptives and cardiovascular disease. **Fertil. Steril.**, Birmingham, v.71, suppl., p.1-6, 1999.
24. COOPER, J. Emergency contraceptive pills. **Can. Pharm. J.**, Alta Vista, v.130, n.3, p.39-40, 1997.
25. CORSON, S.L. Oral contraceptives for the prevention of osteoporosis. **J. Reprod. Med.**, Saint Louis, v.38, p.1015-1020, 1993.
26. COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T., eds. **Robbins' pathologic basis of disease**. 6.ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 414-416, 1222-1224.
27. CROOK, D., GODSLAND, I. Safety evaluation of modern oral contraceptives: effects on lipoprotein and carbohydrate metabolism. **Contraception**, New York, v.57, n.3, p.189-201, 1998.
28. DeBENEDETTI, V.M.G., WELSH, J.A., YU, M.C., BENNETT, W.P. p53 mutations in hepatocellular carcinoma related to oral contraceptive use. **Carcinogenesis**, London, v.17, n.1, p.145-149, 1996.
29. DECHERNEY, A. Bone-sparing properties of oral contraceptives. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.174, p.15-20, 1996.

30. DiSIENA, M.R., INTRES, R., CARTER, D.J. Factor V Leiden and pulmonary embolism in a young woman taking an oral contraceptive. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, Philadelphia, v.19, n.4, p.362-367, 1998.
31. DOLLERY, S. **Therapeutic drugs**. New York: Churchill Livingstone, 1992. suppl.1, p. 99-102.
32. DORANTES, A., STAVCHANSKY, S. Modification of the USP: dissolution method for the analysis of norethindrone and esthiny estradiol tablets. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.83, p.379-381, 1994.
33. DORSEY, J.G., COOPER, W.T. Cloud Point Preconcentration and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons with fluorescence detection. **Anal. Chem.**, Washington, v.66, p.857A, 1994.
34. DORSEY, J.G., DILL, K.A. Revisionist look at solvophobic driving forces in reversed-phase liquid chromatography. **Chem. Rev.**, Washington, v.89, p.331, 1989.
35. DOÖRBERG, B., TACK, J.W., KRAUSE, W., HÜMPEL, M. Pharmacokinetics and biotransformation of gestodeno in man. In: Elstein, M., ed. **Gestodene**. s.l. local: Parthenon Publishing, 1989. p. 35-44.
36. DUNN, N., DE CAESTECKER, L., BIGRIGG, A. Oral contraceptives and thrombosis. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, Philadelphia, v.10, n.3, p.205-209, 1998.

37. DUNN, N., THOROGOOD, M., FARAGHER, B., DeCAESTECKER, L., MACDONALD, T.M., MCCOLLUM, C., THOMAS, S., MANN, R. Oral contraceptives and myocardial infarction: results of the MICA case-control study. **Br. Med. J.**, London, v.318, n.7198, p.1579-1583, 1999.
38. DUPONT, W.D., PAGE, D.L. Menopausal estrogen replacement therapy and breast cancer. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.151, p.67-72, 1991.
39. EISMAN, J.A. Efficacy of treatment of osteoporotic fractures. **Am. J. Med.**, New York, v.98, suppl.2A, p.17-23, 1995.
40. EUROPEAN pharmacopoeia. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 1997. p. 821-822, 1094- 1095.
41. FAMODU, A.A., OSADEBE, W.C. Effects of oral contraceptives on coagulation factors in African women. **Thromb. Res.**, New York, v.90, p.27-30, 1998.
42. FARMER, R.D., LAWRENSEN, R.A, TOMPSON, C.R., KENNEDY, J.G., HAMBLETON, I.R. Population-based study of risk of venous thromboembolism associated with various oral contraceptives. **Lancet**, London, v.349, p.83-88, 1997.
43. FERNANDEZ, N., GARCIA, J.J., DIEZ, M.J., TÉRAN, M.T., SIERRA, M. Rapid high-performance liquid chromatographic assay of ethinylloestradiol in rabbit plasma **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.619, p.143-147, 1993.

44. FINUCANE, F.F., MADANS, J.H., BUSH, T.L., WOLF, P.H., KLEINMAN, J.C. Decreased risk of stroke among postmenopausal hormone users: results from a national cohort. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.153, p.73-79, 1993.
45. FRIEND, D.R., CATZ, P., HELLER, J., OKAGAKI, M. Transdermal delivery of levonorgestrel. IV. Evaluation of membranes. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.78, p.477-480, 1989.
46. FRITSCH, M.K., MURDOCH, F.E. In: BRODY, T.M., LARNER, J., MINNEMAN, K.P. **Farmacologia humana: da molecular à clínica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 430-447.
47. GAMBRELL, R.D. Prevention of endometrial cancer with progestogens. **Maturitas**, New York, v.8, p.159-162, 1986.
48. GAO, Z.H., SHUKLA, A.J., JOHNSON, J.R., CROWLEY, W.R. Controlled release of a contraceptive steroid from biodegradable and injectable gel formulations: In vitro evaluation. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v.12, p.857-863, 1995.
49. GAZDAG, M., SZEPESEI, G., FÁBIÁN, V.K. Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. II. Optimization for selectivity in normal-phase chromatography; **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.454, p.95-107, 1988.
50. GAZDAG, M., SZEPESEI, G., SZELECZKI, E. Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. I. Optimization for selectivity in reversed-phase chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.454, p.83-94, 1988.

51. GENNARO, A., ed. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 19.ed. Easton : Mack, 1995. v.2, p.1091-1095.
52. GLUCK, J.A.P., SHEK, E. Determination of ethinylestradiol and norethisterone in an oral contraceptives capsule by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v.18, p.631-636, 1980.
53. GOLDEFIEN, A. In: KATZUNG, B.G., ed. **Basic & clinical pharmacology**. 6.ed. Norwalk: Appleton & Lange: Prentice-Hall International, 1995. p. 608-636.
54. GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 952-972.
55. GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 1045-1067.
56. GÖRÖG, S., HERÉNYI, B. Analysis of steroids XXXVIII: the use of high-performance liquid chromatography with diode-array UV detection for estimating impurity profiles of steroid drugs. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.400, p.177-186, 1987.
57. GRAHAM, R.E., WILLIAMS, P.A., KENNER, C.T. Absorbance-pH relationship in steroid-tetrazolium reaction. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.62, p.103-107, 1973.

58. GRAHAM, R.E., WILLIAMS, P.A., KENNER, C.T. Detection of decomposition and analytical interferences in pharmaceutical preparations containing corticosteroids. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v. 59, p. 1152-1156, 1970.
59. GRIMES, D.A. The morbidity and mortality of pregnancy: still risky business. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.170, p.1489-1494, 1994.
60. GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.925-939.
61. HAAPANIEMI, H., HILBORN, M., JUVELA, S. Lifestyle associated risk factors for acute brain infarction among persons of working age. **Stroke**, Baltimore, v.28, p.26-30, 1997.
62. HANKINSON, S.E., COLDITZ, G.A., HUNTER, D.J., ROSNER, B. A quantitative assessment of oral contraceptive use and risk of ovarian cancer. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.80, p.708-714, 1992.
63. HANKINSON, S.E., COLDITZ, G.A., MANSON, J.E., WILLETT, W.C., HUNTER, D.J., STAMPFER, M.J., SPEIZER, F.E. A prospective study of oral contraceptive use and risk of breast cancer (Nurses' Health Study, United States). **Cancer, Causes Control, Pap. Symp.**, Canberra, v.8, n.1, p.65-72, 1997.
64. HANNAFORD, P.C., CROFT, P.R., KAY, C.R. Oral contraception and stroke: evidence from Royal college of General Practitioners oral contraceptive study. **Stroke**, Baltimore, v.25, p.935-942, 1994.

65. HANNAFORD, P.C., KAY, C.R. The risk of serious illness among oral contraceptive users: evidence from the RCGP's oral contraceptive study. **Br. J. Gen. Pract.**, London, v.48, n.435, p.1657-1662, 1998.
66. HANNAFORD, P.C., KAY, C.R., VESSEY, M.P., PAINTER, R., MANT, J. Combined oral contraceptives and liver disease. **Contraception**, New York, v.55, n.3, p.145-151, 1997.
67. HANSTEN, P.D., HORN, J.R. **Drug interaction**. 6.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p. 326-333.
68. HARVEY, H.E., HEENAN, M.P., WARING, J.M. A survey of oral contraceptive tables in New Zealand. **N. Z. Pharm.**, v.2, n.1, p.40-41, 1982.
69. HASSAN, H.A. Oral contraceptive-induced mesenteric venous thrombosis with resultant intestinal ischemia. **J. Clin. Gastroenterol.**, Philadelphia, v.29, n.1, p.90-95, 1999.
70. HEINEMANN, L.A.J., LEWIS, M.A., THOROGOOD, M., HOLZMANN, I.G., BRUPPACHER, R. Case-control study of oral contraceptives and risk of thromboembolic stroke: result from international study on oral contraceptive and the health of young women. **Br. Med. J.**, London, v.315, p.1502-1504, 1997.
71. HEINEMANN, L.A.J., WEIMANN, A., GERKEN, G., THIEL, C., SCHLAUD, M., DOMINH T. Modern oral contraceptive use and benign liver tumors: the German Benign Liver Tumor Case-Control Study. **Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care**, Carnfort, v.3, n.4, p.194-200, 1998.

72. HELMERHORST, F.M., BLOEMENKAMP, K.W.M., ROSENDAAL, F.R., VANDENBROUCKE, J.P. Oral contraceptives and thrombotic disease: risk of venous thromboembolism. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.78, p.327-333, 1997.
73. HENDERSON, B.E. Hepatocellular carcinoma and contraceptives, **Br. J. Cancer**, London, v.48, p.437-440, 1983.
74. HENDERSON, B.E. The cancer question: an overview of recent epidemiologic and retrospective data. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.161, p.1859-1864, 1989.
75. HIRAI, S., HUSSAIN, A., BAHHAIR, S. Sensitive method for determination of ethinylestradiol in presence of norethindrone. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.69, p.857-869, 1980.
76. HRESCHYSHYN, M.M., HOPKINS, Z., ZYLSTRA, S., ANBAR, M. Associations of parity, breast-feeding, and birth control pills with lumbar spine and femoral neck bone densities. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.159, p.318-322, 1998.
77. ICH Q2A. Text on validation of analytical procedures. [Online]. Available: <http://www.ich.org> [november 6, 1996]
78. ICH Q2B. Text on validation of analytical procedures: methodology. [Online]. Available: <http://www.ich.org> [october 27, 1994]
79. JAMES, T. Fluorimetric determination of ethinylestradiol in tablets. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.61, p.1306-1308, 1972.

80. JAMES, T. Spectrophotofluorometric determination of mestranol in oral contraceptive tablets. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.59, p.1648-1649, 1970.
81. JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. guidelines for primary validation parameters. **J. Liq. Chromatogr. Related Technol.**, New York, v.19, n.5, p.737-757, 1996.
82. JICK, S.S., JICK, H., GUREWICH, V., MYERS, M.W., VASILAKIS, C. Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen components. **Lancet**, London, v.346, p.1589-1593, 1995.
83. JICK, S.S., JICK, H., GUREWICH, V., MYERS, M.W., VASILAKIS, C. Risk of acute myocardial infarction and low-dose combined oral contraceptives. **Lancet**, London, v.347, p.627-628, 1996.
84. JOHNSTON, M.A. General method for assay of oral contraceptives by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr.**, Amsterdam, v.216, p.269-278, 1981.
85. JOHNSTON, S.C., COLFORD, J.M., GRESS, D.R. Oral contraceptives and the risk of subarachnoid hemorrhage: a meta-analysis. **Neurology**, Minneapolis, v.51, n.2, p.411-418, 1998.
86. JORDAN, V.C., JENG, M.H., CATHERINO, W.H., PARKER, C.J. The estrogenic activity of synthetic progestins used in oral contraceptives. **Cancer**, Philadelphia, v.71, n.4, p.1501-1505, 1993.

87. KATAYAMA, M., TANIGUCHI, H. Determination of estrogens in plasma by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with 2-(4-carboxyphenyl)-5,6-dimethylbenzimidazole. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.616, p.317-322, 1993.
88. KAUNITZ, A.M. Combined oral contraception with desogestrel/ethinyl estradiol: tolerability profile. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.168, p.1028-1033, 1993.
89. KAUNITZ, A.M. Oral contraceptive estrogen dose considerations. **Contraception**, New York, v.58, n.3, p.15-21, 1998.
90. KAUNITZ, A.M. Oral contraceptive health benefits: Perception versus reality. **Contraception**, New York, v.59, n.1, p.29-33, 1999.
91. KAY, C.R., HANNAFORD, P.C. Breast cancer and the pill: further report from the Royal College of General Practitioners oral contraceptive study. **Br. J. Cancer**, London, v.58, p.657-680, 1988.
92. KILLINGER, J., HAHN, D.W., PHILLIPS, A., HETYEI, N.S., McGUIRE, J.L. The affinity of norgestimate for uterine progesterone receptors and its direct action on the uterus. **Contraception**, New York, v.32, p.311-319, 1985.
93. KLUFT, C., LANSINK, M. Effect of oral contraceptives on hemostatic variables. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.78, p.315-326, 1997.
94. KOLS, M., RINEHART, W., PIOTROW, P.T., COUCETTE, L., QUILLIN, W.F. Oral contraceptives in the 1980s. **Popul. Rep. Ser. A.**, v.6, p.189-222, 1982.

95. KOROLCOVAS, A. **Análise farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1984. p.178-180.
96. KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 693-7111.
97. KOROLKOVAS, A., CUNHA, B.C.A., FRANÇA, F.F.A.C., FERREIRA, E.I. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
98. LA VECCHIA, C., FRANCESCHI, S. Oral contraceptives and ovarian cancer. **Eur. J. Cancer Prev.**, Philadelphia, v.8, n.4, p.297-304, 1999.
99. LANE, P.A., MAYBERRY, D.O., YOUNG, R.W. Determinatin of norgestimate and ethinyl estradiol in tablets by high-performance liquid chromatography. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.76, p.44-47, 1987.
100. LAVECCHIA, C., TAVANI, A., FRANCESCHI, S., PARAZZINI, F., LAVECCHIA, C., TAVANI, A., FRANCESCHI, S., PARAZZIN, I.F. Oral contraceptives and cancer: a review of the evidence **Drug Saf.**, Auckland, v.14, n.4, p.260-272, 1996.
101. LEBOW, M.A. The pill and the press: reporting risk. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.93, n.3, p.453-456, 1999.
102. LEVESQUE, H., BORG, J.Y., COURTOIS, H. The vascular risk of third generation oral contraceptives. **J. Mal. Vasc.**, Paris, v.22, n.1, p.5-12, 1998.

103. LEWIS, M.A. Myocardial infarction and stroke in young women: what is the impact of oral contraceptives? **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.179, n.3, p.68-77, 1998.
104. LEWIS, M.A., HEINEMANN, L.A.J., MacRAE, K.D., BRUPPACHER, R., SPITZER, W.O. The increased risk of venous thromboembolism and the use of third generation progestagens: role of bias in observational reaserch. **Contraception**, New York, v.54, p.5-13, 1996.
105. LEWIS, M.A., HEINEMANN, L.A.J., SPITZER, W.O., MACRAE, K.D., BRUPPACHER, R., THOROGOOD, M. The use oral contraceptives and the occurrence of acute myocardial infarction in young women. **Contraception**, New York, v.56, p.129-140, 1997.
106. LEWIS, M.A., SPITZER, W.O., HEINEMANN, L.A.J., MACRAE, K.D., BRUPPACHER, R., THOROGOOD, M. Transnational Research Group on Oral Contraceptive and the Health of young Women. Third generation oral contraceptives and risk of myocardial infarction: an international case-control study. **Br. Med. J.**, London, v.312, p.88-90, 1996.
107. LIDEGAARD, O. Oral contraceptives and risk of a cerebral thromboembolic attack: Result of case-control study. **Br. Med. J.**, London, v.306, p.956-963, 1993.
108. LIDEGAARD, O. Thrombotic diseases in young women and the influence of oral contraceptives. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.179, n.3, p.62-67, 1998.
109. LIEHR, J.G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? **Endocr. Rev.**, Bethesda, v.21, n.1, p.40-54, 2000.

110. LINDSAY, R., TOHME, J., KANDERS, B. The effect of oral contraceptive use on vertebral bone mass in pre- and post-menopausal women. **Contraception**, New York, v.34, p.333-340, 1986.
111. LOBO, R.A. Clinical review 27: effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Philadelphia, v.73, p.925-930, 1991.
112. MADDEN, S., BACK, D.J., MARTIN, C.A., ORME, M.L. Metabolism of the contraceptive steroid desogestrel by the intestinal mucosa. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v.27, n.3, p.295-299, 1989.
113. MARTINDALE, W.H. **The extra pharmacopoeia**. 31.ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. p. 773-775, 1471-1503.
114. MARTINELLI, I., SACCHI, E., LANDI, G., TAIOLI, E., DUCA, F., MANNUCCI, P.M. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Baltimore, v.19, n.3, p.700-703, 1999.
115. MARTINELLI, I., SACCHI, E., LANDI, G., TAIOLI, E., DUCA, F., MANNUCCI, P.M. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.338, n.25, p.1793-1797, 1998.
116. MARTINS, S.M., RUDD, D.R. The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals. **Acta Pharm. Jugosl.**, Zagreb, v.40, p.7-19, 1990.

117. MELTON, L.J. Screening for osteoporosis. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.112, p.516-528, 1990.
118. MERCK index: an encyclopedia of chemical and drugs. 12.ed. Whitehouse Station : Merck, 1996. p.495, 637, 749, 1151.
119. MICHAËLSSON, K., BARON, J.A., FARAHMAND B.Y. Hormone replacement and hip fracture risk: population based case-control study. **Br. Med. J.**, London, v.316, p.1858-1863, 1998.
120. MICHAELSSON, K., BARON, J.A., FARAHMAND, B.Y., PERSSON, I., LJUNGHALL, S. Oral-contraceptive use and risk of hip fracture: a case-control study. **Lancet**, London, v.353, n.9163, p.1481-1484, 1999.
121. MILLER, D.R., ROSENBERG, L., KAUFMAN, D.W., STOLLEY, P., WARSHAUER, M., SHAPIRO, S. Breast cancer before age 45 and oral contraceptive use: new findings. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.129, p.269-280, 1989.
122. MISHELL Jr., D.R. Oral contraception: past, present, and future perspectives. **Int. J. Fertil.**, Port Washington, v.36, suppl.1, p.7-18, 1991.
123. NALIMOV, U.U. The application of mathematical statistics to chemical analysis. Oxford: Pergamon Press, 1963. p.100-103.
124. NEVADO, J.J.B., FLORES, J.R., PEÑALVO, G.C. Simultaneous determination of ethinyloestradiol and gestodene in oral contraceptives by derivative spectrophotometry. **Anal. Lett.**, New York, v.30, n.12, p.1029-1032, 1997.

125. NEVADO, J.J.B., FLORES, J.R., PEÑALVO, G.C. Simultaneous determination of ethinyloestradiol and levonorgestrel in oral contraceptives by derivative spectrophotometry. **Analyst**, London, v.122, n.1, p.41-42, 1997.
126. NEVADO, J.J.B., FLORES, J.R., PEÑALVO, G.C. Simultaneous spectrophotometric determination of ethinylestradiol and levonorgestrel by partial least squares and principal-component regression multivariate calibration. **Anal. Chim. Acta.**, Amsterdam, v.340, n.1/3, p.257-256, 1997.
127. NGUYEN, T.H., SHIU, G.K., WORSLEU, W.N., SKELLY, J.P. Dissolution testing of norethindrone: ethinyl estradiol, noretindrone: mestranol, and norethindrone acetato: ethinyl estradiol combination tablets. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.79, p.163-167, 1990.
128. NIEUWEBOER, B., TACK, J, TAEUBER, U., HUEMPEL, M., WENDT, H. Development and application of a radioimmunoassay for the new progestogen gestodene. **Contraception**, New York, v.40. n.3, p.313-323, 1989.
129. NIEUWEBOER, B., TACK, J., TÄUBER, U., HYEL, M., WENDT, H. Development and aplication of a radioimmunassay of the new progestogen gestodene. **Contraception**, New York, v.40, n.3, p.313-323, 1989.
130. NUEBERGER, J. Oral contraceptives and hepatocellular carcinoma. **Br. Med. J.**, London, v.292, p.1355-1357, 1986.

131. OHKRA, T., ISSE, K., AKAZAWA, K., HAMAMOTO, M., YAOI, Y., HAGINO, N. Long-term estrogen replacement therapy in female patients with dementia of the Alzheimer type: case reports. **Dementia**, Osaka, v.6, p.99-107, 1995.
132. PASINI, R. GAVAZZI, G. Selective colorimetric determination of ethynodiol diacetate in oral estrogen-progestin combination. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.58, p.872-874, 1969.
133. PETITTI, D.B., SIDNEY, S., BERNSTEIN, A., WOLF, S., QUESENBERRY, C.P.J., ZIEL, H.K. Stroke in users of low-dose oral contraceptives. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.335, p.8-15, 1996.
134. POORT, S.R., ROSENDAAL, F.R., REITSMA, P.H., BERTINA, R.M. A common genetic variation in the 3'- untranslated region of the protrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and na increase in venous thrombosis. **Blood**, New York, v.88, p.3698-3703, 1996.
135. PRABHAKAR, B., DESHPANDE, S.G. Analysis of levonorgestrel in transdermal patches by HPLC. **Indian Drugs**, Bombay, v.34, n.12, p.699-701, 1997.
136. PSATY, B.M., HECKBERT, S.R., ATKINS, D., SISCOVICK, D.S., FURBERG, C.D. A review of the association of estrogens and progestins with cardiovascular disease in postmenopausal womens. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.153, p.1421-1427, 1993.
137. PULSINELLI, W.A. Cerebrovascular diseases. In: BENNETT, J.C., PLUM, F., eds. **Cecil's textbook of medicine**. 20.ed. Philadelphia: WB. Saunders, 1996. p.2057-2080.

138. RABE, T., FELDMANN, K., GRUNWALD, K., RUNNEBAUM, B. Liver tumours in women on oral contraceptive. **Lancet**, London, v.344, N.8936, p.1568, 1994. [Letter]
139. RANGE, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 362-387.
140. RECKER, R.R., DAVIES, K.M., HINDERS, S.M., HEANEY, R.P., STEGMAN, M.R., KIMMEL, D.B. Bone gain in young adult women. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.268, p.2403-2408, 1992.
141. REES, D.C., COX, M., CLEGG, J.B. Word distribution of factor V Leiden. **Lancet**, London, v.346, p.1133-1134, 1995.
142. RIGGS, B.L., MELTON, L.J. The prevention and treatment of osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.327, p.620-627, 1992.
143. RIZZOLI, R., BONJOUR, J.P. Hormones and bones. **Lancet**, London, v.349, suppl.1, p.S120-26, 1997.
144. ROSENBERG, L., SHAPIRO, S., SLONE, D., KAUFMAN, D.W., HELMRICH, S.P., PALMER, J.R., ZAUBER, A.G. A case-control study of oral contraceptive use and invasive epithelial ovarian cancer. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.139, p.654-661, 1994.
145. ROSENDAAL, F.R., DOGGEN, C.J.M., ZIVELIN, A., ARRUDA, V.R., AIACH, M., SISCOVICK, D.S., HILLARP, A., WATZKE, H.H., BERNARDI, F., CUMMING, A.M., PRESTON, F.E., REITSMA, P.H. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.79, p.706-708, 1998.

146. ROSENFELD, R.L. Toward optimal estrogen-replacement therapy. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.309, p.1120-1121, 1983.
147. ROSING, J., TANS, G. Effects of oral contraceptives on hemostasis and thrombosis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.180, p.375-382, 1999.
148. ROSING, J., TANS, G., NICOLAES, G.A., THOMASSEN, M.C., VAN OERLE, R., VAN DER PLOEG, P.M. Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second- and third- generation oral contraceptives. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.97, p.233-238, 1997.
149. ROY, D., LIEHR, J.G. Estrogen, DNA damage and mutations. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.424, n.1/2, p.107-115, 1999.
150. SALMERÓN, P., MOLTÓ, J.J.M., VILLAVERDE, R. Patologia vascular cerebral em mujeres jóvenes. **Rev. Neurol.**, v.25, p.1003-1007, 1997.
151. SANTORO, M.I.R.M., GOVATO, E.B., HACKMANN, E.R.M. Determination of steroid hormones in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography. **Anal. Lett.**, New York, v.26, n.5, p.925-935, 1993.
152. SCHAUF, C.L., MOFFETT, D.F., MOFFETT, S.B. **Fisiologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 771p.

153. SCHWARTZ, S.M., PETITI, D.B., SISCOVICK, D.S., LONGSTRETH JR., W.T., SIDNEY, S., RAGHUNATHAN, T.E., QUESENBERRY JR., C.P., KELAGHAN, J. Stroke and use of low-dose oral contraceptives in young women: a pooled analysis of two US studies. **Stroke**, Baltimore, v.29, n.11, p.2277-2284, 1998.
154. SCHWARTZ, S.M., SISCOVICK, D.S., LONGSTRETH, W.T.J., PSATY, B.M., KOEPESELL, T.D. Use of low-dose oral contraceptives in young women. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.127, p.596-603, 1997.
155. SCHWINGL, P.J., ORY, H.W., VISNESS, C.M. Estimates of the risk of cardiovascular death attributable to low-dose oral contraceptives in the United States. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.180, n.1, p.241-249, 1999.
156. SHOUPPE, D. Effects of desogestrel on carbohydrate metabolism. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.168, p.1041-1047, 1993.
157. SHOUPPE, D. New progestins-clinical experiences: gestodene. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.170, p.1562-1568, 1994.
158. SHROFF, A.P., GRODSKY, J. Comparison of na ultraviolet spectrophotometric assay and gas-liquid chromatographic assay for 17 α -ethinylestradiol-3methylether in tablets. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v.56, p.460-464, 1967.
159. SIDNEY, S., PETITTI, D.B., QUESENBERRY, C.P.J., KLATSKY, A.L., ZIEL, H.K., WOLF, S. Myocardial infarction um users of low-dose oral contraceptives. **Obstet Gynecol**; v.88, p.939-944, 1996.

160. SIMIONI, P., PRANDONI, P., LENSING, A.W.A. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with na Arg 506-Gln mutation in the gene for factor V (factor v Leiden). **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.336, p.399-403, 1997.
161. SISKIND, V., GREEN, A., BAIN, C., PURDIE, D. Beyond ovulation: oral contraceptives and epithelial ovarian cancer. **Epidemiology**, Baltimore, v.11, n.2, p.106-110, 2000.
162. SKEGG, D.C. Oral contraception and health. **Br. Med. J.**, London, v.318, n.9, p.69-70, 1999.
163. SMILDE, A.K., BRUINS, C.H.P., DOORNBOS, D.A., VINK, J. Optimization of the reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of synthetic estrogenic and progestogenic steroids using the multi-criteria decision making method. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.410, p.1-12, 1987.
164. SPITZER, W.O., LEWIS, M.A., HEINEMANN, L.A.J., THOROGOOD, M., MacRAE, K.D. Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. **Br. Med. J.**, London, v.312, p.83-88, 1996.
165. SPRITZER, P.M., OSÓRIO, M.C. In: FUCHS, F.D., WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 561-574.
166. STADEL, B.V., LAI, S.H., SCHLESSELMAN, J.J., MURRAY, P. Oral contraceptives and premenopausal breast cancer in nulliparous women. **Contraception**, New York, v.38, p.287-299, 1988.

167. STAMPFER, M.J., COLDITZ, G.A., WILLETT, W.C., MANSON, J.E., HENNEKENS, C.H. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from nurses' health study. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.325, p.756-762, 1991.
168. STAMPFER, M.J., WILLETT, W.C., COLDITZ, G.A., ROSNER, B., HENNEKENS, C.H. A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.313, p.1044-1049, 1985.
169. STANCZYK, F.Z., GOEBELSMANN, U. Use of [125I] iodohistamine-labelled steroid derivatives as radio-ligands for radioimmunoassay of natural and synthetic steroids. *J. Steroid. Biochem.*, Oxford, v.14, n.1, p.53-62, 1981.
170. STANFORD, J.L., WEISS, N.S., VOIGT, L.F., DALING, J.R., ROSSING, M.A. Combined estrogen and progestin hormone replacement therapy in relation to risk of breast cancer in middle-aged women. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.274, p.137-142, 1995.
171. STRUSIAK, S.H., HOOPERHEIDE, J.G., GARDNER, M.S. Determination of ethynil estradiol in solid dosage forms by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.*, Columbus, v.71, p.636-640, 1982.
172. STUBBLEFIELD, P.G. Effects on hemostasis of oral contraceptives containing desogestrel. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, Saint Louis, v.168, suppl., p.1047-1052, 1993.
173. SUPELCO chromatography products 1996 Bellefonte: SUPELCO, 1996. p.A130. 779. 1994.

174. SUPELCO chromatography products 1996 Bellefonte: SUPELCO, 1996. p.A130.
175. SWARTZ, M.E., KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technol. Ed. Bras.**, v.2, n.3, p.12-20, 1998.
176. TAECHAKRAICHANA, N., LIMPAPHAYOM, K., NINLAGARN, T., PANYAKHAMLERD, K., CHAIKITTISILPA, S., DUSITSIN, N. A randomized trial of oral contraceptive and hormone replacement therapy on bone mineral density and coronary heart disease risk factors in postmenopausal women. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.95, n.1, p.87-94, 2000.
177. TALMAGE, J.M., PENNER, M.H., GELLER, M. Quantitative gas-liquid chromatographic determination of ethinylestradiol. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.54, p.1194-1996, 1965.
178. TÄUBER U., TACK W., MATTES H. Single dose pharmacokinetics of gestone in women after intravenous and oral administration. **Contraception**, New York, v.40, p.461-479, 1989.
179. TEMPLETON, R.J., ARNET, W.A., JACOUljeVIC, M. Comparative study of a new fluorimetric assay of mestranol in tablets with CGL and colorimetric assays. **J. Pharm. Sci.**, Columbus, v.57, p.1168-1172, 1968.
180. THOROGOOD, M., MANN, J., MURPHY, M., VESSEY, M. Fatal stroke and use of oral contraceptives: *findings* from a case-control study. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.136, p.35-45, 1992.

181. THOROGOOD, M., MANN, J., MURPHY, M., VESSEY, M. Is oral contraceptive use still associated with an increased risk of fatal myocardial infarction?: report of a case-control study. **Br. J. Obstet. Gynecol.**, London, v.98, p.1245-1253, 1991.
182. TODD, J.C., LAWRENSEN, R., FARMER, R.D.T., WILLIAMS, T.J., LEYDON, G.M. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: a re-analysis of the MediPlus database. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.14, n.6, p.1500-1505, 1999.
183. TZUORIO, C., TEHINDRAZANARIVELO, A., IGLESIAS, S., ALPEROVITCH, A., CHENDRU, F., D' ANGLEJAN, C.J., BOUSSER, M.G. Case control study of migraine and risk of ischaemic stroke in young women. **Br. Med. J.**, London, v.310, p.830-833, 1995.
184. UNITED States pharmacopoeia. 19.ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 1975. p.622-623.
185. UNITED States pharmacopoeia. 22.ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 1995. p.1532.
186. UNITED States pharmacopoeia. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 1995. p.638-639, 880-882, 1105-1106, 1776-1777, 1982-1984.
187. URSIN, G., ROSS, R.K., SULLIVAN, H.J., HANISCH, R., HENDERSON, B., BERNSTEIN, L. Use of oral contraceptives and risk of breast cancer in young women. **Breast Cancer Res. Treat.**, Dordrecht, v.50, n.2, p.175-184, 1998.

188. URSIN, G., ROSS, R.K., SULLIVAN, H.J., HANISCH, R., HENDERSON, B., BERNSTEIN, L. Use of oral contraceptives and risk of breast cancer in young women. **Breast Cancer Res. Treat.**, Dordrecht, v.50, n.2, p.175-184, 1998.
189. USP DI. 17.ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 1997. p. 1364-1390, 2445-2456. [Drug information for the health care professional, v.1].
190. VANDENBROUCKE, J.P., HELMERHORST, F.M., BLOEMENKAMP, K.W.M., ROSENDAAL, F.R. Third-generation oral contraceptive and deep venous thrombosis: from epidemiologic controversy to new insight in coagulation. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.177, n.4, p.887-891, 1997.
191. VANDENBROUCKE, J.P., KOSTER, T., BRIËT, E., REITSMA, P.H., BERTINA, R.M., ROSENDAAL, F.R. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. **Lancet**, London, v.344, p.1453-1457, 1994.
192. VASILAKIS, C., JICK, S.S., JICK, H. The risk of venous thromboembolism in users of postcoital contraceptive pills. **Contraception**, New York, v.59, n.2, p.79-83, 1999.
193. VESSEY, M., LAWLESS, M., YEATS, D. Efficacy of different contraceptive methods. **Lancet**, London, v.1, p.841-842, 1982.
194. VESSEY, M., LAWLESS, M., YEATS, D. Oral contraceptives and stroke: finding in large prospective study. **Br. Med. J.**, London, v.289, p.530-531, 1984.

195. WALTERS, M.J., AYERS, R.J., BROWN, D.J. Analysis of illegally distributed anabolic steroid products by liquid chromatography with identity confirmation by mass spectrometry or infrared spectrophotometry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.73, p.904-926, 1990.
196. WATSON, T.G. STEWART, B.J. Sensitive direct radio-immunoassay for assessing D-norgestrel [levonorgestrel] levels in human plasma. **Ann. Clin. Biochem.**, London, v.25, n.3, p.280-287, 1988.
197. WEIDERPASS, E., ADAMI, H.O., BARON, J.A., MAGNUSSON, C., LINDGREN, A., PERSSON, I. Use of oral contraceptives and endometrial cancer risk. **Cancer Causes Control**, Oxford, v.10, n.4, p.277-284, 1999.
198. WEISS, G. Gynecologic committee assesses: VTE and oral contraceptive link. **ACOG Newslett**; v.12, p.3-4, 1996.
199. WEISS, G. Risk of venous thromboembolism with third-generation oral contraceptives: a review. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.180, n.2, p.295-301, 1999.
200. WIEGRATZ, I., JUNG, H.C., GROSS, W., KUHL, H. Effect of two oral contraceptives containing ethinyl estradiol and gestodene or norgestimate on different lipid and lipoprotein parameters. **Contraception**, New York, v.58, n.2, p.83-91, 1998.
201. WILD, M.J., RUDLAND, P.S., BACK, D.J. Metabolism of the oral contraceptive steroids ethynylestradiol, norgestimate and 3-ketodesogestrel by a human endometrial cancer cell line (HEC-1A) and endometrial tissue *in vitro*. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v.45, p.407-420, 1993.

202. WILD, M.J., RUDLAND, P.S., BACK, D.J. Metabolism of the oral contraceptive steroids ethynylestradiol and norgestimate by normal (Huma 7) and malignant (MCF-7 and ZR-75-1) human breast cells in culture. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v.39, p.535–543, 1991.
203. WILSON, P.W.F., GARRISON, R.J., CASTILLI, W.P. Postmenopausal estrogen use, cigarette smoking, and cardiovascular morbidity in women over five: framingham study. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.313, p.1038-1043, 1985.
204. WINKLER, U.H., OBERHOFF, C., BIER, U., SCHINDLER, A.E., GILLAIN, D. Hemostatic effects of two oral contraceptives containing low doses of ethinyl estradiol and either gestodene or norgestimate: an open, randomized, parallel-group study. **Int. J. Fertil.**, Port Washington, v.40, n.5, p.260-268, 1995.
205. WONG, F.A., JUZWIN, S.J., TISCHIO, N.S., FLOR, S.C. Determination of norgestimate in serum by automated high performance liquid chromatography an subsequent radioimmunoassay. **J. Liq. Chromatogr.**, New York, v.18, p.1851-1861, 1995.
206. WORD HEALTH ORGANIZATION. Oral contraceptives and neoplasia; report of a WHO scientific group. **W.H.O. Tech. Rep. Ser.**, Geneva, p 817, 1992.
207. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Effect of different progestagens in low estrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. **Lancet**, London, v.346, n.8990, p.1582-1588, 1995.

208. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Venous thromboembolic disease and oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. **Lancet**, London, v.346, n.8990, p.1575-1582, 1995.
209. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Acute myocardial infarction and combined oral contraceptives: results of an international multicentre case-control study. **Lancet**, London, v.349, n.9060, p.1202-1209, 1997.
210. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Migraine and stroke in young women: case-control. **Br. Med. J.**, London, v.318, p.13-18, 1999.
211. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Ischaemic stroke and combined oral contraceptives: result of an international, multicentre case-control study. **Lancet**, London, v.348, p.498-505, 1996.
212. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Hemorrhagic stroke, overall stroke risk, and combined oral contraceptives: result of an international, multicentre case-control study. **Lancet**, London, v.348, p.505-510, 1996.
213. YAGER, J.D., ZURLO, J., NAN, N. Sex-hormones and tumor promotion in liver. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v.198, n.2, p.667-674, 1991.

214. ZEITOUN, K., CARR, B.R. Is there an increased risk of stroke associated with oral contraceptives? **Drug Saf.**, Auckland, v.20, n.6, p.467-473, 1999.
215. ZONDERVAN, K.T., CARPENTER, L.M., PAINTER, R., VESSEY, M.P. Oral contraceptives and cervical cancer: further findings from the Oxford Family Planning Association contraceptive study. **Br. J. Cancer**, London, v.73, n.10, p.1291-1297, 1996.

ANEXOS

FEPAFAR

A.F.P.L.P.

C.F.F.

Certificado

Nájlá Mohamad Kassab

Participou do XVII Congresso Pan-Americano de Farmácia e do V Congresso Mundial de Farmacêuticos de Língua Portuguesa, realizado no período de 31 de outubro a 3 de novembro de 2000, no Hotel Glória, Rio de Janeiro na qualidade de Apresentador do Trabalho Científico "Avaliação de contraceptivos orais disponíveis no mercado nacional por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)"
demais autores: Maya Hasegawa; Maria Inês Rocha Miritello Santoro

Rio de Janeiro, 3 de novembro de 2000

Dr. Rodrigo Salas Sanchez
Presidente da FEPAFAR

Dra. Judith Lima
Presidente da AFPLP

Dr. Jaldo de Souza Santos
Presidente do CFF

Dr. Gustavo Baptista Éboli
Presidente da Comissão Organizadora

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
V SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF-USP

CERTIFICADO

C E R T I F I C A M O S que o trabalho “ANÁLISE DE ANTICONCEPCIONAIS ORAIS
COMERCIALIZADOS EM FARMÁCIAS EMPREGANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE)” de autoria de NÁJLA M. KASSAB, MAYA HASEGAWA, MARIA INÊS ROCHA
MIRTELLO SANTORO, foi apresentado no XV Seminário de Pós-Graduação, realizado no
período de 16 à 20 de outubro de 2000.

São Paulo, 17 de outubro de 2000.

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho
Diretor

Prof. Dr. Sunao Sato
Vice-Presidente da Comissão de Pós-Graduação

THE 114th AOAC INTERNATIONAL ANNUAL MEETING AND EXPOSITION FINAL PROGRAM

Leading the Revolution

Quality

September 10-14, 2000
Adam's Mark Hotel • Philadelphia, Pennsylvania, USA

Apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

G-305

ANIL K. SINGH, ERIKA R. M. KEDOR-HACKMANN, and MARIA INÉS R. M. BANTORO, *Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, Brasil*: Direct HPLC Separation of Beta-blockers on Cellulose Triis-3, 5-Dimethylphenyl Carbamate Column: Studies with Atenolol. Atenolol is a cardioselective beta-adrenoceptor blocking agent, used clinically for the treatment of angina pectoris and hypertension. It is an amino alcohol that exhibits a chiral structure and is used commercially as racemic mixture, though S-form being responsible for the desired biological effect. The quantitation and validation of analytical technique for atenolol enantiomers was performed utilizing a cellulose type column (tris- 3,5-dimethylphenyl carbamate, Chiralcel OD, 250x4.6 mm, 10 μ m). The mobile phase constituted of hexane:ethanol:diethylamine:acetic acid (80:40:0.2:0.2 v/v), with a flow rate of 1.0 mL/min. and ultraviolet detection at 278 nm, at ambient temperature. Separate standard curve for R-atenolol and S-atenolol showed linearity over a concentration range from 50-130 (g/mL, with coefficient of correlation of 0.9991 and 0.998, respectively. The coefficient of variation and average recovery of R-atenolol of samples A, B, C, and D were 1.15% and 101.08%; 0.74% and 98.25%; 1.05% and 102.57%; 0.84% and 101.57% respectively. The coefficient of variation and average recovery of S-atenolol in samples A, B, C and D were 1.33% and 98.87%; 0.99% and 100.76%; 1.17% and 101.89%; 1.26% and 100.38%, respectively. The method permits rapid (~ 10-12min.) quantitative analysis of atenolol enantiomers in pharmaceutical tablets with precision and accuracy.

Acknowledgements: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

G-306

TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
DÉBORA CRISTINA DE OLIVEIRA, Eli Lilly do Brasil Ltda., São Paulo, Brazil; Ethylene oxide sterilization—A comparison of process efficacy considering CFC and HCFCs mixtures. Taking into account the importance of the sterilization process applied to medicines and medical devices, different kinds of methods have been developed, also applicable to heat sensitive materials. Ethylene oxide is the process most widely applied to medical devices. Due its explosiveness and inflammability, it has been used associated to non active gases, wich inhibit these properties, mainly the chlorofluorocarbons (CFCs). Recent knowledge about ozone-depleting gases and an international consensus on the need of reducing their effects are promoting a search for alternative chemicals. From these, one of the most interesting are the hydrochlorofluorocarbons (HCFCs). This paper aims to compare two ethylene oxide sterilization mixtures: Oxyfume 12A (using CFC 12) and Oxyfume 2002A (using HCFCs 22 and 124), under different concentrations (450mg/L and 600mg/L) and different temperatures (45°C, 55°C and 85°C). To accomplish this procedure, sub-lethal challenges were performed (3, 6, 9, 12 and 15 minutes of exposition), using six biological indicators per cycle prepared in a laboratory, as well as two others purchased from an American supplier (Attest® 1264, 3M). The sterilizing efficacy of Oxyfume 12A and Oxyfume 2002A revealed equivalent results, even in different concentrations. It is gratifying to conclude that the sterilization process using oxyfume 2002A is both an efficient contribution to a safe utilization of products and, at the same time, to preserve the animal life on Earth.

30 jul a 2 ago/ 2000
Centro de Eventos da AMRIGS
Porto Alegre RS Brasil

www.ufrgs.br/farmacia2000

II ENECO

Encontro Nacional de Ensino em Controle de
Qualidade de Medicamentos e Cosméticos
Simposio Internacional em Controle de
Qualidade de Medicamentos e Cosméticos

certificado

Certificamos a participação de

Maria Inês Santoro

como Apresentador(a) do Poster

**"Determinação de Hormônios Esteróides em Contraceptivos Orais por
CLAE"**

do(s) autor(es)

M.I.R.M, Santoro; M. Hasegawa; N.M. Kassab

Prof. Tércio Paschke Oppe
Coordenador II ENECO

Prof. Elfrides Eva Scherman Schapovol
Presidente de Honra II ENECO

OMOÇÃO

cidade Brasileira de Tecnologia Farmacêutica
missão de Professores de Química Farmacêutica
missão de Professores de Controle de
Qualidade de Medicamentos

PATROCÍNIO OFICIAL

Schering-Plough

PATROCÍNIO

APOIO

SESSORIA À ORGANIZAÇÃO

ANDRÉIA BRUM EVENTOS
R. Prof. Ivo Corseuil 304/201 - CEP 90690-410 - Porto Alegre RS
Tel/Fax (51) 338 4344 - 381 2380 - abevents@terra.com.br

30 julho a 2 agosto de 2000
Centro de Eventos da AMRIGS
Porto Alegre RS Brasil

**PROGRAMA OFICIAL
RESUMO DE TRABALHOS**

3-25

ASSAY OF ETIDOCAINE HYDROCHLORIDE IN DENTAL CARTRIDGES BY UV DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRY

N. dos S. Silva¹ & E.E.S. Schapoval

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

neelsa.farmacia.ufrgs.br

Etidocaine Hydrochloride is a local anesthetic of the amide type, a analogous of lidocaine, that presents significant clinical advantages. A review of literature showed that no analytical procedures are reported in pharmacopoeias for determination of etidocaine in pharmaceutical formulations. The aim of this work was to develop an alternative method for determination of etidocaine hydrochloride in injections for dental use by UV Derivative Spectrophotometry. Duranest injections (Astra, USA) contain a local anesthetic drug etidocaine hydrochloride 15 mg mL⁻¹ and epinephrine bitartrate 5 g mL⁻¹ as vasoconstrictor agent. The spectra were recorded using a Shimadzu UV 160A double-beam ultraviolet-visible spectrophotometer (Kyoto, Japan) with 1 cm quartz cells, equipped with thermal printer and electronic derivative mode. The operating conditions were: delta wavelength 0.1 nm and scan speed 480 nm min⁻¹ with a constant 2 nm slit width. Derivative ultraviolet method was calibrated for D¹, D² and D³ in the concentration range 80.0 - 480.0 g mL⁻¹. The standard solution was prepared in 0.1 mol L⁻¹ hydrochloric acid. Determination of etidocaine hydrochloride was performed at 277.5 nm for D¹, 268.8 nm for D² and 270.2 nm for D³, using the "zero peak" technique. Calibration curves were in agreement with Beer's Law and presented the following equations: D¹_{277.5} = 2901.3X4.17, D²_{268.8} = 3235.2X4.72 and D³_{270.2} = 741.7X2.36. The least and the largest recovery test percentage results was 95.75% and 102.13%, respectively. The results obtained show there was no interference of the matrix under the mentioned experimental conditions. The method is simple, rapid, precise, accurate and present a low-cost. It can be used in a routine analysis of such pharmaceutical dosage forms.

The authors wish to thank Astra-USA for supply etidocaine hydrochloride reference and pharmaceutical.

This work was supported by CNPq program (Brasília - Brasil).

3-26

DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES EM CONTRACEPTIVOS ORAIS POR CLAE

N.M. Kassab^{**}; M. Hasegawa^{*}; M.L.R.M. Santoro(ineva.usp.br)

^{*}Departamento de Farmácia-ICF USP

^{**}Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas-ICT USP

Os contraceptivos orais combinados (COs) são medicamentos constituídos de hormônios sexuais, estrogênios e progestogênios associados, utilizados para prevenção da gravidez. Muitos dos efeitos tóxicos dos COs estão relacionados com o uso prolongado, a dose dos constituintes e a susceptibilidade individual. Em geral, a quantidade desses hormônios presentes nas formulações farmacêuticas são relativamente pequenas, o que limita sua detecção e quantificação com segurança. Portanto, empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com o objetivo de validar um método analítico quantitativo para a determinação desses hormônios. Foram analisadas 3 formulações farmacêuticas diferentes de COs combinados do mercado nacional: amostra 1 (etinilestradiol-levonorgestrel), amostra 2 (etinilestradiol-desogestrel) e amostra 3 (etinilestradiol-gestodeno). Foram validados métodos analíticos para as amostras 1 e 3. A amostra 1 foi analisada por dois métodos (métodos A e B). O método A empregou coluna RP-18 e fase móvel metanol água (70/30). O método B, coluna RP-8 e acetonitrila água (60/40) como fase móvel. O fluxo empregado para ambos os métodos foi de 0,8 mL/min e o comprimento de onda (λ) 215 nm. A amostra 3 foi analisada em coluna RP-8, fase móvel acetonitrila água (50/50) em pH 7,5, com mesmo fluxo e adotados nos métodos A e B. Ainda não se concluiu a padronização do método para a análise da amostra 2. Até o momento, o sistema eluente acetonitrila água (70/30) em coluna RP-8 foi a mais promissora para análise dos constituintes dessa amostra. Estudos adicionais estão sendo realizados, a fim de obter os parâmetros mais adequados para a análise da formulação farmacêutica contendo (etinilestradiol+desogestrel).

Apoio Financeiro: ^{**}CAPES (UFMS-PICDT); ^{*}CNPq

CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

7º SICUSP

AGROPECUÁRIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

NOVEMBRO DE 1999

7.13

DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE): M. Hasegawa¹, N. M. Kassab², M. I. R. M. Santoro (orientadora): Departamento de Farmácia - FCF/USP; Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - FCF/USP

Os contraceptivos orais (COs) ou anticoncepcionais, empregados no controle da fertilização, são formulações farmacêuticas a base de esteróides. Considerando-se o uso prolongado desses hormônios e os riscos que oferecem a longo prazo, verificou-se a necessidade de quantificá-los em preparações farmacêuticas, com o intuito de prevenir e/ou reduzir os riscos associados ao seu uso, os quais podem estar relacionados com a variação de doses contidas nessas preparações, além da susceptibilidade dos organismos expostos. Portanto, este trabalho tem por objetivo padronizar uma metodologia analítica para determinação dos hormônios esteróides levonorgestrel (LEVO), etinilestradiol (ETE), desogestrel e gestodeno contidos em medicamentos comercializados no Brasil, utilizando a CLAE. Avaliou-se os parâmetros: escolha da coluna; composição da fase móvel, testando-se diferentes proporções de metanol/água, acetonitrila/água e velocidade de fluxo. Os resultados obtidos indicam que a mistura metanol/água (70:30) é mais adequada para análise da associação de ETE-LEVO em coluna RP18. Testes adicionais estão sendo realizados com o intuito de obter-se os parâmetros mais adequados para cada análise e validação da metodologia proposta.

¹CNPq (Bolsa de Iniciação Científica); ²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CAPES (PICDT).

**AValiação de 1
AO PRODUTO A
(orientadora): Labo**

O controle
prosegue no proce
parar os testes efetu
Diclofenaco Sódico
fases do processo. A
de e doseamento. C
matéria-prima (secc
espectrofotometria l
o que levou a um pr
uma das etapas este
que confirma a imp

Projeto financiado pelo I

7.14

A PADRONIZAÇÃO SECUNDÁRIA NO CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO - ANÁLISE DE METODOLOGIAS¹: L. M. Cesila¹, T. J.A. Pinto (orientadora): Laboratório Confar-FCF/USP

É prática comum no controle de qualidade de medicamentos e matérias-primas a utilização de padrões domésticos secundários, já que os padrões primários ou substâncias de referência oficiais são de alto custo e muitas vezes de difícil acesso. Porém, muitas vezes, as metodologias usadas para a padronização secundária são inadequadas ao tipo ou à finalidade do padrão. Nosso objetivo foi testar as diversas metodologias farmacopeicas utilizando técnicas diferentes e metodologias específicas para as diversas formas farmacêuticas. Os padrões analisados foram bastante diversificados, assim como as técnicas utilizadas, sendo que o ensaio por HPLC foi mantido em todos os casos. Os resultados preliminares tem mostrado que os ensaios por HPLC fornecem sempre valores maiores que os outros métodos estando esta variação entre 1,81 e 3,44% em relação ao menor valor. Portanto, dependendo da técnica utilizada na padronização secundária o resultado de uma análise pode ser sobre ou subvalorizado. Para minimizar este problema sugerimos que a metodologia utilizada na padronização secundária seja a mesma que será utilizada na análise do produto.

¹Projeto financiado pelo Laboratório CONFAR.

**PLANEJAMENTO
ATIVOS EM M,
DIGLICERÍDICO:**

O objetivo
fármacos triglicéridi
utilizando diésteres d
como grupos espaçar
naturais, sejam cind
primaquina e espaçar
linamente, prolongan
fármacos é a síntese
proteção e desproteç
de síntese proposta
diazabíciclo[5.4.0]ur
obtidos são submetid
diglicerídio puro, dev

Bolsista PIBIC/CNPq.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
IV SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF-USP

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o trabalho "DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)" de autoria de NÁJLA M. KASSAB, MAYA HASEGAWA, MARIA INÊS ROCHA M. SANTORO, foi apresentado no XIV Seminário de Pós-Graduação, realizado no período de 18 à 22 de outubro de 1999.

São Paulo, 22 de outubro de 1999.

Seiz Ogga

Diretor

Mário Hiroyuki Hirata
Presidente da Comissão de Pós-Graduação