UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Determinação simultânea de etinilestradiol e drospirenona em contraceptivos orais por cromatografia em fase líquida de alta eficiência e eletroforese capilar

Viviane Benevenuti Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo

2012

Viviane Benevenuti Silva

Determinação simultânea de etinilestradiol e drospirenona em contraceptivos orais por cromatografia em fase líquida de alta eficiência e eletroforese capilar

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro

Orientadora/Presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

São Paulo, novembro de 2012

À minha familia pela força e incentivo

E por compreender a distância

À minha querida mãe que em todos os momentos da minha vida sempre me apoiou com seu carinho e proteção. Agradeço a Deus pela sua existência!

Agradecimentos

A Deus, pela inspiração, força e fé, que constituíram os pilares para que eu me mantivesse no caminho para atingir o objetivo desejado.

À Profa. Titular Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro, sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, pela oportunidade em ser sua aluna, por seu carinho e constante incentivo durante todas as etapas.

À Profa Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann, ao Profo Dr. Anil Kumar Singh e á Profa Dra. Maria Segunda A. Prado pela valiosa colaboração, apoio e sugestões dadas ao longo de todo o trabalho.

Ao Profo. Dr. Jivaldo do Rosário Matos pelas sugestões e pela oportunidade de ter podido trabalhar em seu grupo de pesquisa.

A Iria R. da Silva pelo carinho pelas palavras de incentivo e pela motivação e apoio.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Jorge Lima, Elizabeth Paiva, Elaine Ychico, David Olimpio e Leila Bonadio pela colaboração e atenção em todos os trâmites e documentações necessárias.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido no desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório, Angel Gaona Galdos, Caroline Zanoline, Cátia Panizzon, Cintia Mothe, Cibele Lima, Claudia Oliveira, Helen Dutra, Michelle Bachi, Simone Ávila e Vanessa Tavares que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família paulistana Caroline Cardozo, Fabiana Fonseca, Lelio Almeida, Maria Pericás, Michelle Loreto, Sarah Gonçalves e Simone Cristina pela torcida e por todo apoio nesse período.

Sumário

1. INTRODUÇÃO ---------- 24

2. REVISÃO DA LITERATURA ---------- 26

2.1. Generalidades ---------- 26

2.2. Tipos de contraceptivos hormonais de uso oral ---------- 27

2.3. Mecanismos de ação dos contraceptivos orais combinados (COCS) ---------- 29

2.4. Propriedades físico-químicas ---------- 30

2.4.1. Etinilestradiol ---------- 30

2.4.2. Drospirenona ---------- 30

2.5. Farmacocinética ---------- 31

2.5.1. Estrogênio ---------- 31

2.5.2. Progestina ---------- 32

2.6. Interações medicamentosas ---------- 34

2.7. Uso clínico e benefícios ---------- 35

2.7.1. Controle do ciclo menstrual ---------- 35

2.7.2. Sintomas emocionais e físicos da síndrome disfórica pré-menstrual (SDPM) ---- 36

2.7.3. Controle da acne ---------- 36

2.7.4. Tratamento de ovário policístico ---------- 37

2.7.5. Prevenção da osteoporose ---------- 37

2.8. Considerações sobre os efeitos nocivos dos contraceptivos ---------- 37

2.8.1. Efeito carcinogênico ---------- 38

2.8.2. Distúrbios vasculares ---------- 41

2.7.3. Alterações metabólicas ---------- 44

2.9. Metodologia analítica ---------- 45

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS ---------- 50

3.1. Análise térmica ---------- 50

3.2. Eletroforese capilar ----------51

3.2.1. Princípio do método----------51

3.2.2. Tipos de eletroforese capilar ----------52

3.3. Cromatografia em fase líquida de alta eficiência ----------56

4. OBJETIVOS ----------58

4.1. Objetivo geral----------58

5.2. Material e Métodos----------59

5.2.1. Material ----------59

5.2.1.1. Equipamentos ----------59

5.2.1.2. Reagentes e solventes----------60

5.2.1.3. Fármacos empregados como substâncias químicas de referência ----------61

5.2.1.4. Amostras ----------61

5.2.1.5. Placebo----------62

5.2.2. Métodos ----------63

5.2.2.1. Intervalo de fusão----------63

5.2.2.2. Análise térmica ----------63

5.2.2.2.1. Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG) ----------63

5.2.2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)----------63

5.2.2.3. Espectrofotometria no ultravioleta (UV) ----------64

5.2.2.4. Análise elementar ----------64

5.2.2.5. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) ----------64

5.2.2.6. Cromatografia em fase líquida de alta eficiência ----------64

5.2.2.6.1. Metodologia ----------64

5.2.2.6.2. Testes preliminares ----------66

5.2.2.6.3. Condições analíticas padronizadas----------66

5.2.2.6.4. Validação do método analítico para a determinação simultânea de etinilestradiol e drospirenona por cromatografia em fase líquida de alta eficiência. ----------67
5.2.2.6.4.1. Curva analitica ----------67
5.2.2.6.4.2. Determinação da linearidade de resposta dos detectores (UV e Fluorescência) ----------67
5.2.2.6.4.3. Determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) por CLAE-UV e CLAE-Fluorescência----------68
5.2.2.6.4.4. Seletividade----------69
5.2.2.6.5. Determinação da precisão por CLAE-UV e CLAE- Fluorescência--------69
5.2.2.6.5.1. Repetibilidade (intra-dia)----------69
5.2.2.6.5.2. Precisão Intermediária (precisão inter-dia) ----------70
5.2.2.6.5.3. Execução do teste de recuperação - Exatidão ----------70
5.2.2.6.5.4. Determinação da robustez do método ----------71
5.2.2.6.6. Teste de estresse----------72
5.2.2.6.6.1. Estabilidade em meio ácido----------72
5.2.2.6.6.2. Estabilidade em meio alcalino ----------72
5.2.2.6.6.3. Estabilidade em meio oxidante ----------73
5.2.2.6.6.4. Estabilidade em meio neutro ----------73
5.2.2.7. Eletroforese capilar----------74
5.2.2.7.1. Testes preliminares ----------74
5.2.2.7.1.1. Cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC) ----------74
5.2.2.7.1.2. Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) ----------75
5.2.2.7.2. Metodologia ----------75
5.2.2.7.3. Condições analíticas padronizadas----------78
5.2.2.7.4. Validação do método analítico para a determinação simultânea de etinilestradiol e drospirenona por eletroforese capilar ----------78
5.2.2.7.4.1. Curva analitica----------78

5.2.2.7.4.2. Determinação da linearidade de resposta do detector ----------79

5.2.2.7.4.3. Determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) ----------79

5.2.2.7.4.4. Seletividade----------80

5.2.2.7.5. Determinação da precisão ----------80

5.2.2.7.5.1. Repetibilidade (intra-dia)----------80

5.2.2.7.5.2. Precisão Intermediária (precisão inter-dias)----------81

5.2.2.7.5.3. Execução do teste de recuperação - Exatidão ----------82

5.2.2.7.5.4. Determinação da robustez do método ----------82

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO----------83

6.1. Determinação de pureza do etinilestradiol e drospirenona ----------83

6.1.1.Intervalo de fusão ----------83

6.1.2.Análise térmica----------83

6.1.2.1. Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)----------83

6.1.3.Espectrofotometria no ultravioleta ----------86

6.1.3. Análise elementar ----------88

6.1.4. Espectrometria no infravermelho----------89

6.2. Cromatografia em fase líquida de alta eficiência ----------90

6.2.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos ----------90

6.2.1.1. Solução padrão ----------92

6.2.1.2. Análise do placebo ----------93

6.2.1.3. Seletividade ----------93

6.2.2. Linearidade----------94

6.2.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)----------97

6.2.4. Teste de adequabilidade do sistema----------99

6.2.5. Precisão---------- 100

6.2.5.1. Determinação dos teores percentuais das amostras ---------- 101
6.2.6. Exatidão ---------- 102
6.2.7. Robustez ---------- 102
6.2.8. Teste de estresse ---------- 103
6.2.8.1. Estabilidade em meio ácido ---------- 104
6.2.8.2. Estabilidade em meio alcalino ---------- 105
6.2.8.3. Estabilidade em meio oxidante ---------- 105
6.2.8.4. Estabilidade em meio neutro ---------- 106
6.3. Eletroforese capilar ---------- 107
6.3.1. Otimização dos parâmetros analíticos ---------- 108
6.3.1.1. Solução padrão ---------- 109
6.3.1.2. Análise do placebo ---------- 110
6.3.1.3. Análise das amostras comerciais ---------- 110
6.3.2. Linearidade ---------- 111
6.3.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) ---------- 114
6.3.4. Teste de adequabilidade do sistema ---------- 115
6.3.5. Precisão ---------- 115
6.3.5.1. Determinação dos teores percentuais das amostras ---------- 117
6.3.6. Exatidão ---------- 117
6.3.7. Robustez ---------- 118
6.4. Comparação entre técnicas de CLAE e EC para a determinação quantitativa de etinilestradiol e drospirenona ---------- 120
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS ---------- 121
8. REFERÊNCIAS ---------- 122
9. ANEXOS ---------- 131

Lista de figuras

Figura 1. Fórmula estrutural do etinilestradiol 30

Figura 2. Fórmula estrutural da drospirenona 31

Figura 3. Diagrama esquemático do sistema de eletroforese capilar 52

Figura 4. Representação esquemática do equipamento para cromatografia em fase líquida de alta eficiência 57

Figura 5. Curvas TG/DTG e DSC do etinilestradiol : (1) Curvas TG/DTG obtidas entre 25 e 900°C (β = 10° C min^{-1}), em atmosfera de ar sintético (50 mL min^{-1}). (2) Curvas TG/DTG entre 25 e 900°C (β = 10° C min^{-1}) e DSC entre 25 e 200°C (β = 10° C min^{-1}) obtidas em atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}). 84

Figura 6. Curvas TG/DTG e DSC da drospirenona: Curvas TG/DTG entre 25 e 700°C (β = 10° C min^{-1}) e DSC entre 25 e 550°C (β = 10° C min^{-1}) obtidas em atmosfera de ar sintético (50 mL min^{-1}). 85

Figura 7. Curvas TG/DTG e DSC da mistura 1:1 e 1:150 etinilestradiol/drospirenona (m/m).: Curvas TG/DTG entre 25 e 700°C (β = 10° C min^{-1}) e DSC entre 25 e 550°C (β = 10° C min^{-1}) obtidas em atmosfera de ar sintético (50 mL min^{-1}). 86

Figura 8. Espectro de absorção no ultravioleta da soução de etinilestradiol 5,0 µg mL em metanol. 87

Figura 9. Espectro de absorção no ultravioleta da solução de drospirenona 500,0 µg /mL em metanol. 87

Figura 10. Espectro de infravermelho obtido para o etinilestradiol. 89

Figura 11. (A) Cromatograma resultante da medida da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg mL), detecção em 200 nm (CLAE-UV);(B) Cromatograma

resultante da medida da solução padrão de etinilestradiol 5,0 µg /mL , λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm, resposta: 1, ganho: 1x, sensibilidade: média (CLAE-Fluorescência). Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min e temperatura controlada de 25 ± 1ºC. Tempo de retenção: 1) Etinilestradiol (Tr =3,90 min) e 2) Drospirenona (Tr = 5,58 min).....93

Figura 12. (A) Placebo; (B) Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg /mL); (C) amostra comercial 2 contendo etinilestradiol (5,0 µg /mL) e drospirenona (750,0 µg /mL). Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel MeCN/H_2O 50:50 (v/v), vazão 1,0 mL min volume de injeção 20 µL, detecção UV em 200 nm e temperatura de 25 ±1ºC. Tempo de retenção: 1) Etinilestradiol (Tr =3,90 min) e 2) Drospirenona (Tr = 5,58 min). 94

Figura 13. Linearidade resultante da análise da solução padrão de etinilestradiol (CLAE-Fluorescência); Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v) vazão 1,0 mL min; volume de injeção 20 µL, λex=280nm e λ_{em}=310nm, resposta: 1, ganho: 1x, sensibilidade: média. temperatura controlada de 25 ±1ºC.....96

Figura 14. Linearidade resultante da análise da solução padrão de drospirenona (CLAE-UV). Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel MeCN/H_2O 50:50 (v/v) vazão 1,0 mL min; volume de injeção 20 µL; detecção UV em 200 nm e temperatura de 25 ± 1ºC.....97

Figura 15. Cromatograma resultante da análise da solução padrão de drospirenona 1,0 µg mL (CLAE-UV); Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min detecção UV em 200 nm e temperatura controlada de 25±1°C. 98

Figura 16. Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol 0,05 µg mL (CLAE-Fluorescência); Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); vazão 1mL min e volume de injeção 20 µL, λ_{ex} = 280nm e λ_{em} = 310nm, resposta: 1, ganho: 1x, sensibilidade: média e temperatura controlada de 25 ± 1ºC.....99

Figura 17. Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg /mL) e drospirenona (750,0 µg mL), detecção em 200 nm (CLAE-UV); Cromatograma resultante da análise da solução padrão de etinilestradiol 5,0 µg /mL , λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm (CLAE-Fluorescência), após exposição em meio ácido; Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min e temperatura controlada de 25 ± 1ºC. 104

Figura 18. Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg mL), detecção em 200 nm (CLAE-UV); Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol 5,0 µg /mL, λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm (CLAE- Fluorescência), após exposição em meio alcalino; Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min e temperatura controlada de 25 ± 1ºC. 105

Figura 19. Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg /mL) e drospirenona (750,0 µg /mL), detecção em 200 nm (CLAE-UV); Cromatograma resultante da análise da solução padrão de etinilestradiol 5,0 µg /mL, λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm (CLAE-Fluorescência) em meio oxidante; Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min e temperatura controlada de 25 ± 1ºC. 106

Figura 20. Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg mL), detecção em 200 nm (CLAE-UV); Cromatograma resultante da análise da solução padrão de etinilestradiol 5,0 µg /mL , λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm (CLAE-Fluorescência), em meio neutro. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min e temperatura controlada de 25 ± 1ºC. 107

Figura 21. Eletroferograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg mL) e Loratadina (padrão interno) (60,0 µg mL), detecção em 210 nm. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida como 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; fase móvel SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9,20; tensão: +12 kv e temperatura controlada de 20ºC. Tempo de retenção: 1) Drosprenona 6,90 min 2) Etinilestradiol 7,45 min 3) Loratadina (Padrão interno) 8,09 min.....110

Figura 22. Amostra comercial contendo etinilestradiol (5,0 µg mL), drospirenona (750,0 µg mL) e loratadina (60,0 µg /mL) (A) e placebo (B) detecção em 210 nm. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida com 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; fase móvel SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9,20; tensão: +12 kv e temperatura controlada de 20ºC. Tempo de retenção: 1) Drospirenona (Tr = 5,07 min), 2) Etinilestradiol (Tr = 5,3 min) e Loratadina (Padrão interno) (Tr = 5,57 min) 111

Figura 23. Linearidade resultante da análise da solução padrão de etinilestradiol/padrão interno; detecção em 210 nm. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida com 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; fase móvel SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9.20; tensão: +12 kv e temperatura controlada de 20ºC.....113

Figura 24. Linearidade resultante da análise da solução padrão de drospirenona/padrão interno; detecção em 210 nm. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida com 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; fase móvel SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9,20; tensão: +12 kv e temperatura controlada de 20ºC.....114

Lista de tabelas

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos do etinilestradiol (0,02 mg) e drospirenona (3 mg) após a administração oral em ‘mulheres caucasianas 32

Tabela 2. Interações entre fármacos e contraceptivos orais 35

Tabela 3. Métodos analíticos para a determinação de drospirenona empregando CLAE 47

Tabela 4. Métodos analíticos para determinação do etinilestradiol empregando CLAE 48

Tabela 5. Métodos analíticos para determinação de etinilestradiol por EC 49

Tabela 6. Reagentes que foram utilizados no trabalho 60

Tabela 7. Principais Contraceptivos orais combinados comercializados no mercado nacional 62

Tabela 8. Composição do placebo preparado no laboratório 62

Tabela 9. Preparação das amostras para a determinação da precisão para o etinilestradiol e drospirenona. 70

Tabela 10. Preparação das amostras para a determinação da exatidão do etinilestradiol e drospirenona 71

Tabela 11. Condições empregadas no teste de estresse 72

Tabela 12. Resultados de análise elementar para a amostra de etinilestradiol 88

Tabela 13. Atribuições das principais bandas características do hormônio etinilestradiol 90

Tabela 14. Condições dos sistemas binários testados para a padronização do método cromatográfico.....91

Tabela 15. Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração de etinilestradiol (CLAE-Fluorescência) e drospirenona (CLAE-UV). Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel MeCN/H_2O 50:50 (v/v), vazão 1,0 mL min volume de injeção 20 µL, temperatura de 25 ±1ºC; Detecção CLAE-UV: ($\lambda_{máx}$) 200 nm; Detecção CLAE-Fluorescência: λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm; resposta: 1; ganho: 1x; sensibilidade: média. 95

Tabela 16. Resultados obtidos nas determinações das curvas de calibração para a drospirenona e etinilestradiol, pelo método CLAE-UV e CLAE-fluorescência. 95

Tabela 17. Resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e de quantificação para a drospirenona e o etinilestardiol, pelos métodos CLAE-UV e CLAE-Fluorescência.....97

Tabela 18. Parâmetros cromatográficos obtidos empregando solução padrão de etinilestradiol e drospirenona 5,0 µg mL e 750,0 µg mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18,(125 x 4 mm) 5 µm; vazão 1,0 mL min; volume de injeção 20 µL, temperatura controlada de 25 ± 1ºC pelos métodos CLAE-UV e CLAE-Fluorescência...99

Tabela 19. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade para determinação quantitativa de etinilestradiol e drospirenona na amostra 2, através da cromatografia de fase líquida de alta eficiência 100

Tabela 20. Resultados estatísticos obtidos na análise das formulações farmacêuticas inter-dia empregando a cromatografia em fase líquida de alta eficiência.....101

Tabela 21. Determinação do teor de fármaco presente na amostra comercial empregando a cromatografia em fase líquida de alta eficiência 101

Tabela 22. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de etinilestardiol e drospirenona adicionada ao placebo.....102

Tabela 23. Condições cromatográficas empregadas para a determinação da robustez do método cromatográfico.....103

Tabela 24. Resultados obtidos empregando-se CLAE após condições de estresse do etinilestradiol e drospirenona.....104

Tabela 25. Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração de etinilestradiol e drospirenona/padrão interno; detecção em 210 nm. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida com 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; fase móvel SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9,20; tensão: +12 kv e temperatura controlada de 20ºC.....112

Tabela 26. Resultados obtidos nas determinações das curvas de calibração para o etinilestradiol e drospirenona/padrão interno, detecção em 210 nm. 113

Tabela 27. Resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e de quantificação para a drospirenona e o etinilestardiol.....114

Tabela 28. Parâmetros eletroforéticos obtidos empregando solução padrão de etinilestradiol e drospirenona 5,0 µg /mL e 750,0 µg /mL. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida com 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e. Injeção hidrodinamica: 0.3 psi 5 seg tampão 0.1 psi 1seg. detecção: 210 nm temperatura: 20ºC. tensão: +12 kV.....115

Tabela 29. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade para determinação quantitativa de etinilestradiol e drospirenona, através da eletroforese capilar.....116

Tabela 30. Resultados estatísticos obtidos na análise das formulações farmacêuticas inter-dia empregando a eletroforese capilar 116

Tabela 31. Determinação do teor de fármaco presente na amostra comercial 117

Tabela 32. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de etinilestardiol e drospirenona adicionada ao placebo.....118

Tabela 33. Condições cromatográficas empregadas para a determinação da robustez do método eletroforético.....119

Tabela 34. Parâmetros estatisticos e estudo comparativo entre CLAE e EC, para determinação quantitativa de etinilestradiol e drospirenona. Amostra 1 contendo 30,0 µg/comprimido revestido e 3.000,00 µg /comprimido revestido para etinilestradiol e drospirenona, respectivamente e Amostra 2 contendo 20,0 µg/unid e 3.000,0 µg/unid para etinilestradiol e drospirenona, respectivamente. 120

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

AUC_{24}	Área sob a curva de tempo-concentração sérica do ponto 0 à 24 hs.
AVC	Acidente vascular cerebral
AVCH	Acidente vascular cerebral hemorrágico
β	Razão de aquecimento
CCD-EM	Cromatografia de camada delgada acoplada à espectrometria de massas
CEC	Eletrocromatografia
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CGE	Eletroforese capilar em gel
CIEF	Focalização isoelétrica capilar
CITP	Isotacoforese capilar
CL/EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
$C_{máx}$	Concentração sérica máxima
COCS	Contraceptivos orais combinados
CYP	Citocromo P_{450}
CZE	Eletroforese capilar de zona
D	Detecção
d.e.	Diâmetro externo
d.i.	Diâmetro interno
DAD	**“**Diode array detector”
DIU	Dispositivo intra-uterino
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
ε	Absortividade molar
EC	Eletroforese capilar
EF	Fluxo eletroforético
EOF	Fluxo eletroosmótico
FDA	Food and Drug Administration
FSCE	Eletroforese capilar de solução livre
FSH	Hormônio folículo estimulante

GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HDL	High density lipoprotein
HPV	Papiloma vírus humano
IC	Inclinação
IAM	Infarto agudo do miocárdio
LD	Limite de detecção
LDL	Low density lipoprotein
LH	Hormônio luteinizante
LQ	Limite de quantificação
MECK	Cromatografia capilar eletrocinética micelar
MeCN	Acetonitrila
MEEKC	Cromatografia eletrocinética em microemulsão
MEKC	Cromatografia capilar eletrocinética micelar
MeOH	Metanol
NACE	Eletroforese capilar em meio não aquoso
NaOH	Hidróxido de sódio
ND	Não determinado
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto isoelétrico
r^2	Coeficiente de correlação
SDPM	Sindrome disfórica pré-menstrual
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBG	Globulina de ligação da tiroxina
TBS	Tetraborato de sódio
TEP	Trombose pulmonar
TEV	Tromboembolismo venoso
TG	Termogravimetria
$T_{máx}$	Tempo para alcançar a $C_{máx}$
TVP	Trombose venosa profunda
UV	Ultravioleta
λ_{em}	Comprimento de onda para emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda para excitação
$\lambda_{máx}$	Comprimento de onda máximo
$\overline{x}$	Média

RESUMO

O controle da fertilidade é obtido principalmente pela inibição da ovulação por meio da atividade combinada de dois componentes principais: estrogênio e progestina. Desta forma, novas formulações vêm sendo desenvolvidas com baixa dose de etinilestradiol associado a um novo agente progestógeno, a drospirenona, com o objetivo de garantir equilíbrio entre eficácia, segurança e controle de ciclo menstrual. Este trabalho tem como objetivo desenvolver, validar e comparar métodos analíticos para a identificação e quantificação de etinilestardiol e drospirenona presentes em uma mesma formulação por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC). O método por CLAE, foi realizado empregando-se uma coluna LiChoCART® 100RP – C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel constituída por MeCN/H_2O 50:50 (v/v) e vazão de 1.0 mL min. Utilizou-se um detector UV 200 nm para drospirenona e um de fluorescência λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm, para o etinilestradiol. O método por EC foi validado utilizando-se como eletrólito, tampão de tetraborato de sódio 30 mM, dodecil sulfato de sódio 20 mM e acetonitrila 30% a pH 9,2, capilar de sílica fundida de 31,2 cm sendo 21 cm efetivos, com 75 µm de diâmetro interno. O método por CLAE apresentou um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9989 para o etinilestradiol e 0,999 para a drospirenona. No método por EC, o coeficiente de correlação (r^2) encontrado foi de 0,9988 para o etinilestradiol e 0,998 para a drospirenona. Os métodos podem ser considerados eficientes e confiáveis para serem empregados em análise de rotina para controle de qualidade destes produtos farmacêuticos.

Palavras chaves: Métodos analíticos. Cromatografia em fase líquida de alta eficiência. Eletroforese capilar. Etinilestradiol. Drospirenona.

ABSTRACT

The fertility control is achieved mainly by inhibiting ovulation through the combined activity of two main components: estrogen and progestin. Thus, new formulations have been developed associating appropriately low dose of ethinylestradiol to a new drug, the drospirenone, in order to ensure the balance between efficacy, safety and cycle control. The objective of this research was to develop, to validate and to compare two analytical method for separation and quantification of ethinylestardiol and drospirenone using high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis (CE). The HPLC method, was performed using a LiChoCART® 100RP – C18, (125 x 4 mm) 5 µm column, a mobile phase constituted of acetonitrile:water (50:50 v/v) and flow rate of 1.0 mL min. UV detection was made for drospirenone at 200 nm coupled with a fluorescence detector at λ_{ex}= 280 nm and λ_{em} = 310 nm for ethinylestradiol. The CE method was validated using a solution of sodium tetraborate buffer 30 mM, sodium dodecil sulphate 20 mM and acetonitrile 30%, pH 9.2 and a fused silica capillary of 31,2 cm with 21 cm effective and 75 µm of diameter. The HPLC method showed a correlation coefficient (r^2) of 0.9989 for ethinylestradiol and 0,999 for drospirenone. For CE method, the correlation coefficient was (r^2) 0,9988 for ethinylestradiol and 0,9989 for drospirenone. The methods showed to be efficient and reliable, and can be used in routine analysis for quality control of these pharmaceutical preparations.

Keywords: Analytical methods. High performance liquid chromatography. Capillary electrophoresis. Ethinylestradiol. Drospirenone.

1. INTRODUÇÃO

Desde sua introdução em 1960, os contraceptivos orais combinados (COCS) tornaram-se o método de escolha na prevenção da concepção. Sendo um método efetivo e reversível, sua introdução no mercado garantiu à mulher a possibilidade de um melhor planejamento familiar, permitindo a escolha do método contraceptivo de acordo com suas necessidades, preferências e estilo de vida (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; GRUBER, *et al*., 2006; ZEHDEN e BOSCHITSCH, 2006).

A crescente popularidade dos COCS se deve à garantia da mesma eficiência e segurança presente nos demais contraceptivos disponíveis no mercado, com a vantagem da redução dos efeitos adversos. Para alcançar esse propósito, novos estudos vêm sendo realizados para aprimorar este tipo de formulações com redução, por exemplo, da dose estrogênica por combinação com uma progestina, garantindo à paciente uma maior efetividade de tratamento (BACHMANN, *et al*., 2004; GRUBER, *et al*., 2006; ZEHDEN e BOSCHITSCH, 2006).

Tendo em vista as pequenas doses hormonais presentes e o prolongado uso do tratamento, a qualidade é uma característica fundamental aos contraceptivos orais de baixa dose. Desta forma, tem-se investido, cada vez mais, no controle de qualidade dessas novas formulações de maneira a garantir a confiabilidade necessária na identificação e quantificação das doses hormonais diárias administradas à paciente (KASSAB, 2001; SANTORO, *et al*., 2002).

Com o objetivo de solucionar problemas que acompanham o controle de qualidade, muitos métodos analíticos para determinação quantitativa de fármacos em medicamentos são indicados na literatura científica, tais como, colorimetria, espectrofotometria no ultravioleta, entre outros. No entanto, para a determinação de hormônios, todos os métodos propostos apresentaram interferências, o que torna os estudos de novos métodos cada vez mais necessários (DENISOVA, CHISTYAKOV e SADCHIKOVA, 2008; GOROG, 2004; KASSAB, 2001; SANTORO, *et al*., 2002).

A cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC) têm possibilitado separações e determinações quantitativas de fármacos em

preparações farmacêuticas, mesmo quando presentes em pequenas quantidades, que antes eram dificilmente obtidas por outros métodos (SANTORO*, et al*., 2002).

Desta maneira, é plenamente justificada a escolha dessas duas técnicas, visando nesse trabalho, a validação de métodos analíticos que possibilitem a separação e a determinação quantitativa simultânea de etinilestradiol e drospirenona em COCS comercializados no Brasil.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Generalidades

Os COCS, conhecidos no mercado como “pílula anticoncepcional” são esteróides utilizados isoladamente ou em associação com a finalidade básica de impedir a concepção (BRASIL, 2011). Sua introdução no mercado provocou um impacto revolucionário na sociedade global, pois permitiu que a mulher utilizasse um meio de contracepção conveniente, com custos módicos e seguro de planejamento familiar (BAYER, 2007; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; GRUBER, 2006).

Inicialmente aprovados nos Estados Unidos em 1960 para uso irrestrito, os COCS foram empregados extensivamente por um grande numero de mulheres. No Brasil, o comércio da “pílula anticoncepcional” teve início em 1962, dois anos após ter sido aprovada nos Estados Unidos pela FDA (Food and Drug Administration) (PEDRO, 2003). Desde então, diversas pesquisas isoladas foram realizadas, visando prestar informações sobre estes tipos de preparações farmacêuticas. Foi somente em 1966, que as revistas médicas brasileiras começaram a difundir, para os ginecologistas e obstetras, os estudos já realizados por pesquisadores tanto brasileiros, quanto estrangeiros (PEDRO, 2003).

Em 1970, com a percepção de que os efeitos indesejados eram dose-dependentes, realizou-se a primeira modificação no conteúdo hormonal das formulações, com redução da dose de estrogênio de 50 µg para 30-40 µg por comprimido. Estes medicamentos são conhecidos como contraceptivos de segunda geração (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; MERKATZ, TOKAY e SITRUK-WARE, 2009). Mesmo com os frequentes enfrentamentos pela oposição da Igreja, de problemas de saúde surgidos com o uso dos COCS, da mudança sensível no padrão de fecundidade das famílias, foram vendidas e consumidas, em 1970, cerca de 6,8 milhões de cartelas de COCS (PEDRO, 2003).

Na década de 80, observou-se um aumento no consumo de COCS (40,9 milhões de cartelas). O crescente uso de preparações bifásicas e trifásicas, denominadas contraceptivos orais de baixa dose ou de terceira geração reduziu

ainda mais a dose de esteróides, permitindo a mesma eficiência com redução dos efeitos adversos (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; MERKATZ, TOKAY e SITRUK-WARE, 2009).

Atualmente, o crescimento no poder aquisitivo, a elevação da participação da mulher no mercado de trabalho e o controle da fertilidade para o desenvolvimento profissional feminino, são as principais razões apontadas para a elevação na demanda do país por COCS (PEDRO, 2003). Dados publicados em 2004 por cinco países europeus (França, Alemanha, Itália, Espanha e Reino Unido) sugerem que cerca de 19-45% das mulheres com idade entre 15-49 anos são usuárias de contraceptivos orais (BAYER, 2007).

Atualmente o baixo conteúdo estrogênico dos COCS entre 20-35 µg /comprimidos tem provocado menor incidência de efeitos colaterais, do que as preparações que continham quantidades entre 50-150 µg de etinilestradiol/comprimido (BAYER, 2007; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007). Acredita-se que as doses disponíveis atualmente no mercado são as menores doses possíveis capazes de proporcionar uma anticoncepção confiável e reversível (KASSAB, 2001; ZEHDEN e BOSCHITSCH, 2006).

2.2. Tipos de contraceptivos hormonais de uso oral

Os contraceptivos hormonais de uso oral podem ser classificados de acordo com sua formulação. Os COCS compõem-se de um estrogênio em associação a uma progestina, já a “minipílula” é constituída por uma progestina isolada (BRASIL, 2011).

Os COCS atuam basicamente por meio da inibição da ovulação, além de provocar alterações nas características físico-químicas do endométrio e do muco cervical. São métodos muito eficazes quando usados de forma correta, sendo que a taxa de falha pode ser da ordem de 0,1%, no primeiro ano de uso (BAYER, 2007; YASMIN, 2009; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; BRASIL, 2011).

Os COCS são formulações que contêm dois hormônios sintéticos em combinação, um estrogênio associado a uma progestina, semelhantes aos produzidos pelo ovário da mulher (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; BRASIL, 2011).

Os COCS dividem-se ainda em formulações **monofásicas, bifásicas** e **trifásicas**. As **preparações monofásicas** são as mais comuns. Quantidades fixas de estrogênio e progestina estão presentes em todas as unidades, que apresentam a mesma composição e dose, e que devem ser ministradas diariamente. Estão disponíveis comercialmente em embalagens de 21 ou 22 comprimidos ativos, cujo uso deve ser seguido por um período sem o medicamento. Em algumas apresentações as embalagens contêm, além dos comprimidos ativos, 6 ou 7 a mais, contendo apenas os ingredientes inertes, para completar os 28 comprimidos (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; FUCHS e WANNMACHER, 1998).

Preparações bifásicas ou **trifásicas** contêm dois e três tipos de comprimidos, respectivamente, com quantidades variáveis de ingredientes ativos, que devem ser ministrados em diferentes momentos, durante o ciclo de 21 dias. A redução da quantidade de esteróides administrados permitiu mimetizar as flutuações de estrogênio e de progestina ao longo do ciclo menstrual (FUCHS e WANNMACHER, 1998; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007). Para facilitar a administração, a indústria farmacêutica desenvolveu cartelas contendo comprimidos de diferentes cores que devem ser tomados na ordem indicada na embalagem. Entretanto, as formulações bi e trifásicas não parecem acarretar nenhuma vantagem em relação às monofásicas (FUCHS e WANNMACHER, 1998).

As apresentações “modernas” ou “de baixa dose” são preparações monofásicas contendo 35 µg ou menos de um estrogênio. A dose de progestina é mais variável devido à diferença de atividades entre os compostos utilizados (FUCHS e WANNMACHER, 1998; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007). Diversos estudos demonstram que os contraceptivos orais de baixa dose apresentam a mesma eficácia do que os com doses maiores (BACHMANN, *et al*., 2004; GRUBER, et al.; 2006; YONKERS, *et al*., 2005; ZEHDEN e BOSCHITSCH, 2006).

2.3. Mecanismos de ação dos contraceptivos orais combinados (COCS)

A associação, etinilestradiol e drospirenona, desenvolvida para administração oral diária por mulheres na prevenção da concepção, apresenta mecanismo de ação baseado na supressão da ovulação (BAYER, 2007; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007).

O estrógeno atua suprimindo a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) da hipófise durante a fase folicular do ciclo menstrual, o que contribui para o desenvolvimento folicular deficiente. Os níveis elevados de estrogênio deflagram o pulso de hormônio luteinizante (LH) no meio do ciclo, necessário para a ovulação (BAYER, 2007; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007).

O que garante à progestina eficácia contraceptiva é a sua capacidade nítida em reduzir a frequência dos pulsos de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) no sistema vascular hipotalâmico-hipofisário. Esta redução compromete a frequência adequada de pulsos de hormônio luteinizante (LH), que é essencial para a ovulação (BAYER, 2007; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007).

A combinação estrógeno/progestina reduz, em termos sinérgicos, os níveis plasmáticos de gonadotrofina (LH e FSH), suprimindo a ovulação de forma mais eficiente. Medidas dos níveis de hormônios plasmáticos indicam que o FSH e o LH são sensivelmente reduzidos. Não existindo pulso de LH no meio do ciclo, ocorre redução dos níveis de esteróides endógenos, e consequentemente, a ovulação é impedida (BAYER, 2007; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; ELANI 28, 2009; ELANI CICLO, 2009).

A eficácia dos COCS é ainda reforçada pela modificação na consistência e propriedades do muco cervical e na mobilidade nas trompas de Falópio, importante na sobrevida, deslocamento e penetração do espermatozóide, ou no transporte ovular (BAYER, 2007; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; ELANI 28, 2009; ELANI CICLO, 2009).

2.4. Propriedades físico-químicas

2.4.1. Etinilestradiol

É quimicamente denominado de 19-Nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-ine-3,17β-di-ol (Figura 3). Apresenta fórmula molecular $C_{20}H_{24}O_2$ e massa molecular 296,4 g/mol (MARTINDALE, 2009; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011). Apresenta pKa 10,24 e teor de pureza entre 97 e 102% (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011). É um estrógeno esteróide sintético, ou semi-sintético. É ativo por via oral e empregado em anticoncepcionais combinados. Apresenta um grupamento etinila no carbono 17, que o protege da inativação pelo fígado (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; KASSAB, 2001).

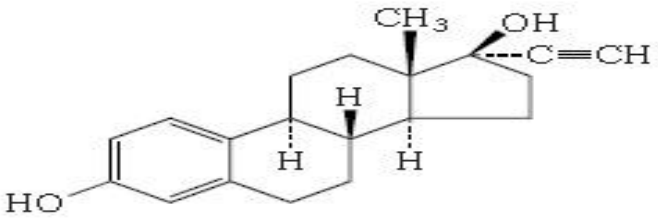

Figura 1. Fórmula estrutural do etinilestradiol (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011).

É um pó cristalino branco a levemente amarelado, inodoro. Apresenta ponto de fusão entre 180-186°C. É praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em etanol e solúvel em soluções alcalinas (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

2.4.2. Drospirenona

Apresenta fórmula molecular $C_{24}H_{30}O_3$, massa molecular de 366,5 g/mol, sendo denominado quimicamente: (6R, 7R-8R, 9S, 10R, 13S, 14S, 15S, 16S, 17S) - 1, 3’, 4’, 6, 6a, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 - 15, 15a, 16- hexadecaidro- 10- 13-dimethilspiro- [17h -diciclo -propa [6,7:15,16] ciclopenta [α] fenantrene-17,2’ (5’H) - furano]-3,5’ (2H) -diona (Figura 4) (MARTINDALE, 2009; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011).

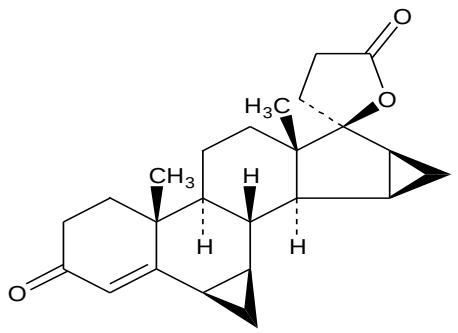

Figura 2. Fórmula estrutural da drospirenona (MARTINDALE, 2009; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011).

É um pó branco a amarelado, inodoro. Apresenta ponto de fusão entre 198 e 203ºC. Praticamente insolúvel em água e hexano, levemente solúvel em etanol e acetato de etila, solúvel em metanol e acetona, muito solúvel em diclorometano (MARTINDALE, 2009; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011).

2.5. Farmacocinética

2.5.1. Estrogênio

- **Etinilestradiol**

O etinilestradiol administrado por via oral é, rápida e completamente absorvido, uma vez que a substituição etinila na posição C17 inibe o metabolismo hepático de primeira passagem, resultando em uma biodisponibilidade oral média de aproximadamente 45% (YASMIN, 2009; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007).

Sua via primária de biotransformação envolve a 2-hidroxilação e subsequente formação dos correspondentes 2-metil e 3-metil éteres. Vários estudos demonstram que sua fase de eliminação varia de 13 a 27 horas, sendo excretado como conjugado glicuronídeo e sulfato, na urina e nas fezes (BAYER, 2007; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007). Os níveis séricos máximos de 54 a 100 pg mL^{-1} são alcançados entre 1 e 2 horas (Tabela 1). Foi demonstrado que a ingestão

concomitante de alimentos reduz a biodisponibilidade do etinilestradiol em cerca de 25% dos indivíduos estudados (BAYER, 2007; YASMIN, 2009).

2.5.2. Progestina

- **Drospirenona**

Quando administrada por via oral, é rápida e quase totalmente absorvida. Os níveis séricos máximos do fármaco, de aproximadamente 37 ng/mL, são alcançados entre 1 e 2 horas após a ingestão de uma dose única (Tabela 1). Sua biodisponibilidade está compreendida entre 76 e 85% e não sofre influência da ingestão concomitante de alimentos (ELANI 28, 2009; ELANI CICLO, 2009; YASMIN, 2009).

A drospirenona é extensamente metabolizada no fígado antes da eliminação. Somente traços são excretados inalterados na urina ou fezes. Os dois principais metabólitos encontrados no plasma são a forma ácida da drospirenona, e a 4,5-diidrodropirenona-3-sulfato. Esses metabólitos são farmacologicamente inativos e são formados sem envolvimento das enzimas do citocromo P_{450} (CYP) (BAYER, 2007).

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos do etinilestradiol (0,02 mg) e drospirenona (3 mg) após a administração oral em mulheres caucasianas (BAYER, 2007)**.**

Drospirenona	**Dia 1**	**Dia 21**
C_{max} (µg /L)	38,4	70,3
t_{max} (h)	1,5	1,5
AUC_{24}(µg h/L)	268	763
$t_{1/2}$ (h)	ND	30,8
Etinilestradiol	**Dia 1**	**Dia 21**
C_{max} (µg /L)	32,8	45,1
t_{max} (h)	1,5	1,5
$t_{1/2}$ (h)	108	220

C_{max}- concentração sérica máxima **t_{max}-** tempo para alcançar a C_{max}

ND - não determinado

AUC_{24} – área sob a curva de tempo/concentração sérica do ponto zero até 24h após a administração

- **Propriedades antimineralocorticóide e antiandrogênica**

O que despertou interesse para o desenvolvimento de hormônios destituídos de atividade mineralocorticóide foi a observação de que os contraceptivos, até então disponíveis no mercado, apresentavam efeitos indesejáveis, acarretando retenção de sódio e água em mulheres que os utilizavam (BAZOTTE, SCHELEICHER e MARCON, 2005). A observação de que algumas espironolactonas bloqueiam os efeitos dos mineralocorticóides, levando à síntese de antagonistas específicos para os receptores mineralocorticóides (BAZOTTE, SCHELEICHER e MARCON, 2005; CARDOSO, FONSECA e COSTA, 2003; NAROD, et al., 2002), conduziu ao desenvolvimento da drospirenona.

Denominada como uma progestina sintética, com perfil semelhante ao da progesterona, apresenta propriedade antimineralocorticóide e antiandrogênica, sendo, porém destituída de atividades glicocorticóides (BAYER, 2007; BAZOTTE, SCHELEICHER e MARCON, 2005, YASMIN, 2009; ELGER, *et al*., 2003; KRATTENMACHER, 2000).

A drospirenona foi desenvolvida, visando inicialmente reduzir a retenção de líquidos, entretanto, outros benefícios relevantes como menor retenção lipídica e diminuição dos sintomas da síndrome pré-menstrual, foram observados (BAHAMONDES, et al., 2007; BAYER, 2007; ELANI, 28; YASMIN, 2009, KLIPPING e MARR, 2005; KRATTENMACHER, 2000; PEARLSTEIN, et al., 2005; YONKERS, et al., 2005). A drospirenona apresenta ainda, baixa afinidade de ligação pelo receptor androgênico, além de atividade antiandrogênica, o que proporciona uma redução nas lesões acnêicas e produção sebácea, e na quantidade de pelos no buço, queixo e tórax. Este fato é explicado pelo mecanismo de supressão do LH e consequente redução da síntese de andrógenos ovarianos (testosterona e androstenediona) (BAHAMONDES, et al., 2007; BAZOTTE, SCHELEICHER e MARCON, 2005; ELANI CICLO, 2009; YASMIN, 2009; ELGER, et al., 2003; KRATTENMACHER, 2000).

2.6. Interações medicamentosas

Muitos problemas estão relacionados à utilização concomitante de contraceptivos orais e outros fármacos. São observados desde problemas de ordem clínica, até a gravidez indesejada. Para minimizar as interações medicamentosas, uma das medidas é esclarecer dúvidas da usuária garantindo assim, a total compreensão da administração adequada e segura (BRASIL, 2011).

Para que sejam evitadas interações medicamentosas entre COCS, principalmente com outros fármacos de uso continuo, devem ser indicados às pacientes métodos alternativos de contracepção ou, se necessário, do ajuste da dose do contraceptivo (AMARAL, VISCOLA e BAHAMONDES, 2006; BRASIL, 2011; NICOLINI, et al., 2008; OGA e BASILE, 1994; SOUZA, MEIRA e COSTA, 2005.

Certos fármacos são capazes de reduzir a eficácia anticonceptiva quando administrados concomitantemente com os COCS, estimulando a biotransformação hepática. Assim, fármacos antiepiléticos (DENBY, 2011; OGA e BASILE, 1994), antimicrobianos (NICOLINI, et al., 2008; OGA e BASILE, 1994; SOUZA, MEIRA e COSTA, 2005), antiretrovirais (AMARAL, VISCOLA e BAHAMONDES, 2006; BRASIL, 2011), hipnóticos e barbitúricos (OGA e BASILE, 1994) reduzem o efeito contraceptivo e podem levar à gravidez e irregularidade menstrual.

Outras interações podem ocorrer no sentido inverso isto é, os esteróides podem alterar a eficácia de outros fármacos (Tabela 2).

Tabela 2. Interações entre fármacos e contraceptivos orais (OGA e BASILE, 1994).

Agentes	Efeitos observados	Significância clínica
Benzodiazepinicos	Aumento da concentração sérica de benzodiazepínicos	Ajuste de dose dos benzodiazepínicos
Hipoglicemiantes	Redução da resposta aos antidiabéticos	Maior risco de diabetes
Anticoagulantes orais	Aumento do efeito do acenocumarol Redução do efeito do dicumarol	Necessidade de adaptação da dosagem
Paracetamol	Redução da concentração plasmática de paracetamol	Aumento dos efeitos indesejados dos estrogênios
Tiroxina	Aumento da TBG. Diminuição da tiroxina livre	Ajuste de dose da tiroxina

TBG – Globulina de ligação da tiroxina

2.7. Uso clínico e benefícios

Estima-se que atualmente os COCS evitem milhares de mortes, episódios de várias doenças e hospitalizações. Somente nos EUA, cerca de 20% de todas as gestantes são hospitalizadas antes do parto devido a complicações e a incidência de morte relacionada ao parto. Portanto, a regulação da fertilidade pelos COCS, mesmo sem considerar os benefícios adicionais destes fármacos à saúde, é muito mais segura do que a gravidez ou o parto para a maioria das mulheres (BRUNTON, LAZO e PARKER 2007).

2.7.1. Controle do ciclo menstrual

A literatura tem revelado que a eficácia contraceptiva de COCS está associada a um efeito positivo no padrão de sangramento (BACHMANN, et al.; 2004; BAYER, 2007; GRUBER, et al., 2006; ZEHDEN e BOSCHITSCH, 2006).

Os contraceptivos orais apresentam grandes benefícios relacionados à menstruação na maioria das usuárias. O controle de ciclo é um importante fator na escolha e aderência ao uso de COCS, diminuindo notadamente a incidência de amenorréia, ciclos irregulares, sangramento intermenstrual e consequentemente, a anemia ferropriva (BAYER, 2007; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007).

2.7.2. Sintomas emocionais e físicos da síndrome disfórica pré-menstrual (SDPM)

É conhecido o fato de que alguns hormônios ovarianos são capazes de modular os sistemas neurotransmissores no cérebro, sendo responsáveis pelos sintomas afetivos ligados ao ciclo menstrual. O tratamento apropriado utilizando COCS têm sido de profundo interesse em pesquisas sobre o alívio de sintomas da SDPM. Estima-se que pelo menos 75% das mulheres podem apresentar um ou mais sintomas durante o ciclo menstrual normal (BAYER, 2007; STEINER, 2000) .

Os sintomas associados com a SDPM são numerosos, e se caracterizam pela recorrência cíclica de sintomas psicológicos, comportamentais e físicos, incluindo irritabilidade, variação de humor, dificuldade de concentração, cefaléia, distensão abdominal, mastalgia e outros sintomas relacionados à retenção de líquidos, que aparecem após a ovulação e são resolvidos dentro de poucos dias após a menstruação (BAYER, 2007; STEINER, 2000).

Estudos comprovam que usuárias de COCS de baixa dose contendo a drospirenona como progestina, apresentam melhora em sua qualidade de vida com redução de 47% no total de registro diário de severidade da SDPM (BAHAMONDES, *et al*., 2007; BAYER, 2007; MACHADO, et al., 2010b; PEARLSTEIN, *et al*.; 2005; LOPEZ, KAPTEIN e HELMEHERST; 2010).

2.7.3. Controle da acne

A acne é iniciada pelo efeito dos andrógenos sobre as unidades pilossebáceas resultando em hipersecreção sebácea e oclusão folicular. A terapia hormonal na patogênese da acne é, portanto, dirigida a interromper a fase inicial da sequência inibindo a formação de pápulas, pústulas e comedões (TAN e DEGREEF, 2001).

Estudos realizados com a progestina, com atividade antiandrogênica e antimineralocorticóide comprovam os benefícios na acne leve e moderada e na

redução do crescimento de pêlos acima do lábio superior e queixo, em mulheres jovens (BAYER, 2007; MACHADO, et al., 2010b; VAN VLOTEN, *et al.*, 2002).

2.7.4. Tratamento de ovário policístico

A síndrome do ovário policístico é caracterizada por um transtorno endócrino determinado pela secreção anormal de gonadotrofina, anovulação crônica, deficiência do metabolismo glico-insulinêmico, e elevados níveis de andrógenos circulantes. Acomete mulheres jovens em idade reprodutiva e se caracterizam pelo aparecimento de irregularidades menstruais, infertilidade, obesidade, hirsutismo e acne (GUIDO, *et al*., 2004).

Como foi anteriormente comentado, os COCS afetam a síntese de andrógenos em diferentes níveis. Para o tratamento de ovário policístico, o principal mecanismo de ação é a inibição da foliculogênese, tanto pelo resultado da supressão da secreção da gonadotrofina pela hipófise como pela influência direta sobre a foliculogenêse no ovário (VRBÍKOVA e CIBULA, 2005).

2.7.5. Prevenção da osteoporose

Os COCS têm elevada eficácia na manutenção da massa óssea antes da menopausa. Algumas variáveis tais como idade, tabagismo, duração do uso, função menstrual, doenças endócrinas e exercício físico podem tornar difícil a avaliação de sua eficácia na prevenção da osteoporose. No entanto, resultados de estudos publicados sugerem que o uso de contraceptivos orais na pré-menopausa está associado a maior densidade óssea (2-3%) (PRIOR, *et al*., 2001).

2.8. Considerações sobre os efeitos nocivos dos contraceptivos

Uma das preocupações dos pesquisadores que estudam os contraceptivos são os efeitos colaterais que podem advir de seu uso. São atribuídos à utilização de

tais medicamentos desde as mais simples manifestações como ansiedade, náuseas, alteração de humor, aumento de peso corpóreo, cefaléia e retenção hídrica, até sérias complicações vasculares cerebrais, efeitos carcinogênicos e alterações metabólicas (BAYER, 2007). No entanto, se observa uma ampla utilização dos COCS ao longo dos anos por mulheres do mundo inteiro. Desde que foram introduzidos no mercado, os contraceptivos sofreram diversas modificações em suas formulações na tentativa de reduzir riscos associados ao seu uso. Estudos recentes, efetuados com formulações de baixa dose evidenciam menores efeitos indesejáveis quando comparados às formulações com altas doses hormonais (BACHMANN, *et al*., 2004, BAYER, 2007; GRUBER, et al., 2006; ZEHDEN e BOSCHITSCH, 2006). Acredita-se que os contraceptivos orais atuais sejam relativamente seguros para mulheres sadias, entretanto, há situações em que seu uso é totalmente contra-indicado (KASSAB, 2001; WHO, 2004).

Nos últimos 20 anos foram publicados, em âmbito mundial, muitos artigos onde são analisados os fatores associados ao maior risco de complicações durante o uso dos COCS. A incidência de efeitos negativos e complicações graves tornam-se muito reduzidas se o método for utilizado apenas por mulheres sem fatores de risco. Para a redução dos perigos à saúde com o uso dos COCS, mudanças nas características das usuárias devem ser tão ou mais importantes quanto as mudanças nas dosagens hormonais (KASSAB, 2001) .

2.8.1. Efeito carcinogênico

- **Carcinoma de mama**

Apesar da discordância de alguns autores (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; MARCHBANKS, *et al*., 2002), numerosos estudos demonstram que o uso por tempo prolongado de contraceptivos aumenta em 25% a possibilidade de carcinoma de mama em mulheres, persistindo certo aumento do risco em até 10 anos após a interrupção do uso. Mulheres na faixa de 35-45 anos apresentam um maior risco, principalmente quando a utilização de contraceptivos se iniciou antes dos 30 anos (NAROD, *et al*., 2002; PAULINELLI *et al*., 2003; PINHO, COUTINHO, 2007; TESSARO, *et al*., 2001). A explicação biológica para esse efeito é que os COCS

aumentam a proliferação de células epiteliais normais e também de células malignas, quando presentes no tecido mamário (PRIOR, et al., 2001).

- **Câncer endometrial**

Resultados de estudos recentes sugerem que COCS estão associados à redução, em 50%, da incidência de riscos de carcinoma endometrial (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007). Acredita-se que a redução da incidência se deva à inclusão da progestina capaz de neutralizar a proliferação de células induzida pelo estrogênio durante todo o ciclo (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007).

A formulação não é considerada fator de risco. Em mulheres que fazem uso de COCS, o fator tempo de utilização é primordial na redução da incidência de casos de câncer endometrial. Pacientes que os utilizam por pelo menos 12 meses por exemplo, tem cerca de metade do risco de desenvolver câncer endometrial quando comparadas a mulheres que nunca os utilizaram (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007).

- **Câncer cervical**

Para avaliar a relação entre o uso de contraceptivos orais e o risco de câncer invasivo do colo uterino, a literatura disponibiliza estudos que fornecem evidências de que o uso prolongado de contraceptivos orais pode provocar o câncer no epitélio uterino. Entretanto, é necessário uma cuidadosa avaliação, já que outros fatores tais como o tabagismo, atividade sexual desprotegida, HPV positivo e infecções genito urinárias, podem potencializar o risco de câncer invasivo (CASTELLSAGUÉ e MUNÕZ, 2003; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; SMITH*, et al.,* 2003).

- **Câncer de ovário**

O uso de contraceptivos orais e a gravidez apresentam efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de ovário. A capacidade de redução do risco está relacionada à duração do tratamento, e está entre 20%, para pacientes que utilizaram contraceptivos durante 3 anos e entre 60% para pacientes que os utilizaram por 6 ou mais anos. Embora o efeito favorável contra o risco de câncer de

ovário persista por pelo menos 10-15 anos, em média, as mulheres recebem o diagnóstico da doença até 17 anos após cessado o uso de COCS (MODAN, *et al*., 2001; SHILDKRAUT, *et al*., 2002).

Em estudo recente realizado por SCHILDKRAUT *et al*. (2002) foi concluído que as formulações com pequenas doses estrogênicas têm potênciais menores e, portanto, são susceptíveis a produzir um efeito reduzido sobre o risco de câncer de ovário. Entretanto, no mesmo trabalho o autor apoia a hipótese de que os efeitos sobre a apoptose no epitélio ovariano estejam relacionados com a progestina.

A administração de um agente contraceptivo oral deve ser considerado, em pacientes que apresentam riscos hereditários (mutações BRCA1 ou BRCA2), na prevenção do desenvolvimento de câncer de ovário, embora não tenha sido determinada a formulação específica a ser recomendada ou a idade em que o tratamento deva começar (MODAN, *et al.*, 2001; NAROD, *et al*., 2002).

- **Tumores hepáticos**

Os COCS são responsáveis pelo desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Os riscos de desenvolvimento da doença são elevados, ou seja, em 4,4 vezes em mulheres saudáveis, com idade superior a 30 anos e que fazem uso de contraceptivos durante 8 anos ou mais (TAO, 1991; ROSSI, et. al., 2009).

O mecanismo de ação do estrogênio associado à progestina ainda é pouco elucidado, sabe-se porém, que os esteróides induzem à colestase aumentando a exposição do fígado à estimulação mitogênica (KASSAB, 2001). As progestinas, além de serem estruturalmente similares aos esteróides anabólicos androgênicos, responsáveis por um alto índice de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, são indutores enzimáticos, o que aumenta a carcinogenicidade (TAO, 1991).

2.8.2. Distúrbios vasculares

Com objetivo de minimizar risco de tromboembolismo venoso nas usuárias de COCS, seus efeitos sobre o sistema hemostático vêm sendo exaustivamente estudados (FERREIRA, *et al*., 2000).

Foi observado que vários fatores da hemostasia são alterados pelo uso de COCS. Tal alteração aponta para uma maior atividade dos sistemas de coagulação e fibrinólise, implicando em um aumento na formação e degradação de fibrina (FERREIRA, *et al*., 2000).

As alterações nos parâmetros hemostáticos foram atribuídas às elevadas doses estrogênicas. A fim de diminuir tais efeitos, a indústria farmacêutica desenvolveu formulações mais recentes (COCS de 3º geração), onde as doses de estrogênios foram reduzidas para 20-30 µg . Além disso, novas progestinas foram desenvolvidas com objetivo de reduzir os efeitos androgênicos (FERREIRA*, et al*., 2000; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007).

Os principais distúrbios vasculares que acometem mulheres usuárias de COCS são: o tromboembolismo venoso (TEV), incluindo a trombose venosa profunda (TVP) e o tromboembolismo pulmonar (TEP), além de doença cardíaca isquêmica, tais como, infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC) (KASSAB, 2001).

- **Doença tromboembolítica venosa**

Por muito tempo, acreditou-se que os distúrbios vasculares fossem claramente associados às doses estrogênicas elevadas nas formulações (COCS 1º e 2º geração), e não ao conteúdo de progestina (FERREIRA, *et al*., 2000; KASSAB, 2001).

Estudos recentes sugerem que a incidência de TEV em mulheres que fazem uso de COCS de 3º geração é 1,7 vezes maior do que entre as que usam os de 2º geração, sendo que a frequência de TEV está relacionada aos primeiros meses de uso (BLOEMENKAMP, *et al*., 1999; KEMMEREN, ALGRA e GROBBEE, 2001). Além

disso, a progestina dos COCs é apontada como um importante fator nas desordens vasculares arteriais, sendo capaz de modificar o efeito do estrógeno sobre o sistema hemostático, aumentando a pressão sanguínea e consequentemente, o risco de doenças cardiovasculares (FERREIRA, *et al*., 2000; JICK e HERNANDEZ, 2011; KASSAB, 2001).

No entanto, a interpretação quantitativa desses dados pode ser influenciada por vários fatores, tais como estilo de vida e fatores hereditários. Segundo VANDENBROUCKE, *et al*. (1994) e BLOEMENKANP, *et al*., (1999), a ocorrência de TEV em mulheres jovens que utilizam COCS pode ser elevada em 30 vezes. Essa afirmação está fortemente relacionada pela mutação do fator V Leiden, que promove a resistência à proteína C reativa, elevando a suscetibilidade à trombose.

- **Doença vascular cerebral**

O AVC em adultos jovens é considerado uma patologia rara, com incidência descrita na literatura que varia entre 5 a 10% do total, e que aumenta com a idade (YASMIN, 2009). Clinicamente é evidenciado por: cefaléia, déficits focais (motora ou sensorial), convulsões e alterações da consciência (MARTINELLI, SACCHI e LANDI, 1998). O AVC é dividido em duas categorias: acidente vascular cerebral isquêmico (AVEI), que pode ser causado por embolia ou trombose arterial, ou acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCH) (CARDOSO, FONSECA e COSTA, 2003).

Os COCS causam hipercoagulação elevando de forma potencial os fatores de riscos para AVEI, através do aumento dos níveis plasmáticos de protombina (GUIDO, *et al*., 2004). Foi evidenciada uma maior incidência de acidente vascular cerebral (AVC), associada ao uso de COCS, mas esta estimativa não está correlacionada de forma definitiva ao uso de COCS. A hipertensão, fumo, idade, obesidade, dislipidemia do diabetes mellitus e o uso de álcool aumentam em cerca de seis vezes o risco de AVEI, quando associado à utilização de COCS (CARDOSO, FONSECA e COSTA, 2003; DENTALI, CROWTHER e AGENO, 2006; MARTINELLI, SACCHI e LANDI, 1998; PETITTI, *et al*., 1996).

Observação importante, feita por alguns autores, foi que mulheres que utilizaram COCS de baixa dose ou 3º geração, não apresentaram significante

aumento do risco de AVEI e AVC hemorrágico (PETITTI, *et al*., 1996; SCHWARTZ, *et al*., 1997).

- **Doenças cardiovasculares**

O uso de COCS é um fator determinante para o desenvolvimento de doenças cardíacas, tais como angina, síndrome coronariana aguda, insuficiência cardíaca congestiva e IAM, sendo 24% maior quando comparado com mulheres que utilizaram placebo durante o estudo realizado (MANSOR, *et al*., 2003; TANIS, *et al*., 2001).

A presença de diversos fatores como o tabagismo, dieta, exercício, hipertensão, diabetes e o conteúdo estrogênico na formulação, tem grande influencia na patogênese das doenças cardiovasculares principalmente no risco de IAM (MANSOR, *et al*., 2003; TANIS, *et al.*, 2001). O sinergismo entre COCS e o tabagismo resulta em um aumento 20,8 vezes a probabilidade de desenvolvimento de IAM, quando comparado com mulheres sadias (MANSOR, *et al*., 2003).

Estudos realizados por MANN *et al*., (1975) afirmam que o IAM pouco afeta mulheres jovens (2-7 vezes no grupo etário 30-39 anos e de 5-7 vezes no grupo etário 40-44 anos) e em idade reprodutiva, entretanto, a taxa de fatalidade é alta. O risco relativo de IAM em mulheres está associado principalmente à utilização, em curto prazo, de contraceptivos quando comparadas com o grupo de mulheres que nunca os utilizaram.

O estrógeno tem inúmeras ações que poderiam influenciar o risco de doenças coronarianas. Tais ações incluem alteração no metabolismo de lipídios, carboidratos, parâmetros de coagulação e de pressão arterial. Entretanto, segundo estudos realizados por TANIS, *et al*., (2001), não existem evidencias significativas no aumento de IAM em usuários de COCS de 2º e 3º geração.

2.7.3. Alterações metabólicas

Muito se tem pesquisado sobre as alterações metabólicas sofridas por mulheres em tratamento com vários tipos de COCS combinados.

- **Efeito sobre o metabolismo dos lipídeos**

As alterações no metabolismo dos lípides plasmáticos em mulheres jovens sem fatores de risco, que fazem uso de COCS, estão diretamente relacionadas às dosagens de estrógeno e de progestina. Estrógenos tendem a aumentar os níveis de triglicerídeos e as concentrações de colesterol HDL, enquanto que a progestina produz efeitos contrários, reduzindo as concentrações de colesterol LDL, neutralizando, portanto, a ação do estrógeno (SANTOS, *et al*., 2008).

Vários pesquisadores estudaram o efeito dos COCS de baixa dosagem sobre o perfil das lipoproteínas, e concluíram que os níveis de LDL eram significativamente reduzidos quando associados a um estrógeno de pequena dosagem (BAYER, 2007; KLIPPING e MARR, 2005; MANSON, *et al*., 2003). Segundo SANTOS, *et al.,* (2008), efeitos sobre o metabolismo de lipídios, associados à utilização de COCS de baixa dose, foram observados somente em mulheres com mais de 35 anos, quando associado ao hábito de fumar.

- **Efeito sobre o metabolismo dos carboidratos**

A redução da tolerância à glicose está associada a um elevado risco de doenças cardíacas coronarianas, particularmente em mulheres. Usuárias de COCS apresentam uma resposta insulínica aumentada, e este aumento está diretamente relacionado à dose e à progestina utilizada. A normalização de tais perturbações na homeostase da glicose é mediada através do aumento da secreção de insulina pelo pâncreas e a resposta do peptídeo C presente no plasma (SANTOS, *et al.*, 2008).

Na literatura foram encontrados estudos nos quais formulações de baixa dose apresentam efeitos menores sobre o metabolismo de carboidratos (MACHADO, 2010a). Entretanto, mesmo com as baixas doses de uso corrente, observou-se que a progestina apresentava efeitos metabólicos secundários indesejados quando

combinada com estrógeno (BAYER, 2007; BRUNTON, LAZO e PARKER, 2007; KRATTENMACHER, 2000; SANTOS, *et al.*, 2008).

2.9. Metodologia analítica

A análise de hormônios esteróides geralmente se dá por meio de dois tipos de métodos: os imunoensaios usados rotineiramente para detecção, tais como radioimunoensaio e imunoenzimático (SILVA, 2007), e os físico-químicos, por CLAE, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL/EM), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), cromatografia em camada delgada acoplada à espectrometria de massas (CCDAE) e EC, empregados para a determinação quantitativa destes hormônios (SILVA, 2007).

Embora diversos métodos analíticos para a determinação de hormônios esteróides, encontrarem-se disponíveis na literatura, muitos métodos são vulneráveis à interferência de produtos de degradação e impurezas, à determinação de hormônios em associação, o que torna necessário, o desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis (DU, et al., 2009; GOROG, 2004; SANTORO, et al., 2002).

Nos últimos anos, observa-se uma tendência para o uso da EC e de métodos cromatográficos, como importante ferramenta para a análise de hormônios esteróides em geral. A utilização da CLAE pode ter ainda uma maior efetividade quando associada à outras técnicas (hifenadas) (GOROG, 2004; SILVA, 2007).

As técnicas hifenadas, atualmente bastante difundidas, têm proporcionado grande êxito na detecção e identificação, com baixo limite de detecção, para a análise de hormônios esteróides. Essas técnicas consistem no acoplamento de dois equipamentos diferentes, buscando unir requisitos essenciais à determinação e quantificação com sensibilidade, seletividade e rapidez (GOROG, 2004; SILVA, 2007).

A literatura tem revelado poucos estudos utilizando técnicas hifenadas associadas à CLAE aplicados na determinação de drospirenona em plasma humano (BHAUMIK, *et al*., 2008; CHAMBERS e DIEHL, 2011). Recentemente em estudos realizados por PRADAD, BABU e RAMANA (2011) foi utilizado a CLAE para determinação de drospirenona em formulação farmacêutica (Tabela 3).

Para a determinação de etinilestradiol estão disponíveis na literatura métodos empregando a CLAE e técnicas hifenadas associadas à CLAE (SHOU, JIANG e NAIDONG, 2004) (Tabela 4), em formulações farmacêuticas (DENISOVA, CHISTYAKOV e SADCHIKOVA, 2008; LABAN, *et al.*, 2004; SANTORO, *et al.*, 2002) e/ou em plasma humano (TACEY, HARMAN e KELLY, 1994).

Em estudos recentes, BHUSARI e DHANESHWAR (2012) utilizam para determinação simultânea de etinilestradiol e drospirenona em formulações farmacêuticas a cromatografia em camada delgada. A separação cromatográfica foi realizada utilizando como fase estacionária, uma placa de alumínio previamente revestida com gel de sílica 60 F_{254}, solvente constituído por uma mistura de tolueno/metanol/ amônia (8:2:0,1) (v/v/v) e detecção em 280 nm.

Entre os métodos analíticos de separação e identificação de substâncias que estão rapidamente se desenvolvendo, destaca-se a EC, técnica de fácil implementação, com alta eficiência na separação e análise rápida (SILVA, 2007). Nos últimos anos, a determinação de esteróides em formulações farmacêuticas vem sendo realizada utilizando-se diferentes tipos de EC, tais como a eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC) e cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC) (GOROG, 2004). Estas técnicas tem sido frequentemente referenciadas na literatura (Tabela 5) pois possibilitam a separação e a quantificação de hormônios esteróides.

A EC, por ser uma técnica analítica ainda recente, é pouco citada na literatura para a determinação quantitativa de hormônios esteróides. Na literatura referente à drospirenona, não foram encontradas propostas de metodologias analíticas empregando EC. O etinilestradiol é o estrógeno mais estudado e com maior número de citações em toda literatura, como pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 3. Métodos analíticos para a determinação de drospirenona empregando CLAE

Matriz	Coluna	Fase móvel	Detecção	Vazão	Tempo de retenção	Padrão interno	Ref.
Plasma CL-SM-SM	Phenomenex® (33 x 4.6 mm i.d., 3 µm)	Formiato de amônia 0,01 M em metanol (97:3 v/v)	____	1,0 mL min	1,22 min	Levonorgestrel	(BHAUMIC, et al., 2008)
Plasma UPLC-SM-SM	Acquity® UPLC BEH C18 (2,1 X 50 mm i.d., 1,7 µm)	1) 0,1% Ác. fórmico/ H_20 2) Metanol em gradiente	____	0,6 mL min	1,68 min	____	(CHAMBERS e DIEL, 2011)
Formulação farmacêutica CLAE	Symmetry C18 (250X4.6 mm, 5µm)	Metanol 1%/Ac. orto fosfórico (54.5:45.5)	252 nm	1,0 mL min	8,35 min	____	(PRADAD, BABU e RAMANA, 2011)

Tabela 4. Métodos analíticos para determinação do etinilestradiol empregando CLAE

Matriz	Coluna	Fase móvel	Detecção	Vazão	Tempo de retenção	Padrão interno	Ref.
Formulação farmacêutica	LiChrospher® 100 C8 (125x4.0 mm i.d., 5 µm)	MeCN:H_2O (60:40 v/v) MeCN:H_2O (50:50 v/v)	UV-215 nm	0,8 mL min	2.81 min 4.85 min	___	(SANTORO, *et al.,* 2002)
Formulação farmacêutica	Water Symmery Shield® C18 (150x4,6mm i.d., 5 µm)	MeOH:H_2O (80:20 v/v)	UV-220 nm	1,0 mL min	4,74 min	Acetato de ciproterona	(LABAN, *et al.*, 2004)
Formulação farmacêutica	Nova-Pak® C18 (150x4.6 mm i.d., 5 µm)	MeCN/MeOH/H_2O (30:20:50 v/v/v)	UV-215 nm	1,0 mL min	9,70 min	___	(DENISOVA, CHISTYAKOV e SADCHIKOVA, 2008)
Plasma CL-SM-SM	Phenomenex® C18 (50X2 mm i.d., 5 µm)	H_2O/MeCN 20:80 (v/v) com 1% de ácido fórmico	___	___	2,78 min	___	(SHOU, JIANG e NAIDONG, 2004)
Plasma	Alltech LiChrosorb® C8 (250*x*4.6 mm i.d., 10 µm)	H_20/MeCN/metil butil éter (65:35:10v/v/v)	___	2,0 mL min	9,50 min	___	(TACEY, HARMAN, KELLY, 1994)
Formulação farmacêutica CLAE	Waters µPorasil silica column (30 cm X 3.9 mm i.d., 10µm)	2 propanol/ciclohexano (1,5:98,5)	Fluorescência λ_{ex} 280 nm λ_{em} 310 nm	1,5 mL min	7,20 min	___	(JOHNSTON, 1981)
Esgotos sanitários CLAE	(C18 250 X 4.6 mm, 5µm)	MeCN/H_2O (48:52)	Fluorescência λ_{ex} 280 nm λ_{em} 310 nm	1,0 mL min	8,40 min	___	(ARAUJO, 2006)

Tabela 5. Métodos analíticos para determinação de etinilestradiol por EC

Matriz	Método	Eletrólito	pH	Kv	Tempo de retenção	Detecção	Padrão interno	Ref.
Formulação Farmacêutica	MEKC	TBS 20 mM MeCN 30% SDS 15 mM	9,2	25 Kv	7,0 min	UV -197 nm	___	(BERZAS, *et al.,* 1999)
Formulação Farmacêutica	MEKC	TBS 20 mM MeCN 30% SDS 15 mM	9,2	25 Kv	7,0 min	UV-197 nm	___	(BERZAS, *et al.,* 1999)
Formulação Farmacêutica	NACE	20 mM de acetato de amônia 10 mM SDS em MeOH	___	28 kv	21,0 min	UV-220 nm	Tamoxifeno	(DU, et al., 2009)
Formulação Farmacêutica	MEKC	TBS 10 mM MeCN 22,5% SDS 20 mM	9,2	25 Kv	5,5 min	UV-200 nm	___	(SILVA, 2007)
Formulação Farmacêutica	MEEKC	0,5% Ac. de etila 0,6% butanol 0,6% SDS 15% etanol TBS 12 mM	9,2	18 Kv	2,4 min	UV-200 e 247 nm	___	(SILVA, 2007)
Formulação Farmacêutica	CEC	5 mM acetato de amônia em metanol	-----	12 Kv	14,0 min	UV-254 nm	___	(CHANKVETADZE, et al., 2003)
Padrões de referência	MEKC	20 mM CAPS 25 mM SDS 15% MeCN	11,5	25 Kv	12,0 min	UV-200 nm	___	(FOGARTY, REGA e DEMPSEY, 2000)

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.1. Análise térmica

A análise térmica é definida como um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física da substância e seus produtos de reação são medidos em função da temperatura ou tempo, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura (SILVA, PAOLA e MATOS, 2007; STORPIRTIS *et al.,* 2009).

O desenvolvimento e fabricação de medicamentos requerem intenso cuidado devido à pureza, qualidade e estabilidade dos componentes. As técnicas termoanalíticas têm sido utilizadas na indústria farmacêutica com a finalidade de caracterizar desde as matérias-primas até produtos finais. Com base em estudos de compatibilidade de pré-formulação é possível avaliar uma interação entre os componentes ativos e os excipientes, existência de polimorfismo, compostos de inclusão e dispersões sólidas, determinação de pureza química, estudos de reações no estado sólido, análise de formas farmacêuticas sólidas e no controle de qualidade (MAMEDE, *et. al*., 2006; OLIVEIRA, 2011).

Neste contexto, a análise térmica constitui um grupo de técnicas de grande interesse na área farmacêutica, visto que propicia a obtenção de dados relevantes quanto ao comportamento térmico de fármacos e insumos farmacêuticos em tempo relativamente curto, os quais são fundamentais para o desenvolvimento de novos produtos (STORPIRTIS *et al.,* 2009).

As principais técnicas termoanalíticas aplicadas nessa área são a termogravimeria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

A *termogravimetria* (TG) é uma técnica termoanalítica na qual a variação de massa de uma amostra (perda ou ganho), é determinada em função da temperatura e/ou tempo enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura.

A *termogravimetria derivada* (DTG) à derivada primeira da curva TG nos quais os degraus são substituidos por picos que delimitam áreas proporcionais às

alterações de massas sofrida pela amostra (STORPIRTIS *et al.,* 2009; OLIVEIRA, 2011).

3.2. Eletroforese capilar

3.2.1. Princípio do método

A eletroforese capilar (EC) foi desenvolvida inicialmente pelo químico sueco Arne Tiselius, na década de 1930, para o estudo de proteínas do soro sanguíneo (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002). É um método de separação baseado na diferença de velocidades, nas quais os íons do analíto migram sob a influência de um campo elétrico de corrente contínua. As separações são baseadas nas diferenças das relações carga-tamanho dos vários analítos em uma amostra. Quanto maior esta razão, mais rápido o íon migra no campo elétrico (SANTORO, *et al.*, 2000; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002). É aplicada na separação de compostos com estruturas muito complexas, tais como, princípios ativos altamente polares, biomoléculas de elevada massa molecular e compostos quirais, o que caracteriza sua habilidade única em separar macromoléculas de interesse da indústria biotecnológica, farmacêutica e de pesquisa em biologia e bioquímica (SANTORO, *et al.*, 2000; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

A EC se caracteriza pela simplicidade da instrumentação utilizada. Os componentes principais do aparelho são fornecedores de alta voltagem. Um capilar de diâmetro estreito (25-100 µm) é preenchido com um eletrólito condutor, que passa através do centro óptico de um sistema de detecção e conectado a um dispositivo de aquisição de dados (SANTORO, *et al.*, 2000).

A Figura 1 apresenta o esquema do funcionamento da EC. Nos recipientes contendo solução eletrolítica se encontram os eletrodos conectados à fonte de potência. Os círculos brancos representam os íons, as áreas representam as massas e os sinais negativos e positivos indicam as cargas. A detecção radial da absorção molecular é representada por uma fonte de radiação e um detector

acoplado a um computador. No retângulo é mostrado o registro temporal dos sinais (GERVASIO, et al., 2003).

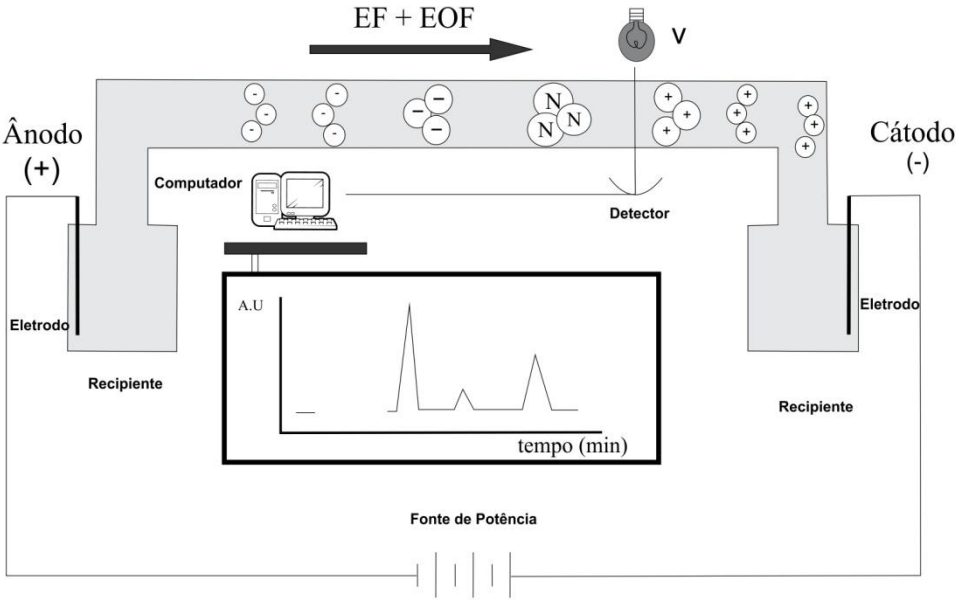

Figura 3. Diagrama esquemático do sistema de eletroforese capilar (GERVASIO, et al., 2003).

3.2.2. Tipos de eletroforese capilar

Vários são os modos de separação em EC, que apresentam mecanismos singulares e seletividade característica. Os principais modos de EC desenvolvidos e atualmente aplicados incluem a eletroforese capilar de zona (CZE), em que se enquadram a eletroforese capilar em solução livre (FSCE), cromatografia capilar eletrocinética micelar (MECK), a eletrocromatografia (CEC) e a eletroforese capilar em gel (CGE). Outros modos de CE, também muito utilizados, são a focalização isoelétrica capilar (CIEF) e a isotacoforese capilar (CITP) (SANTORO, et al., 2000; SILVA, 2007).

- **Eletroforese capilar de zona (CZE)**

A eletroforese capilar em solução livre (FSCE), como é ainda comumente conhecida, é um dos modos de separação eletroforética mais simples. Na prática é

utilizada em razão da facilidade de implementação e de otimização das condições experimentais (SILVA, 2007). Seu mecanismo de separação está baseado nas diferenças apresentadas pela razão massa/carga das espécies analisadas (SANTORO, et al., 2000).

Em FSCE, o fundamental é a homogeneidade da solução tampão e a força constante do campo elétrico por todo o comprimento do capilar. Nesta técnica, uma tensão é aplicada sobre um capilar de sílica contendo solução tampão. As moléculas são separadas de acordo com o tamanho e o número de grupamentos ionizáveis. A separação ocorre como resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimizar as causas de alargamento das zonas (SANTORO, et al, 2000).

- **Cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC)**

Foi introduzida em 1984. Neste tipo de EC a solução tampão contém um tensoativo que atua de maneira similar à fase estacionária de uma coluna reversa. Agentes tensoativos são introduzidos dentro do capilar em concentração acima da concentração micelar crítica, proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases. As micelas carregadas atuam como fase estacionária, enquanto que o eletrólito representa a fase móvel que é transportada eletrosmóticamente sob a ação do campo elétrico. Assim, compostos mais hidrofóbicos permanecem na micela carregada negativamente, eluindo por último. Compostos mais hidrofílicos, não são solubilizados na micela, sendo separados de acordo com a mobilidade eletroforética (SANTORO, et al., 2000; SILVA, 2007).

- **FSCE e MEKC com seletores quirais**

Estes tipos de EC são aplicados à compostos quirais de interesse terapêutico. A separação é normalmente efetuada por FSCE, utilizando-se seletores quirais. Outra forma comumente empregada para obtenção de resoluções quirais é o MEKC através da utilização de sistemas micelares estereoespecíficos ou ainda, um sistema misto (micela/ciclodextrina) (SANTORO, et al., 2000).

A separação pode ser aplicada de modo direto ou indireto. No método indireto o seletor quiral reage com a mistura racêmica antes da análise eletroforética produzindo dois diasteroisômeros estáveis, que podem então ser separados através do sistema eletroforético não quiral. No método direto, o seletor quiral é adicionado ao eletrólito. A interação entre o seletor quiral e os enantiômeros ocorre durante o processo eletroforético através da formação de diasteroisômeros lábeis (SANTORO, et al., 2000).

- **Focalização isoelétrica capilar (CIEF)**

Neste modo de separação eletroforética, as substâncias anfóteras são separadas com base no seu ponto isoelétrico (PI), que corresponde ao valor em que a carga efetiva do composto é nula. Compostos com diferentes PI como proteínas, peptídeos, aminoácidos e fármacos, podem ser resolvidos por essa técnica. O capilar inteiro é preenchido com a mistura anfólito/amostra, onde se aplica uma corrente elétrica. Os anfólitos adicionados criam então, um gradiente de pH forçando a migração dos analitos em direção aos seus pontos isoelétricos, onde apresentam carga líquida igual a zero. Esta movimentação das moléculas permite sua concentração em bandas de migração, de acordo com seu PI específico (SANTORO, et al., 2000; SILVA, 2007).

- **Isotacoforese capilar (CITP)**

Técnica fundamentada no mesmo principio da eletroforese de zona na qual a separação de espécies iônicas está baseada nas diferenças das mobilidades efetivas de cada íon quando submetidos a um campo elétrico. Os capilares são preenchidos com um eletrólito denominado “líder”. Os ânions do eletrólito líder devem possuir mobilidade efetiva maior do que a de qualquer espécie aniônica presente na amostra. O cátion do eletrólito líder também denominado “contra íon” deve possuir boa capacidade tamponante no pH de análise. O cátodo é preenchido com um eletrólito chamado terminador, contendo ânions que possuam mobilidade efetiva mais baixa do que a de qualquer outra espécie aniônica presente (SANTORO, et al., 2000). A separação deve ocorrer entre o eletrólito líder e o terminador, e está baseada nas mobilidades individuais dos analitos (SILVA, 2007).

- **Eletroforese capilar em gel (CGE)**

É utilizada na separação de compostos iônicos de alta massa molecular pelo mecanismo de peneira molecular. A CGE está baseada nas diferenças dos tamanhos dos solutos que migram através de uma estrutura polimérica do capilar preenchido com gel (SANTORO, et al., 2000; SILVA, 2007).

- **Eletrocromatografia capilar (CEC)**

É uma técnica híbrida que combina alta eficiência da EC com alta seletividade da cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) (SILVA, 2007). A separação baseia-se, simultaneamente, em processos eletroforéticos e interações cromatográficas como partição, adsorção e permeação em gel por meio de um capilar (SANTORO, et al., 2000). Em CEC, a fase móvel é conduzida por um fluxo eletroosmótico (EOF) através do capilar. São utilizadas, fases móveis e estacionárias típicas de CLAE que proporcionam as interações essenciais para realização das separações. Como consequência, a seletividade de analítos neutros, tanto em CEC como em CLAE, é similar (SILVA, 2007).

- **Cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC)**

Microemulsões são soluções contendo gotículas nanométricas dispersas em um liquido imiscível. As microemulsões mais utilizadas como meios de separação são formadas por gotas de óleo dispersas num líquido imiscível, já que existe tensão superficial entre eles. Para reduzir a tensão superficial entre as duas camadas líquidas, as gotículas de óleo são revestidas com um tensoativo. Com o objetivo de promover a estabilidade da microemulsão utiliza-se o butanol, que reduz a tensão superficial para próximo de zero (SILVA, 2007).

A MEEKC utiliza tampões de microemulsões constituídos por gotículas de óleos, minúsculas e imiscíveis, suspensas em tampão aquoso. Os solutos sofrem partição entre as gotículas de óleo e a fase aquosa do tampão. Os compostos não solúveis em água favorecem uma melhor inclusão nas gotículas de óleo do que no tampão aquoso. Solutos hidrofóbicos se acoplam, mais frequentemente, na gotícula de óleo do que os solutos solúveis em água (SILVA, 2007).

3.3. Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

A cromatografia foi inicialmente utilizada e assim denominada pelo botânico russo Mikhail Tswett em 1906, que descreveu suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). É um método físico-químico que tem como objetivo separar componentes muito semelhantes em misturas complexas (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

A larga utilização da CLAE deve-se a sua grande sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas, adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente lábeis e acima de tudo, sua ampla aplicabilidade em substâncias de grande interesse para a indústria e para muitos campos da ciência (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

A separação dos componentes de uma mistura por meio da CLAE é realizada através da distribuição desses componentes, em duas fases, que estão em contato íntimo. Ocorre como consequência da diferença de mobilidade, entre a fase móvel, que passa sob pressão através de uma fase estacionária imiscível fixa colocada na coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de maneira que os componentes da amostra se distribuam entre a fase móvel e a estacionária em diferentes graus. Os componentes que são mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se muito lentamente no fluxo da fase móvel. Ao contrário, os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária, movem-se mais rapidamente. Como consequência, os componentes das amostras se separam em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e quantitativamente (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

O cromatógrafo líquido é constituído por um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna sob alta pressão, um detector, um forno para controle da temperatura da coluna e um computador capaz de controlar o sistema e apresentar resultados (Figura 2).

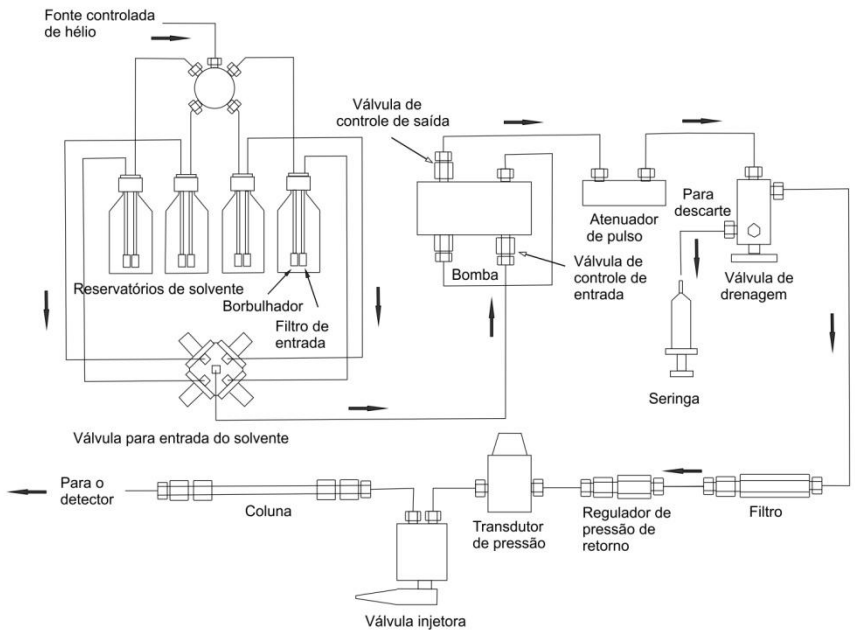

Figura 4. Representação esquemática do equipamento para cromatografia em fase líquida de alta eficiência (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

A qualidade de uma bomba de alta pressão para a CLAE é definida pela estabilidade e reprodução que ela produz. A bomba deve proporcionar ao sistema uma vazão continua sem pulsos a uma pressão que pode variar de 0,01 a 35 MPa (0,1 a 350 bar), possibilitando a eluição da fase móvel a uma vazão adequada. A fase móvel não deve corroer qualquer peça ou acessório do sistema. Intervalo de vazão deve estar compreendido entre 0,1 a 5 mL min para aplicações analíticas, entre 0,05 e 200 µL/min para uso com coluna micropore e capilar e até 100 mL min para aplicações preparativas (HARRIS, 2008).

Os detectores mais empregados em CLAE são os espectrofotômetros no UV/VIS. Eles determinam a diferença de absorbância na região do ultravioleta ou no visível, sendo, assim, um detector seletivo para moléculas que possuem cromóforos. As colunas utilizadas em CLAE são de aço inoxidável e de plástico, com diâmetro interno entre 1 a 5 mm, e comprimento variável de 5 a 30 cm. Estas colunas tem um custo elevado, portanto a entrada principal deve ser protegida por uma pequena coluna (pré-coluna) (HARRIS, 2008).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O objetivo principal desse trabalho foi desenvolver, validar e comparar métodos analíticos seguros e eficientes para a identificação e determinação quantitativa simultânea da drospirenona e do etinilestradiol em comprimidos revestidos.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar a estabilidade térmica da formulação utilizando as técnicas TG/DTG e DSC.

Na Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010), são reportadas metodologias para determinação quantitativa de drospirenona e etinilestradiol separadamente, ou para a associação do etinilestradiol a outras progestinas, porém, não há uma metodologia indicada para a separação e determinação simultânea destes fármacos em contraceptivos orais combinados, utilizando métodos de separação e quantificação por CLAE e EC.

As metodologias analíticas desenvolvidas e validadas, empregando CLAE e EC poderão ser aplicadas em análises de rotina para o controle de qualidade de preparações farmacêuticas contendo os dois hormônios selecionados para pesquisa.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Material

5.2.1.1. Equipamentos

- Sistema de eletroforese capilar Beckman Coulter MDQ com detector de arranjo de diodos e detector UV/VIS e termostatização de amostras (Part. 285400 - Beckman Coulter®);
- Capilar de sílica fundida com: 40,2 cm (30 cm efetivo) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; 31,2 cm (21 cm efetivo) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e. (Polymicro Technologies®);
- Sistema de cromatografia em fase líquida de alta eficiência, composto por "*software*" controlador *LC Wokstation Class-VP* (Shimadzu Corporation, Japão); controlador de sistema modelo SCL-10Avp (Shimadzu Corporation, Japão); degaseificador *on line* modelo DGU-14A (Shimadzu Corporation, Japão); sistema de bombeamento de solvente modelo LC-10Advp (Shimadzu Corporation, Japão); injetor automático com *loop* de 50 µL modelo SIL-10 ADvp (Shimadzu Corporation, Japão); forno para controlar temperatura da coluna modelo CTO-10ASvp (Shimadzu Corporation, Japão); detectores: detector UV-VIS do tipo DAD (*diode array detector*) modelo SPD-M10Avp (Shimadzu Corporation, Japão) e de fluorescência modelo RF-10Axl;
- Coluna cromatográfica LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm.
- Espectofotômetro UV-visível Shimadzu modelo UV-1601 equipado com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, acoplado ao computador.
- pHmetro Digimed®, modelo TE-901;
- Agitador de tubos (Vortex) 2.500 rpm;
- Banho de ultra-som Quimis® modelo Q335D
- Balança analítica AL204 Mettler Toledo®;
- Aparelho para ponto de fusão, Stuart Scientific®, modelo SMP1;
- Célula DSC-50 (Shimadzu®);
- Termobalança modelo STA-409 PC Luxx (Netzsch);
- Analisador elementar, modelo Elemental Analyzer 2400 CHIN (Perkin Elmer);

- Espectrômetro, modelo FTIR Bomem MB100 (Perkin Elmer®);
- Milli-Q Ultrapore Water Purificaton System®;
- Membranas filtrantes HV 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore®);
- Vidraria usual de laboratório

5.2.1.2. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes empregados na pesquisa foram de grau analítico e suas finalidades estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Reagentes que foram utilizados no trabalho

Descrição	Finalidade
Água (purificada através de Milli-Q®)	Preparação de eletrólito, fase móvel, lavagem da coluna e preparação de soluções
Metanol (MeOH) (J.T. Baker®)	Preparação da solução estoque
Acetonitrila (MeCN) (J.T. Baker®)	Lavagem da coluna, fase móvel (CLAE)
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3%) (Merck®)	Teste de estresse
Hidróxido de sódio (NaOH) 1 M (Merck®)	Teste de estresse
Ácido clorídrico (HCl) 1 M (Merck®)	Teste de estresse
Dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich®)	Preparação da microemulsão (EC)
Tetraborato de sódio (TBS) (Sigma-Aldrich®)	Preparação da microemulsão (EC)
Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M (Merck®)	Lavagem da coluna (EC)
Acetato de etila (Merck®)	Preparação da microemulsão (EC)
Butanol (Sigma-Aldrich®)	Preparação da microemulsão (EC)

5.2.1.3. Fármacos empregados como substâncias químicas de referência

Os fármacos empregados como substâncias químicas de referência drospirenona (DROSP) (99,8%) e etinilestradiol (ETE)(99,6%), foram gentilmente cedidos por uma indústria farmacêutica nacional.

As amostras das substâncias químicas de referência foram analisadas para confirmação da pureza.

5.2.1.4. Amostras

Amostra 1: Comprimido revestido contendo 3,0 mg de drospirenona e 0,03 mg de etinilestradiol/comprimido, fabricante “A”, Lote: 09F0705

Amostra 2: Comprimido revestido contendo 3,0 mg de drospirenona e 0,02 mg de etinilestradiol/comprimido, fabricante “B”, Lote: BS005C3

Amostra 3: Comprimido revestido contendo 3,0 mg de drospirenona e 0,03 mg de etinilestradiol/comprimido, fabricante “A”, Lote: 09E0297

As amostras 1 e 3, embora contenham a mesma concentração e serem do mesmo fabricante, apresentam nome comercial e forma de administração diferentes. O critério de seleção das amostras foi feito de acordo com sua disponibilidade no mercado nacional. A Tabela 7 apresenta os principais COCS comercializados no Brasil.

Tabela 7. Principais Contraceptivos orais combinados comercializados no mercado nacional

Nome comercial	Laboratório	Concentração (drospirenona + etinilestradiol)	Tipo	Regime de tratamento	Intervalo livre
Yaz®	Schering do Brasil	3 mg + 0,02 mg	Referência	24 dias	4 dias
Yasmin®	Schering do Brasil	3 mg + 0,03 mg	Referência	21 dias	7 dias
Yasminelle®	Schering do Brasil	3 mg + 0,02 mg	Referência	21 dias	7 dias
Elani Ciclo®	Libbs	3 mg + 0,03 mg	Similar	21 dias	7 dias
Elani 28®	Libbs	3 mg + 0,03 mg	Similar	28 dias	Sem intervalo

Fonte: Anvisa – Resultado de consulta a banco de dados – medicamentos (ANVISA, 2009)

5.2.1.5. Placebo

O placebo foi preparado no Laboratório de Controle Físico e Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos do Departamento de Farmácia da FCF-USP. A composição desta formulação foi a estabelecida pelo fabricante, empregando as quantidades de excipientes usuais para comprimidos revestidos. A Tabela 8 apresenta a composição e a concentração dos excipientes na preparação do placebo.

Tabela 8. Composição do placebo preparado no laboratório

Descrição	Concentração (%)
Povidona	3
Amido	15
Croscarmelose sódica	1
Estearato de magnésio	1
Macrogol	0,3
Hipromelose	2
Corante amarelo crepúsculo	0,0001
Lactose	qsp. 100

5.2.2. Métodos

5.2.2.1. Intervalo de fusão

As amostras das substâncias químicas de referência de etinilestradiol e drospirenona foram colocadas em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada até cerca de 3,0 mm de altura em aparelho convencional de ponto fusão. Iniciou-se o aquecimento a uma razão de 5° C min; quando a temperatura chegou a 10° C abaixo do inicio da fusão (teórico), reduziu-se a velocidade de aquecimento de cerca de 1° C min. A temperatura na qual a coluna da amostra funde sobre a parede do tubo em qualquer ponto, é definida como o início de fusão, e a temperatura na qual a amostra torna-se completamente líquida, é definida como o final de fusão ou o ponto de fusão (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011).

5.2.2.2. Análise térmica

5.2.2.2.1. Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG)

As curvas TG/DTG do etinilestradiol foram obtidas entre 25 e 900°C [razão de aquecimento (β) de 10º C min^{-1}], tanto sob atmosfé ra dinâmica de ar sintético como de N_2 (vazão de 50 mL min^{-1}). No entanto as curvas TG/DTG da drospirenona e das misturas foram obtidas no intervalo de temperatura de 25 a 700º C [razão de aquecimento (β) de 10º C min^{-1}] sob atmosféra dinâmica de ar sintético (vazão de 50 mL min^{-1}). Resalta-se que, estes resultados foram obtidos utilizando cadinho de Al_2O_3 contendo cerca de 15 mg de amostra.

5.2.2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas entre 25 a 550°C [razão de aquecimento (β) de 10º C min^{-1}], sob atmosfera dinâmica de N_2 (vazão de 50 mL min^{-1}) utilizando cápsula de Al aberta contendo aproximadamente 2,5 mg de amostra.

5.2.2.3. Espectrofotometria no ultravioleta (UV)

A identificação espectrofotométrica do etinilestradiol e drospirenona foi realizada mediante a espectroscopia no ultravioleta, realizando uma varredura entre 190 a 400 nm. O espectro de absorção foi obtido mediante o preparo de uma diluição das soluções estoque dos padrões nas concetrações de 5,0 µg mL de etinilestradiol e 500,0 µg mL de drospirenona, em metanol (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011).

5.2.2.4. Análise elementar

Os teores de carbono e hidrogênio presentes na amostra de referência do etinilestradiol foram obtidas em um equipamento Elemental Analisys modelo 2.400 CHN (marca Perkin Elmer) pertencente a Central Analítica do IQ-USP.

5.2.2.5. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho da amostra de etinilestradiol foi obtido por um espectrofotômetro marca Bomem, modelo MB102, pertencente a central analítica do IQ-USP. O espectro de infravermelho foi obtido em 25º C e registrados na faixa espectral compreendida entre 4000 a 400 cm^{-1}, utilizando o método de pastilhas em KBr .

5.2.2.6. Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

5.2.2.6.1. Metodologia

- Preparação da solução padrão: as soluções foram preparadas contendo as seguintes concentrações de hormônios: 100,0 µg mL e 2.000,0 µg mL de ETE e DROSP, respectivamente.

Foram pesados exatamente 10,0 mg de etinilestradiol e 20,0 mg de drospirenona. Transferiu-se cada massa para balões de 100,0 mL e de 10,0 mL,

respectivamente e os volumes foram completados com metanol. Obtiveram-se assim, soluções nas concentrações de 100 µg mL e 2.000 µg mL de etinilestradiol e drospirenona, respectivamente.

As soluções estoque de ETE e DROSP foram preparadas diariamente em metanol, e homogeneizadas em agitador de tubos (Vortex®) a 2.500 rpm durante 5 minutos para completa dissolução, e mantidas sob refrigeração.

- **Preparação das amostras comerciais:** Foram pesadas em balança analítica 21 unidades da forma farmacêutica (quantidade correspondente a 1 cartela), das amostras 1, 2 e 3. Após a determinação do peso médio, procedeu-se a trituração até completa pulverização.

Pesou-se exatamente a massa de 265,6 e 268,0 mg das amostras 1 e 3, respectivamente e 417,8 mg da amostra 2, e transferiu-se para balões de 10 mL, aos quais foi adicionado metanol. A solução foi levada ao banho de ultra-som por 20 minutos, e em seguida centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em seringa através de membrana Milipore®.

Obteve-se teoricamente, para as amostras 1 e 3 soluções na concentração de 10,0 µg /mL e 1.000,0 µg /mL de etinilestradiol e drospirenona, respectivamente e para a amostra 2, solução na concentração de 10,0 µg mL e 1.500,0 µg mL de etinilestradiol e drospirenona, respectivamente.

- **Preparação de solução do placebo:** Foi preparada em laboratório quantidade de placebo correspondente a 90 unidades da formulação farmacêutica.

O procedimento adotado para o placebo foi idêntico ao descrito para as amostras comerciais. A solução foi levada ao banho de ultra-som por 20 minutos, e centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em seringa através de membrana Milipore®.

5.2.2.6.2. Testes preliminares

- **Otimização dos parâmetros cromatográficos**

Com a finalidade de padronizar uma metodologia eficiente para análise das formulações de COCS, alguns testes preliminares utilizando detector UV foram desenvolvidos para a escolha do comprimento de onda mais adequado, do sistema eluente e das concentrações dos padrões a serem empregados. Também foram ajustadas as condições de análise, ou seja, os parâmetros variáveis do equipamento.

Determinação dos espectros de absorção: Foram obtidos empregando soluções padrão contendo 5,0 µg /mL de etinilestradiol e 750,0 µg /mL de drospirenona a partir da diluição das soluções em MeCN/H_2O 50:50 (v/v).

Fase móvel: Diversos sistemas eluentes binários foram testados em diversas proporções empregando MeCN, MeOH e água. Todas as fases móveis foram filtradas em membrana para filtração Milipore® (0,45 µm) e desgaseificadas antes do uso.

Vazão: As vazões experimentadas foram aquelas compatíveis com a coluna empregada de modo a fornecer a melhor separação e resolução dos picos. Intervalo testado: 0,8 mL min a 1,4 mL min.

Temperatura: A temperatura de trabalho foi de 25 ± 1ºC.

Volume de injeção: O intervalo testado foi de 20 µL a 40 µL.

5.2.2.6.3. Condições analíticas padronizadas

Fase estacionária: coluna do tipo LiChroCART® 100RP- C_{18}, 5 µm, (125 x 4 mm)

Fase móvel: O sistema isocrático que se mostrou mais eficiente para a análise foi o constituído de MeCN/H_2O na proporção 50:50 (v/v).

Detecção: foi efetuada empregando o detector UV: ($\lambda_{máx}$) 200 nm; e de fluorescência: λ_{ex}= 280 nm e λ_{em}= 310 nm; resposta: 1; ganho: 1x; sensibilidade: média.

Vazão: 1,0 mL min.

Temperatura: A temperatura de trabalho foi de 25 ± 1ºC.

Volume de injeção: 20 µL

5.2.2.6.4. Validação do método analítico para a determinação simultânea de etinilestradiol e drospirenona por cromatografia em fase líquida de alta eficiência.

5.2.2.6.4.1. Curva analitica

A partir da diluição das soluções estoque de etinilestradiol e drospirenona em MeCN/H_2O 50:50 (v/v) em balão de 10 mL, obtiveram-se os 6 pontos da curva, nas concentrações de 0,1; 0,5; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 µg mL de etinilestradiol e 15,0; 75,0; 375,0; 750,0; 1.125,0; 1.500,0 µg mL de drospirenona. O volume de injeção foi de 20 µL, sendo as áreas dos picos correspondentes aos pontos de cada curva representadas pelas médias aritméticas de 3 leituras. Assim, com os resultados obtidos, as curvas de calibração foram construídas, calculados os desvios padrão e os coeficientes de variação.

5.2.2.6.4.2. Determinação da linearidade de resposta dos detectores (UV e Fluorescência)

De acordo com a Resolução nº 899 (ANVISA, 2003), linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para o estudo da linearidade faz-se necessário a confecção

de uma curva de resposta, sendo o eixo x, o da concentração e o eixo y, o da resposta obtida.

$$y = ax + b$$

Onde: a = coeficiente angular (expressa a inclinação da reta)

b = coeficiente linear (expressa a intersecção da curva aos eixos)

Durante o trabalho, a correspondência linear entre concentração e áreas foram determinadas por CLAE empregando detectores UV e Fluorescênca. Foram construídas curvas analíticas para cada hormônio, para definir o intervalo de concentração no qual a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional à concentração das substâncias analisadas.

5.2.2.6.4.3. Determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) por CLAE-UV e CLAE-Fluorescência

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Para o método cromatográfico desenvolvido os LD e LQ foram determinados por meio do desvio-padrão (DP) e da inclinação (IC) das curvas de calibração correspondentes a cada um dos analitos separados.

Foram efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para o LD e LQ foi realizado pelas seguintes equações:

$$LD = (DP \times 3{,}3)/IC$$

$$LQ = (DP \times 10)/IC$$

Foram ainda realizados testes em triplicata utilizando quantidades decrescentes dos analitos até as menores concentrações possíveis em estudo. A

partir da diluição das soluções de etinilestradiol e drospirenona em MeCN/H_2O 50:50 (v/v) em balão de 10 mL, obtiveram-se pontos nas concentrações de 0,05; 0,025; 0,010 e 0,005 µg mL de etinilestradiol e 5,0; 3,0; 1,0; 0,5; 0,25 e 0,10 µg mL de drospirenona.

5.2.2.6.4.4. Seletividade

Com objetivo de averiguar se haviam possíveis interferências do excipiente no método proposto, foram preparadas soluções do padrão e amostra nas concentrações nominais (etinilestradiol 5 µg mL e drospirenona 750 µg mL) e placebo. Os placebos dos comprimidos foram submetidos às mesmas condições analíticas empregadas para as amostras, verificando-se assim a seletividade do método (RIBANI, 2004).

5.2.2.6.5. Determinação da precisão por CLAE-UV e CLAE- Fluorescência

5.2.2.6.5.1. Repetibilidade (intra-dia)

A repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo obtidos pelo mesmo analista e utilizando a mesma instrumentação (ANVISA, 2003). Para este estudo, seis determinações do padrão e da amostra foram preparadas em soluções contendo 100% da concentração nominal (5,0 µg /mL de etinilestradiol e 750,0 µg /mL de drospirenona). As leituras foram realizadas em triplicata, estabelecendo-se assim, a precisão intra-dia.

Preparo do padrão: 0,5 mL e 3,75 mL de etinilestradiol e drospirenona, respectivamente, foram transferidos para balões de 10 mL e o volume foi completado com MeCN/H_2O 50:50 (v/v). A solução foi filtrada em filtro Millex (0,45 µm) e transferida para um “vial”.

Preparo da amostra: 5 mL da amostra 2 foram transferidos para balões de 10 mL e o volume foi completado com MeCN/H_2O 50:50 (v/v). A solução foi filtrada em filtro Millex (0,45 µm) e transferida para um “vial”.

5.2.2.6.5.2. Precisão Intermediária (precisão inter-dia)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtido em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003). Para este estudo a precisão intermediária foi avaliada através da injeção das amostras 1, 2 e 3 preparadas em concentrações baixa, média e alta, em triplicata, durante 3 dias consecutivos.

Preparo da solução padrão: Transferiu-se separadamente para balões de 10 mL alíquotas de 0,5 mL; 2,5 mL e 0,5 mL; 3,75 mL das soluções estoque de etinilestradiol e drospirenona, respectivamente e os volumes completados com MeCN/H_2O 50:50 (v/v). As soluções foram filtradas em filtro Millex (0,45 µm) e transferidas para “vials”. Obtiveram-se as seguintes concentrações: 5,0 µg mL; 500,0 µg mL e 5,0 µg mL; 750,00 µg mL de etinilestradiol e drospirenona, respectivamente.

Preparo da amostra: Aliquotas das soluções das amostras 1, 2 e 3 foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL (Tabela 10), e o volume foi completado com MeCN/H_2O 50:50 (v/v). As soluções foram filtradas em filtro Millex (0,45 µm) e transferidas para “vials”.

Tabela 9. Preparação das amostras para a determinação da precisão para o etinilestradiol e drospirenona.

Amostras	Conc. ETE/DROSP (µg mL)	Volume de amostra (mL)	Volume de MeCN/H_2O 50:50 (v/v)
1 e 3	2,5/250,0	2,5	7,5
	5,0/500,0	5,0	5,0
	7,5/750,0	7,5	2,5
2	2,5/375,0	2,5	7,5
	5,0/750,0	5,0	5,0
	7,5/1.125,0	7,5	2,5

5.2.2.6.5.3. Execução do teste de recuperação - Exatidão

A exatidão de um método analítico, é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão de um método

deve ser realizada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada à partir de, no mínimo, 9 determinações completando o intervalo linear do procedimento ou seja em concentrações baixa, média e alta, com 3 replicatas de cada (ANVISA, 2003).

Preparo da amostra simulada: Para simular uma amostra foram adicionadas à mistura de ingredientes inativos preparados em laboratórios, quantidades de hormônios equivalentes a 50, 100 e 150% da concentração nominal (Tabela 10) a balões de 10 mL e os volumes completados com MeCN/H_2O 50:50 (v/v).

Tabela 10. Preparação das amostras para a determinação da exatidão do etinilestradiol e drospirenona

Exatidão (%)	Solução padrão Etinilestradiol (µL)	Solução padrão Drospirenona (µL)	Balão volumétrico (mL)
50%	250,0	2,5	10
100%	500,0	5,0	10
150%	750,0	7,5	10

Os procedimentos adotados para a preparação das amostras simuladas foram idênticos aos descritos para as amostras comerciais (5.2.2.5.1) e, em seguida, as soluções finais foram filtradas em filtro Millex (0,45 µm) transferidos para “vials” e injetadas no cromatógrafo, em triplicata.

5.2.2.6.5.4. Determinação da robustez do método

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ANVISA, 2003; ICH, 2010). A robustez foi avaliada de acordo com a influência de três parâmetros cromatográficos: vazão (1.0 ± 0.1 mL min), temperatura (25 ± 3°C), e a proporção de MeCN (50 ± 5%) na fase móvel. Os três parâmetros foram examinados em triplicata, sendo dois extremos fixados alto (+) e baixo (-) sendo que a condição experimental estabelecida foi incluída como fator médio.

5.2.2.6.6. Teste de estresse

O teste de estresse é definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas. Um dos principais objetivos a serem atingidos por meio desse teste é demonstrar a especificidade ao desenvolver um método indicativo de estabilidade, sobretudo quando poucas informações estão disponíveis sobre os possíveis produtos de degradação (SILVA, *et al*., 2009).

Para este estudo diferentes meios de reação foram utilizados (Tabela 11) com objetivo de avaliar o comportamento dos fármacos em condições extremas.

Tabela 11. Condições empregadas no teste de estresse

Meio de reação	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Diluente
Ácido	80	4	HCl 1M
Alcalino	80	4	NaOH 1M
Oxidante	80	4	H_2O_2 3%
Neutro	80	4	Água ultrapura

5.2.2.6.6.1. Estabilidade em meio ácido

A determinação da estabilidade em meio ácido foi realizada preparando solução padrão conforme descrito abaixo:

Preparo do padrão: Pesou-se exatamente 2,5 e 375,0 mg de etinilestradiol e drospirenona e transferiu para um balão de 25 mL. Adicionou 7 mL de metanol e submeteu ao banho de ultrasom por 20 minutos. Completou-se o volume com HCl 1 M, levou ao banho maria a 80°C por 4 hs. Após o resfriamento à temperatura ambiente, transferiu-se uma alíquota de 0,5 mL para balão de 10 mL e completou o volume com MeCN/H_2O 50:50 (v/v).

5.2.2.6.6.2. Estabilidade em meio alcalino

A determinação da estabilidade em meio alcalino foi realizada preparando solução padrão conforme descrito abaixo:

Preparo do padrão: Pesou-se exatamente 2,5 e 375,0 mg de etinilestradiol e drospirenona e transferiu para balão de 25 mL. Adicionou 7 mL de metanol e submeteu ao banho de ultrasom por 20 minutos. Completou-se o volume com NaOH 1 M, levou ao banho maria a 80°C por 4 hs. Após o resfriamento à temperatura ambiente, transferiru-se uma alíquota de 0,5 mL para balão de 10 mL e completou o volume com MeCN/H_2O 50:50 (v/v).

5.2.2.6.6.3. Estabilidade em meio oxidante

A determinação da estabilidade em meio oxidante foi realizada preparando solução padrão conforme descrito abaixo:

Preparo do padrão: Pesou-se exatamente 2,5 mg e 375,0 mg de etinilestradiol e drospirenona e transferiu para um balão de 25 mL. Adicionou 7 mL de metanol e submeteu ao banho de ultrasom por 20 minutos. Completou o volume com H_2O_2 3%, levou ao banho maria a 80°C por 4 hs. Após o resfriamento à temperatura ambiente, transferiru-se uma alíquota de 0,5 mL para balão de 10 mL e completou o volume com MeCN/H_2O 50:50 (v/v).

5.2.2.6.6.4. Estabilidade em meio neutro

A determinação da estabilidade em meio neutro foi realizada preparando solução padrão conforme descrito abaixo:

Preparo do padrão: Pesou-se exatamente 2,5 mg e 375,0 mg de etinilestradiol e drospirenona e transferiu para balão de 25 mL. Adicionou 7 mL de metanol e submeteu ao banho de ultrasom por 20 minutos. Completou-se o volume com H_2O, levou ao banho maria a 80°C por 4 hs. Após o resfriamento à temperatura ambiente, transferiu-se uma alíquota de 0,5 mL para balão de 10 mL e completou o volume com MeCN/H_2O 50:50 (v/v).

5.2.2.7. Eletroforese capilar

5.2.2.7.1. Testes preliminares

Testes preliminares foram desenvolvidos utilizando diferentes modos de eletroforese capilar, com a finalidade de padronizar-se uma metodologia eficiente para análise das formulações de COCS.

5.2.2.7.1.1. Cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC)

Diversos eletrólitos foram testados com o objetivo de se obter a melhor resposta na padronização da metodologia. No desenvolvimento do método, o equipamento foi ajustado em 200, 205, 220 e 245 nm com o objetivo de verificar o comprimento de onda mais adequado. Os padrões foram introduzidos no capilar pelo *inlet*, através de injeção hidrodinâmica aplicando-se 0,3 psi por 3 segundos. O instrumento foi operado sob polaridade positiva

As condições empregadas para a realização dos testes foram:

Capilar: 31,2 cm (21 cm efetivo) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; **temperatura:** controle de temperatura ajustado para 25 ± 1°C.

Foram ainda testadas as seguintes microemulsões:

Microemulsão 1: A microemulsão foi preparada, pesando-se 0,05 g acetato de etila, 0,06 g de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,12 g de butanol, 9,77 g de tetraborato de sódio 10 mM pH 9,2. A mistura foi sonicada durante 30 minutos até completa dissolução (solução translúcida); a tensão foi ajustada entre 8 kV e 15 kV.

Microemulsão 2: A microemulsão foi preparada, pesando-se 0,05 g acetato de etila, 0,06 g de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,12 g de butanol, 1,00 g de metanol, 97,7 g de tetraborato de sódio 10 mM pH 9,2. A mistura foi sonicada durante 30

minutos até completa dissolução (solução translúcida), obtendo-se uma microemulsão estável; a tensão foi ajustada em 12 kV ;

Microemulsão 3: A microemulsão foi preparada pesando-se 0,661 g de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,081 g de octano, 0,661 g de butanol e 8,927 g de tetraborato de sódio 10 mM pH 9,2. A mistura foi sonicada durante 30 minutos até completa dissolução (solução translúcida), obtendo-se uma microemulsão estável; a tensão foi ajustada em 5 kV e 6 kV.

5.2.2.7.1.2. Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

Para desenvolvimento do método, o detector do equipamento foi ajustado em 200, 205, 210 e 220 nm com o objetivo de verificar o comprimento de onda mais adequado. Os padrões foram introduzidos no capilar pelo *inlet*, através de injeção hidrodinâmica aplicando-se 0,3 psi por 3 segundos. O instrumento foi operado sob polaridade positiva.

As condições empregadas para a realização dos testes foram:

Capilar: 40,2 cm (30 cm efetivo) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; **eletrólito:** diversos eletrólitos foram testados em diversas proporções de acetonitrila (MeCN), SDS e TBS, em diferentes pHs; **temperatura:** controle de temperatura ajustado para 25 ± 5ºC; **tensão:** ajustada entre 15 kV e 20 kV

Capilar: 31,2 cm (21 cm efetivo) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; **eletrólito:** diversos eletrólitos foram testados em diversas proporções de acetonitrila (MeCN), isopropanol, metanol e acetona em associação com o SDS e TBS em diferentes pHs ; **temperatura:** controle de temperatura ajustado para 25 ± 5ºC; **tensão:** ajustada entre 9 kV e 15 kV.

5.2.2.7.2. Metodologia

- **Preparação da solução do tampão de tetraborato de sódio, 100 mM:** dissolver 3,81 g de tetraborato de sódio e transferir para balão volumétrico de 100

mL, adicionar cerca de 50 mL de água ultrapura, levar ao ultrasom por 20 minutos. Esperar esfriar e completar o volume para 100 mL.

- **Preparação da solução de dodecil sulfato de sódio, 100 mM:** dissolver 2,88 g de dodecil sulfato de sódio e transferir para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 50 mL de água ultrapura, levar ao ultrasom por 20 minutos. Esperar esfriar e completar o volume para 100 mL.

- **Preparação da solução tampão, pH 9,2:** transferir para um béquer de 100 mL, 20 mL dodecil sulfato de sódio 100 mM, 30 mL do tampão tetraborato de sódio 100 mM e 20 mL de água ultrapura. Aferir o pH para 9,2. Transferir 3 mL de acetonitrila para balão de 10 mL e completar o volume com a solução preparada anteriormente.

- **Preparação da solução padrão:** foram preparadas soluções contendo as seguintes concentrações de hormônios:

- 500,0 µg mL e 10.000,0 µg mL de etinilestradiol e drospirenona, respectivamente

- 1.000,0 µg mL de loratadina utilizada como padrão interno

Foram pesados exatamente 5,0 mg de etinilestradiol, 100,0 mg de drospirenona e 10,0 mg de loratadina. Transferiu-se cada massa para balões de 10 mL e os volumes foram completados com metanol. Obtiveram-se assim, soluções nas concentrações de 500,0 µg mL, 10.000,0 µg mL e 1.000 µg mL de etinilestradiol, drospirenona e loratadina, respectivamente.

As soluções estoque de ETE e DROSP foram preparadas diariamente em metanol, e homogeneizadas em agitador de tubos (Vortex®) a 2.500 rpm durante 5 minutos para completa dissolução, e mantidas sob refrigeração.

Solução estoque de etinilestradiol (40,0 µg mL) e drospirenona (4.000 µg mL): uma alíquota das soluções estoque de etinilestradiol 80,0 µL e drospirenona

400,0 µL foram transferidas para um frasco volumétrico de 1 mL, e o volume foi completado com MeOH/H_2O 25:75 (v/v).

Solução estoque de etinilestradiol (40 µg mL) e drospirenona (6.000 µg mL): uma alíquota das soluções estoques de etinilestradiol 80 µL e drospirenona 600 µL foram transferidas para um frasco volumétrico de 1 mL, e o volume foi completado com MeOH/H_2O 25:75 (v/v).

- **Preparação das amostras comerciais:** Foram pesadas em balança analítica 21 unidades da forma farmacêutica (quantidade correspondente a 1 cartela), das amostras 1, 2 e 3. Após a determinação do peso médio, procedeu-se a trituração até completa pulverização.

Pesou-se exatamente a massa 1.338,16 e 1.347,35 mg para as amostras 1 e 3, respectivamente e 1.395,98 mg da amostra 2. Transferiu-se para balões de 5 mL, nos quais foi adicionado metanol.

As soluções foram levadas ao banho de ultra-som por 20 minutos, e em seguida centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em seringa através de membrana Milipore®.

Em seguida, uma alíquota de 400,0 µL da amostra 1 e 3 (contendo, teoricamente etinilestradiol 40,0 µg mL e drospirenona 4.000,0 µg mL) e 600 µL da amostra 2 (contendo, teoricamente etinilestradiol 40,0 µg mL e drospirenona 6.000,0 µg /mL) foram transferidas separadamente para frascos volumétricos de 1 mL, e o volume foi completado com MeOH/H_2O 25:75 (v/v).

- **Preparação de solução do placebo:** foi preparada em laboratório quantidade de placebo correspondente a 90 unidades da formulação farmacêutica. O procedimento adotado para o placebo foi idêntico ao descrito para as amostras comerciais. A solução foi levada ao banho de ultra-som por 20 minutos, e centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em seringa através de membrana Milipore®.

5.2.2.7.3. Condições analíticas padronizadas

Eletrólito: Dodecil sulfato de sódio 20 mM, tampão tetraborato de sódio 30 mM e acetonitrila 30%, pH 9,2.

Modo de injeção: Injeção hidrodinamica 0,3 psi, 5 segundos seguida de tampão 0,1 psi, por 1 segundo.

Capilar: Capilar de sílica fundida de 31,2 cm sendo 21 cm efetivos até a coluna, 75 µm de diâmetro interno, Polymicro Technologies.

Detecção: UV 200 nm

Voltagem: 12 kV operado sob polaridade positiva

Temperatura: 20°C

O capilar novo foi condicionado com solução de NaOH 0,1 mol/L durante 30 minutos, seguidos por 15 minutos com água deionizada e 20 minutos com o eletrólito de corrida. No inicio do dia, o capilar de sílica fundida foi condicionado com uma solução de NaOH 0,1 mol/L por 20 minutos, seguidos de água deionizada por 15 minutos e então pelo eletrólito por 15 minutos. Entre as corridas, o eletrólito foi lavado por 3 minutos com solução de NaOH 0,1 mol/L. Ao fim do dia, foram lavados com solução de NaOH 0,1 mol/L por 15 minutos, seguidos de água deionizada por 15 minutos e finalmente ar durante 1 minuto.

5.2.2.7.4. Validação do método analítico para a determinação simultânea de etinilestradiol e drospirenona por eletroforese capilar

5.2.2.7.4.1. Curva analitica

Aliquotas de 25.0, 75.0, 125.0, 175.0, 225.0 e 275.0 µL da solução estoque de etinilestradiol (40,0 µg mL) e drospirenona (6.000,0 µg mL) foram transferidas separadamente para frascos volumétricos de 1 mL, diluídas com o padrão interno 60,0 µL e completados os volumes com solução tampão e finalmente transferidos

para um “microvial” de 200 µL. Obtiveram-se os 6 pontos da curva, nas concentrações de 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0 µg mL de etinilestradiol e 150,0; 450,0; 750,0; 1.050,0; 1.350,0; 1.650,0 µg mL de drospirenona. Cada solução foi injetada em triplicata. As razões das áreas dos picos (etinilestradiol/loratadina e drospirenona/loratadina) foram dispostas em gráficos versus a concentração do etinilestradiol e drospirenona. Assim, com os resultados obtidos, as curvas de calibração foram construídas, calculados os desvios padrão e os coeficientes de variação.

5.2.2.7.4.2. Determinação da linearidade de resposta do detector

De acordo com a Resolução nº 899 (ANVISA, 2003), linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para o estudo da linearidade faz-se necessário a confecção de uma curva de resposta, sendo o eixo x o da concentração e o eixo y o da resposta obtida.

$$y = ax + b$$

Onde: a = coeficiente angular (expressa a inclinação da reta)

b = coeficiente linear (expressa a intersecção da curva aos eixos)

Foram construídas curvas analíticas para cada hormônio, para definir o intervalo de concentração no qual a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional à concentração das substâncias analisadas.

5.2.2.7.4.3. Determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Os LD e LD foram determinados através do desvio-padrão (DP) e da inclinação (IC) das curvas de calibração correspondentes a cada um dos analitos separados.

Foram efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para o LD e LQ foi realizado pelas seguintes equações:

LD = (DP x 3,3)/IC

LQ = (DP x 10)/IC

5.2.2.7.4.4. Seletividade

Com objetivo de averiguar se haviam possíveis interferências do excipiente no método proposto, foram preparadas soluções do padrão e amostra nas concentrações nominais etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg mL) e placebo. Os placebos dos comprimidos foram submetidos ás mesmas condições analíticas empregadas para as amostras, verificando-se assim a seletividade do método (RIBANI, 2004).

5.2.2.7.5. Determinação da precisão

5.2.2.7.5.1. Repetibilidade (intra-dia)

A repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo obtidos pelo mesmo analista e utilizando a mesma instrumentação (ANVISA, 2003). Para este estudo, seis determinações em soluções de padrão e amostra contendo 100% da concentração nominal (5,0 µg mL de etinilestradiol e 750,0 µg mL de drospirenona). As leituras foram realizadas em triplicata, sendo um novo tampão preparado a cada três corridas. As razões das áreas dos picos (etinilestradiol/loratadina e drospirenona/loratadina) foram calculadas, estabelecendo-se assim, a precisão intra-dia.

Preparo da solução padrão: Transferir para frasco volumétrico de 1 mL, 125,0 µL da solução estoque de etinilestradiol (40,0 µg mL) e drospirenona (6.000,0 µg mL), 60,0 µg /mL de padrão interno e completar o volume com solução tampão. Transferir para um “microvial” de 200 µL.

Preparo da Amostra: Transferir para um frascos volumétricos de 1 mL, 125,0 µL da amostra 2, 60,0 µg mL de padrão interno e completar o volume com solução tampão. Transferir para um “microvial” de 200 µL.

5.2.2.7.5.2. Precisão Intermediária (precisão inter-dias)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtido em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003). Para este estudo a precisão intermediária foi avaliada através da injeção das amostras 1, 2 e 3 preparadas em concentrações baixa, média e alta, mais a concentração fixa do padrão interno, em triplicata, durante 3 dias consecutivos.

Preparo da solução padrão: Uma alíquota de 125,0 µL de soluções estoque de etinilestradiol 40,0 µg mL, drospirenona 4.000,0 µg mL e etinilestradiol 40,0 µg /mL, drospirenona 6.000,0 µg mL, foram transferidas separadamente para frascos volumétricos de 1 mL e então diluídas com 60,0 µL de padrão interno. Completou-se o volume com solução tampão e transferiu-se para “microvials” de 200 µL.

Preparo da amostra: Alíquotas de 75, 125 e 175 µL das amostras 1, 2 e 3 foram transferidas separadamente para frascos volumétricos de 1 mL, e então diluídas com 60 µL de padrão interno e completados os volumes com solução tampão. Transferiu-se para um “microvial” de 200 µL.

5.2.2.7.5.3. Execução do teste de recuperação - Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão de um método deve ser realizada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações completando o intervalo linear do procedimento ou seja em concentrações, baixa, média e alta com 3 replicatas de cada (ANVISA, 2003).

Para determinar a exatidão do método, as amostras simuladas foram analisadas a partir de comprimidos placebo preparados em laboratórios contaminados com quantidades de hormônios equivalentes a 60, 100 e 140% da concentração nominal, mais a concentração fixa do padrão interno.

Preparo da amostra simulada: Alíquotas de solução padrão de etinilestradiol (0,4 mL) e drospirenona (3,0 mL), foram adicionadas à mistura de ingredientes inativos em balões de 5 mL e o volume foi completado com metanol. A solução foi levada ao banho de ultra-som por 20 minutos, e em seguida centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em seringa através de membrana Milipore®. Alíquotas de 75,0, 125,0 e 175,0 µL das amostras simuladas foram transferidas separadamente para frascos volumétricos de 1 mL, e então diluídas com 60,0 µL de padrão interno e o volume completado com solução tampão. Transferiu-se para “microvials” de 200 µL.

5.2.2.7.5.4. Determinação da robustez do método

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ANVISA, 2003; ICH, 2010). A robustez foi avaliada de acordo com a influência de três parâmetros cromatográficos: SDS (20 ± 2.0 mL min), TBS (30 ± 2.0 mL min), e a voltagem (12 ± 1kV). Os três parâmetros foram examinados em triplicata, sendo dois extremos fixados alto (+) e baixo (-) e a condição experimental estabelecida foi incluída como fator médio.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Determinação de pureza do etinilestradiol e drospirenona

6.1.1. Intervalo de fusão

A determinação da faixa de fusão do etinilestradiol apresentou resultados compreendidos em um intervalo entre 180-185°C e para drospirenona entre 200-203°C. As temperaturas de fusão estão dentro dos limites estipulados pela literatura (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011).

6.1.2. Análise térmica

6.1.2.1. Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

- **Etinilestradiol:** As curvas TG/DTG obtidas sob atmosfera de ar e de nitrogênio (Figura 5) evidenciaram uma perda de massa entre 92 e 130°C (Δm = 2,13%), que foi atribuída à eliminação de 2/5 de moléculas de água por fórmula grama da espécie. O fármaco é estável termicamente entre 130 e 205°C e se decompõe em duas etapas distintas com T_{pico} = 347 e 596°C (Δm_1= 65,67% e Δm_2= 32,20%), sob atmosfera de ar e T_{pico} = 349 e 467°C (Δm_1= 59,39% e Δm_2= 36,20%), sob atmosfera de N_2. Acima de 700°C a perda de massa é total observada nas curvas TG/DTG obtidas sob atmosfera de ar. As curvas DSC mostraram um evento endotérmico coincidente à etapa de desidratação observada nas curvas TG/DTG, reforçando que se trata de uma espécie hidratada. Também foram observados outros dois eventos endotérmicos (T_{pico}= 140 e 184°C) em um intervalo de temperatura no qual não foi observada perda de massa nas curvas TG/DTG. O primeiro evento está, provavelmente, associado à modificação estrutural ou fusão de espécie polimorfa que está em pequena quantidade (SÁNCHEZ, *et al*., 2007) enquanto o segundo evento corresponde à fusão do fármaco, conforme observação

visual em aparelho convencional de ponto fusão e indicação na Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011).

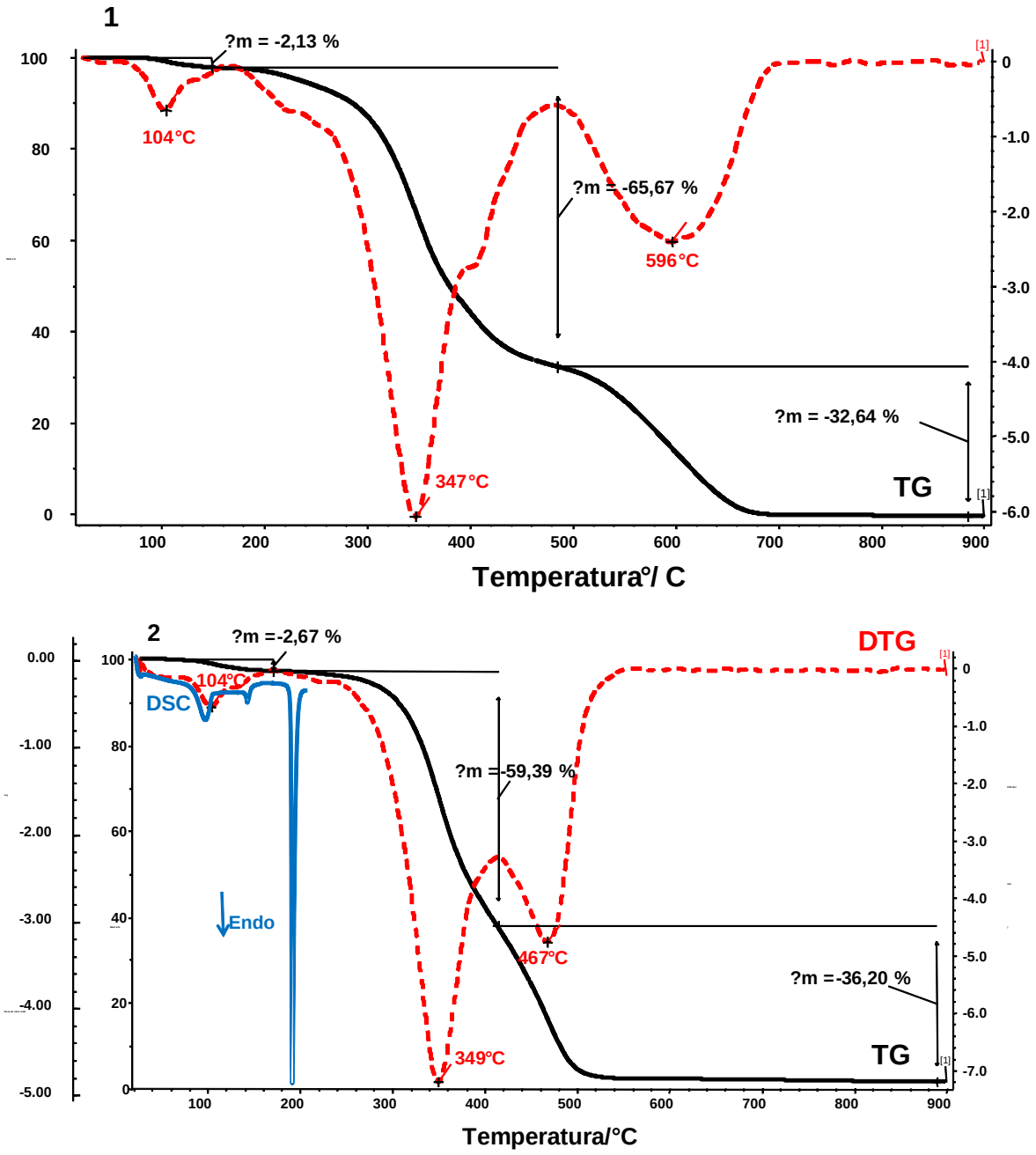

Figura 5. Curvas TG/DTG e DSC do etinilestradiol **:** (1) Curvas TG/DTG obtidas entre 25 e 900°C (β = 10° C min^{-1}), em atmosfera de ar sintético (50 mL min^{-1}). (2) Curvas TG/DTG entre 25 e 900°C (β = 10° C min^{-1}) e DSC entre 25 e 200°C (β = 10° C min^{-1}) obtidas em atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}).

Análise térmica associada a outras técnicas como a espectroscopia de absorção do infravermelho e a análise elementar, permite determinar a estequiometria de um composto e sua estrutura molecular, com objetivo de caracterizar e comprovar a pureza do padrão de referência do etinilestradiol. Foram

utilizados como testes complementares a espectrometria no infravermelho e a análise elementar.

- **Drospirenona:** A Figura 6 ilustra as curvas TG/DTG e DSC que mostra o comportamento térmico da drospirenona. A curva DSC evidenciou um evento endotérmico entre 197 e 210°C (T_{pico}= 202°C) que é referente à fusão do material. As curvas TG/DTG mostraram três eventos de perda de massa relacionados à decomposição térmica do fármaco, sendo este estável termicamente até 296°C. Na temperatura acima de 700°C a decomposição térmica do material é completa.

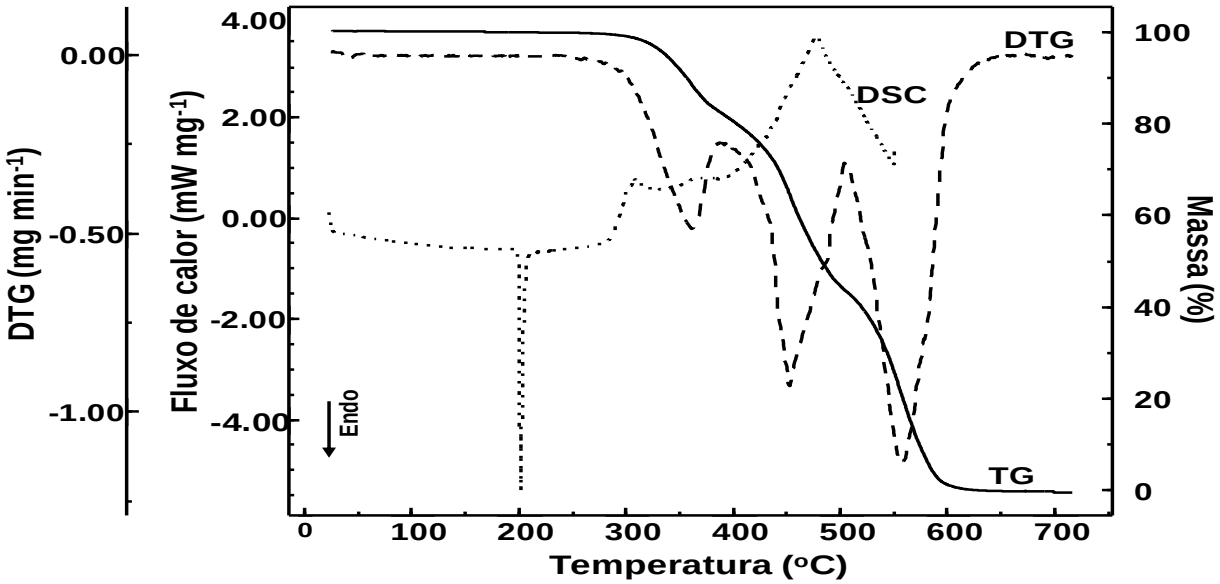

Figura 6. Curvas TG/DTG e DSC da drospirenona: Curvas TG/DTG entre 25 e 700°C (β = 10° C min^{-1}) e DSC entre 25 e 550°C (β = 10° C min^{-1}) obtidas em atmosfera de ar sintético (50 mL min^{-1}).

- **Associação de hormônios:** A Figura 7 ilustra as curvas TG/DTG e DSC que mostra o comportamento térmico de misturas dos fármacos que correspondem a associação de hormônios 1:1 e 1:150 etinilestradiol/drospirenona, respectivamente. A decomposição térmica das misturas ocorreu em três etapas. As curvas TG/DTG da mistura 1:150 é similar àquela da amostra de drospirenona pura, enquanto que o perfil termogravimétrico da mistura 1:1 diverge do perfil termogravimétrico de seus componentes isolados. Observa-se um aumento da estabilidade térmica do material quando se compara o comportamento térmico da mistura 1:1 com aquele do etinilestradiol isolado. A curva DSC da mistura 1:150 evidenciou um evento

endotérmico (T_{pico}= 202ºC), coincidente com a endoterma de fusão da drospirenona isolada, enquanto que a curva DSC da associação dos hormônios 1:1 (etinilestradiol/drospirenona) mostrou um evento endotérmico (T_{pico} = 161ºC). Tal evento ocorreu em temperatura inferior à temperatura de fusão dos fármacos isolados, caracterizando o comportamento de uma mistura eutética. A influência do etinilestradiol é pequena na mistura de hormônios e se manifesta no desvio do ponto de fusão da mistura 1:150.

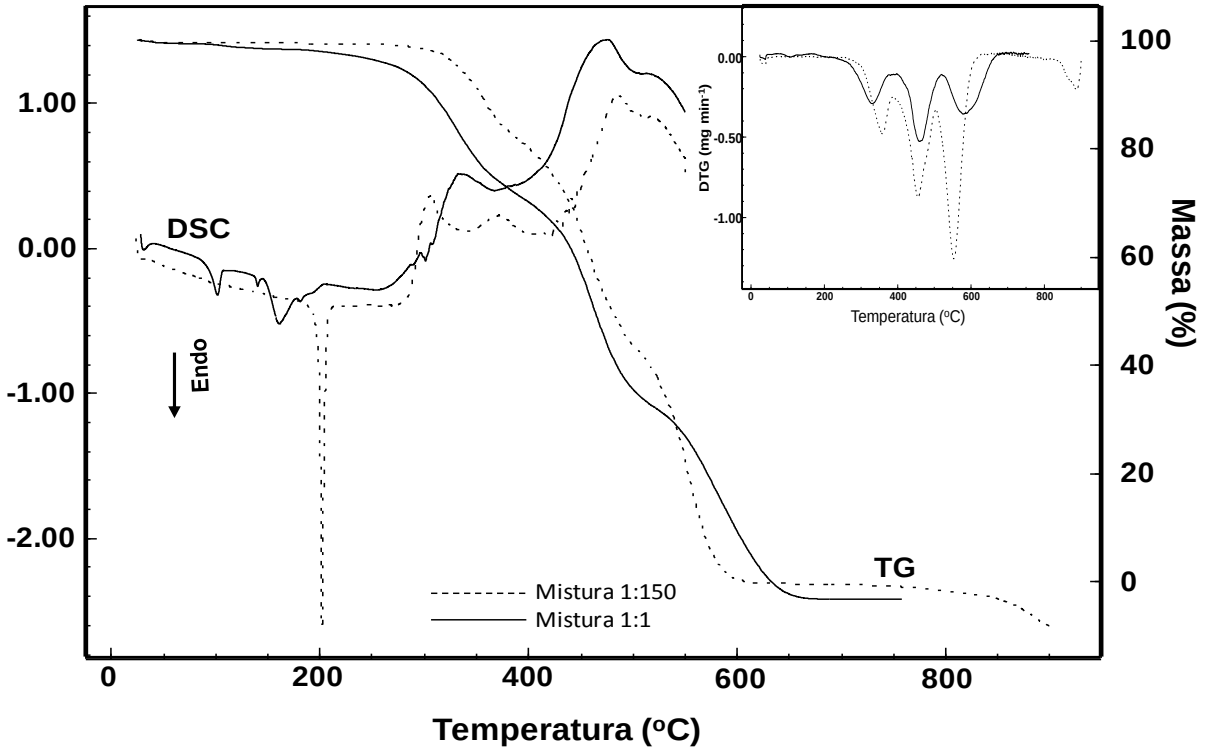

Figura 7. Curvas TG/DTG e DSC da mistura 1:1 e 1:150 etinilestradiol/drospirenona (m/m).: Curvas TG/DTG entre 25 e 700°C (β = 10° C min^{-1}) e DSC entre 25 e 550°C (β = 10° C min^{-1}) obtidas em atmosfera de ar sintético (50 mL min^{-1}).

6.1.3. Espectrofotometria no ultravioleta

- **Determinação dos espectros de absorção no ultravioleta:** Os espectros de absorção correspondentes aos hormônios em estudo, foram obtidos na varredura de 190 a 600 nm (Figura 8 e 9). Os comprimentos de onda correspondentes ao máximo de absorbância de cada analito foram selecionados para posterior determinação analítica dos hormônios pelo método cromatográfico com detecção no UV. Os comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{máx}$) foram 210 nm para o etinilestradiol e 265 nm para a drospirenona.

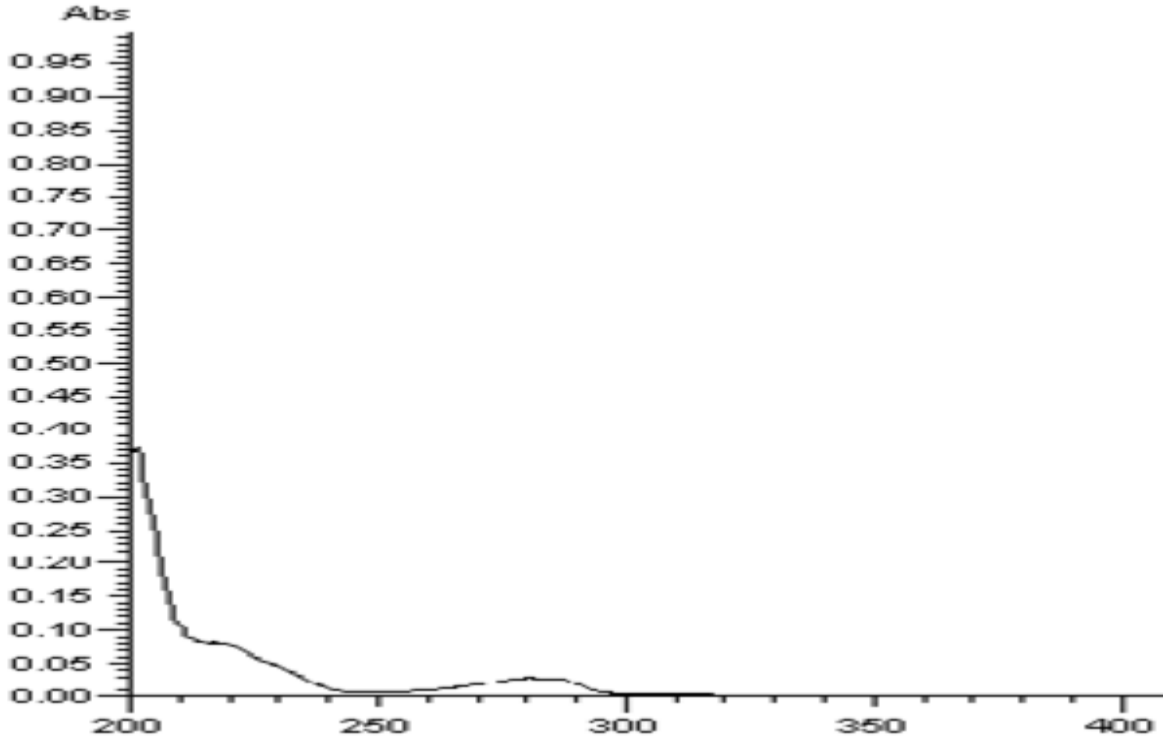

Figura 8. Espectro de absorção no ultravioleta da soução de etinilestradiol 5,0 µg mL em metanol.

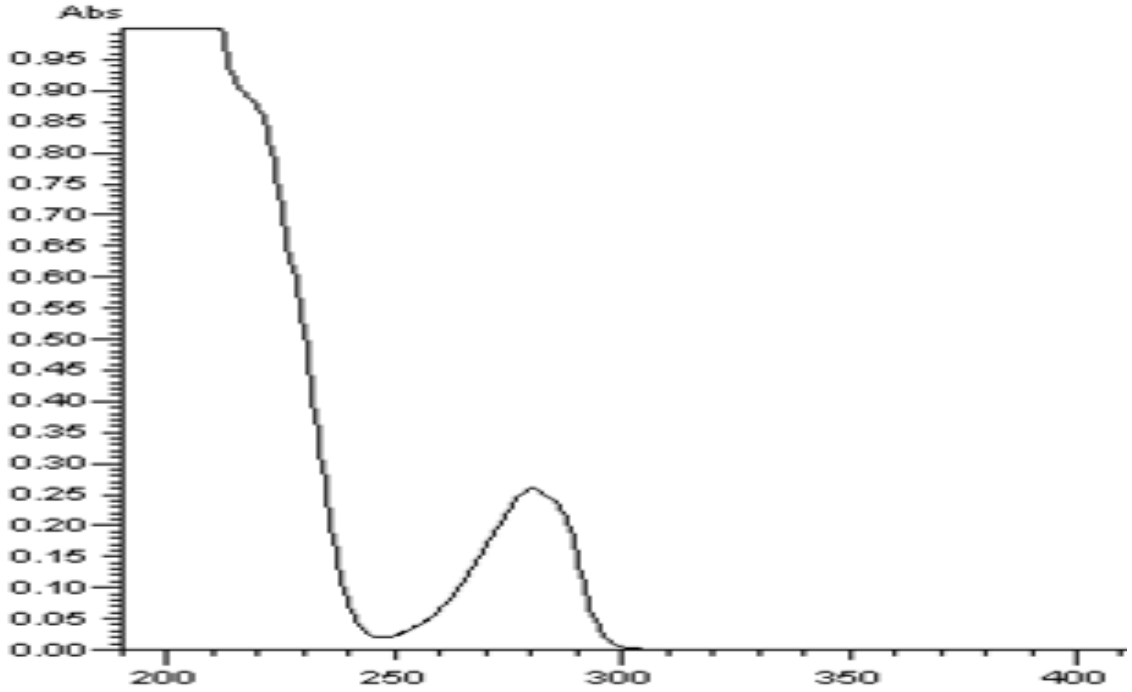

Figura 9. Espectro de absorção no ultravioleta da solução de drospirenona 500,0 µg mL em metanol.

- **Detecção no ultravioleta:** A medida do etinilestradiol e drospirenona foi realizada em 200 nm; a faixa de comprimento de onda foi a mais adequada para a detecção dos analitos em associação, quando se utiliza CLAE-UV. Para tanto, tomou-se também como base trabalhos publicados que empregam CLAE para detecção de estrógeno e progestina em formulações farmacêuticas (Tabelas 4 e 5).

- **Detecção por fluorescência:** No detector por fluorescência, os comprimentos de onda selecionados para excitação (λ_{ex}) e emissão (λ_{em}) do etinilestradiol, foram de 280 nm e 310 nm, respectivamente. O hormônio drospirenona não emite radiação fluorescente considerável para quantificação ao nível de traços, portanto foi analisado utilizando CLAE-UV.

6.1.3. Análise elementar

A Tabela 12 lista os resultados da análise elementar de uma amostra do padrão de etinilestradiol, comparada com os valores teóricos calculados.

Tabela 12. Resultados de análise elementar para a amostra de etinilestradiol

Amostra de etinilestradiol	%C	%H
%Teórica	80,90	8,10
%Prática	79,13	8,45

Os resultados de AE indicaram 79,13% de C e 8,45% de H. Esses resultados combinados aos TG/DTG são concordantes com a seguinte fórmula molecular para o fármaco: $C_{20}H_{24}O_2$ 2/5 H_2O.

6.1.4. Espectrometria no infravermelho

Para a caracterização do etinilestradiol, obteve-se o espectro de infravermelho apresentado na Figura 10, onde podem ser observadas as bandas características do etinilestradiol.

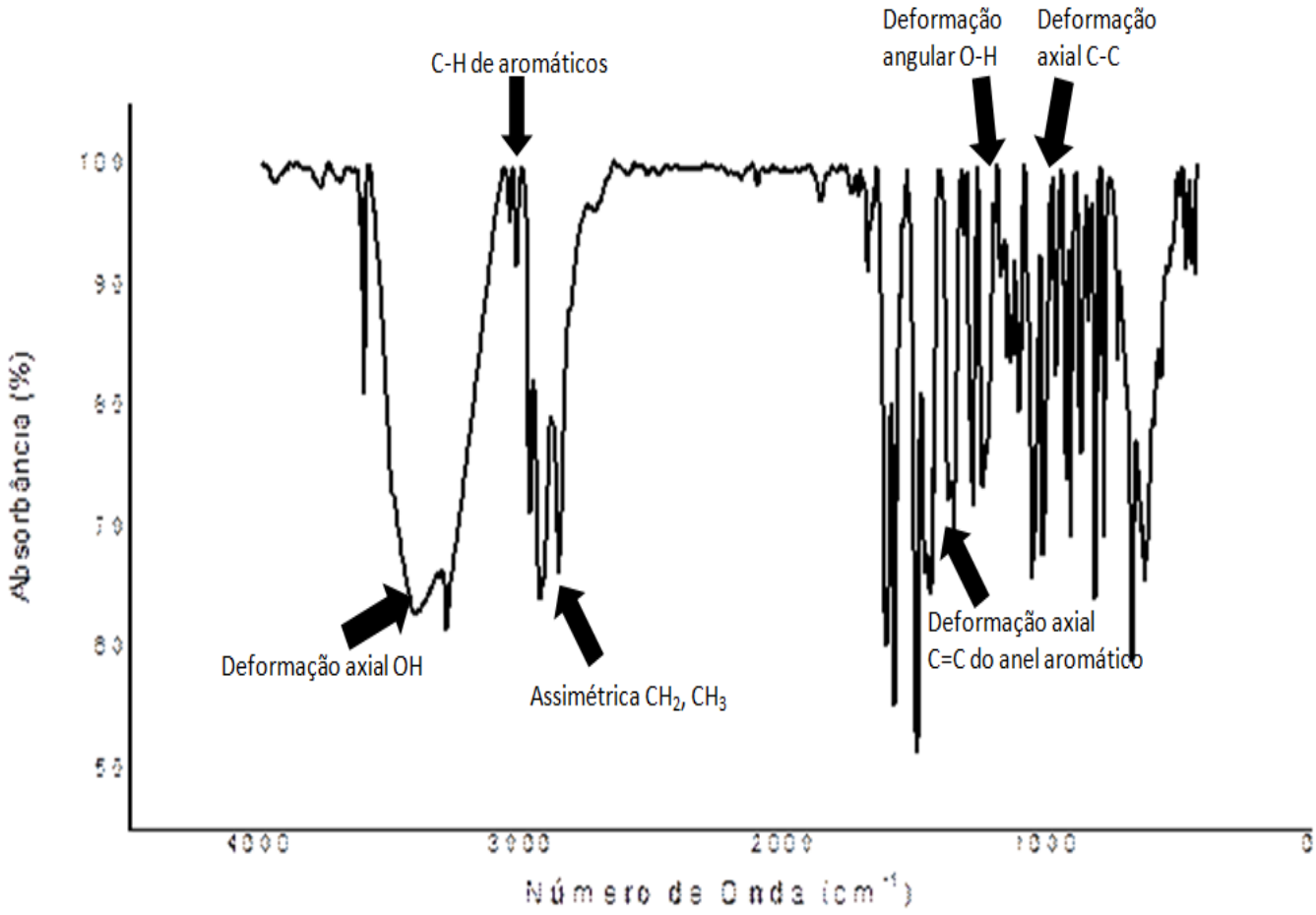

Figura 10. Espectro de infravermelho obtido para o etinilestradiol.

A Tabela 13 apresenta as principais bandas características atribuídas ao hormônio etinilestradiol.

Tabela 13. Atribuições das principais bandas características do hormônio etinilestradiol

Número de onda (cm^{-1})	Atribuições
3.291 - 3.409	Deformação axial O-H, larga em ligação de hidrogênio intermolecular
3.026	C-H de aromáticos
2.107	C ≡ C
2.865, 2.924, 2.936	Assimétrica CH_2, CH_3
1.468, 1.498, 1.585	Deformação axial C=C do anel aromático
1.231, 1.248	Deformação angular O-H
1.019, 1.059	Deformação axial C-C

Com base na análise das principais bandas do espectro (EDUARDO, 2009) e dos resultados obtidos empregando-se as demais técnicas analíticas, pode-se concluir que o etinilestradiol empregado como substância química de referência é de boa qualidade.

6.2. Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

6.2.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos

Quando um novo método cromatográfico é desenvolvido, muito tempo é despendido na escolha e avaliação do desempenho e reprodutibilidade do método (RIBANI, 2004). A coluna tem papel determinante no processo de retenção dos analitos, além da influencia das propriedades físico-químicas sobre a mesma exercidas pelos analitos presentes na mistura.

A padronização das condições cromatográficas para as medidas das amostras foi avaliada após estudo sistemático. Numerosos sistemas eluentes foram utilizados, com diferentes proporções de metanol, acetonitrila e água tanto no modo

isocrático (Tabela 14) como em gradiente. Optou-se por estes solventes por serem compatíveis com a coluna utilizada, pela facilidade de obtenção e pela baixa toxicidade quando comparados a outros solventes empregados em alguns dos métodos cromatográficos anteriormente mencionados (Tabelas 4 e 5).

Tabela 14. Condições dos sistemas binários testados para a padronização do método cromatográfico

MeOH (%)	MeCN (%)	H_2O (%)	Vazão (mL min)	Tempo de retenção (min) Etinilestradiol	Drospirenona
50	--	50	1,0	29,4	33,30
50	_	50	1,2	25,8	29,26
50	_	50	1,4	22,28	25,26
52	_	48	1,4	17,00	18,88
53	_	47	1,4	14,88	16,42
55	_	45	1,0	16,17	17,52
60	_	40	1,0	co-eluição	
70	_	30	1,0	co-eluição	
_	70	30	1,0	1,89	3,29
_	65	35	1,0	1,88	2,43
_	60	40	1,0	2,40	3,26
_	60	40	0,8	3,11	4,11
_	60	40	1,2	2,08	2,76
_	60	40	1,4	1,78	2,36
_	50	50	1,0	3,89	5,60
_	45	55	1,0	5,56	8,28

O sistema eluente com o qual foram obtidos os melhores resultados foi a mistura entre MeCN/H_2O (v/v). Assim foram testadas diversas proporções destes dois solventes, com o objetivo de se padronizar a melhor condição cromatográfica. O sistema eluente composto de MeCN/H_20 (50:50) (v/v) deu origem ao menor tempo de retenção e melhor resolução dos picos sendo o tempo total da corrida de 7 minutos. Desta forma, este sistema eluente foi escolhido como a condição a ser padronizada.

- **Condições padronizadas**

Foram as condições que se mostraram mais adequadas para determinação e quantificação dos fármacos em associação utilizando CLAE-UV e CLAE–Fluorescência em uma mesma análise. Nas condições padronizadas observou-se uma boa quantificação, principalmente do etinilestradiol, presente em pequenas quantidades, e separação dos analitos. Não houve co-eluição, o que prejudicaria a quantificação dos dois analitos. Assim, o sistema isocrático que se mostrou mais eficiente para a análise foi a utilização de coluna do tipo LiChroCART® 100RP- C_{18}, 5 µm, (125 x 4 mm), a fase movel da MeCN/H_2O na proporção 50:50 (v/v). A vazão de 1,0 mL min demonstrou maior eficiência para análise. Todas as análises foram realizadas em temperatura controlada de 25 ± 1ºC. Foram injetados 20 µL de cada solução de amostra e padrão e a detecção foi efetuada por CLAE-UV: ($\lambda_{máx}$) 200 nm; e CLAE-Fluorescência: λ_{ex}= 280 nm e λ_{em}= 310 nm; resposta: 1; ganho: 1x; sensibilidade: média.

6.2.1.1. Solução padrão

A solução dos padrões foi preparada com objetivo de realizar-se a quantificação simultânea de ambos os hormônios da formulação.

O cromatograma ilustrado na Figura 11 corresponde à medida da solução padrão de etinilestradiol e drospirenona nas concentrações de 5,0 µg mL e 750,0 µg mL, respectivamente. A que atribui a diferença de resposta (em termo de área de pico) para a mesma concentração de etinilestradiol utilizando diferentes detectores. O pico do etinilestradiol foi detectado em 3,90 minutos e o da drospirenona em 5,58 minutos.

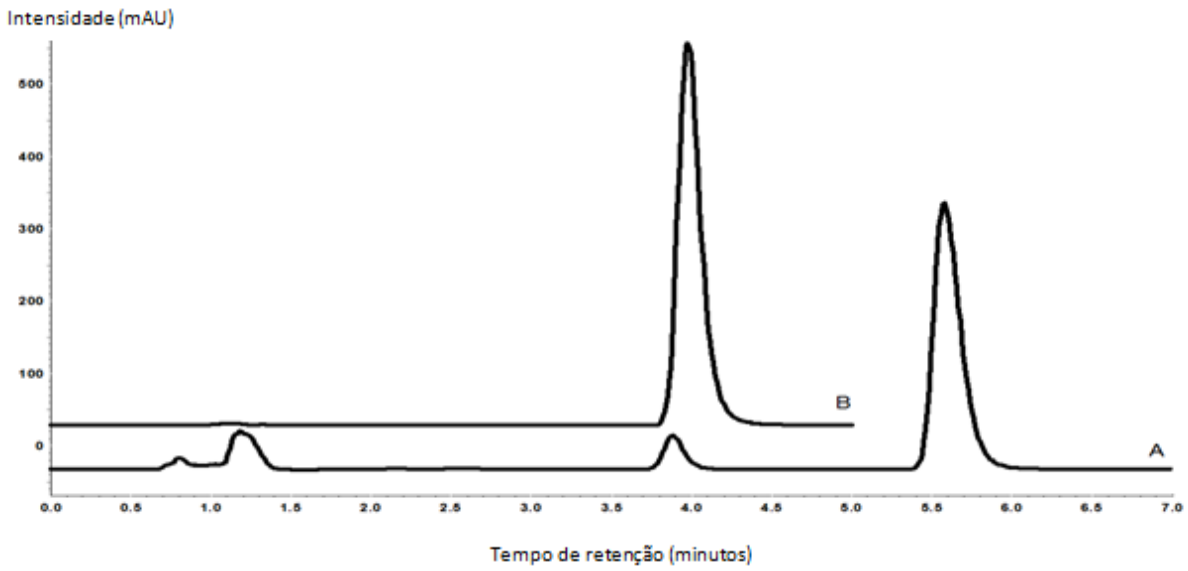

Figura 11. (A) Cromatograma resultante da medida da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg mL), detecção em 200 nm (CLAE-UV);(B) Cromatograma resultante da medida da solução padrão de etinilestradiol 5,0 µg /mL , λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm, resposta: 1, ganho: 1x, sensibilidade: média (CLAE-Fluorescência). Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min e temperatura controlada de 25 ± 1ºC. Tempo de retenção: 1) Etinilestradiol (Tr =3,90 min) e 2) Drospirenona (Tr = 5,58 min).

A utilização do método de detecção por fluorimetria permitiu melhor quantificação do etinilestradiol. Entretanto, a progestina drospirenona não apresentou radiação fluorescente notável para sua detecção à nível de traços. Por esta razão, utilizou-se a detecção no UV.

6.2.1.2. Análise do placebo

O placebo foi preparado com o objetivo de se avaliar possíveis interferentes nos métodos, utilizando as condições padronizadas. O cromatograma CLAE-UV ilustrado na Figura 12 corresponde à análise do placebo preparado em laboratório de acordo com a composição apresentada anteriormente (item 5.2.1.5.).

6.2.1.3. Seletividade

Na Figura 12 podem ser observados os cromatogramas da amostra, solução padrão e do placebo, onde a presença dos excipientes contidos na formulação testada não interferem com os picos de interesse.

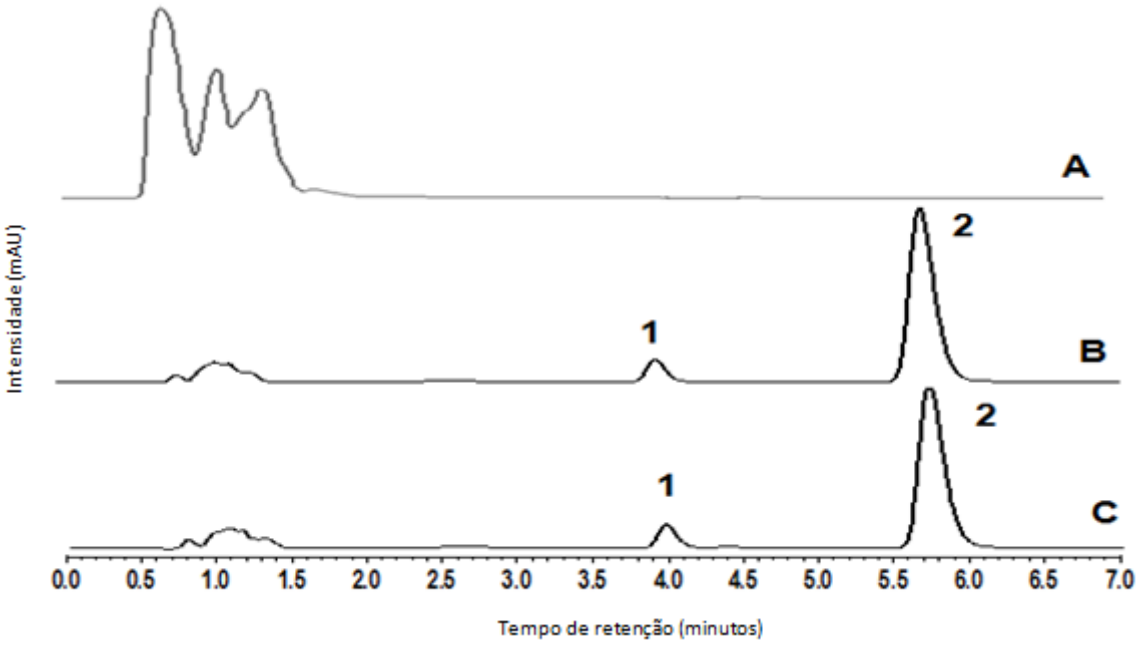

Figura 12. (A) Placebo; (B) Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg /mL); (C) amostra comercial 2 contendo etinilestradiol (5,0 µg /mL) e drospirenona (750,0 µg /mL). Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel MeCN/H_2O 50:50 (v/v), vazão 1,0 mL min volume de injeção 20 µL, detecção UV em 200 nm e temperatura de 25 ±1ºC. Tempo de retenção: 1) Etinilestradiol (Tr =3,90 min) e 2) Drospirenona (Tr = 5,58 min).

6.2.2. Linearidade

Para a preparação da solução dos padrões e obtenção da curva de calibração, tomou-se por base a quantidade de etinilestradiol e de drospirenona declarados nas amostras comerciais, de modo que as concentrações nos pontos intermediários das curvas de calibração correspondessem à diluição de uma unidade (comprimido revestido). Assim o ponto médio da curva de etinilestradiol e drospirenona corresponde a 5,0 µg mL e 750,0 µg mL, respectivamente, equivalentes a 20,0 µg de etinilestradiol e 3000,0 µg de drospirenona por unidade declarada.

Tabela 15. Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração de etinilestradiol (CLAE-Fluorescência) e drospirenona (CLAE-UV). Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel MeCN/H_2O 50:50 (v/v), vazão 1,0 mL min volume de injeção 20 µL, temperatura de 25 ±1ºC; Detecção CLAE-UV: ($\lambda_{máx}$) 200 nm; Detecção CLAE-Fluorescência: λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm; resposta: 1; ganho: 1x; sensibilidade: média.

Concentração esperada de ETE (µg mL) Detecção Fluorescência	Área média Encontrada (três leituras)	Desvio padrão das concentrações encontradas de ETE	Coeficiente de variação das concentrações de ETE (%)
0,1	250.086	2.391	0,956
0,5	568.517	4.629	0,814
2,5	2.767.330	2.081	0,075
5,0	5.518.148	8.948	0,162
7,5	9.038.146	17.938	0,198
10,0	11.656.734	7.995	0,068
Concentração esperada de DROSP (µg /mL) Detecção UV	**Área média encontrada (três leituras)**	**Desvio padrão das concentrações encontradas de DROSP**	**Coeficiente de variação das concentrações de DROSP (%)**
15	77.030	39	0,051
75	385.214	314	0,081
375	1.714.909	15.558	0,907
750	3.564.847	8.227	0,230
1125	5.440.002	27.620	0,507
1500	7.481.189	14.159	0,189

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (r^2) obtido pelas curvas padrão, conforme pode ser visto na Tabela 16.

Tabela 16. Resultados obtidos nas determinações das curvas de calibração para a drospirenona e etinilestradiol, pelo método CLAE-UV e CLAE-fluorescência.

	Faixa de concentração (µg /mL)	Equação da reta	Desvio Padrão	Coeficiente de correlação
Etinilestradiol	0,1 - 10	$Y = 1,17185+10^{-6}x - 33.413$	7.197	0,99898
Drospirenona	15 - 1.500	Y = 7.422,8x - 56.550	10.986	0,99900

A linearidade foi determinada por meio da curva de calibração na qual se verificou a proporcionalidade entre a concentração do padrão e as áreas dos picos. De acordo com ANVISA (2003), julga-se satisfatório a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade (0,99<R<1,00 correlação perfeita), para validação de métodos analíticos. Estes coeficientes de correlação demonstram que a resposta do detector CLAE-UV para a drospirenona e CLAE-Fluorescência para o etinilestradiol, foram lineares nos intervalos de concentração estudados.

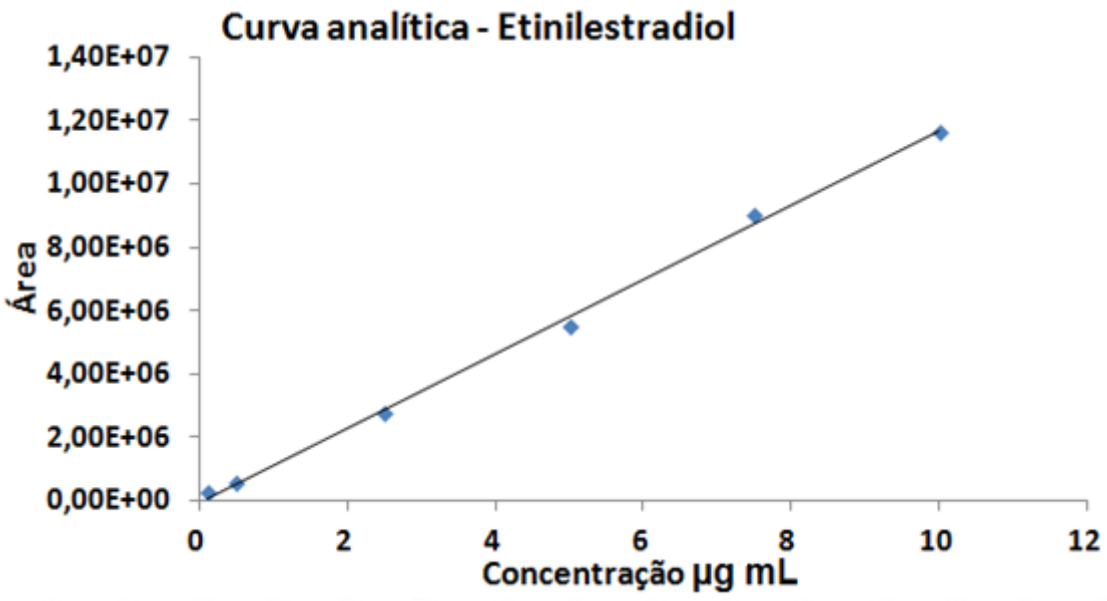

Figura 13. Linearidade resultante da análise da solução padrão de etinilestradiol (CLAE-Fluorescência); Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v) vazão 1,0 mL min; volume de injeção 20 µL, λex=280nm e λ_{em}=310nm, resposta: 1, ganho: 1x, sensibilidade: média. temperatura controlada de 25 ±1ºC.

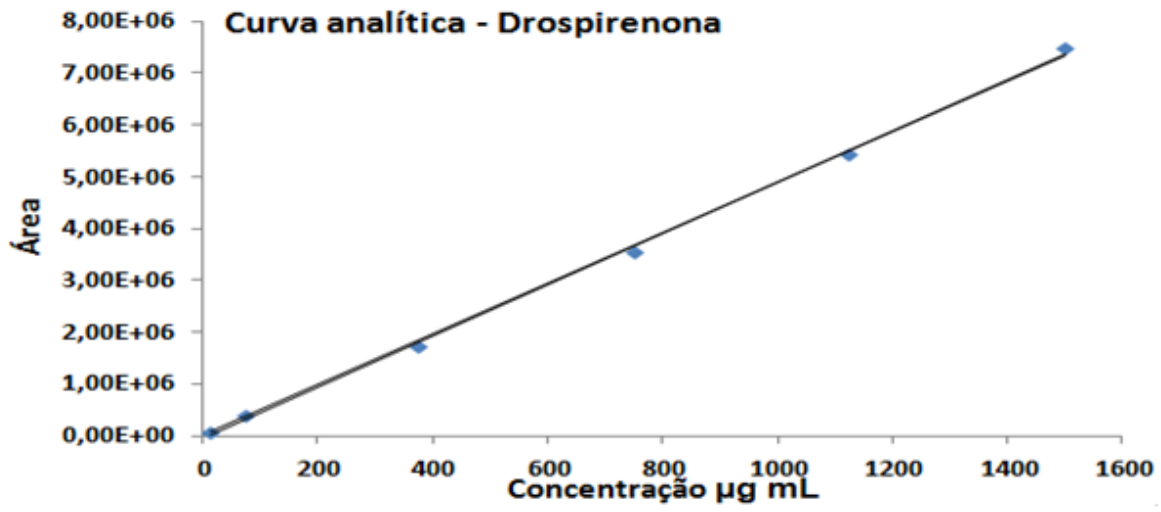

Figura 14. Linearidade resultante da análise da solução padrão de drospirenona (CLAE-UV). Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel MeCN/H_2O 50:50 (v/v) vazão 1,0 mL min; volume de injeção 20 µL; detecção UV em 200 nm e temperatura de 25 ± 1ºC.

6.2.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação do método CLAE-UV e fluorescência foram estabelecidos experimentalmente através da análise dos hormônios estudados, em concentrações decrescentes e comparados com os parâmetros calculados de acordo com a curva analítica, que são estatisticamente confiáveis. A Tabela 17 apresenta os respectivos valores estimados de limites de detecção e quantificação para cada um dos analitos.

Tabela 17. Resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e de quantificação para a drospirenona e o etinilestardiol, pelos métodos CLAE-UV e CLAE-Fluorescência.

CLAE-UV	LQ (µg mL)	LD (µg mL)
Etinilestradiol	0,415	0,137
Drospirenona	14,80	4,88
CLAE-Fluorescência	**LQ (µg mL)**	**LD (µg mL)**
Etinilestradiol	0,06142	0,02026

O etinilestradiol apresenta em sua estrutura um anel aromático, o que promove uma emissão de fluorescência molecular mais intensa e maior

sensibilidade mesmo em faixas de concentrações mais baixas do analito, quando comparada com a absorção em detector UV. A baixa sensibilidade da detecção UV para o etinilestradiol, se deve às baixas intensidades de absortividade molar (Ɛ) do anel benzênico na região ultravioleta. (ARAUJO, 2006). De acordo com os LQ e LD obtidos, verifica-se, portanto que o LD da CLAE-Fluorescência para o etinilestradiol é cerca de 7 vezes menor do que o LD da CLAE-UV.

A drospirenona apresenta uma maior sensibilidade ao detector UV, isto é, a conjugação da dupla ligação com o grupo carbonil proporciona uma absortividade molar (Ɛ= 8.000 – 20.000 nm) correspondente à transição mais intensa π-----π* do grupo carbonil e à transição n---- π*, bem menos intensa (Ɛ = 50 – 100 nm) (ARAUJO, 2006).

Considerando o coeficiente de variação menor do que 2%, verificou-se que as menores concentrações de etinilestradiol e drospirenona capazes de se identificar e de se quantificar com precisão, foram de 0,05 µg mL e 1,0 µg mL, respectivamente (Figura. 15 e 16).

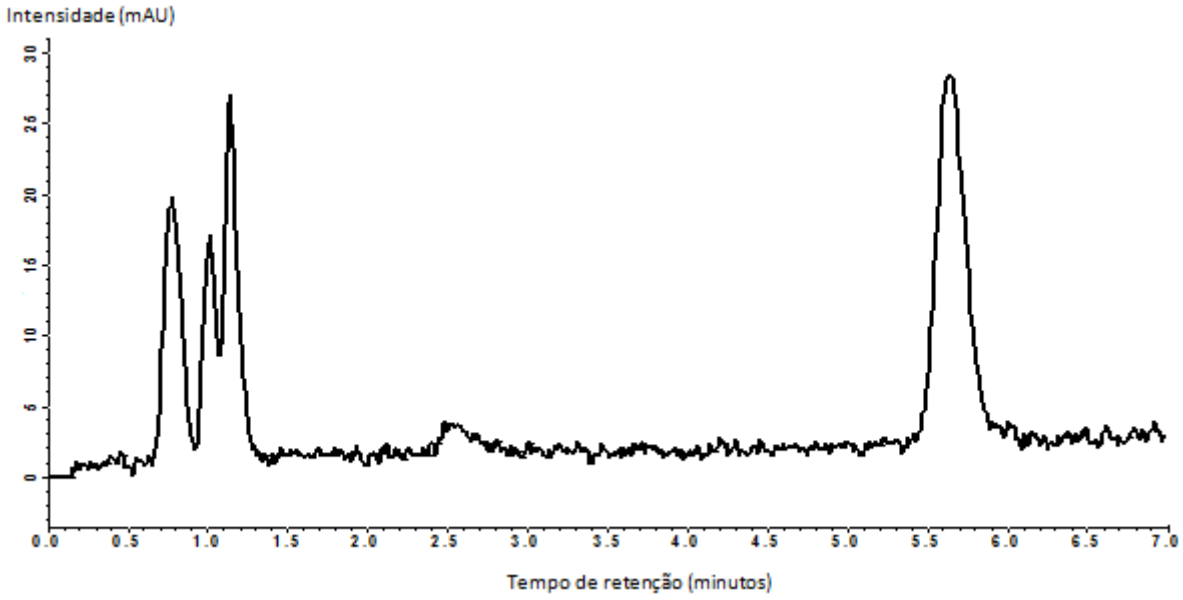

Figura 15. Cromatograma resultante da análise da solução padrão de drospirenona 1,0 µg mL (CLAE-UV); Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min detecção UV em 200 nm e temperatura controlada de 25±1°C.

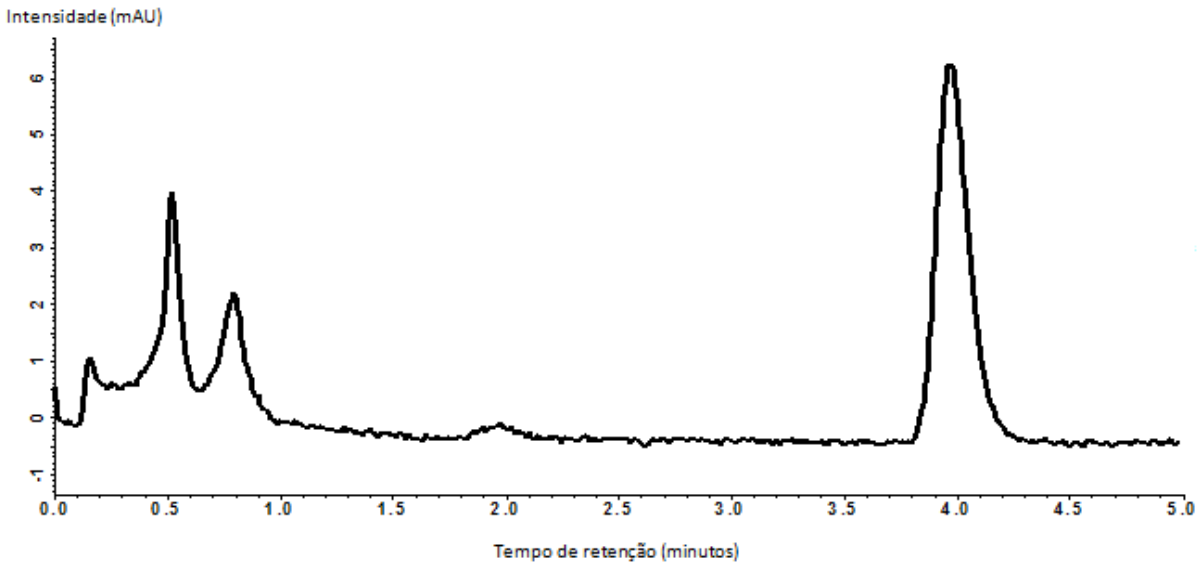

Figura 16. Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol 0,05 µg mL (CLAE-Fluorescência**)**; Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); vazão 1mL min e volume de injeção 20 µL, λ_{ex} = 280nm e λ_{em} = 310nm, resposta: 1, ganho: 1x, sensibilidade: média e temperatura controlada de 25 ± 1ºC

6.2.4. Teste de adequabilidade do sistema

Os testes de adequabilidade do sistema podem ser observados na Tabela 18

Tabela 18. Parâmetros cromatográficos obtidos empregando solução padrão de etinilestradiol e drospirenona 5,0 µg mL e 750,0 µg mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18,(125 x 4 mm) 5 µm; vazão 1,0 mL min; volume de injeção 20 µL, temperatura controlada de 25 ± 1ºC pelos métodos CLAE-UV e CLAE-Fluorescência.

Parâmetros[a]	**Etinilestradiol**	**Drospirenona**
Tempo de retenção	3,96 ± 0,00	5,69 ± 0,065
Área	5.536.195 ± 1,06	3.023.521 ± 1,97
Pratos teóricos	3765 ± 0,03	4639 ± 0,05
Fator capacidade	2,55 ± 0,00	4,10 ± 0,00

[a]média de 10 determinações

De acordo com os resultados do teste de adequabilidade do sistema, pode-se verificar que a resolução e a repetibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas. Os resultados deste teste garantem que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados confiáveis (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 2011).

Para os resultados obtidos pelo DPR, que foram inferiores a 2%, pode-se assegurar que o sistema esta adequado para a realização dos testes de validação.

6.2.5. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos por uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). O objetivo principal foi avaliar a variabilidade intra-dia e inter-dia, além de determinar o teor do fármaco no medicamento.

Tabela 19. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade para determinação quantitativa de etinilestradiol e drospirenona na amostra 2, através da cromatografia de fase líquida de alta eficiência

Repetibilidade	Etinilestradiol	Drospirenona
Valor encontrado (µg /unid)[a]	19,53	3.026,00
Teor (%)	97,65	100,88
DPR (%)	1,06	1,97

[a] valor da média aritimética (n = 6)

Para que um método seja tido como preciso o DPR, tanto intra-dia como inter-dia, deve ser inferior a 5%, conforme a RE 899 (ANVISA, 2003). A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR). O método intra-dia determinou DPR inferior a 2%, assegurando assim a repetibilidade do método e pequena variabilidade (Tabela 19). A precisão inter-dia foi realizada à partir da análise de soluções de concentrações baixa, média e alta (em triplicata), durante 3 dias consecutivos pelo mesmo analista. Os resultados indicam que o DPR varia entre 0.37 e 1.17%, assegurando a precisão do método proposto (Tabela 20).

Tabela 20. Resultados estatísticos obtidos na análise das formulações farmacêuticas inter-dia empregando a cromatografia em fase líquida de alta eficiência

Amostra		Concentração (µg /mL)	Desvio Padrão	Desvio padrão relativo (%)
1	Etinilestradiol[a]	2,50	0,55	0,70
		5,00	0,84	1,00
		7,50	0,41	1,70
	Drospirenona[b]	250,00	0,95	1,26
		500,00	1,17	1,49
		750,00	0,60	1,21
2	Etinilestradiol[a]	2,50	0,88	0,99
		5,00	0,65	1,25
		7,50	0,59	0,61
	Drospirenona[b]	375,00	0,43	0,88
		750,00	0,47	1,19
		1125,00	0,96	1,16
3	Etinilestradiol[a]	2,50	0,73	1,19
		5,00	1,04	1,27
		7,50	0,37	0,68
	Drospirenona[b]	250,00	0,84	1,24
		500,00	1,37	1,74
		750,00	0,67	1,31

[a] Detecção por fluorescência [b] Detecção por UV

6.2.5.1. Determinação dos teores percentuais das amostras

A Tabela 21 demonstra os resultados obtidos na determinação dos teores das amostras comerciais 1, 2 e 3 analisadas pelo método proposto.

Tabela 21. Determinação do teor de fármaco presente na amostra comercial empregando a cromatografia em fase líquida de alta eficiência

Amostra		Quantidade declarada (µg /unid)	Valor encontrado (µg /unid)	Desvio padrão relativo (%)	Teor (%)
1	Etinilestradiol[a]	30,00	29,22	0,57	97,40
	Drospirenona[b]	3000,00	2859,30	0,37	95,30
2	Etinilestradiol[a]	20,00	21,45	0,96	107,26
	Drospirenona[b]	3000,00	2889,30	0,99	96,31
3	Etinilestradiol[a]	30,00	32,37	0,18	107,91
	Drospirenona[b]	3000,00	2901,00	0,34	96,70

[a] Detecção por fluorescência
[b] Detecção por UV

De acordo com a Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011), a associação de etinilestradiol com a drospirenona não deve conter menos do que 90% e não mais que 110% de um dos componentes.

Baseando-se nessa informação, as três amostras analisadas encontram-se com as quantidades dentro da concentração permitida.

6.2.6. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação, em três níveis de concentração. A recuperação média encontrada para o etinilestradiol foi de 100,84% e para a drospirenona 100,06%. Pode ser observado que o intervalo de recuperação está entre 98,0 e 102,0% (ANVISA, 2003) (Tabela 22), indicando assim boa concordância entre as quantidades adicionadas de solução padrão e as quantidades recuperadas. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o método é exato.

Tabela 22. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de etinilestardiol e drospirenona adicionada ao placebo

	Padrão adicionado ao placebo (µg mL)	**Padrão encontrado (µg /mL)**	**Recuperação (%)**
Etinilestradiol[a]	2,50	2,53	101,30
	5,00	5,06	101,38
	7,50	7,48	99,85
Drospirenona[b]	375,00	382,99	102,00
	750,00	740,50	98,73
	1.125,00	1.118,54	99,45

[a] Detecção por fluorescência [b] Detecção por UV

6.2.7. Robustez

A robustez do método foi avaliada mediante um planejamento fatorial 2^3. Sabendo-se que o valor da resolução (Rs) para a condição experimental estabelecida é 5,84, outros valores foram obtidos com as modificações dos fatores, porém, em nenhum dos dois níveis avaliados a resolução se observa comprometida, sendo sempre maior do que 2,00, indicando com isto que o método é capaz de suportar mudanças provenientes de erros aleatórios e erros do analista. Assim sendo, considera-se o método proposto robusto nas condições analíticas avaliadas para a resposta resolução. A Tabela 23 mostra os resultados obtidos em função da resolução (Rs).

Tabela 23. Condições cromatográficas empregadas para a determinação da robustez do método cromatográfico

	Condições cromatográficas		
Fatores	**Nível inferior (-)**	**Nível zero (0)**	**Nível superior (+)**
A – Vazão (mL min)	0,9	1,0	1,1
B – Temperatura (°C)	22	25	28
C – MeCN/H_2O (v/v)	45:55	50:50	55:45

Exp. n°	**Fator A**	**Fator B**	**Fator C**	**Rs**
1	–	–	–	5,40
2	+	–	–	4,84
3	–	+	–	5,32
4	+	+	–	4,75
5	–	–	+	4,56
6	+	–	+	4,27
7	–	+	+	4,58
8	+	+	+	4,29

De acordo com os resultados obtidos, podemos avaliar que a Rs será maior quanto menor for a vazão e a proporção de MeCN. A temperatura não tem efeito significativo na *Rs*, sendo o fator menos crítico na separação.

6.2.8. Teste de estresse

Os resultados obtidos nos testes de estresse, empregando-se o método por CLAE podem ser observados na Tabela 24 e nas Figuras 17,18,19 e 20.

Tabela 24. Resultados obtidos empregando-se CLAE após condições de estresse do etinilestradiol e drospirenona

Meio de reação	Após estresse (%)		Degradação (%)	
	Etinilestradiol	Drospirenona	Etinilestradiol	Drospirenona
Ácido	1,51	0	98,48	100,00
Alcalino	87,37	87,42	12,42	12,58
Oxidante	5,85	4,24	94,15	95,75
Neutro	25,26	124,00	74,73	0,00

6.2.8.1. Estabilidade em meio ácido

Após exposição em meio ácido (Tabela 24), observa-se degradação significante do etinilestradiol e total da drospirenona.

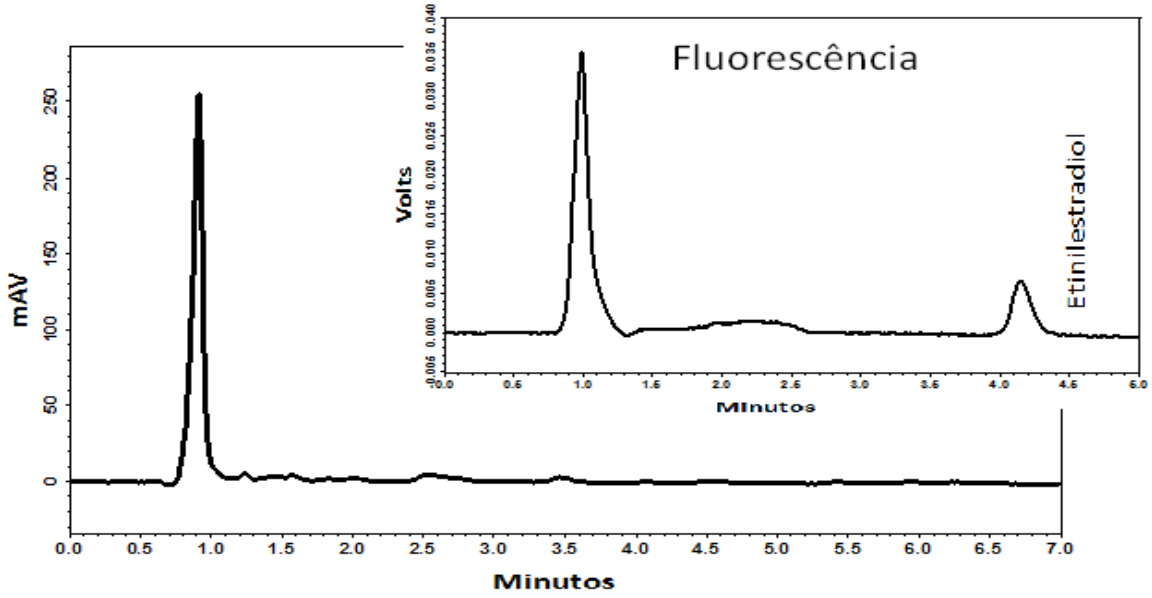

Figura 17. Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg /mL) e drospirenona (750,0 µg mL), detecção em 200 nm (CLAE-UV); Cromatograma resultante da análise da solução padrão de etinilestradiol 5,0 µg /mL , λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm (CLAE-Fluorescência), após exposição em meio ácido; Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min e temperatura controlada de 25 ± 1ºC.

6.2.8.2. Estabilidade em meio alcalino

Em exposição a meio alcalino, observa-se em 2,0 min um pico não identificado por fluorescência, o que confirma a modificação no tempo de retenção da drospirenona.

Para exposição em meio alcalino, não se observa degradação significativa tanto do etinilestradiol quanto da drospirenona (Tabela 24). De acordo com SILVA, *et al*. (2009) a taxa de decomposição é lenta para hidrólise realizada em pH neutro, o que é compreensível, porque reações em pH neutro são não-catalíticas e por isso podem ser necessários períodos muito longos sob condições de temperatura extremas, para conseguir quantidades suficientes de produtos de degradação.

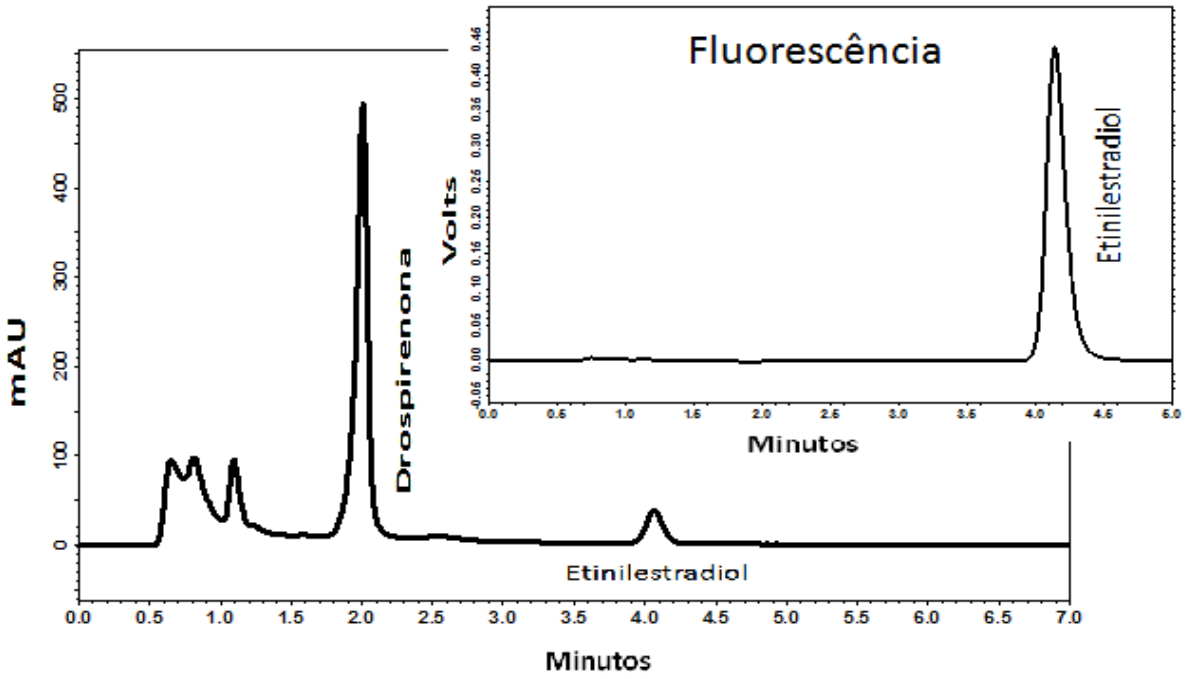

Figura 18. Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg mL), detecção em 200 nm (CLAE-UV); Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol 5,0 µg /mL, λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm (CLAE- Fluorescência), após exposição em meio alcalino; Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min e temperatura controlada de 25 ± 1ºC.

6.2.8.3. Estabilidade em meio oxidante

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos. Dentre os mais conhecidos e estudados estão os esteróides, os

antibióticos, as vitaminas, os óleos e as gorduras. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que procedem lentamente sob a influência do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação (SILVA, *et al*., 2009).

Após exposição ao meio oxidante, podem ser observados picos desconhecidos (Figura 19), além de degradação significativa para a drospirenona e etinilestradiol (Tabela 24).

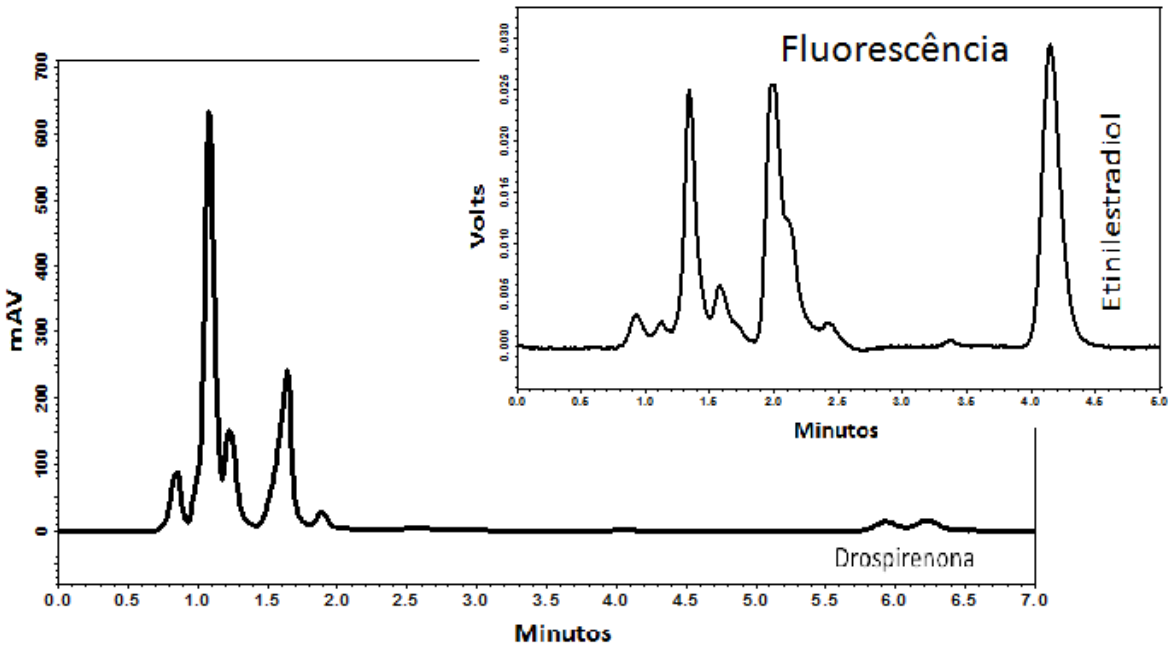

Figura 19. Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg /mL) e drospirenona (750,0 µg /mL), detecção em 200 nm (CLAE-UV); Cromatograma resultante da análise da solução padrão de etinilestradiol 5,0 µg /mL, λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm (CLAE- Fluorescência) em meio oxidante; Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min e temperatura controlada de 25 ± 1ºC.

6.2.8.4. Estabilidade em meio neutro

Em meio neutro o tempo de retenção não variou, entretanto verificou-se degradação significante do etinilestradiol de 74,73%. A drospirenona apresentou aumento na área, certamente devido a co-eluição de um produto de degradação no mesmo tempo de eluição.

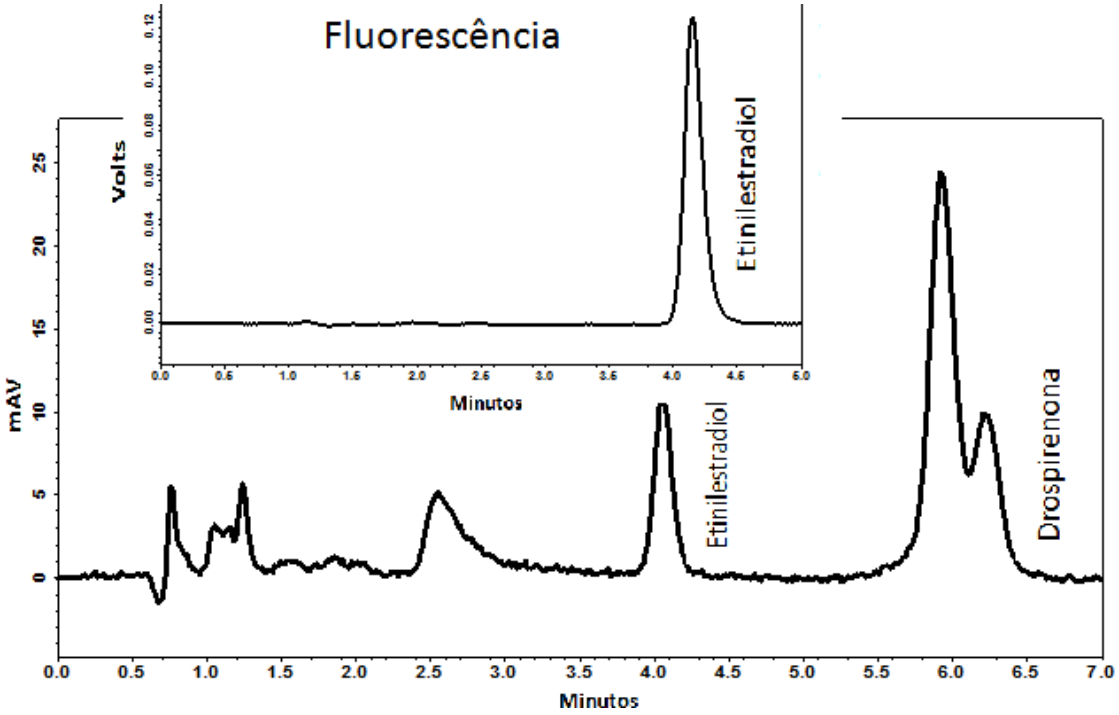

Figura 20. Cromatograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg mL), detecção em 200 nm (CLAE-UV); Cromatograma resultante da análise da solução padrão de etinilestradiol 5,0 µg /mL , λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm (CLAE-Fluorescência), em meio neutro. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100RP - C18, (125 x 4 mm) 5 µm, fase móvel MeCN/H_2O (50:50) (v/v); e volume de injeção 20 µL; vazão 1,0 mL min e temperatura controlada de 25 ± 1ºC.

6.3. Eletroforese capilar

Após o desenvolvimento de diversos sistemas micelares modificados utilizando diversas proporções de acetonitrila, isopropanol, metanol e acetona em associação com o SDS e TBS e a variação dos parâmetros testados, foi possível chegar a uma condição favorável à separação dos analitos.

Após os testes realizados utilizando metanol 0 - 20% e isopropanol 0 - 10%, em associação com o SDS e TBS, observou-se co-eluição dos analitos em todas as análises realizadas. Utilizando-se acetona, foi possível separar os analitos, entretanto, o método não foi reprodutível. As condições experimentais estabelecidas utilizando MeCN foram as mais adequadas para análise dos dois hormônios em associação.

O sistema micelar que se mostrou mais eficiente para a análise com coluna 40,2 cm (30 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e., foi o constituído pela solução de

TBS 20 mM, SDS 30 mM e 30 % (v/v) de MeCN; injeção hidrodinâmica: 0,3 psi por 3 seg; controle de temperatura ajustado em 30ºC e, + 18 kV de tensão.

Para análise em coluna de 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e., o sistema micelar que se mostrou mais eficiente foi o constituído pela solução de TBS 30 mM, SDS 25 mM e 40% (v/v) de MeCN; injeção hidrodinâmica: 0,3 psi por 3 seg; controle de temperatura ajustado em 30ºC e +13 kV de tensão. Embora o sistema para análise em coluna 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e., tenha demonstrado tempos de retenção menores, o método não demonstrou reprodutibilidade adequada para sua validação.

Com sistemas contendo quantidades menores do que 38% de MeCN, observou-se co-eluição dos analitos, o que prejudicou a quantificação dos dois fármacos. Utilizando-se sistemas com quantidades maiores do que 40% de MeCN observou-se a formação de precipitado proveniente da quebra do revestimento externo do capilar de silica, o que impediu a passagem do tampão através da coluna além de torná-lo frágil e quebradiço.

6.3.1. Otimização dos parâmetros analíticos

Quando um novo método é desenvolvido, muito tempo é despendido na escolha e avaliação do desempenho e reprodutibilidade do método (RIBANI, 2004). O capilar de sílica tem papel determinante no processo de retenção dos analítos presentes na mistura. Diversos estudos foram feitos com objetivo de reduzir a concentração de MeCN presente no tampão, garantindo a integridade do capilar de sílica e a boa separação dos analitos.

A padronização das condições para análise das amostras foram avaliadas após estudo sistemático. Foram testados diferentes pHs, mas o que demonstrou melhor resposta foi o pH 9,20. Para a diluição das soluções estoque de etinilestradiol e drospirenona foram efetuados testes com diferentes proporções da mistura H_2O/metanol, inclusive o metanol puro. A mistura H_2O/metanol 25:75 (v/v) foi a que proporcionou respostas mais satisfatórias. Foram realizados testes com diferentes

volumes de injeção hidrodinâmica (amostra e amostra seguida de tampão). O volume que demonstrou a melhor resposta foi de 0.3 psi por 5 seg seguidos de tampão 0.1 psi por 1 seg.

O comprimento de onda de 210 nm foi o escolhido, pois dentre os testados foi o que proporcionou os melhores resultados dando origem a picos com boa resolução. Para evitar a obstrução da coluna a cada triplicata um novo tampão foi preparado e os “vials” trocados.

- **Condições padronizadas**

Foram as condições que se mostraram mais adequadas para determinação e quantificação dos fármacos em associação, pois possibilitaram uma boa quantificação principalmente do etinilestradiol, presente em pequenas quantidades e separação dos analitos, isto é, não houve co-eluição, o que prejudicaria a quantificação dos dois analitos. O tempo de corrida de 10 min, é adequado para análise de rotina. As condições selecionadas foram:

O tampão que se mostrou mais eficiente para a análise com coluna 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e., foi o constituído de SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9,20. Todas as análises foram realizadas em temperatura controlada de 20ºC e tensão de +12 kv. A detecção foi efetuada em 210 nm e a injeção hidrodinamica de 0.3 psi por 5 seg seguidos de tampão 0.1 psi por 1 seg.

6.3.1.1. Solução padrão

As soluções padrão foram preparadas com objetivo de realizar a quantificação simultânea de ambos os hormônios da formulação.

O eletroferograma ilustrado na Figura 21 corresponde à análise da solução padrão de etinilestradiol, drospirenona e loratadina nas concentrações de 5,0 µg mL, 750,0 µg mL e 60,0 µg mL, respectivamente.

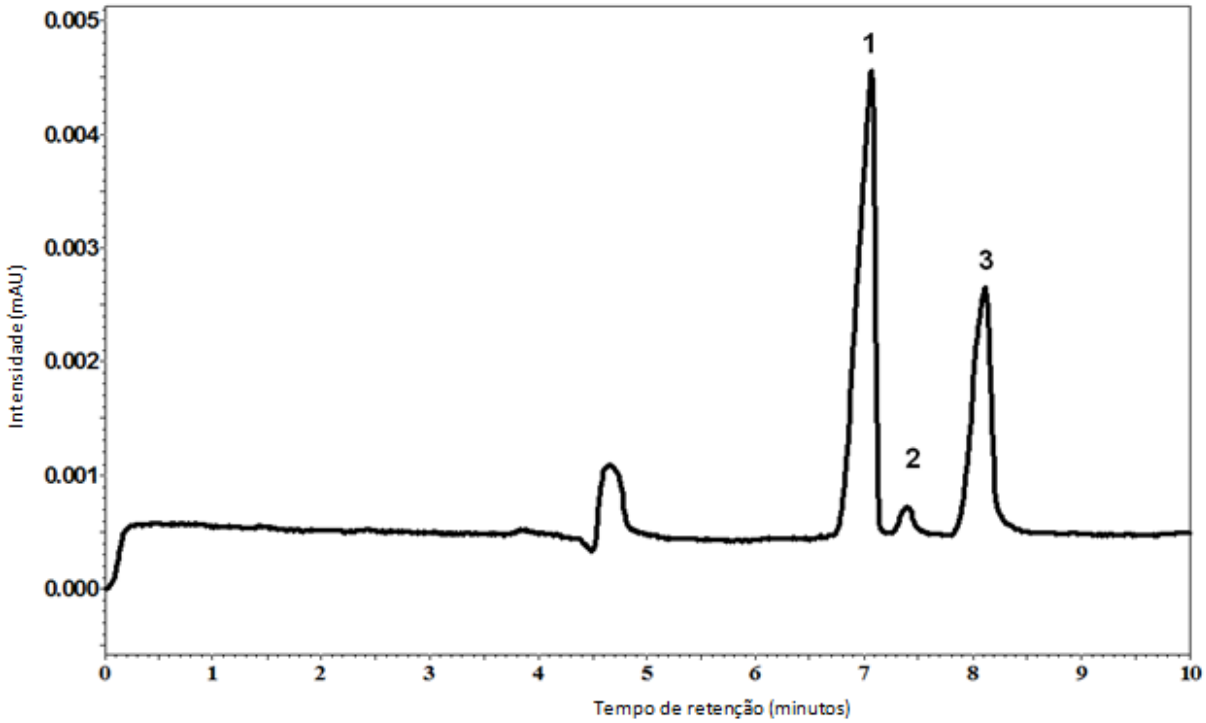

Figura 21. Eletroferograma da solução padrão de etinilestradiol (5,0 µg mL) e drospirenona (750,0 µg mL) e Loratadina (padrão interno) (60,0 µg mL), detecção em 210 nm. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida como 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; fase móvel SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9,20; tensão: +12 kv e temperatura controlada de 20ºC. Tempo de retenção: 1) Drosprenona 6,90 min 2) Etinilestradiol 7,45 min 3) Loratadina (Padrão interno) 8,09 min

6.3.1.2. Análise do placebo

O placebo foi preparado com o objetivo de se avaliar possíveis interferentes nos métodos, utilizando as condições padronizadas. O eletroferograma corresponde à análise do placebo preparado em laboratório de acordo com a composição apresentada anteriormente (item 5.2.1.5.)(Figura. 22).

6.3.1.3. Análise das amostras comerciais

Na Figura 22 podem ser observados os eletroferogramas da amostra e do placebo, onde a presença dos excipientes contidos na formulação testada não interferem com os picos de interesse.

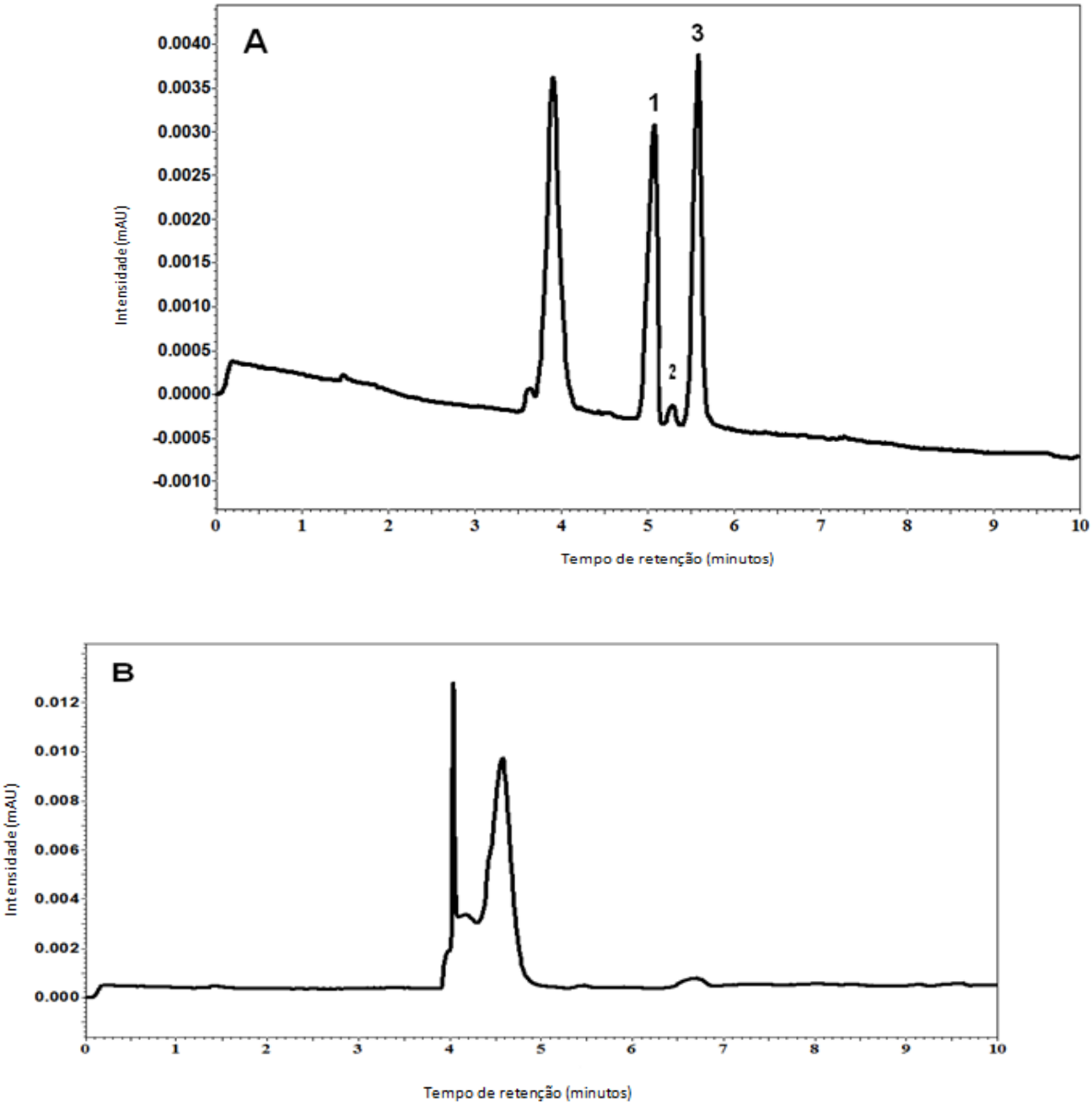

Figura 22. Amostra comercial contendo etinilestradiol (5,0 µg mL), drospirenona (750,0 µg mL) e loratadina (60,0 µg /mL) (A) e placebo (B) detecção em 210 nm. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida com 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; fase móvel SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9,20; tensão: +12 kv e temperatura controlada de 20ºC. Tempo de retenção: 1) Drospirenona (Tr = 5,07 min), 2) Etinilestradiol (Tr = 5,3 min) e Loratadina (Padrão interno) (Tr = 5,57 min)

6.3.2. Linearidade

Para a preparação da solução dos padrões e obtenção da curva de calibração, tomou-se por base a quantidade de etinilestradiol e de drospirenona declarados nas amostras comerciais, de modo que as concentrações nos pontos

intermediários das curvas de calibração correspondessem à diluição de uma unidade (comprimido revestido). Assim o ponto médio da curva de etinilestradiol e drospirenona corresponde a 5,0 µg mL e 750,0 µg mL, respectivamente, equivalentes a 20,0 µg de etinilestradiol e 3.000,0 µg de drospirenona por unidade declarada.

Tabela 25. Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração de etinilestradiol e drospirenona/padrão interno; detecção em 210 nm. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida com 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; fase móvel SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9,20; tensão: +12 kv e temperatura controlada de 20ºC.

Concentração esperada de ETE (µg mL)	**Área média encontrada (três leituras)**	**Desvio padrão das concentrações encontradas de ETE**	**Coeficiente de variação das concentrações de ETE (%)**
1	0.0069	0.00005	0.77
3	0.0182	0.0060	3.30
5	0.0308	0.0016	5.27
7	0.0439	0.0005	1.15
9	0.0577	0.0149	2.52
11	0.0714	0.0003	0.47
Concentração esperada de DROSP (µg mL)	**Área média Encontrada (três leituras)**	**Desvio padrão das concentrações encontradas de DROSP**	**Coeficiente de variação das concentrações de DROSP (%)**
150	0.179	0.0022	1.26
450	0.472	0.0056	3.30
750	0.805	0.009	1.12
1050	1.179	0.017	1.48
1350	1.478	0.014	0.98
1650	1.892	0.089	4.76

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (r^2) obtido pelas curvas padrão, conforme pode ser visto na Tabela 26.

Tabela 26. Resultados obtidos nas determinações das curvas de calibração para o etinilestradiol e drospirenona/padrão interno, detecção em 210 nm.

	Faixa de Concentração (µg mL)	Equação da reta	Desvio Padrão	Coeficiente de correlação
Etinilestradiol	1 - 11	Y= 0.0065x - 0.0007	0.0039	0.9988
Drospirenona	150 - 1650	Y = 0.0011x - 0.0236	0.0531	0.9980

A linearidade foi determinada por meio da curva de calibração na qual se verificou a proporcionalidade entre a concentração do padrão e as áreas dos picos. De acordo com ANVISA (2003), julga-se satisfatório a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade (0,99<R<1,00 correlação perfeita), para validação de métodos analíticos. Estes coeficientes de correlação demonstram que a resposta do detector, foram lineares nos intervalos de concentração estudados.

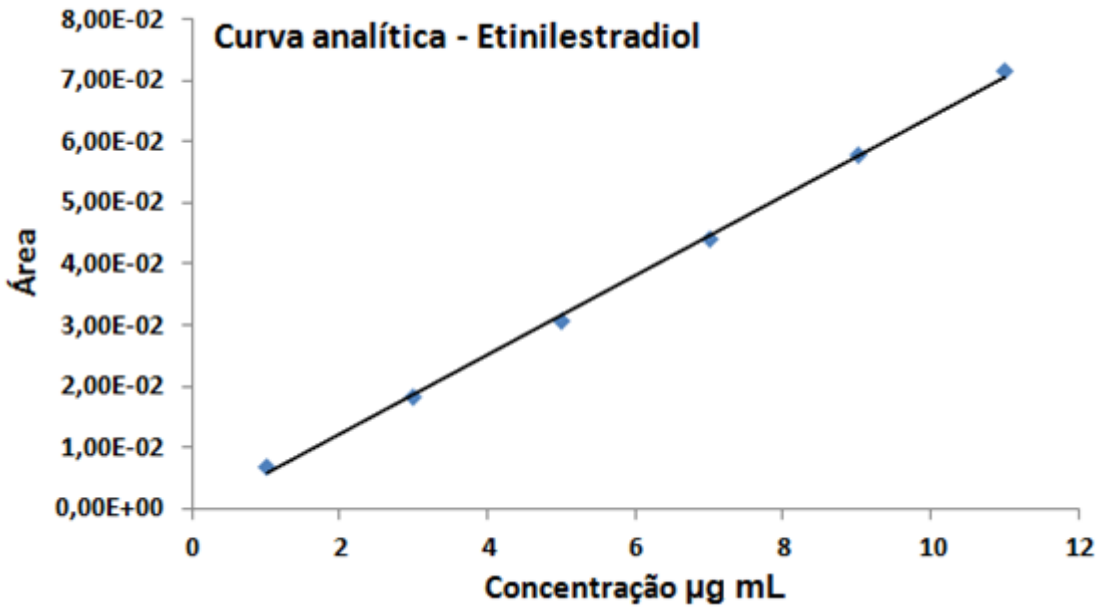

Figura 23. Linearidade resultante da análise da solução padrão de etinilestradiol/padrão interno; detecção em 210 nm. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida com 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; fase móvel SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9.20; tensão: +12 kv e temperatura controlada de 20ºC

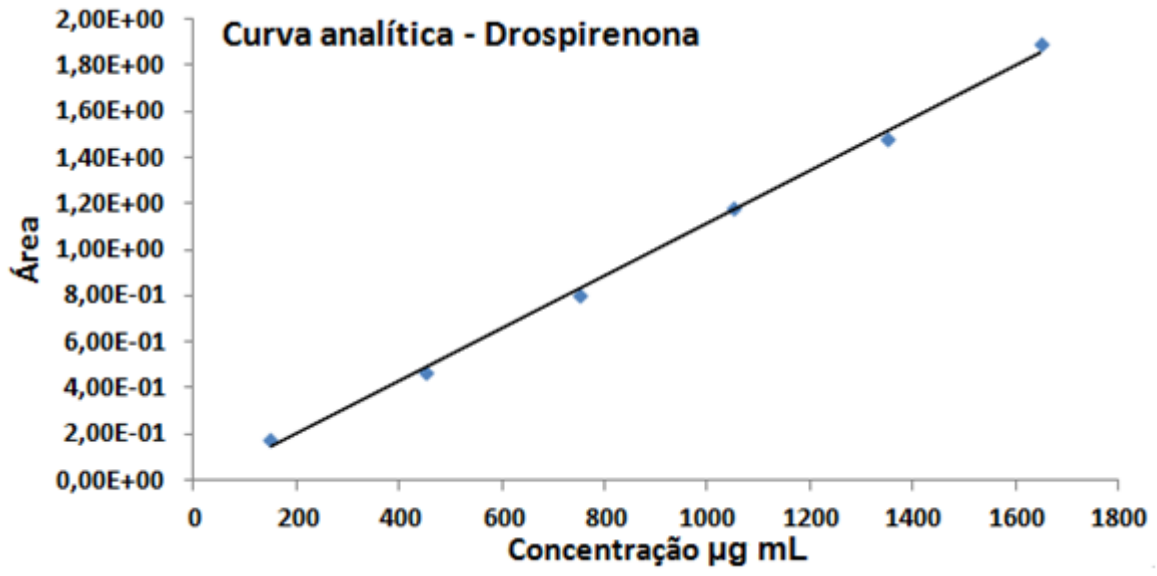

Figura 24. Linearidade resultante da análise da solução padrão de drospirenona/padrão interno; detecção em 210 nm. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida com 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; fase móvel SDS 20 mM, TBS 30 mM e MeCN 30%, pH 9,20; tensão: +12 kv e temperatura controlada de 20ºC

6.3.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação do método foram estabelecidos experimentalmente através da análise dos hormônios estudados. A Tabela 27 apresenta os respectivos valores estimados de limites de detecção e quantificação para cada um dos analitos.

Tabela 27. Resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e de quantificação para a drospirenona e o etinilestardiol.

Detecção 210 nm	LQ (µg /mL)	LD (µg /mL)
Etinilestradiol	1,44	0,47
Drospirenona	483,20	159,40

6.3.4. Teste de adequabilidade do sistema

Os testes de adequabilidade do sistema podem ser observados na Tabela 28

Tabela 28. Parâmetros eletroforéticos obtidos empregando solução padrão de etinilestradiol e drospirenona 5,0 µg /mL e 750,0 µg /mL. Condições experimentais: Capilar de sílica fundida com 31,2 cm (21 cm efetivos) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e. Injeção hidrodinamica: 0.3 psi 5 seg tampão 0.1 psi 1seg. detecção: 210 nm temperatura: 20ºC. tensão: +12 kV.

Parâmetros[a]	Etinilestradiol	Drospirenona
Tempo de retenção	8,72 ± 1,20	8,11 ± 1,18
Área	0,062 ± 0,00	1,871 ± 0,03
Pratos teóricos	16678 ± 0,03	19665 ± 0,02
Fator capacidade	9004166 ± 0,53	8049999 ± 0,42
Assimetria	1,358 ± 0,00	0,816 ± 0,00

[a]média de 10 determinações

De acordo com os resultados do teste de adequabilidade do sistema, pode-se verificar que a resolução e a repetibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas. Os resultados deste teste garantem que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados confiáveis (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011). Para os resultados obtidos pelo DPR, que foram inferiores a 2%, pode-se assegurar que o sistema esta adequado para a realização dos testes de validação.

6.3.5. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos por uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). O objetivo principal foi avaliar a variabilidade intra-dia e inter-dia, além de determinar o teor do fármaco no medicamento.

Tabela 29. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade para determinação quantitativa de etinilestradiol e drospirenona, através da eletroforese capilar

Repetibilidade	Etinilestradiol	Drospirenona
Valor encontrado (µg/unid)	20,4	3036,00
Teor (%)	102,00	101,22
DPR (%)	2,65	1,81

Para que um método seja tido como preciso, o DPR, tanto intra-dia como inter-dia, devem ser inferioriores a 5%, conforme a RE 899 (ANVISA, 2003). A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR). O método intra-dia determinou DPR, inferior a 5%, assegurando assim a repetibilidade do método e pequena variabilidade (Tabela 29). A precisão inter-dia foi realizada à partir da análise de soluções de concentrações baixa, média e alta (em triplicata), durante 3 dias consecutivos pelo mesmo analista. Os resultados indicam que o DPR varia entre 0.74 e 3,50%, assegurando a precisão do método proposto (Tabela 30). A amostra 3 demonstrou co-eluição no ponto alto, o que impediu sua quantificação.

Tabela 30. Resultados estatísticos obtidos na análise das formulações farmacêuticas inter-dia empregando a eletroforese capilar

Amostra		Concentração (µg mL)	Desvio padrão (%)	Desvio padrão relativo (%)
1	Etinilestradiol	3,00	0,0009	2,73
		5,00	0,0008	1,96
		7,00	0,0005	1,20
	Drospirenona	300,00	0,0078	1,21
		500,00	0,0281	2,63
		700,00	0,0259	1,78
2	Etinilestradiol	3,00	0,0009	3,50
		5,00	0,0003	0,82
		7,00	0,0026	2,56
	Drospirenona	450,00	0,0183	1,73
		750,00	0,0399	2,08
		1.050,00	0,0488	2,05
3	Etinilestradiol	3,00	0,0006	2,08
		5,00	0,0003	0,74
		7,00	----	----
	Drospirenona	300,00	0,0164	2,52
		500,00	0,0251	2,35
		700,00	----	----

6.3.5.1. Determinação dos teores percentuais das amostras

A Tabela 31 demonstra os resultados obtidos na determinação dos teores das amostras comerciais 1, 2 e 3 analisadas pelo método proposto.

Tabela 31. Determinação do teor de fármaco presente na amostra comercial

Amostra		Quantidade declarada (µg/unid)	Valor encontrado (µg/unid)	Desvio padrão relativo (%)	Teor (%)
1	Etinilestradiol	30,00	27,16	1,96	90,54
	Drospirenona	3000,00	2.910	2,63	97.07
2	Etinilestradiol	20,00	19,92	0,82	99,60
	Drospirenona	3000,00	3036	2,08	101.20
3	Etinilestradiol	30,00	30,78	0,74	102.60
	Drospirenona	3000,00	2.907,00	2,35	96,90

De acordo com a Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011), a associação de etinilestradiol com a drospirenona não deve conter menos do que 90% e não mais que 110% de um dos componentes. Baseando-se nessa informação, as três amostras analisadas encontram-se com as quantidades dentro da concentração permitida.

6.3.6. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação, em três níveis de concentração. A recuperação média encontrada para o etinilestradiol foi de 99,37% e para a drospirenona 100,97%. Pode ser observado que o intervalo de recuperação está entre 98,0 e 102,0% (Tabela 31), indicando assim boa concordância entre as quantidades adicionadas de solução padrão e as quantidades recuperadas. Cada determinação foi realizada em triplicata para calcular o intervalo de confiança e desvio padrão relativo. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o método é exato.

Tabela 32. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de etinilestardiol e drospirenona adicionada ao placebo

	Padrão adicionado ao placebo (µg /mL)	Padrão encontrado (µg /mL)	Recuperação (%)
Etinilestradiol	3,00	2,96	98,85
	5,00	5,05	101,2
	7,00	6,86	98,06
Drospirenona	450,00	444,42	98,76
	750,00	769,97	102,65
	1050,00	1.065,75	101,50

6.3.7. Robustez

Quando é desenvolvido um novo método analítico entram em estudo algumas variáveis as quais devem ser controladas cuidadosamente. No caso da técnica de eletroforese capilar existem dificuldades para o planejamento da avaliação da robustez, visto que é necessário manter sob controle todas as condições analíticas estabelecidas (DEJAEGUER e HEYDEN, 2007).

A robustez do método foi avaliada mediante um planejamento fatorial 2^3. Sabendo-se que o valor da resolução (Rs) para a condição experimental estabelecida é 2,30, outros valores foram obtidos com as modificações dos fatores, porém, em nenhum dos dois níveis avaliados a resolução se observa comprometida, sendo sempre maior do que 2,00, indicando com isto que o método é capaz de suportar mudanças provenientes de erros aleatórios e erros do analista. Assim sendo, considera-se o método proposto robusto nas condições analíticas avaliadas para a resposta resolução. A Tabela 33 mostra os resultados obtidos em função da resolução (Rs).

Tabela 33. Condições cromatográficas empregadas para a determinação da robustez do método eletroforético

	Condições cromatográficas		
Fatores	**Nível inferior (-)**	**Nível zero (0)**	**Nível superior (+)**
A – SDS (mM)	18	20	22
B – TBS (mM)	28	30	32
C – Voltagem (+Kv)	+11	+ 12	+ 13

Exp. n°	**Fator A**	**Fator B**	**Fator C**	**Rs**
1	**–**	**–**	**–**	2,05
2	**+**	**–**	**–**	2,27
3	**–**	**+**	**–**	2.20
4	**+**	**+**	**–**	2,25
5	**–**	**–**	**+**	2,16
6	**+**	**–**	**+**	2.22
7	**–**	**+**	**+**	2,06
8	**+**	**+**	**+**	2.10

De acordo com os resultados obtidos, podemos avaliar que a Rs será maior quanto menor for a voltagem. A concentração de TBS não tem efeito significativo na *Rs*, sendo o fator menos crítico na separação.

6.4. Comparação entre técnicas de CLAE e EC para a determinação quantitativa de etinilestradiol e drospirenona

Os resultados obtidos na determinação de etinilestradiol e drospirenona por CLAE e EC podem ser observados na Tabela 34:

Tabela 34. Parâmetros estatisticos e estudo comparativo entre CLAE e EC, para determinação quantitativa de etinilestradiol e drospirenona. Amostra 1 contendo 30,0 µg/comprimido revestido e 3.000,00 µg /comprimido revestido para etinilestradiol e drospirenona, respectivamente e Amostra 2 contendo 20,0 µg/unid e 3.000,0 µg/unid para etinilestradiol e drospirenona, respectivamente.

Amostra	Parâmetros estatísticos	CLAE Etinilestradiol	CLAE Drospirenona	EC Etinilestradiol	EC Drospirenona
1	$\overline{X}$	29,94	3.081,00	29,35	3.062,50
	DPR	0,04	0,22	0,05	0,29
2	$\overline{X}$	19,68	2.965	19,8	2.970,00
	DPR	0,03	0,36	0,035	0,49

	Teste – f [a] Etinilestradiol	Teste – f [a] Drospirenona	Teste – t [b] Etinilestradiol	Teste – t [b] Drospirenona
1	1,56	1,73	0,29	1,65
2	1,36	1,85	0,08	0,26

[a] valor crítico F com P = 95%, F =4,026

[b] valor crítico t student's com P = 95%

DPR = Desvio padrão relativo

Para cada método 10 determinações foram realizadas, portanto o número de graus de liberdade (n-1) em cada caso é nove. Para o teste t, o valor crítico de t (P = 0,05) é 2,1, para 95% de certeza. Como o valor experimental é menor do que esse valor, não existe diferença significante entre os dois métodos. O valor crítico de F (P = 0,05), é nesse caso, de 4,026. Como os valores calculados de F para as amostras 1 e 2, não excedem o valor crítico, a variância entre os métodos não é significativamente diferente.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes de caracterização e teor de pureza foram utilizados como importantes ferramentas de caracterização química para o etinilestradiol, drospirenona e para os fármacos em associação. A TG/DTG e a DSC permitem avaliar a ocorrência de uma interação entre os componentes da formulação, o que demonstra a importância dessas técnicas na caracterização desses materiais.

Os métodos propostos para determinação de etinilestradiol e drospirenona são simples, confiáveis e econômicos. Podem ser utilizados em análise de rotina já que os excipientes do medicamento não interferem na quantificação nas duas técnicas utilizadas nesse trabalho (cromatográfica e eletroforética), além de serem aplicadas satisfatoriamente às amostras comercializadas no Brasil.

O método elétroforético demonstrou ser linear, com detecção UV. O procedimento cromatográfico proposto foi avaliado empregando-se dois detectores o de UV e de Fluorescência. Os LD e LQ para CLAE-fluorescência mostraram-se adequados para o etinilestradiol. A drospirenona não emite radiação fluorescente para quantificação, portanto a detecção foi efetuada utilizando-se o UV. A utilização da detecção por fluorescência no método cromatográfico permitiu a obtenção de um menor LD e LQ para o etinilestradiol, quando comparado ao método eletroforético.

Os coeficientes de variação comprovaram a precisão dos métodos propostos e os testes de recuperação efetuados apresentaram resultados que comprovaram a exatidão dos métodos. A robustez foi demonstrada sem perda da resolução não ocorrendo sobreposição dos picos (etinilestradiol e drospirenona). Estatisticamente não existem diferenças significativas quanto à determinação de teor entre os dois métodos propostos, permitindo um nível de confiança de 95,0%.

8. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. Saúde Legis. **Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_espelho_consulta.cfm?id=3829675&highlight=&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo_norma=&numero=899&data=&dataFim=&ano=2003&pag=1. Acesso em: 29 nov. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resultado da consulta a banco de dados – medicamentos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/banco_med.htm. Acesso em: 23 set. 2009.

AMARAL, E.; VISCOLA, M.A.M.; BAHAMONDES, L. Contracepção hormonal e anti-retrovirais em mulheres infectadas pelo HIV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v.28, n.11, p.680-684, 2006.

ARAUJO, J.C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. São Carlos, 2006. 1v. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.

BACHMANN, G.; SALAK, P.J.; LANDERS, C.S.; BENDA, N.; MARR, J. Efficacy and safety of a low-dose 24-day combined oral contraceptive containing 20 µg ethinylestradiol and 3 mg drospirenone. **Contraception**, v.70, p.191-198, 2004.

BAHAMONDES, L.; EGUEZ, S.C.; PONS, J.E.; SHULMAN, L. Perspectives on premenstrual syndrome/premenstrual dysphoric disorder. **Disease Management & Health Outcomes**, v.15, n.5, p.263-277, 2007.

BAYER. Bayer Health Care. Bayer Schering Pharma. **Yaz dropirenona etinilestradiol**: monografia do produto. São Paulo: Bayer, 2007. 71p.

BAZOTTE, R.B.; SCHELEICHER, F.; MARCON, A. Aspectos farmacológicos e clínicos de um novo contraceptivo oral contendo drospirenona como componente progestínico. **Arquivos de Ciências de Saúde da UNIPAR**, v.9, n.1, p.37-40, 2005.

BERZAS, J.J.; CASTILLO, B.D.; CASTANEDA, G.; PINILLA, M.J. Micellar electrokinetic capillary chromatography as an alternative method for the determination of ethinylestradiol and levo-norgestrel. **Talanta**, v.50, p.261-268, 1999.

BERZAS, J.J.; RODRIGUES, J.; CASTANEDA, G.; PINILLA, M.J. Determination of ethinylestradiol and gestodeno in oral contraceptives by micelar electrokinetic chromatography. **Chromatographia**, v.49, p.65-70, 1999.

BHAUMIK, U.; GHOSH, A.; MANDAL, U.; CHATTERJEE, B.; SARKAR, A.K.; BOSE, A.; RAY, K.K.; PAL, T.K. Determination of drospirenone in human plasma by LC–Tandem-MS. **Chromatographia**, v.68, n.9/10, p.713-720, 2008.

BHUSARI, V.K.; DHANESHWAR, S.R.; Validated HPTLC method for simultaneous estimation of ethinyl estradiol and drospirenone in bulk drug and formulation. **Reviews in Analytical Chemistry**, v.31, n.2, p.123-129, 2012.

BBLOEMENKAMP, K.W.M.; ROSENDAAL, F.R.; BULLER, H.R.; HELMERHOST, F.M.; COLLY, L.P.; VANDENBROUCKE, J.P. Risk of venous thrombosis with use of current low-dose oral contraceptives is not explained by diagnostic suspicion and referral bias. ***Archives of Internal Medicine***, v.159, p.65-70, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Anticoncepção hormonal oral**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/0102assistencia1.pdf. Acesso em: 21 ago. 2012.

BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 2009. v.1, p.800-801.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. 1821p.

CARDOSO, T.; FONSECA, T.; COSTA, M. Acidente vascular cerebral no adulto jovem. **Acta Médica Portuguesa**, v.16, p.239-244, 2003.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUNÕZ, N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute**, v.31, n.3, p.20-28, 2003.

CHAMBERS, E.E.; DIEHL, D.M. **A highly selective method for the analysis of drospirenone in human plasma**. In: LC-GC Europe, 2008. p.22-23. Disponível em: http://www.chromatographyonline.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=589494. http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/App+Notes+Medical%2FBiological/A-Highly-Selective-Method-for-the-Analysis-of-Dros/ArticleStandard/Article/detail/589494?contextCategoryId=46059&ref=25. Acesso em: 21 Ago. 2012.

CHANKVETADZE, B.; KARTOZIA, I.; YAMAMOTO, C.; OKAMOTO, Y.; BLASCHKE, G. Comparative study on the application of capillary liquid chromatography and capillary electrochromatography for investigation of enantiomeric purity of the contraceptive drug levonorgestrel. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.30, n.6, p.1897-1906, 2003.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006. 453p.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y.V. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography, A**, v.1158, n.1/2, p.138-157, 2007.

DENBY, A. What is a suitable combined oral contraceptive pill in a patient who is taking hepatic enzyme-inducing drugs, such as carbamazepine or phenytoin? **National Electronic Library for Medicines**, 2010. 3p. Disponível em: http://www.nelm.nhs.uk/en/NeLM-Area/Evidence/Medicines-Q--A/What-is-a-suitable-combined-oral-contraceptive-pill-in-a-patient-with-epilepsy-who-is-taking-carbamazepine-or-phenytoin/. Acesso em: 20 jan. 2011.

DENISOVA, T.A.; CHISTYAKOV, V.V.; SADCHIKOVA, N.P. Quantitative estimation of components of combined hormonal contraceptives by HPLC. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.42, n.5, p.40-42, 2008.

DENTALI, F.; CROWTHER, M.; AGENO, W. Thrombophilic abnormalities, oral contraceptives, and risk of cerebral vein thrombosis: a meta-analysis. **Blood**, v.107, n.7, p.2766-2773, 2006.

DU, B.; SONG, S.; SHI, X.; ZHANG, Z. Analysis of steroids by nonaqueous capillary electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry**, v.64, n.3, p.59-64, 2009.

EDUARDO, E.J. **Estudo da degradação eletroquímica, fotolítica, fotocatalítica e eletrofotocatalítica do hormônio etinilestradiol**. São Carlos, 2009. 82p. Tese de Mestrado – Instituto de química de São Carlos – Universidade de São Paulo.

ELANI 28: drospirenona 3 mg etinilestradiol 0,03 mg: comprimidos revestidos. Responsável técnico Cintia Delphino de Andrade. São Paulo: Libbs Farmacêutica, s.d. [Bula de remédio]. Disponível em: http://www.libbs.com.br/Arquivos/Produto/ELANI-28.pdf. Acesso em: 23 set. 2009.

ELANI CICLO: drospirenona + etinilestradiol: comprimidos revestidos 3 mg + 0,03 mg. Responsável técnico Cintia Delphino de Andrade. São Paulo: Libbs Farmacêutica, s.d. [Bula de remédio]. Disponível em: http://www.libbs.com.br/Arquivos/Produto/ELANI-CICLO.pdf. Acesso em: 23 set. 2009.

ELGER, W.; BEIER, S.; POLLOW, K.; GARFIELD, R.; SHI, Q.S. HILLISCH, A. Conception and pharmacodynamic profile of drospirenone. **Steroids**, v.68, p.891-905, 2003.

FERREIRA, A.C.P.; MONTES, M.B.A. FRANCESCHINI, S.A.; TOLOI, M.R.T. Efeitos do contraceptivo oral contendo 20 µg de etinilestradiol e 150 µg de desogestrel sobre os sistemas de coagulação e fibrinólise. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.22, n.2, p.77-87, 2000.

FOGARTY, B.; REGA, F.; DEMPSEY, E. Separation of two groups of oestrogen mimicking compounds using micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.895, n.1/2, p.237-246, 2000.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L., eds. **Farmacologia clínica**: fundamentos da terapêutica racional. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.566-574.

GERVASIO, A.P.G.; LAVORANTE, A.F.; MORAES, M.C.B.; GINÉ, M.F. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. **Química Nova**, v.26, n.1, p.65-74, 2003.

GOROG, S. Recent advances in the analysis of steroid hormones and related drugs. **Analytical Sciences**, v.20, p.767-782, 2004.

GRUBER, D.M.; HUBER, J.C.; MELIS, G.B.; STAGG, C.; PARKE, S.; MARR, J. A comparison on the cicle control, safety, and efficacy profile of a 21-day regimen of ethinylestradiol 20 µg and drospirenone 3 mg with a 21 day regimed of ethinylestradiol 20 µg and desogestrel 150 µg. **Treatments in Endocrinology**, v.5, n.2, p.115-121, 2006.

GUIDO, M.; ROMUALDI, D.; GIULIANE, M.; SURIANO, R.; SELVAGGI, L.; LANZONE, A. Drospirenone for the treatment of hirsute women with polycystic ovary syndrome: a clinical, endocrinological, metabolic pilot study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.89, n.6, p.2817–2823, 2004.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 7ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros técnicos e científicos, 2008. p.596-623.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENT FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Q Quality Gyuidelines. View All Quality Gyuidelines. Analytical Validation Q2. **Q2 (R1)**: validation of analytical proceduces: text and methodology. Geneva: ICH, 2005. 17p. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Acesso em: 21. ago. 2012.

JICK, S.S.; HERNANDEZ, R.K.; Risk of non-fatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives containing drospirenone compared with women using oral contraceptives containing levonorgestrel: case-control study using United States claims data. **BMJ [British Medical Journal]**, v.340, p.1-8, 2011.

JOHNSTON, M.A. General method for the assay of oral contraceptives by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.216, p.269-278, 1981.

KASSAB, N.M. **Determinação de hormônios esteróides em contraceptivos orais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**. São Paulo, 2001. 1v. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

KEMMEREN, J.M.; ALGRA, A.; GROBBEE, D. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. **BMJ [British Medical Journal]**, v.323, p.1-9, 2001.

KLIPPING, C.; MARR, J. Effects of two oral contraceptives containing ethinylestradiol 20 µg combined with either drospirenone or desogestrel on lipids, hemostatic parameters and carbohydrate metabolism. **Contraception**, v.71, p.409-416, 2005.

KRATTENMACHER, R. Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. **Contraception**, v.62, p.29-38, 2000.

LABAN, A.; MARKOVIC, S.; STANKOV, M.; DJURDJEVIC, P. Simultaneous determination of gestodene and ethinylestradiol in contraceptive formulations by RP-HPLC. **Analytical Letters**, v.37, n.2, p.273-282, 2004.

LOPEZ, L.M.; KAPTEIN, A.A.; HELMERHORST, F.M. Oral contraceptives containing drospirenone for premenstrual syndrome. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.11, p.1-3, 2010. Disponível em: http://adkaptein.nl/wp-content/uploads/2011/04/2009_Lopez_Oral-contraceptives-containing.pdf. Acesso em: 21. ago.2012.

MACHADO, R.B.; MELLO, N.R.; MAIA, H. Bleeding patterns and menstrual-related symptoms with the continuous use of a contraceptive combination of ethinylestradiol and drospirenone: a randomized study. **Contraception**, v.81, n.3, p.215-222, 2010.

MACHADO, R.B.; MELLO, N.R.; MAIA, H.; CRUZ, A.M. Effect of a continuous regimen of contraceptive combination of ethinylestradiol and drospirenone on lipid, carbohydrate and coagulation profiles. **Contraception**, v.81, n.2, p.102-106, 2010.

MAMEDE, L.C.; CAETANO, B.L.; ROCHA, L.A.; FERREIRA, E.M.; CESTARI, A., KFURI, C.R.; CIUFFI, K.J.; CALEFI, P.S.; MELLO, C.; CUNHA, W.R.; NASSAR, E.J. Comportamento térmico de alguns fármacos e medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.27, n.2, p.151-155, 2006.

MANN, J.I.; VESSEY, M.P.; THOROGOOD, M.; DOLL, R. Myocardial infarction in young women with special reference to oral contraceptive practice. **British Medical Journal**, v.2, p.241-245, 1975.

MANSON, J.E.; HSIA, J.; JOHNSON, K.C.; ROSSOUW, J.E.; ASSAF, A.R.; LASSER, N.L.; TREVISAN, M.; BLACK, H.R.; HECKBERT, S.R.; DETRANO, R.; STRCKLAND, O.L.; WONG, N.D.; CROUSE, J.R.; STEIN, E.; CUSHMAN, M. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, v.349, p.523-534, 2003.

MARCHBANKS, P.A.; MCDONALD, J.A.; WILSON, H.G.; FOLGER, S.G.; MENDEL, M.G.; DARLING, J.R.; BERNSTEIN, L.; MALONE, K.E.; URSIN, G.; STROM, B.J.; NORMAN, S.A.; WEISS, L. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v.346, n.26, p.2025-2032, 2002.

MARTINDALE The complete drug reference. 36.ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p.2058-2979.

MARTINELLI, I.; SACCHI, E.; LANDI, G. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombina-gene mutation and in users of oral contraceptives. **New England Journal of Medicine**, v.338, n.25, p.1793-1797, 1998.

MERKATZ, R.B.; TOKAY, B.; SITRUK-WARE, R.L. Methods for female contraception: a model for innovation in drug delivery systems. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.85, n.5, p.553-557, 2009.

MODAN, B.M.D.; HAZTZE, P.; HIRSH-YECHEZKEL, G.; CHETRIT, A.; LUBIN, F.; BELLER, U.; BARUCH, G.B.; FISHMAN, A.; MENCZER, J.; STRUEWING, J.P.; TUCKER, M.A.; WACHOLDER, S. Parity, oral contraceptives, and the risk of ovarian câncer among carrier and noncarriess of a BRCA1 or BRCA2 mutation. **New England Journal of Medicine**, v.345, n.4, p.235-240, 2001.

NAROD, S.A.; DUBÉ, M.P.; KLIJN, J.; LUBISKI, J.; LYNCH, H.T.; GHADIRIAN, P.; PROVENCHER, D.; HEIMDAL, K.; MOLLER, P.; ROBSON, M.; OFFIT, K.; ISAACS, C.; WEBER, B.; FRIEDMAN, E.; BARUCH, R.G.; RENNERT, G.; PASINI, B.; WAGNER, T.; DALY, M.; GARBER, J.E.; NEUHAUSEN, S.L.; AINSWORTH, P.; OLSSON, H.; EVANS, G.; OSBORNE, M.; COUCH, F.; FOULKES, W.D.; WARNER, E.; SING, C.K.; OLOPADE, O.; TUNG, N.; SAAL, H.M.; WEITZEL, J.; MERAJVER, S.; VILLARS, M.G.; JERNSTROM, H.; SUN, P.; BRUNET, J.S. Oral contraceptives

and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Journal of the National Cancer Institute**, v.94, n.23, p.1773-1779, 2002.

NAROD, S.A.; RISCH, H.; MOSLEHIET, R.; DORUM, A.; NEUHAUSEN, S.; OLSSON, H.; PROVENCHER, D.; RADICE, P.; EVANS, G.; BISHOP, S.; BRUNET, J.S. Oral contraceptives and the risck of hereditary ovarian cancer. **New England Journal of Medicine**, v.339, n.7, p.424-428, 1998.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J.W.L.; GRECO, K.V.; MENEZES, F.G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, p.689-696, 2008.

OGA, S.; BASILE, A.C. **Medicamentos e suas interações**. São Paulo: Atheneu, 1994. p.131-141.

OLIVEIRA, M.A. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêutica na indústria farmacêutica. **Química Nova***,* v.34, n.7, p.1224-1230, 2011.

PAULINELLI, R.S.; FREITAS Jr., R.; CURADO, M.P.; SOUZA, A.A. A situação do câncer de mama em Goiás, no Brasil e no mundo: tendências atuais para a incidência e a mortalidade. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.3, n.1, p.17-24, 2003.

PEARLSTEIN, T.B.; BACHMANN, G.A.; ZACUR, H.A.; YONKERS, K.A. Treatment of premenstrual dysphoric disorder with a new drospirenone-containing oral contraceptive formulation. **Contraception**, v.72, p.414-421, 2005.

PEDRO, J.M. A experiência com contraceptivos no Brasil: uma questão de geração. **Revista Brasileira de História**, v.23, n.45, p.239-260, 2003.

PETITTI, D.B.; SIDNEY, S.; BERNSTEIN, A.; WOLF, S.; QUESENBERRY, C.; ZIEL, H.K. Stroke in users of low-dose oral contraceptives. **New England Journal of Medicine**, v.335, n.1, p.8-15, 1996.

PINHO, V.F.S.; COUTINHO, E.S.F. Risk factors for breast cancer: a systematic review of studies with female samples among the general population in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.2, p.351-360, 2005.

PINHO, V.F.S.; COUTINHO, E.S.F. Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.5, p.1061-1069, 2007.

PRADAD, G.R.; BABU, P.S.; RAMANA, M.V. Validated RP-HPLC method for the estimation of drospirenone in formulation. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v.2, p.1341-1345, 2011. Disponível em: http://www.ijrpbsonline.com/files/RS00062.pdf. Acesso em: 21. ago. 2012.

PRIOR, J.C.; KIRKLAND, S.A.; JOSEPH, L.; KREIGER, N.; MURRAY, T.M.; HANLEY, D.A.; ADACHI, J.D.; VIGNA, Y.M., BERGER, C.; BLONDEAU, L.; JACKSON, S.A., TENENHOUSE, A. Oral contraceptive use and bone mineral density in premenopausal women: cross-sectional, population-based data from the

canadian multicentre osteoporosis study. **Canadian Medical Association Journal**, v.165, n.8, p.1023-1029, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELLO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p.771-780, 2004.

ROSSI, J.Z.; JEANNOT, E.; NHIEU, J.T.V.; SCOAZEC, Y.; GUETTIER, C.; REBOUISSOU, S.; BACQ, Y.; LETEURTRE, E.; PARADIS, V.; FABRE, M.; MELLOTTEE, L.; LAURENT, C.; PATENSKY, C.; CASTAING, D.; ZAFRANI, E.S.; PUIG, P.L.; BALABAUD, C.; BIOULAC-SAGE, P. Genotype – phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. **Hepatology**, v.43, n.3, p.515-524, 2009.

SANCHEZ, E.G.; HELGI, J.C.; YÉPES, L.M.; HERMÁNDEZ-ABAD, V.; Relevancia del polimorfismo en el área farmacéutica. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.2, p.57-76, 2007.

SANTORO, M.I.R.M.; KASSAB, N.M.; HASEGAWA, M.; HACKMANN, E.R.M.K. Determination of steroid hormones in oral contraceptives by high-performance liquid chromatography. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.28, n.6, p.741-747, 2002.

SANTORO, M.I.R.M.; PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; HACKMANN, E.R.M.K. Eletroforese capilar: teoria e aplicação na análise de medicamentos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.36, n.1, p.97-110, 2000.

SANTOS, M.C.S.; REBELO, A.C.S.; ZUTTIN, R.S.; CESAR, M.C.; CATAI, A.M. Influência do uso de contraceptivos orais nos níveis lipídicos e nas respostas cardiorrespiratórias de mulheres saudáveis e sedentárias. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.12, n.3, p.188-194, 2008.

SCHWARTZ, S.M.; SISCOVICK, D.S.; LONGSTRETH, W.T.; PSATY, B.M.; BEVERLY, R.K.; RAGHUNATHAN, T.E., LIN, D.; KOEPSELL, T.D. Use of low-dose oral contraceptives and stroke in young women. **Annals of Internal Medicine**, v.127, n.8, p.596-603, 1997.

SHILDKRAUT, J.M.; CALINGAERT, B., MARCHBANKS, A.; MOORMAN, P.G.; RODRIGUES, G.C. Impact of progestin and estrogen potency in oral contraceptives on ovarian cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v.94, n.1, p.32-38, 2002.

SHOU, W.Z.; JIANG, X.; NAIDONG, W. Development and validation of a high-sensitivity liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method with chemical derivatization for the determination of ethinyl estradiol in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v.18, p.414-421, 2004.

SILVA, C.A. **Estudos fundamentais e aplicações envolvendo hormônios esteróides por meio de eletroforese capilar**. São Paulo, 2007. 171p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SILVA, E.C.; PAOLA, M.V.R.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.3, p.347-356, 2007.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, E.R.; ROLIM, P.J.N. Modelo de avaliação de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v.30, n.2, p.129-135, 2009.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SMITH, J.S.; GREEN, J.; GONZALEZ, A.; APPLEBY, P.; PLUMMER, M.; FRANCESCHI, S.; BERAL, V. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. **Lancet**, v.361, p.1159-1167, 2003.

SOUZA, F.R.; MEIRA, A.L.T.; COSTA, A.L.C. Associação de antibióticos e contraceptivos orais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.4, n.3, p.221-225, 2005.

STEINER, M. Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder: guidelines for management. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v.25, n.5, p.459-468, 2000.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.32-65. (Ciências farmacêuticas)

TACEY, L.R.; HARMAN, W.J.; KELLY, L.L. Development of a highly sensitive and specific assay for plasma ethinylestradiol using combined extraction, liquid chromatography and radioimmunoassay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.12, n.10, p.1303-1310, 1994.

TAN, J.K.L.; DEGREEF, H. Oral contraceptives in the treatment of acne. **Skin Therapy Letter**, v.6, n.5, p.1-8, 2001.

TANIS, B.C.; SPITER, W.O.; HEINEMAN, N.L.A.J.; MACRAE, K.D.; BRUPPACHER, R. Oral contraceptives and risk of myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v.345, p.1787-1793, 2001.

TAO, L.C. Oral contraceptive-associated liver cell adenoma and hepatocellular carcinoma cytomorphology. **Cancer**, v.68, p.941-947, 1991.

TESSARO, S.; BERIA, J.U.; TOMASI, E.; BARROS, A.J.D. Contraceptivos orais e câncer de mama estudo de casos e controle. **Revista de Saúde Pública**, v.35, n.1, p.32-38, 2001.

UNITED States Pharmacopeia: 34; The National Formulary: 29. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011. p.2651, 2771.

VAN VLOTEN, W.A.; VAN HASELEN, C.W.; VAN ZUUREN, E.J.; GERLINGER, C.; HEITHECKER, R. The effect of two combined oral contraceptives containing either drospirenone or cyproterone acetate on acne and seborrhea. **Cutis**, v.69, n.4, p.2-15, 2002.

VANDENBROUCKE, J.P.; KOSTER, T.; BRIET, 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**, v.344, p.1453-1457, 1994.

VRBÍKOVA, J.; CIBULA, D. Combined oral contraceptives in the treatment of polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction Update**, v.11, n.3, p.277-291, 2005.

WEIDERPASS, E.; ADAMI, H.O.; BARON, J.A.; MAGNUSSON, C.; LINDGREN, A.; PERSSON, I. Use of oral contraceptives and endometrial cancer risk (Sweden). **Cancer, Causes and Control**, v.10, n.4, p.277-284, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Reproductive Health and Research. **Medical eligibility criteria for contraceptives use**. 3.ed. Geneva: WHO Department of Reproductive Health and Research, 2004. 1v.

YASMIN: drospírenona etínílestradíol: comprimido revestido. Responsável técnico Paulo Camossa. São Paulo: Schering do Brasil, s.d. [Bula de remédio]. Disponível em: http://www.bayerpharma.com.br/Site/fosAdm/UI/Publicador/VisualizarArquivo.aspx?arquivoId=4d17886e-9484-4773-93f3-c25330bcf461. Acesso em: 23 set. 2009.

YONKERS, K.A.; BOWN, C.; PEARLSTEIN, T.B.; FOEGH, M.; LANDERS, C.S.; RAPKIN, A. Efficacy of a new low-dose oral contraceptive with drospirenone in premenstrual dysphoric disorder. **Obstretrics & Gynecology**, v.106, n.3, p.492-501, 2005.

ZEHDEN, B.S.; BOSCHITSCH, E. User experience with an oral contraceptive containing ethinylestradiol 30 µg and drospirenone 3 mg (Yasmin) in clinical practice. **Treatments in Endocrinology**, v.5, n.4, p.251-256, 2006.

9. ANEXOS