UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêutico

Desenvolvimento de metodologias indicativas de
estabilidade para medicamentos utilizados como diuréticos

Aline de Souza

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêutico

Desenvolvimento de metodologias indicativas de
estabilidade para medicamentos utilizados como diuréticos

Aline de Souza

Versão Original

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo

2015

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

Souza, Aline de
S237d Desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade
para medicamentos utilizados como diuréticos / Aline de Souza.
-- São Paulo, 2015.
121p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria

1. Cromatografia líquida de alta pressão : Análise
química : Farmacologia 2. Eletroforese capilar de zona
I. T. II. Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria, orientador.

615.19015 CDD

Aline de Souza

Desenvolvimento de metodologia indicativa de estabilidade
para medicamentos utilizados como diuréticos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dr^a. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann
orientador/presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015.

**"Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor"**

Fernando Pessoa - Mar Português

***À Deus que até aqui me ajudou. Me
capacitando e me direcionando
neste projeto***

***A meus pais por todo apoio e
amor incondicional e por
serem exemplos para
minha vida.***

***A minha irmã, Gabi, por ser
minha amiga e sempre me
encorajar.***

***Ao meu irmão, Vitor, pelos
momentos alegres e pelo
carinho.***

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar e me dar entendimentos para ultrapassar obstáculos

À meus pais por sempre apoiarem meus sonhos.

À meus irmãos, Gabi e Vitor, por todo amor, carinho e incentivo

Às minhas amigas Aline, Raquel e Priscila pelo incentivo.

À Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann pela orientação, ensinamentos e constantes incentivos para a realização deste trabalho

À Profa. Maria Segunda Aurora-Prado pela ajuda, convívio e contribuição ao meu trabalho

Aos atuais e antigos colegas do laboratório: Laura, Andrea, Claudia, Marcela, Grazielle, Elenice, Antônio, Adriana, Carol, Isabel , Aline e Verônica obrigada pela amizade, companhia e auxílio.

Aos professores Humberto Gomes Ferraz e Felipe Rebelo Lourenço pela colaboração em etapas importantes do estudo.

Aos técnicos de laboratório Adriana, Leandro e Charles pelas informações e auxílio.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos, Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro, Prof Dr Jorge Luiz Seferin Martins e funcionária Íria Raimunda da Silva, muito obrigada.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e realização deste trabalho.

À todos os meus amigos e familiares, muito obrigada.

À todas as pessoas que fizeram parte da minha vida e de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, meu eterno agradecimento.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS	19
RESUMO.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. JUSTIFICATIVA	25
3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA.....	26
3.1 MÉTODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE:.....	26
3.1.1 <i>Geração da Amostra</i>	26
3.1.1.1 Hidrólise	28
3.1.1.2 Oxidação	28
3.1.1.3. Degradação Térmica	29
3.1.1.4. Degradação por fotólise	29
3.1.2. <i>Desenvolvimento de metodologia</i>	30
3.1.3. <i>Validação de metodologia</i>	31
3.2 DIURÉTICOS.....	32
3.2.1 <i>Classificação dos diuréticos</i>	34
3.2.1.1 Inibidores da Anidrase Carbônica	34
3.2.1.2 Diuréticos Osmóticos.....	35
3.2.1.3 Inibidores do simporte de Na^+ - K^+ - 2Cl^- (diuréticos de alça; diuréticos de alto limiar).....	35
3.2.1.4 Inibidores do simporte de Na^+ - Cl^- (diuréticos tiazídicos e semelhantes aos tiazídicos)	36
3.2.1.5 Inibidores dos canais de Na^+ do epitélio renal (diuréticos poupadores de K^+)	36
3.2.1.6 Antagonistas dos receptores mineralocorticoides (antagonistas da aldosterona; diuréticos poupadores de K^+)	37
3.2.1.7 Furosemida	37
3.2.1.8 Hidroclorotiazida.....	39

3.3	TÉCNICAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS DE ESTABILIDADE	40
3.3.1	<i>Eletroforese Capilar (CE)</i>	40
3.3.1.1	Instrumentação	41
3.3.1.2	Fluxo Eletrosmótico	42
3.3.1.3	Classificação da eletroforese capilar	42
3.3.1.4	Vantagens e Limitações	45
3.3.2	<i>Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	47
3.3.2.1	Instrumentação	48
3.3.2.2	Princípios de Separação	49
3.3.2.3	Vantagens e limitações	52
4.	OBJETIVOS	53
4.1	OBJETIVO GERAL	53
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
5.	MATERIAL E MÉTODOS	54
5.1	MATERIAL	54
5.1.1	<i>Amostras</i>	54
5.1.2	<i>Placebo</i>	54
5.1.3	<i>Solventes e reagentes:</i>	54
5.1.4	<i>Soluções e tampões</i>	55
5.1.5	<i>Equipamentos</i>	55
5.1.6	<i>Consumíveis</i>	56
5.2	MÉTODOS	56
5.2.1	<i>Caracterização do padrão</i>	56
5.2.1.1	Temperatura de fusão	56
5.2.1.2	Espectrometria de absorção na região do Infravermelho	57
5.2.1.3	Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta	57
5.2.1.4	Calorimetria exploratória diferencial	57
5.2.1.5	Análise por termogravimetria	57
5.2.2	<i>Desenvolvimento de metodologia analítica</i>	58
5.2.2.1	Eletroforese capilar	58
5.2.2.1.1	Eletrólito	58
5.2.2.1.2	Preparo das amostras	58

5.2.2.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	59
5.2.2.2.1	Preparo das amostras	60
5.2.2.2.2	Fase móvel.....	60
5.2.3	<i>Degradação forçada</i>	61
5.2.3.1	Degradação por hidrólise	61
5.2.3.2	Degradação por hidrólise ácida.....	62
5.2.3.3	Degradação por hidrólise alcalina	62
5.2.3.4	Degradação por oxidação	63
5.2.3.5	Degradação por termólise	63
5.2.3.6	Degradação por Fotólise	64
5.2.4	<i>Validação de metodologia analítica</i>	65
5.2.4.1	Eletroforese capilar.....	65
5.2.4.1.1	Condições cromatográficas	65
5.2.4.1.2	Especificidade	65
5.2.4.1.3	Linearidade.....	66
5.2.4.1.1	Limite de detecção e Limite de quantificação	67
5.2.4.1.2	Precisão do sistema	68
5.2.4.1.3	Precisão intermediária.....	68
5.2.4.1.4	Repetibilidade.....	68
5.2.4.1.5	Exatidão	68
5.2.4.1.6	Robustez	69
5.2.4.2	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	70
5.2.4.2.1	Condições cromatográficas	70
5.2.4.2.2	Especificidade	70
5.2.4.2.3	Linearidade.....	71
5.2.4.2.1	Limite de detecção e Limite de quantificação	72
5.2.4.2.2	Precisão sistema	72
5.2.4.2.3	Precisão intermediária.....	72
5.2.4.2.4	Repetibilidade.....	73
5.2.4.2.5	Exatidão	73
5.2.4.2.6	Robustez	74
5.2.4.2.7	Adequabilidade do sistema (System Suitability)	74
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75

6.1	CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA FUROSEMIDA.....	75
6.1.1	<i>Temperatura de fusão</i>	75
6.1.2	<i>Espectrofotometria no ultravioleta (UV):</i>	75
6.1.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV):</i>	76
6.1.4	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC):</i>	77
6.1.5	<i>Análise por termogravimetria</i>	78
6.2	ELETROFORESE CAPILAR	79
6.2.1	<i>Desenvolvimento de metodologia analítica</i>	79
6.2.1.1	Degradação forçada da furosemida	80
6.2.1.1	Padrão interno	83
6.2.1.2	Eletrólito	85
6.2.2	<i>Validação de metodologia analítica por eletroforese capilar</i>	87
6.2.2.1	Especificidade	87
6.2.2.2	Linearidade.....	95
6.2.2.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	95
6.2.2.4	Precisão do Sistema.....	97
6.2.2.5	Precisão intermediária.....	97
6.2.2.6	Repetibilidade.....	97
6.2.2.7	Exatidão	98
6.2.2.8	Robustez	98
6.2.2.9	Adequabilidade do sistema (System Suitability)	99
6.3	CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	100
6.3.1	<i>Desenvolvimento de metodologia analítica</i>	100
6.3.2	<i>Validação de metodologia analítica por HPLC</i>	103
6.3.2.1	Especificidade	103
6.3.2.2	Linearidade.....	109
6.3.2.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	110
6.3.2.4	Precisão do Sistema.....	111
6.3.2.5	Precisão intermediária.....	111
6.3.2.6	Repetibilidade.....	112
6.3.2.7	Exatidão	112
6.3.2.8	Robustez	113
6.3.2.9	Adequabilidade do sistema (System Suitability)	114

6.4	COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS DE FSCE E HPLC PARA A QUANTIFICAÇÃO DE FUROSEMIDA	114
7.	CONCLUSÃO	116
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

LISTA DE ABREVIATURAS

a	Intercepto da curva
ACN	Acetonitrila
Anvisa	Agencia nacional de vigilância sanitária
b	Inclinação da curva
CE	Eletroforese capilar
CEC	Eletrocromatografia capilar
CGE	Eletroforese capilar em gel
CIEF	Eletroforese por focalizaçãoisoelétrica
CITP	Esotacoforese capilar
di	Diâmetro interno do capilar
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FDA	Food and Drug Administration
FEO	Fluxo eletroosmótico
FSCE	Eletroforese capilar em solução livre
FUR	Furosemida
HID	Hidroclorotiazida
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	International Conference on Harmonization
IFA	Insumo farmacêutico ativo
IR	Infravermelho
k	Fator de capacidade
LD	Limite de detecção

LQ	Limite de quantificação
lux	Unidade de medida de iluminamento
MECK	Cromatografia capilar eletrocinético micelar
MEECK	Cromatografia capilar eletrocinético micelar por microemulsão
N	Número de pratos teóricos
Pd	Produto de degradação (em FSCE)
PD	Produto de degradação (em HPLC)
PI	Ponto isoelétrico
R	Resolução
TBS	Tetraborato de sódio
TGA	Termogravimetria
Tr	Tempo de retenção
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** O néfron. BC, Cápsula de Bowman; G, glomérulo; PCT, túbulo contorcido proximal; PST, túbulo reto proximal; DHL, ramo descendente da alça de Henle; TALH, ramo espesso ascendente da alça de Henle; DCT, túbulo contorcido distal; CD, ducto coletor. (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1982) 34
- Figura 2:** Estrutura química da Furosemida 38
- Figura 3:** Estrutura química da hidroclorotiazida 39
- Figura 4:** Diagrama esquemático do sistema CE. R1 e R2 são os recipientes contendo solução eletrolítica onde se encontram os eletrodos (e1 e e2) conectados à fonte de potência (F). 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 (ν) e um detector (D) acoplado a um computador (C). No retângulo é mostrado o registro temporal dos sinais (GERVASIO et al., 2003). 41
- Figura 5:** Representação esquemática do fluxo eletroosmótico em FSCE (QUEIROZ; JARDIM, 2001). 42
- Figura 6:** Representação de um equipamento de HPLC (CZAPLICKI, 2013) . 49
- Figura 7:** Espectro de absorção na região UV para a furosemida 5,0 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,1M 76
- Figura 8:** Espectro de absorção da furosemida na região do infravermelho (IV). 76
- Figura 9:** Curva DSC da furosemida obtida no intervalo de 50 a 400°C, razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de 50,0ml/min. 78
- Figura 10:** Curva TGA da furosemida obtida no intervalo de 0 a 800°C, razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de 50,0ml/min 78
- Figura 11:** Estrutura química e ionização da furosemida (“Chemicalize.org”, 2015)..... 79
- Figura 12:** Eletroferograma da degradação forçada da Furosemida em diferentes meios degradantes Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20mmol/L, metanol 20%, pH 9,3; tensão 20kV; temperatura de 25°C; detecção UV a 273nm e injeção por pressão 0,5psi/8s. 81
- Figura 13:** Esquema da degradação de furosemida em meio ácido (Adaptado de BUNDGAARD; NØRGAARD; NIELSEN, 1988) 82

Figura 14: Eletroferograma da furosemida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) e hidroclorotiazida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$). Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20mmolL^{-1} , metanol 20%, pH 9,3; tensão 20kV; temperatura de 25°C ; detecção UV a 273nm e injeção por pressão 0,5psi/8s..... 84

Figura 15: Eletroferograma da furosemida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) e hidroclorotiazida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) com diferentes concentrações de TBS, metanol e diferentes voltagens. A) 20mM TBS, 20% MeOH, 20kV; B) 20mM TBS, 20% MeOH e 25kV; C) 20mM TBS, 10% MeOH e 20kV; D) 20mM TBS, 10% MeOH e 25kV. 85

Figura 16: Eletroferograma da furosemida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) e hidroclorotiazida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) com diferentes concentrações de TBS, metanol e diferentes voltagens. A) 30mM TBS, 20% MeOH, 20kV; B) 30mM TBS, 20% MeOH e 25kV; C) 30mM TBS, 10% MeOH e 25kV; D) 30mM TBS, 10% MeOH e 20kV 86

Figura 17: Eletroferograma do padrão de furosemida ($100,0\mu\text{g mL}^{-1}$), adicionada do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0\mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0\text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 μm i.d; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm. Picos: HID e FUR. 87

Figura 18: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0\mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0\text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 μm d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm. 88

Figura 19: Eletroferograma da solução padrão de furosemida ($100,0\mu\text{g mL}^{-1}$) exposto á degradação forçada neutra, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0\mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0\text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 μm d.i; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm. Picos: HID e FUR. 88

Figura 20: Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0\mu\text{g mL}^{-1}$) exposta a degradação forçada neutra, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0\mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0\text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 μm d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm. Picos: HID e FUR. 88

Figura 21: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0\mu\text{g mL}^{-1}$) exposto a degradação forçada neutra. Condições: eletrólito contendo $20,0\text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 μm d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura:

- 25°C. Detecção UV em 273 nm. 89
- Figura 22:** Eletroferograma do padrão de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) expostos à degradação forçada ácida, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID, FUR e Pd1..... 89
- Figura 23:** Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta a degradação forçada ácida, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por 5 s ; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID, FUR e Pd1..... 89
- Figura 24:** Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto a degradação forçada ácida. Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm 90
- Figura 25:** Eletroferograma do padrão de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto à degradação forçada básica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR..... 90
- Figura 26:** Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta a degradação forçada básica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR. 90
- Figura 27:** Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto a degradação forçada básica. Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm 91
- Figura 28:** Eletroferograma do padrão de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto à degradação forçada oxidativa, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol}$

L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 µm d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 2735 nm. Picos: Pd2, HID, FUR, Pd3 e Pd4..... 91

Figura 29: Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida (100,0 µg mL⁻¹) exposta a degradação forçada oxidativa, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida (100,0 µg mL⁻¹). Condições: eletrólito contendo 20,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 µm d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 273 nm. Picos: Pd2, HID, FUR, Pd3 e Pd4. 91

Figura 30: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida (100,0 µg mL⁻¹) exposto a degradação forçada oxidativa. Condições: eletrólito contendo 20,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 µm d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 273 nm. 92

Figura 31: Eletroferograma do padrão de furosemida (100,0 µg mL⁻¹) exposto à degradação forçada térmica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida (100,0 µg mL⁻¹). Condições: eletrólito contendo 20,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 µm d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 273 nm. Picos: HID e FUR..... 92

Figura 32: Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida (100,0 µg mL⁻¹) exposta a degradação forçada térmica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida (100,0 µg mL⁻¹). Condições: eletrólito contendo 20,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 µm d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 273 nm. Picos: HID e FUR. 92

Figura 33: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida (100,0 µg mL⁻¹) exposto a degradação forçada térmica. Condições: eletrólito contendo 20,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 µm d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 273 nm. 93

Figura 34: Eletroferograma do padrão de furosemida (100,0 µg mL⁻¹) exposto à degradação forçada fotolítica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida (100,0 µg mL⁻¹). Condições: eletrólito contendo 20,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50,0 µm d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 273 nm. Picos: HID e FUR..... 93

- Figura 35:** Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta a degradação forçada fotolítica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m d.i.}$; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR. 93
- Figura 36:** Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto a degradação forçada fotolítica. Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m d.i.}$; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm 94
- Figura 37:** Curva analítica da solução padrão de furosemida na faixa de $70,0$ a $130,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando FSCE 96
- Figura 38:** Esquema do resíduo da furosemida..... 97
- Figura 39:** Cromatograma furosemida obtido com: A) ACN: água acidificada com ácido fórmico $0,1\%$ $30:70 \text{ v/v}$; B) ACN: tampão água acidificada com ácido fórmico $0,1\%$ $50:50 \text{ v/v}$; C) ACN: tampão água acidificada com ácido fórmico $0,1\%$ $70:30 \text{ v/v}$ 101
- Figura 40:** Cromatograma da determinação do padrão de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), fase móvel constituída por água:acetonitrila ($50:50 \text{ v/v}$) com ácido fosfórico $0,1\%$. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, $20,0 \mu\text{l}$ de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm . Pico: FUR 102
- Figura 41:** Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), fase móvel constituída por água:acetonitrila ($50:50 \text{ v/v}$) com ácido fosfórico $0,1\%$. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, $20,0 \mu\text{l}$ de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm 103
- Figura 42:** Cromatograma do padrão de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta à degradação forçada neutra. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), fase móvel constituída por água:acetonitrila ($50:50 \text{ v/v}$) com ácido fosfórico $0,1\%$. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, $20,0 \mu\text{l}$ de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm . Pico: FUR..... 103
- Figura 43:** Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta à degradação forçada neutra. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), fase móvel constituída por água:acetonitrila ($50:50 \text{ v/v}$) com ácido fosfórico $0,1\%$. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, $20,0 \mu\text{l}$ de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm . Pico: FUR 104

- Figura 44:** Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida exposto à degradação forçada neutra. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm..... 104
- Figura 45:** Cromatograma do padrão de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposto à degradação forçada ácida. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Picos: PD1 e FUR..... 104
- Figura 46:** Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposta à degradação forçada ácida. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Picos: PD1 e FUR. 105
- Figura 47:** Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida exposto à degradação forçada ácida. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. 105
- Figura 48:** Cromatograma do padrão de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposto à degradação forçada básica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR..... 105
- Figura 49:** Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposta à degradação forçada básica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR..... 106
- Figura 50:** Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida exposto à degradação forçada básica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm..... 106
- Figura 51:** Cromatograma do padrão de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposto à degradação forçada oxidativa. Condições: Coluna Shim-pack CLC-

ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Picos: PD2, PD3, PD4 e FUR 106

Figura 52: Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposta à degradação forçada oxidativa. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Picos: PD2, PD3, PD4 e FUR 107

Figura 53: Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida exposto à degradação forçada oxidativa. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm..... 107

Figura 54: Cromatograma do padrão de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposto à degradação forçada térmica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR..... 107

Figura 55: Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposta à degradação forçada térmica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR..... 108

Figura 56: Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida exposto à degradação forçada térmica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm..... 108

Figura 57: Cromatograma do padrão de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposta à degradação forçada fotólise. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR..... 108

Figura 58: Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposta à degradação forçada fotólise. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo

de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR..... 109

Figura 59: Curva analítica da furosemida por HPLC. 111

Figura 60: Esquema do resíduo da furosemida..... 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos testes, segundo a sua finalidade:.....	31
Tabela 2: Ensaios necessários para validação de métodos analíticos, segundo sua finalidade:	32
Tabela 3: Vantagens e desvantagens do CE em relação à cromatografia Líquida (HPLC) (Adaptado de PICO; RODRIGUEZ; MANES, 2003).	46
Tabela 4: Eletrólitos para FSCE.	58
Tabela 5: Fases móvel utilizadas no desenvolvimento do método analítico para HPLC.....	61
Tabela 6: Preparo de soluções para o teste de linearidade.....	67
Tabela 7: Procedimento experimental para teste de exatidão em método de FSCE.....	69
Tabela 8: Variações empregadas no teste de robustez para FSCE.	70
Tabela 9: Preparo de soluções para o teste de linearidade.....	72
Tabela 10: Procedimento experimental para teste de exatidão em método de HPLC.....	73
Tabela 11: Variações empregadas no teste de robustez para HPLC.	74
Tabela 12: Comprimentos de onda teórico e experimental dos padrões de furosemida.....	75
Tabela 13: Bandas do espectro de absorção da furosemida.....	77
Tabela 14: Condições empregadas no teste de estresse.....	81
Tabela 15: Substâncias analisadas para padrão interno em FSCE.....	83
Tabela 16: Resultados obtidos empregando FSCE após condições de estresse da furosemida.....	94
Tabela 17: Resultados Obtidos em curvas analíticas da furosemida	96
Tabela 18: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método por FSCE.....	97
Tabela 19: Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por FSCE.....	98
Tabela 20: Resultados obtidos nos testes de robustez com variação no tempo	

de injeção, proporção de metanol no eletrólito e voltagem para a determinação de furosemida por FSCE em comparação com condição inicial	99
Tabela 21: Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema para FSCE.	100
Tabela 22: Resultados obtidos empregando HPLC após condições de estresse da furosemida.....	109
Tabela 23: Resultados obtidos em curvas analíticas da furosemida	110
Tabela 24: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método por HPLC.....	112
Tabela 25: Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por HPLC.....	113
Tabela 26: Resultados obtidos nos testes de robustez com variação no fluxo, proporção de acetonitrila na fase móvel e temperatura para a determinação de furosemida por HPLC em comparação com condição inicial.	113
Tabela 27: Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema para HPLC.	114
Tabela 28: Parâmetros estatísticos e estudo comparativo entre FSCE e HPLC, para a determinação de furosemida, concentração 40,0 mg/cp....	115

Resumo

SOUZA, A. **Desenvolvimento de metodologia indicativa de estabilidade para medicamentos utilizados como diuréticos.** 2015. 121f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os diuréticos aumentam o fluxo urinário e a excreção de sódio e são utilizados para ajustar o volume e/ou a composição dos líquidos corporais em uma variedade de situações clínicas. A furosemida é um agente diurético potente que induz uma poderosa diurese. É utilizada no tratamento de edema associado com o coração e doenças renais. Nesta pesquisa objetivou-se desenvolver métodos indicativos de estabilidade para a furosemida, por eletroforese capilar em solução livre (FSCE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método por FSCE utilizou um capilar de sílica fundida com comprimento total de 30,2 cm x 50,0 μm d.i. O tampão utilizado foi tetraborato de sódio 2,0 mmol L^{-1} e 10% de metanol, injeção hidrodinâmica 0,5 psi/5s, tensão aplicada +25 kV, detecção em 273 nm e temperatura a 25°C. O tempo de migração da furosemida foi de 1,8 minutos. O método obteve boa linearidade no intervalo de 70,0 a 130,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com coeficiente de correlação maior de 0,99. Os limites de detecção e de quantificação foram 6,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 20,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A precisão do sistema foi inferior a 2,0%. A repetibilidade e precisão intermediária foram inferiores a 5,0%. A recuperação média foi de 102,1 %. No teste de especificidade, foram detectados três potenciais produtos de degradação com os seguintes tempos de retenção 1,3 2,0 e 2,2 min. O método por CLAE utilizou uma coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250mm x4.6mm, 5 μm). A fase móvel era constituída de acetonitrila:água (50:50) com 0,1% de ácido fórmico. O fluxo foi de 1.0 mL min^{-1} e detecção em 273 nm e temperatura a 30 $\pm$ 1 °C. O método apresentou boa linearidade nas concentrações entre 7,0 e 13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; com coeficiente de correlação maior de 0,99. E tempo de retenção para furosemida foi de 4,9 minutos. Os limites de detecção e de quantificação foram 0,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A precisão do sistema foi inferior a 1,0%. A repetibilidade e precisão intermediária foram inferiores a 3,0%. A recuperação média foi de 105,1 %. No teste de especificidade, foram detectados três potenciais produtos de degradação com os seguintes tempos de retenção 2,4, 3,1 e 3,8 min.

Palavras chaves: método indicativo de estabilidade, cromatografia líquida, eletroforese capilar, degradação forçada, produtos de degradação.

Abstract

SOUZA, A. **Development of stability-indicating assay for diuretics drugs.** 2015. 121 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Diuretics increase urine flow and sodium excretion and are used to adjust volume and / or composition of body fluids in a variety of clinical situations. Furosemide is a potent diuretic agent that induces a strong diuresis. It is used in the treatment of edema associated with heart and kidney disease. This research aimed to develop stability indicative methods for furosemide, by capillary electrophoresis in free solution (FSCE) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The method FSCE used a fused silica capillary with a total length of 30.2 cm x 50.0 μm di The buffer used was sodium tetraborate 2.0 mmol L^{-1} and 10% methanol, hydrodynamic injection 0.5 psi / 5s, +25 kV applied voltage, detection at 273 nm and 25 ° C. The furosemide migration time was 1.8 minutes. The method achieved good linearity in the range of 70.0 to 130.0 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ with correlation coefficient higher of 0.99. The limits of detection and quantification were 6.2 and 20.6 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, respectively. The system accuracy was less than 2.0%. The repeatability and intermediate precision were less than 5.0%. The average recovery was 102.1%. The specificity test detected three potential degradation products with the following retention times 1.3, 2.0 and 2.2 min. The HPLC method used a Shim-pack CLC-ODS (M) [®] column (250mm x 4.6mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile: water (50:50) with 0.1% formic acid. The flow rate was 1.0 mL min^{-1} , detection at 273 nm and temperature at 30 $\pm$ 1°C. The method showed good linearity in concentrations between 7.0 and 13.0 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$; with correlation coefficient higher of 0.99. Retention time for furosemide was 4.9 minutes. The limits of detection and quantification were 0.6 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ and 1.9 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, respectively. The system accuracy was less than 1.0%. The repeatability and intermediate precision were less than 3.0%. The average recovery was 105.1%. The specificity test detected three potential degradation products of the following retention times of 2.4, 3.1 and 3.8 min.

Key words: stability indicating method, liquid chromatography, capillary electrophoresis, forced degradation, the degradation products.

1. Introdução

Um método indicativo de estabilidade é um procedimento analítico quantitativo validado capaz de detectar as mudanças, com o tempo, nas propriedades pertinentes das substâncias ativas e seus produtos. Um método indicativo de estabilidade mede precisamente as substâncias ativas, sem a interferência de produtos de degradação e excipientes. As agências reguladoras recomendam a utilização do método indicativo de estabilidade para estudos de estabilidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; FDA, 2014).

O desenvolvimento do método indicativo de estabilidade envolve três etapas: a geração da amostra, onde a molécula será estressada para forçar a degradação; o desenvolvimento da metodologia indicativa de estabilidade; e por último, a validação do método indicativo de estabilidade. (SWARTZ; KRULL, 2005).

O ensaio de estresse permite identificar os prováveis produtos de degradação, dando subsídio ao estabelecimento da via de degradação e a estabilidade intrínseca da molécula (ICH, 2003).

Após a geração da amostra um método analítico deve ser desenvolvido envolvendo alguns fatores como: fase móvel, fase estacionária, uso de tampões e diversos pH. A seletividade e a especificidade são dois parâmetros importantes. Segundo a Farmacopeia Americana a avaliação da especificidade deve envolver pureza do pico baseado na detecção UV/visível por arranjo de diodo (DAD) e/ou por detecção por espectrometria de massas (MS) (SWARTZ; KRULL, 2005).

Diferentes métodos têm diferentes requerimentos quando se trata de validação. A Farmacopeia Americana (USP, 2014) reconhece quatro categorias e define as características de desempenho analítico que devem ser medidos para validar cada tipo de método. O método indicativo de estabilidade é incluído na categoria 2, procedimentos analíticos para determinação de impurezas em fármacos a granel ou compostos de degradação em produtos farmacêuticos acabados (SWARTZ; KRULL, 2005; USP, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

As empresas responsáveis pelo desenvolvimento e fabricação de medicamentos realizam normalmente os testes e estudos constantes em farmacopeias. E poucas monografias citam a análise de produtos de degradação e poucos fabricantes conhecem metodologias validadas para detecção e quantificação destes produtos.

A “International Conference on Harmonization” (ICH) e Food Drug Administration (FDA) colocam como diretriz a necessidade de desenvolver metodologias indicativas de estabilidade (FDA, 2014; ICH Q1A (R2), 2003). Além disso, a Farmacopeia Americana em seu capítulo: “Estudos de Estabilidade durante a Fabricação” recomenda que as amostras retiradas durante o processo de fabricação devem ser analisadas por métodos quantitativos indicativos de estabilidade (USP, 2014).

A Anvisa na RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), por meio do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" recomenda a validação de métodos analíticos com análise de produtos de degradação e impurezas. A RDC nº 58 de 20 de dezembro de 2013, estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

3.1 Métodos Indicativos de Estabilidade:

O método indicativo de estabilidade é um método que é utilizado para a análise da estabilidade de amostras na indústria farmacêutica. Com o advento dos guias do ICH a exigência do estabelecimento de método indicativo de estabilidade tornou-se mais claramente ordenado. As orientações exigem a realização de estudos de degradação forçada sob uma variedade de condições, como pH, luz, oxidação, calor seco, etc, e a separação do fármaco a partir de produtos de degradação (ICH, 2003).

Segundo o guia do ICH Q1A “Testes de Estabilidade para novos Medicamentos e Produtos” a análise dessas características deve ser feita por método indicativo de estabilidade validado (BAKSHI; SINGH, 2002).

O desenvolvimento do método indicativo de estabilidade envolve três etapas: a geração da amostra, onde a molécula será estressada para forçar a degradação; o desenvolvimento da metodologia indicativa de estabilidade; e por último, a validação do método indicativo de estabilidade (SWARTZ; KRULL, 2005).

Segundo o ICH Q1A (R2) o ensaio de estresse é realizado em um único lote do fármaco e deve incluir o efeito da temperatura, umidade, oxidação e fotólise. O teste deve também avaliar a susceptibilidade do fármaco a hidrólise numa vasta gama de pH quando em solução ou suspensão (ICH, 2003).

3.1.1 Geração da Amostra

O teste de degradação forçada ou estresse é realizado para demonstrar a especificidade no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, principalmente quando há pouca informação disponível sobre potenciais produtos de degradação. Estes estudos também fornecem informações sobre as vias de degradação e produtos de degradação que

poderiam se formar durante o armazenamento. Estudos de degradação forçada podem ajudar a facilitar o desenvolvimento farmacêutico, tais como em áreas de desenvolvimento de formulação, fabricação e embalagem, em que o conhecimento do comportamento químico pode ser usado para melhorar um medicamento (REYNOLDS et al., 2002)

As orientações das agências reguladoras fornecem pouca informação sobre as estratégias e princípios para a realização de estudos de degradação forçada, incluindo problemas de fármacos pouco solúveis e compostos excepcionalmente estáveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; ICH, 2003; REYNOLDS et al., 2002).

O protocolo experimental para estudos de degradação de novos fármacos e medicamentos, idealmente, resulta em amostras que foram degradadas em aproximadamente 10%, ou foram exposta a uma quantidade de energia que excede ligeiramente a fornecida sob condições aceleradas de armazenamento (por exemplo, 40°C durante 6 meses) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; REYNOLDS et al., 2002).

Estudos de degradação forçada devem ser realizados sempre que um estudo indicativo de estabilidade for requerido. Estudos de degradação forçada devem ser realizados na formulação única antes do início estudos formais de estabilidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

Segundo a RDC nº58 de 20 de dezembro de 2013 o estudo de degradação forçada deve ser conduzidos em um lote, em escala laboratorial, piloto ou industrial do medicamento e para fins de comparação a execução do estudo deve ser feita também com a formulação, com o placebo e no insumo farmacêutico ativo isolado e associado no caso de associações em dose fixa. Além disso, o estudo de degradação forçada deve ser realizado em todas as concentrações do medicamento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

O estudo de degradação forçada deve submeter a amostra as seguintes condições: aquecimento; umidade; solução ácida; solução básica; solução oxidante; exposição fotolítica; e íons metálicos (AGÊNCIA NACIONAL

DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

3.1.1.1 Hidrólise

A água é considerada como um dos principais catalisadores em reações de degradação. Muitos fármacos são considerados como instáveis nesse meio e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia, sua estabilidade e a da forma farmacêutica final não sejam comprometidas. Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação (ALLEN Jr; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Ensaio de estresse ácido ou básico envolve a degradação forçada de uma substância por exposição a condições ácidas ou básicas, que geram produtos de degradação primária em gama desejável. A seleção do tipo e concentração de ácido ou de base depende da estabilidade da substância medicamentosa. Ácido clorídrico ou ácido sulfúrico (0,1-1 M) para hidrólise ácida e o hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio (0,1-1M) para hidrólise básica, são reagentes sugeridos adequados para hidrólise (ALSANTE et al., 2007; BAKSHI; SINGH, 2002; BLESSY et al., 2014).

3.1.1.2 Oxidação

Reações de oxidação são um dos dois mais comuns mecanismos de degradação de fármacos. As reações de degradação oxidativa de fármacos são normalmente de auto-oxidação, ou seja, a reação é iniciada por um radical iniciador. Reações com radical iniciador começam com a fase de iniciação, envolvendo a formação de radicais, seguida pela fase de propagação e eventualmente a fase terminal. Assim, a reação cinética frequentemente segue uma curva em forma de S quando a “degradação x tempo” é plotada em gráfico (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

Peróxido de hidrogênio é amplamente utilizado para oxidação de fármacos em estudo de degradações forçadas, mas outros agentes oxidantes,

como íons metálicos, oxigênios e radicais iniciadores, também podem ser usados. A seleção de agentes oxidantes, suas concentrações e condições dependem do fármaco utilizado (ALSANTE et al., 2007; BLESSY et al., 2014).

3.1.1.3. Degradação Térmica

Degradação térmica consiste na degradação causada por exposição a temperaturas altas, o suficiente para induzir a quebra de ligações, conhecida como pirólise (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

Segundo o ICH a temperatura utilizada para testes de estresse deve ser maior em 10°C do que as utilizadas em estudo de estabilidade acelerada (ICH, 2003).

A análise térmica possibilita uma ampla faixa de aplicação para medidas de propriedades físicas, como: estudo de reações químicas, avaliação da estabilidade térmica, determinação da composição de materiais e desenvolvimento de metodologia analítica (FARIA et al., 2002; SILVA et al., 2009).

3.1.1.4. Degradação por fotólise

A reação de fotólise é iniciada após absorção de radiação eletromagnética pelo insumo farmacêutico ativo (IFA). A maioria das substâncias ativas apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético. A radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo a degradação da molécula. Desta forma, é importante conhecer a fotoestabilidade das substâncias ativas e seus produtos de degradação obtidos a partir de fotólise, e avaliar a toxicidade destes últimos (MORIWAKI et al., 2008).

A degradação por fotólise é a degradação que resulta de exposição a luz ultravioleta ou visível no intervalo de comprimento de onda de aproximadamente 300 a 800nm (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

Segundo as recomendações para os testes de fotoestabilidade descritos pelo ICH (ICH, 1996), as amostras de substância do fármaco e

sólido/medicamento líquido devem ser expostas a um mínimo de 1,2 milhões de lux horas e 200Wh/m² luz (BLESSY et al., 2014).

O ICH descreve dois tipos de fontes de luz para o teste de foto estabilidade: Para a opção 1 utiliza-se qualquer fonte de luz que é projetada para produzir uma saída similar a um padrão de emissão D65 / ID65, como uma lâmpada fluorescente que combina luz visível e ultravioleta (UV), xenon, ou lâmpadas de iodetos metálicos. D65 é o padrão internacional para a luz do dia ao ar livre reconhecida pela norma ISO 10977 (1993). ID65 é o equivalente ao padrão de luz do dia indireto e interno, com radiação menor que 320nm.

Para a opção 2, a mesma amostra deve ser exposta tanto a luz fluorescente branca fria quanto lâmpada ultravioleta. Uma lâmpada fluorescente branca fria deve ser projetada para produzir uma saída semelhante ao especificado na norma ISO 10977 (1993); e uma lâmpada fluorescente UV com uma distribuição espectral de 320 nm a 400 nm com uma emissão máxima de energia entre 350 nm e 370 nm.

3.1.2 Desenvolvimento de metodologia

Antes de iniciar o desenvolvimento do método, várias propriedades físico-químicas, como valor da constante de dissociação (pKa), coeficiente de partilha óleo-água (log P), solubilidade e a intensidade de absorção na região UV do medicamento devem ser conhecidos, pois estabelecem uma base para o desenvolvimento do método cromatográfico. Log P e solubilidade permitem selecionar a fase móvel e solvente da amostra, enquanto o valor pKa auxilia na determinação do pH da fase móvel (BAKSHI; SINGH, 2002).

Após submetido ao estresse, o composto de origem pode gerar amostras contendo produtos de degradação, podendo ser usadas para desenvolvimento de procedimentos analíticos adequados. É importante notar que os produtos de degradação gerados nas amostras submetidos ao estresse podem ser classificados como “potenciais” produtos de degradação, as quais podem ser formados sob condições relevantes de armazenamento (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

3.1.3 Validação de metodologia

Diferentes métodos têm diferentes requerimentos quando se trata de validação. A Farmacopeia dos Estados Unidos reconhece quatro categorias (Tabela 1) e define as características de desempenho analítico que devem ser medidas para validar cada tipo de método (Tabela 2). O método indicativo de estabilidade é incluído na categoria 2, procedimentos analíticos para determinação de impurezas em fármacos a granel ou compostos de degradação em produtos farmacêuticos acabados (USP, 2014).

Tabela 1: Classificação dos testes, segundo a sua finalidade:

Categoria	Finalidade do Teste
I	Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matéria-prima.
II	Testes quantitativos ou ensaios limites para determinação de impurezas ou produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matéria-prima
III	Testes de desempenho (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Tabela 2: Ensaios necessários para validação de métodos analíticos, segundo sua finalidade:

Parâmetro	Categori a I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão /Repetitividade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário dependendo da natureza do teste específico

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

3.2 Diuréticos.

Os antigos empregavam como diuréticos preparados herbáceos contendo óleos voláteis. Extrato de chá e café também foram usados com esta finalidade. Em 1884, Koschlakoff identificou a cafeína como sendo o componente diurético ativo do café. Em 1902, Minkowski descobriu a atividade diurética da teofilina (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1982).

O efeito diurético dos compostos organometálicos foi descoberto, 1919, por acaso. Vogl empregou o merbafeno para tratar um paciente sifilítico e observou o efeito diurético deste fármaco. A ação catalítica da anidrase carbônica foi descrita em 1930 e sua inibição pela sulfanilamida, observada pela primeira vez, em 1949. Após esta descoberta inúmeras sulfanilamidas derivadas foram descobertas e estudadas. Como por exemplo a acetazolamida em 1954; a clortalidona, em 1959, a furosemida, em 1962 (KOROLKOVAS;

BURCKHALTER, 1982).

As benzotíazidas foram produto inesperado do estudo sistemático de inibidores da anidrase carbônica. O primeiro membro desta nova classe de diuréticos foi a clorotiazida, obtida em 1957, por Novello e Sprague. Em breve surgiam outros benzotiazídicos: hidroclorotiazida, em 1958, por Stevens e colaboradores; hidroflumetiazida, em 1959; quinetazona, em 1960, por Cohen e colaboradores (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1982).

Considerando que a aldosterona, hormônio do córtex adrenal, apresenta acentuadas propriedades de reter sódio por promover a reabsorção de Na^+ , iniciou-se no fim da década de 1950 a investigação sistemática de antagonistas e inibidores da aldosterona, mediante modificação da molécula do hormônio. Esta pesquisa culminou na introdução, em 1962, da espironolactona, diurético cuja constituição química é muito semelhante à da aldosterona (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1982).

Os diuréticos aumentam o fluxo urinário e a excreção de sódio e são utilizados para ajustar o volume e/ou a composição dos líquidos corporais em uma variedade de situações clínicas. Os diuréticos clinicamente úteis além de aumentar a velocidade de fluxo de urina aumentam a taxa de excreção do Na^+ (natriurese) e do ânion associado, em geral Cl^- . O NaCl no organismo é o principal determinante do volume de líquido extracelular, e as aplicações clínicas dos diuréticos visam, em sua maioria, à redução do volume de líquido extracelular ao diminuir o conteúdo de NaCl (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

Os diuréticos são utilizados em dois importantes estados, edema e hipertensão. Mas também são usados no tratamento em numerosos outros estados incluindo aumento craniano (trauma ou cirurgia) ou aumento intraocular (glaucoma), aumento da pressão (diuréticos osmóticos), diabetes insipidus (tiazídicos), hipercalcemia (diuréticos de alça), doença das alturas (inibidores da anidrase carbônica), hiperaldosteromismo primário (i.e. antagonistas da aldosterona) e osteoporose (tiazídicos) (FOYE; LEMKE; WILLIAMS, 2008).

3.2.1 Classificação dos diuréticos

Na Figura 1 abaixo é possível verificar um néfron e os locais de ação de cada um dos tipos de diuréticos elucidados até hoje.

Figura 1: O néfron. BC, Cápsula de Bowman; G, glomérulo; PCT, túbulo contorcido proximal; PST, túbulo reto proximal; DHL, ramo descendente da alça de Henle; TALH, ramo espesso ascendente da alça de Henle; DCT, túbulo contorcido distal; CD, ducto coletor. (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1982)

3.2.1.1 Inibidores da Anidrase Carbônica

Quando a sulfanilamida foi introduzida como agente quimioterápico, constatou-se a ocorrência de acidose metabólica como efeito colateral. Essa observação levou à realização de estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstraram ser a sulfanilamida um inibidor da anidrase carbônica. Posteriormente, um enorme número de sulfanilamidas foi sintetizado e testado quanto à sua capacidade de inibir a anidrase carbônica; desses compostos, a acetazolamida foi o mais intensamente estudado. A anidrase carbônica é responsável pela reabsorção de NaHCO_3 e secreção de ácido. Assim, a inibição de anidrase carbônica está associada a uma rápida elevação da excreção urinária de HCO_3^- para cerca de 35% da carga filtrada (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

Apesar de a acetazolamida ser utilizada no tratamento de edema, a eficácia dos inibidores da anidrase carbônica como agentes isolados é baixa, e os inibidores da anidrase carbônica não são amplamente utilizados neste

aspecto (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

3.2.1.2 Diuréticos Osmóticos

Os diuréticos osmóticos são agentes livremente filtrados no glomérulo, que sofrem reabsorção limitada pelo túbulo renal e são relativamente inertes do ponto de vista farmacológico. Ao extraírem água dos compartimentos intracelulares, expandem o volume líquido extracelular, diminuem a viscosidade do sangue e inibem a liberação de renina (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

Os diuréticos osmóticos aumentam a excreção urinária de quase todos os eletrólitos, incluindo Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , e fosfato (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

3.2.1.3 Inibidores do simporte de Na^+ - K^+ - 2Cl^- (diuréticos de alça; diuréticos de alto limiar)

Os inibidores do simporte de Na^+ - K^+ - 2Cl^- formam um grupo de diuréticos que tem em comum a capacidade de bloquear o simportador Na^+ - K^+ - 2Cl^- no ramo ascendente espesso da alça de Henle; por isso, esses diuréticos são também conhecidos como *diuréticos de alça* (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

Os inibidores do simporte de Na^+ - K^+ - 2Cl^- constituem um grupo de fármacos quimicamente diversos. A furosemida, a bumetamina, a azosemida, a piretamida e a tripamida contêm um componente sulfonamida, enquanto o ácido etacrínico é um derivado do ácido fenoxiacético (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

Devido ao bloqueio do simportador de Na^+ - K^+ - 2Cl^- , os diuréticos de alça provocam acentuado aumento na excreção urinária de Na^+ e Cl^- (i.e., até 25% da carga filtrada de Na^+). A abolição da diferença de potencial transpitelial também resulta em notáveis aumentos na excreção de Ca^{2+} e Mg^{2+} (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

3.2.1.4 Inibidores do simporte de Na^+ - Cl^- (diuréticos tiazídicos e semelhantes aos tiazídicos)

Ao contrário dos inibidores da anidrase carbônica, que aumentam primariamente a excreção de NaHCO_3 , foi constatado que os benzotiadiazídicos aumentam predominantemente a excreção de NaCl , um efeito independente da inibição da anidrase carbônica (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

Como os inibidores originais do simporte de Na^+ - Cl^- eram derivados da benzotiadiazina, essa classe de diuréticos tornou-se conhecida como diuréticos tiazídicos. Subsequentemente, foram desenvolvidos agentes farmacologicamente semelhantes aos diuréticos tiazídicos, mas que não eram tiazidas. Esses fármacos são denominados diuréticos semelhantes aos tiazídicos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

Os diuréticos tiazídicos são utilizados no tratamento do edema associado a cardiopatia (insuficiência cardíaca congestiva), hepatopatia (cirrose hepática) e de doença renal (síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, glomerulonefrite aguda) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

3.2.1.5 Inibidores dos canais de Na^+ do epitélio renal (diuréticos poupadores de K^+)

O triantereno e a amilorida são os únicos dois fármacos dessa classe de uso clínico. Ambos provocam pequenos aumentos na excreção de NaCl e, em geral, são utilizados pelas suas ações anticaluréticas para compensar os efeitos de outros diuréticos que aumentam a excreção de K^+ . São frequentemente classificados como diuréticos poupadores de potássio (K^+) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

Como a porção final do túbulo distal e do ducto coletor tem uma capacidade limitada de reabsorver solutos, o bloqueio de canais de Na^+ nessa parte do néfron resulta em ligeiro aumento nas taxas de excreção de Na^+ e Cl^- (cerca de 2% da carga filtrada). Assim, a natriurese leve provocada por esses fármacos faz com que eles raramente sejam utilizados como fármacos únicos

no tratamento do edema ou da hipertensão (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

3.2.1.6 Antagonistas dos receptores mineralocorticoides (antagonistas da aldosterona; diuréticos poupadores de K⁺)

Os mineralocorticóides provocam retenção de sal e de água e aumentam a excreção de K⁺ e H⁺ através de sua ligação a receptores de mineralocorticoides específicos. A espironolactona, constitui o único membro dessa classe disponível nos EUA (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

Os efeitos da espironolactona na excreção urinária são muito semelhantes aos induzidos por inibidores dos canais de Na⁺ do epitélio renal. Entretanto, ao contrário dos inibidores dos canais de Na⁺, a eficácia clínica da espironolactona é uma função dos níveis endógenos de aldosterona. Quanto mais elevados os níveis endógenos de aldosterona, maiores os efeitos da espironolactona na excreção urinária (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

Tal como outros diuréticos poupadores de K⁺, a espironolactona é frequentemente administrada junto com diuréticos tiazídicos ou de alça no tratamento do edema ou da hipertensão (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2006).

3.2.1.7 Furosemida

A furosemida é um diurético inibidor do simporte de Na⁺- K⁺- 2Cl⁻. Quimicamente é o ácido 5-(aminosulfonil)-4-cloro-2-[(furanilmetil)amino] benzóico. Sua fórmula molecular é C₁₂H₁₁ClN₂O₅S com massa molecular de 330,75g/mol, possui faixa de fusão em 206°C e pKa de 4,25, 9,83 e 16,96 (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010; “Chemicalize.org”, 2015; O’NEIL, 2013).

Figura 2: Estrutura química da Furosemida

A furosemida é um dos medicamentos diuréticos mais potentes e eficazes disponíveis. Exerce a sua ação na alça de Henle, que é uma porção do néfron, e que regula o balanço de água e sódio do organismo; na verdade, furosemida induz uma perda total de cloreto de sódio e água (HEIDARIMOGHADAM; FARMANY, 2016). Este composto foi originalmente usado como um agente antibacteriano. Mas recentemente suas propriedades diuréticas fizeram da furosemida um medicamento útil para o tratamento de hipertensão e a retenção de líquidos (edema) em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, doença hepática e disfunção renal, tais como a síndrome nefrótica. A furosemida é também um agente comum encontrado em exames de doping no esporte (KOR; ZAREI, 2016).

A furosemida é identificada em preparações farmacêuticas utilizando espectrofotometria no UV/VIS (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010; VALLADÃO; IONASHIRO; ZUANON NETTO, 2008; DIAS; OLIVEIRA NETO; MARTINS, 2004; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2014), espectrofotometria no infravermelho (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2014) e colorimetria (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2014). Para doseamento as seguintes técnicas são utilizadas: espectrofotometria no UV/VIS (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), titulometria (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2014), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010; DIAS; OLIVEIRA NETO; MARTINS, 2004; USP, 2014) métodos potenciométricos (DIAS; OLIVEIRA NETO; MARTINS, 2004).

Tem como impurezas os seguintes produtos: ácido 2-cloro-4-[(furano-2-ilmetil)amino]-5-sulfamoilbenzóico; ácido 2,4-dicloro-5-sulfamoilbenzóico; ácido 2-amino-4-cloro-5-sulfamoilbenzóico; ácido 2,4-

bis[(furano-2-ilmetil)amino]-5-sulfamoilbenzóico; ácido 2,4-diclorobenzóico (BRITISH PHARMACOPEIA, 2010; BUNDGAARD; NØRGAARD; NIELSEN, 1988; CARDA-BROCH; ESTEVE-ROMERO; GARCIA-ALVAREZ-COQUE, 2000; FIORI et al., 2003; MIZUMA; BENET; LIN, 1998).

3.2.1.8 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida é um diurético inibidor do simporte de Na^+ - K^+ . Quimicamente é 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiodiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido. Sua fórmula molecular é $\text{C}_7\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}_2$ com massa molecular de 297,74g/mol (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 3: Estrutura química da hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida é identificada em preparações farmacêuticas utilizando espectrofotometria em UV/VIS (BRITISH PHARMACOPEIA, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2014), espectrofotometria no infravermelho (BRITISH PHARMACOPEIA, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2014), cromatografia em camada delgada (CCD) (BRITISH PHARMACOPEIA, 2010; VALLADÃO; IONASHIRO; ZUANON NETTO, 2008; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) e colorimetria (BRITISH PHARMACOPEIA, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Para doseamento utiliza-se as seguintes técnicas: titulometria em meio aquoso (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV (BRITISH PHARMACOPEIA, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2014) e espectrofotometria em UV. (VALLADÃO; IONASHIRO; ZUANON NETTO, 2008; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Tem com impurezas os seguintes produtos: clorotiazida; 4-amino-6-

clorobenzeno-1,3-disulfonamida (salamida), 6-cloro-N-[(6-cloro-7-sulfamoil-2,3-dihidro-4H-1,2,4-benzotiadiazina-4-il-1,1-dióxido)metil]-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010).

3.3 Técnicas utilizadas no desenvolvimento de metodologias analíticas de estabilidade

Para o presente trabalho foram escolhidas as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Eletroforese Capilar (CE) por serem atualmente as técnicas mais utilizadas.

3.3.1 Eletroforese Capilar (CE)

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação em fase líquida que se baseia na migração diferencial de espécies iônicas ou ionizáveis quando as mesmas são submetidas a um campo elétrico. Essa técnica de separação para as amostras de tamanho macro foi desenvolvida inicialmente por Arne Tiselius, um químico sueco, nos anos 1930, para o estudo de proteínas do soro sanguíneo, que ganhou o Prêmio Nobel por esse trabalho (SKOOG et al., 2006; TAVARES, 1996).

No início dos anos 1980, os cientistas começaram a verificar a viabilidade de realizar separações com microamostras em tubos capilares de sílica fundida. Seus resultados mostraram-se promissores em termos de resolução, velocidade e potencial para automação. Em consequência, a CE tornou-se uma ferramenta importante para a solução de ampla variedade de problemas analíticos envolvendo separações (SKOOG et al., 2006).

O rápido avanço da eletroforese capilar decorre, em parte, da simplicidade instrumental, mas principalmente da variedade dos modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna capilar e da diversidade dos compostos passíveis de análise em cada modo (TAVARES, 1997).

3.3.1.1 Instrumentação

Como mostrado na Figura 4, a instrumentação para a eletroforese capilar é simples. Um capilar de sílica fundida preenchido com um tampão, tipicamente com um diâmetro interno entre 10 e 100 μm e com comprimento de 40 a 100 cm, é estendido entre dois reservatórios de tampão que também contêm eletrodos de platina. A introdução da amostra é realizada em uma das extremidades e a detecção na outra. Um potencial de 5 a 30 kV é aplicado entre os eletrodos (ALTRIA, 1996; SKOOG et al., 2006).

A injeção de amostra, na eletroforese capilar, pode ser feita por: injeção hidrodinâmica e eletrocinética. Na injeção hidrodinâmica utiliza-se uma gradiente de pressão, é feita aplicando-se pressão pela introdução de um gás inerte no reservatório contendo a amostra ou pela aplicação de vácuo no reservatório que contém a solução tampão na outra extremidade do capilar. A injeção por sifonagem é feita pelo deslocamento de líquido provocado pela diferença de altura dos reservatórios de amostra e tampão. Na injeção eletrocinética um gradiente de alta tensão é aplicado na amostra durante um curto período de injeção, é feita pela aplicação de um potencial, geralmente entre 5 e 15 kV, por alguns segundos (ALTRIA, 1996; SANTOS; TAVARES; RUBIM, 2000).

Figura 4: Diagrama esquemático do sistema CE. R1 e R2 são os recipientes contendo solução eletrolítica onde se encontram os eletrodos (e1 e e2) conectados à fonte de potência (F). 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 (ν) e um detector (D) acoplado a um computador (C). No retângulo é mostrado o registro temporal dos sinais (GERVASIO et al., 2003).

3.3.1.2 Fluxo Eletrosmótico

Uma característica particular da eletroforese capilar consiste no fluxo eletrosmótico (FEO). Quando uma alta voltagem é aplicada por meio de um capilar de sílica fundida contendo uma solução tampão, um FEO é geralmente produzido, causando uma migração do solvente em direção ao cátodo (SKOOG et al., 2006).

Como mostrado na Figura 5, a causa do FEO é a dupla camada elétrica que se desenvolve na interface sílica/solução. A valores de pH maiores que 3, a parede interna do capilar de sílica encontra-se carregada negativamente em virtude da ionização dos grupos silanóis (Si-OH) da sua superfície. Para contrabalancear as cargas da parede, há na região próxima a esta, o excesso de cargas positivas, provenientes dos cátions da solução. Os cátions na camada difusa externa à dupla camada são atraídos para o cátodo, ou eletrodo negativo, e uma vez que estão solvatados arrastam o solvente com eles. A eletrosmose leva a um fluxo líquido da solução com um perfil plano através do tubo porque o fluxo origina-se em suas paredes. Esse perfil contrasta com o perfil laminar (parabólico) observado em fluxos gerados por pressão encontrados na HPLC. Visto que o perfil é essencialmente plano, o fluxo eletrosmótico não contribui significativamente para o alargamento de banda, como o fluxo gerado por pressão o faz em cromatografia líquida (ALTRIA, 1996; SKOOG et al., 2006).

Figura 5: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico em FSCE (QUEIROZ; JARDIM, 2001).

3.3.1.3 Classificação da eletroforese capilar

A eletroforese capilar é classificada de acordo com o modo de

separação. Esses modos são os seguintes: Eletroforese capilar de zona (FSCE) que compreende a eletroforese capilar em solução livre (FSCE), a cromatografia capilar eletrocinética micelar (MECK), cromatografia capilar eletrocinética micelar por microemulsão (MEEK), eletroforese capilar em gel (CGE), eletrocromatografia capilar (CEC). Outros métodos também utilizados são: a eletroforese por focalização isoeletrica capilar (CIEF) e isotacoforese capilar (CITP).

- *Eletroforese capilar em solução livre*

A separação de íons é a forma mais simples de CE e é denominada eletroforese capilar em solução livre (FSCE). Muitos compostos podem ser separados rapidamente e facilmente por esta técnica. A separação em FSCE é baseada nas diferenças nas mobilidades eletroforéticas resultantes das diferentes velocidades de migrações de espécies iônicas no tampão, contido dentro do capilar. (QUEIROZ; JARDIM, 2001).

A mobilidade eletrosmótica (μ_{FEO}) do tampão é dada pela equação:

$$\mu_{FEO} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta}$$

Equação 1

Onde ε é a constante dielétrica do tampão, ζ é o potencial zeta e o η é a viscosidade do tampão (BAKER, 1995).

As moléculas são separadas de acordo com o tamanho e o número de agrupamentos ionizáveis. Sendo a mobilidade eletrosmótica dependente somente das características do tampão, isto é, da constante dielétrica, viscosidade, pH e concentração (que influencia o potencial zeta), sendo independente da tensão aplicada. Na FSCE espécies neutras não são separadas, porém permite a separação de cátions e ânions na mesma corrida (BAKER, 1995; QUEIROZ; JARDIM, 2001).

- *Cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC)*

A limitação primária dos métodos eletroforéticos em solução livre é a impossibilidade de separar compostos neutros, a menos que existam diferenças significativas de massa molecular. Em geral, compostos neutros migram no capilar por ação exclusiva do FEO (QUEIROZ; JARDIM, 2001).

Nesta nova versão, agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de micelas (acima da concentração micelar crítica), são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando assim um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletroosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, ou pseudo-estacionária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletroosmose. A partição diferenciada de solutos neutros entre estas duas fases é responsável pela seletividade da separação (QUEIROZ; JARDIM, 2001; TAVARES, 1997)

- *Cromatografia capilar eletrocinética micelar por microemulsão (MEEKC)*

A cromatografia eletrocinética micelar por microemulsão é um caso especial da cromatografia eletrocinética, no qual uma microemulsão é empregada como fase dispersa (SILVA et al., 2007). Tem sido relatada como sendo útil na separação de uma gama de solutos hidrofóbicos. O princípio de separação é semelhante ao de cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) em micelas de SDS que são geralmente utilizados para formar uma fase de pseudo-soluções eletrolíticas em pH elevado (ALTRIA, 1999).

- *Eletroforese capilar em gel (CGE)*

Este tipo de CE tem sido utilizada na separação de compostos de caráter iônicos e de alta massa molecular. Para este formato, redes poliméricas estão presentes ao longo do capilar e os compostos são mais ou menos impedidos em seu percurso, de acordo com seu tamanho. Consequentemente, este processo de separação é comumente conhecido como "peneiramento". É particularmente adequado para a separação de biomacromoléculas que

consistem em diversas unidades de repetição de carga, como o DNA, por exemplo (TAVARES, 1997).

- *Eletrocromatografia capilar (CEC)*

È um tipo de cromatografia líquida em que o capilar é preenchido com o material de empacotamento de HPLC e a aplicação de uma voltagem resulta num bombeamento através do FEO da fase móvel através do capilar. O tempo de retenção é determinado pela combinação da migração eletroforética e da retenção cromatográfica (ALTRIA, 1996; SILVA et al., 2007)

- *Eletroforese por focalização isoeétrica capilar (CIEF)*

Técnica eletroforética para separação de analitos anfóteros de acordo com seu ponto isoeletrico, através da aplicação de um campo elétrico ao longo de um gradiente de pH gerado no capilar (SILVA et al., 2007).

Compostos anfóteros possuem em sua estrutura grupos funcionais com caráter ácido e básico. A protonação e/ou dissociação destes grupos é responsável pela variação da carga efetiva da molécula em função do pH e, portanto, o pH do meio governa a magnitude da mobilidade eletroforética. Compostos deste tipo são caracterizados por um ponto isoeletrico (PI), que corresponde ao valor de pH em que a carga efetiva do composto é nula (TAVARES, 1997).

3.3.1.4 Vantagens e Limitações

Há várias vantagens comerciais e de eficiência que a CE tem a oferecer sobre a HPLC. Entre elas estão incluídos: o reduzido tempo gasto para o desenvolvimento de métodos, proporcionado pelas facilidades de mudanças das condições operacionais; a alta eficiência na separação de análise de solutos que possuem limitações na absorção de raios UV. Entretanto suas maiores desvantagens estão principalmente relacionadas ao instrumento, como a baixa precisão na injeção e na sensibilidade, quando

comparado ao HPLC (MARCHI et al., 2007).

Um comparativo entre as técnicas de Eletroforese Capilar e Cromatografia Líquida é demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3: Vantagens e desvantagens do CE em relação à cromatografia Líquida (HPLC) (Adaptado de PICO; RODRIGUEZ; MANES, 2003).

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Soluções
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> - Permite a análise de compostos orgânicos, mesmo os termoinstáveis; - Maior flexibilidade para otimização das separações, por permitir a variação tanto da fase móvel quanto da fase estacionária; - Facilidade de automação e acoplamento a sistemas de preparo de amostras "online". 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor capacidade de separação; - Grande consumo de solventes orgânicos; - Elevado custo operacional (exige o uso de colunas e solventes caros de alta pureza) 	<ul style="list-style-type: none"> - Desenvolvimento de colunas analíticas mais eficientes e de menor tamanho, permitindo melhores separações e menor consumo de solventes.
CE	<ul style="list-style-type: none"> - Alta capacidade de separação; - Baixo consumo de solventes; - Menor necessidade de preparo de amostras 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa sensibilidade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Preparo de amostras com etapa de pré-concentração; - Uso de procedimentos eletroforéticos de pré-concentração "online"; - Utilização de detectores altamente seletivos (como os detectores de fluorescência induzida a laser ou espectrômetros de massas).

3.3.2 Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. Conhecer suas vantagens, limitações, componentes e os critérios de escolha entre as opções de equipamentos e acessórios disponíveis é uma obrigação dos profissionais de laboratórios químicos, farmacêuticos, bioquímicos e outros (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência é um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

As colunas cromatográficas são geralmente construídas de tubos de aço inoxidável. O tipo mais comum de recheio para a cromatografia líquida é preparado a partir de partículas de sílica, as quais são sintetizadas aglomerando-se partículas de sílica de tamanho submicrométrico sob condições que levam à formação de partículas maiores com diâmetros altamente uniformes. As partículas resultantes são geralmente recobertas com filmes orgânicos, os quais são quimicamente ou fisicamente ligados à superfície. Outros materiais de recheio incluem as partículas de alumina, de polímeros porosos e resinas de troca iônica (SKOOG et al., 2006)

Dois tipos de cromatografia por partição podem ser distinguidos com base nas polaridades relativas da fase estacionária e móvel. Na cromatografia de fase normal a fase estacionária é altamente polar como o trietileno glicol ou água e por isso utiliza-se como fase móvel solvente relativamente não-polar, como o hexano ou o éter i-propílico. Na cromatografia de fase reversa, a fase estacionária é não-polar, geralmente um hidrocarboneto, e a fase móvel corresponde a um solvente relativamente polar (como água, metanol, acetonitrila ou tetraidrofurano). (SKOOG et al., 2006)

Na cromatografia de fase normal, o componente menos polar é eluído primeiro; o aumento da polaridade da fase móvel diminui o tempo de eluição. Em contraste, na cromatografia de fase reversa, o componente mais polar elui primeiro e o aumento da polaridade da fase móvel eleva o tempo de eluição. (SKOOG et al., 2006)

Foi estimado que mais de três quartos de todas as separações feitas por HPLC são atualmente realizadas em fase reversa com recheios com fase ligada contendo octil ou octadecil siloxano (SKOOG et al., 2006)

3.3.2.1 Instrumentação

Conforme a Figura 6, o equipamento de HPLC é basicamente constituído de seis componentes. O reservatório de solventes (Reservoir) é o local onde se encontram os solventes da fase móvel que é impulsionada até a coluna cromatográfica por um sistema de bomba (Pump) composto de uma ou mais bombas de alta pressão. (SKOOG et al., 2006)

A coluna cromatográfica (HPLC column) é o local em que ocorre a separação da amostra, introduzida através de um injetor (Injector), localizado entre a bomba e a coluna. A composição do efluente que passa pela coluna gera sinais elétricos através de um detector (Detector) e esses sinais são compilados em um processador de dados (Data acquisition), um computador, que os transforma em um conjunto de picos conhecido como cromatograma (SKOOG et al., 2006)

Figura 6: Representação de um equipamento de HPLC (CZAPLICKI, 2013)

3.3.2.2 Princípios de Separação

A eficiência de uma coluna cromatográfica é usualmente medida pelo número de pratos (N), o qual é determinado diretamente do cromatograma por meio da relação entre o tempo de retenção de um composto e a largura de sua base (LANÇAS, 2011):

$$N = \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \times 16$$

Equação 2

Em que N é o número de pratos da coluna, uma medida da eficiência; t_R é o tempo de retenção do analito empregado na medida e w_b , a largura na base desse mesmo analito.

Apesar da simplicidade inequívoca deste enfoque, existem muitas críticas a ele, a começar pelo fato de que o número de pratos (eficiência) dependerá do composto escolhido e das condições analíticas, uma vez que o tempo de retenção e a largura variam para cada composto e também com as condições experimentais (LANÇAS, 2011).

Assim, podemos dizer que alguns parâmetros exercem bastante influência na eficiência de uma coluna como: o comprimento da coluna (L), o tamanho (diâmetro) e a distribuição das partículas da fase estacionária (LANÇAS, 2011).

Desde o surgimento da teoria dos pratos para cromatografia ficou bastante óbvio que a diminuição do tamanho das partículas seria o caminho natural para o aumento do número de pratos. Em sua versão original, van Deemter normalizou o cálculo da eficiência de uma coluna dividindo seu comprimento (L) pelo o número de pratos (N) resultado denominando de altura equivalente a um prato (H), ou seja (LANÇAS, 2011),

$$H = \frac{L}{N}$$

Equação 3

Essa proposta permitia então comparar colunas de diferentes comprimentos (L) e tamanhos de partículas (dp), uma vez que, independente dos detalhes, quanto menor o valor de H, maior será N e, portanto, a eficiência da coluna. Na forma original, van Deemter desenvolveu uma equação empírica em que associou o valor de H com vários parâmetros, agrupados na forma de constantes A, B e C (LANÇAS, 2011),

$$H = A + \left(\frac{B}{\mu}\right) + C\mu$$

Equação 4

Demonstrou também a dependência de N com a velocidade linear média da fase móvel (μ), ou seja,

$$\mu = \frac{L}{t_0}$$

Equação 5

em que μ é a velocidade linear média da fase móvel; L, o comprimento da coluna e t_0 , o tempo morto da coluna (tempo para eluir um composto pouco retido). O termo A depende de dois fatores principais: do quadrado do tamanho médio das partículas (dp) e do fator de empacotamento da coluna (f). (LANÇAS,

2011)

Para um dado soluto, o factor de retenção k (por vezes, referido como o fator capacidade k) é definido como a quantidade de soluto na fase estacionária (s), dividida pela quantidade na fase móvel (m). A quantidade de soluto em cada fase é igual à sua concentração (C_s ou C_m , respectivamente) vezes o volume da fase (V_s ou V_m , respectivamente), ou seja,

$$k = \frac{C_s V_s}{C_m V_m}$$

Equação 6

É preferível valores de k entre 1 e 10. Por isso, é importante ser capaz de estimar (ou calcular) valores de k para os diferentes picos num cromatograma. Um valor de t_0 pode muitas vezes ser obtido a partir de uma inspeção visual da porção inicial do cromatograma. (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010)

A resolução R_s é uma medida de habilidade de uma coluna em separar dois componentes e pode ser calculado pela equação 7,

$$R_s = \frac{2(t_{R(b)} - t_{R(a)})}{w_a + w_b}$$

Equação 7

Em que $t_{R(a)}$ é o tempo de retenção da espécie a que é menos fortemente retida, $t_{R(b)}$ é o tempo de retenção da espécie b mais fortemente retida, w_a é a largura da base do pico menos retido e w_b é a largura da base do pico mais retido.(SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

$$A_s = \frac{CB}{CA}$$

Equação 8

3.3.2.3 Vantagens e limitações

Principais vantagens:

- Tempo reduzido de análise, devido à alta eficiência da coluna e à vazão rápida da fase móvel através da coluna;
- Alta resolução, devido a possibilidade de se analisar misturas complexas;
- Boa análise qualitativa;
- Resultados quantitativos, devido a facilidade de execução e grande precisão, sendo comuns à maioria dos métodos de LC desvios relativos inferiores a 0,5%;
- Boa detectabilidade, pois permite detecção em nanogramas;
- Versatilidade, pois pode ser aplicada a amostras orgânicas ou inorgânicas, sólidas ou líquidas, iônicas ou covalentes;
- Mecanização ou automatização do sistema feita por microcomputadores acoplados ao cromatógrafo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Principais limitações:

- Alto custo da instrumentação, levando a alto investimento;
- Alto custo de operação, devido ao alto preço de fases móveis, que devem ter alto grau de pureza, e das fases estacionárias;
- Falta de um bom detector universal,
- Necessidade de experiência no seu manuseio (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O objetivo deste projeto é desenvolver método analítico indicativo de estabilidade para diuréticos.

4.2 Objetivos Específicos

- Submeter os diuréticos em estudo a condições de estresse para conseguir degradações forçadas destes
- Desenvolver métodos analíticos indicativos de estabilidade simples, rápidos e confiáveis para separar os produtos de degradação formados no estudo de estresse;
- Validar as metodologias analíticas indicativas de estabilidade segundo critérios do ICH, da ANVISA e da Farmacopeia Americana (USP) categoria 2;
- Comparar estatisticamente as metodologias analíticas utilizadas pelos testes estatísticos t e F .

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Amostras

A Furosemida foi fornecida pela Fundação do Remédio Popular (FURP) (lote 1072HJIIIX), 99,8%.

A amostra de comprimidos Furp-Furosemida 40mg lote 131378v08/15

A Hidroclorotiazida foi utilizada como padrão interno da sigma

5.1.2 Placebo

Para preparo do placebo utilizaram-se os mesmo excipientes da formulação comercial utilizada na validação da metodologia. A fórmula empregada na preparação do placebo de furosemida foi:

- Amido (15,0%)
- Amido glicolato de sódio (4,0%)
- Manitol (78,5%)
- Estearato de magnésio (2,5%)

5.1.3 Solventes e reagentes:

- acetonitrila grau HPLC (Merck),
- metanol grau HPLC (Merck),
- água (Purificada usando um sistema Millipore Q-Plus),
- pellets de hidróxido de sódio – grau analítico (Merck),
- tetraborato de sódio – grau analítico (Merck),
- ácido clorídrico – grau analítico (Merck),
- peróxido de hidrogênio – grau analítico (Merck).
- ácido fórmico – grau analítico (Merck).

5.1.4 Soluções e tampões

- *Solução tampão tetraborato de sódio (TBS) 100,0 mM:* 1,907 g de TBS foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 50,0 ml e dissolvidos com água Milli-Q.
- *Solução de hidróxido de sódio 1,0 M:* 2 g de hidróxido de sódio foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 50,0 mL e dissolvidos com água Milli-Q e filtrado em filtro de 0,45 μm
- *Solução de hidróxido de sódio 0,1 M:* Pipetou-se 10 mL de solução de hidróxido de sódio 1M em balão de 100,0 mL e completou-se o volume com água milli-Q.
- *Solução de ácido clorídrico 1,0 M:* Pipetou-se 8,4mL de solução de ácido clorídrico em balão de 50mL e completou-se com água milli-Q
- *Solução de ácido clorídrico 0,1M:* Pipetou-se 10 mL de solução de ácido clorídrico 1,0 M em balão de 100,0 mL e completou-se com água milli-Q.

5.1.5 Equipamentos

- Aparelho de determinação de Ponto de Fusão PF 1000 (GeHaka, São Paulo);
- aparelho de ultrassom- modelo T14 (Thorton, São Paulo, Brasil),
- Câmara de fotoestabilidade FARMA 424 (Nova Ética, São Paulo, Brasil)
- balança analítica Mettler modelo AB204 (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil);
- calorímetro diferencial de varredura DSC-60/60A (Shimadzu Corporation, Japan);
- equipamento de eletroforese capilar Beckman and Coulter P/ACE MDQ equipado com detector UV-Vis com arranjo de diodos, controlador de temperatura e software Karat[®] V.8.0;
- espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu Corporation, Japan);
- estufa Soc. Fabbe Ltda (Brasi);
- equipamento de HPLC Agilent 1100 Hewlett Packard com detector UV-

Vis, controlador de temperatura e software Open Lab – EZChrom Edition Version A.04.04

- espectrofotômetro de infravermelho VERTEX 70 Series FT-IR Spectrometers
- pHmêtro digital modelo PG1800 (Gehaka, Brasil),
- purificador de água MilliQ[®]-Plus, Millipore
- sistema de calorimetria exploratória diferencial modelo DSC-60 (Shimadzu Corporation, Japan).

5.1.6 Consumíveis

- coluna capilar de sílica fundida (PolymicroTechnologies, Phoenix, AZ), 50 µm diâmetro x 20 cm comprimento efetivo,
- coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250mm x 4.6mm, 5µm)
- filtros durapore 0,45 µm (Millipore Cat. No. GVWP 04700),

5.2 Métodos

5.2.1 Caracterização do padrão

O padrão (furosemida) foi submetido a testes preliminares de identificação e caracterização físico-química, com a finalidade de avaliar as condições de trabalho para uso com segurança nos procedimentos experimentais. A identificação foi realizada através da técnica de espectrofotometria de absorção nas regiões do infravermelho (IR) e do ultravioleta (UV), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise por termogravimetria (TGA).

5.2.1.1 Temperatura de fusão

A amostra de furosemida foi colocada em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada até cerca de 3,0 mm de altura em aparelho convencional de ponto de fusão. Começou-se a aquecer a uma razão de

5°C/min; quando a temperatura chegou a 10°C abaixo do início de fusão teórico da amostra, reduziu-se a velocidade de aquecimento a cerca de 1°C/min. A temperatura na qual a amostra funde sobre a parede do tubo é definida como o início da fusão e a temperatura na qual a amostra torna-se completamente líquida é definida como o final de fusão ou o ponto de fusão (USP, 2014).

5.2.1.2 Espectrometria de absorção na região do Infravermelho

O padrão foi disperso em pastilhas de brometo de potássio individualmente. Foram traçados espectros no IR das matérias primas na faixa de 2000 a 400 cm^{-1} , por refletância atenuada (USP, 2014).

5.2.1.3 Espectrometria de absorção na região do Ultravioleta

A identificação espectrofotométrica foi realizada mediante a espectroscopia no ultravioleta, realizando varredura de 200 a 600 nm. O espectro de absorção foi obtido mediante preparo de uma solução da furosemida na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,1M e depois foram comparados com os máximos de absorção descritos na literatura.

5.2.1.4 Calorimetria exploratória diferencial

A análise térmica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada utilizando-se o equipamento Shimadzu DSC-60/60A, equipado com analisador térmico TA-5 WS/PC. Cerca de 5 mg das amostras de furosemida foram acondicionadas em cadinho de alumínio selado, submetidas à taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL.min⁻¹).

5.2.1.5 Análise por termogravimetria

A curva de TGA foi realizada utilizando-se o equipamento termobalança TGA-50 Shimadzu. Cerca de 10 mg das amostras de furosemida foram acondicionadas em cadinho de platina, submetidas à taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e atmosfera dinâmica de oxigênio (50mL.min⁻¹).

5.2.2 Desenvolvimento de metodologia analítica

5.2.2.1 Eletroforese capilar

Para o desenvolvimento do método por FSCE foram conduzidos ensaios para seleção da melhor composição do eletrólito de corrida para otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais críticos para garantia da adequada resolução na separação do analito e de seus produtos de degradação.

5.2.2.1.1 Eletrólito

O eletrólito foi preparado em balão volumétrico de 10 ml. Com diferentes concentrações de TBS e metanol como mostrado na Tabela 4. O volume era sempre completado com água ultrapura Milli-Q e a solução, sonicada por 15 minutos e filtrado em filtro de 0,45 μm .

Tabela 4: Eletrólitos para FSCE.

Solução	Concentração de TBS	% de Metanol	pH
1	20mM	10%	9,2
2	20mM	20%	9,2
3	30mM	10%	9,2
4	30mM	20%	9,2
5	20mM	10%	9,3
6	20mM	20%	9,3
7	30mM	10%	9,3
8	30mM	20%	9,3

5.2.2.1.2 Preparo das amostras

- *Solução estoque de furosemida:* foram transferidos 100,0 mg de padrão de furosemida para um balão volumétrico de 50,0 mL e se completou o volume

com metanol (concentração final de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$).

- *Solução estoque de hidroclorotiazida*: foram transferidos 100,0 mg de padrão de hidroclorotiazida para um balão volumétrico de 50,0 mL e se completou a volume com metanol (concentração final de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$).
- *Solução estoque amostra*: foram transferidos 372,4 mg de amostra para um balão volumétrico de 50,0 mL e se completou a volume com metanol (concentração final de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$).
- *Solução estoque placebo*: foram transferidos 372,4 mg de placebo para um balão volumétrico de 50,0 mL e se completou a volume com metanol.
- *Solução de trabalho de furosemida*: foram transferidos 0,5 mL da solução estoque de furosemida para um balão de 10,0 mL. acrescentou-se 0,5mL hidroclorotiazida, como padrão interno e completou-se o volume com metanol 20% (concentração final de $100,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)
- *Solução de trabalho amostra*: 0,5 mL da solução estoque de furosemida para um balão de 10,0 mL. acrescentou-se 0,5 mL hidroclorotiazida, como padrão interno e completou-se o volume com metanol 20% (concentração final de $100,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)
- *Solução de trabalho de placebo*: 0,5 mL da solução estoque de furosemida para um balão de 10,0 mL e completou-se o volume com metanol 20% (concentração final de $100,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)

Todas as soluções foram sonicadas para permitir a dissolução e em seguida filtradas utilizando filtro de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$.

5.2.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para o desenvolvimento do método por cromatografia líquida foram conduzidos ensaios para seleção da melhor composição da fase móvel de corrida para otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais críticos para garantia da adequada resolução na separação do analito e seus degradantes.

5.2.2.2.1 Preparo das amostras

- *Solução estoque de furosemida:* foram transferidos 25,0 mg de padrão de furosemida para um balão volumétrico de 50,0 mL e se completou o volume com metanol (concentração final de $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).
- *Solução estoque amostra de furosemida comprimidos:* foram transferidos 93,1 mg de amostra para um balão volumétrico de 50,0 mL e se completou a volume com metanol (concentração final de $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).
- *Solução estoque placebo:* foram transferidos 93,1 mg de placebo para um balão volumétrico de 50,0 mL e se completou a volume com metanol.
- *Solução de trabalho de furosemida:* foram transferidos 0,2 mL da solução estoque de furosemida para um balão de 10,0 mL completou-se o volume com água milli-Q (concentração final de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$)
- *Solução de trabalho amostra de furosemida comprimidos:* foram transferidos 200 μL da solução estoque de furosemida para um balão de 10 mL completou-se o volume com água milli-Q (concentração final de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$)
- *Solução de trabalho de placebo:* foram transferidos 0,2 mL da solução estoque de furosemida para um balão de 10,0 mL completou-se o volume com água milli-Q.

Todas as soluções foram sonicadas para permitir a dissolução e em seguida filtradas utilizando filtro de $0,45 \mu\text{m}$.

5.2.2.2.2 Fase móvel

Diferentes fases móvel foram testadas durante o desenvolvimento da metodologia analítica. Sendo estes listados na Tabela 5:

Tabela 5: Fases móvel utilizadas no desenvolvimento do método analítico para HPLC.

Fase Móvel	Concentração de fase orgânica – Acetonitrila (%)	Concentração de fase aquosa (%)	pH
20mM Acetato de amônio	70	30	7,0 e 5,5
	50	50	
	30	70	
10mM Acetato de amônio	70	30	7,0 e 5,5
	30	70	
0,1% ácido fórmico	70	30	2,6
	50	50	
	30	70	

5.2.3 Degradação forçada

5.2.3.1 Degradação por hidrólise

Para preparo da solução tomou-se 1,25 mL da solução estoque de furosemida ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e transferiu-se para frasco âmbar. Acrescentou-se 1,25mL de água ultrapura milli-Q. Os frascos foram levados para o banho-maria a 60°C por 24 horas. Após degradação, completou-se a solução com 2,5 mL de solução metanol 20% (concentração final de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Para análise em FSCE tomou-se uma alíquota de 1,0 mL. Adicionou-se o padrão interno hidroclorotiazida tomando-se 0,25 mL da solução estoque e completou-se para 5,0 mL com solução de metanol 20% a fim de obter concentração final de $100,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para furosemida e hidroclorotiazida. Esta solução foi filtrada em filtro de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Para análise em HPLC tomou-se uma alíquota 0,1 mL e completou-se o volume para 5,0 mL com água a fim de obter concentração final de $10,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta solução foi filtrada em filtro de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ e injetada no equipamento de cromatografia líquida.

5.2.3.2 Degradação por hidrólise ácida

Para preparo da solução tomou-se 1,25 mL da solução estoque de furosemida ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e transferiu-se para frasco âmbar. Acrescentou-se 1,25 mL de ácido clorídrico 0,1M. Os frascos foram levados para o banho-maria a 60°C por 24 horas. Após degradação, a solução foi neutralizada com 1,25 mL de hidróxido de sódio 0,1M. Completou-se a solução com 1,25 mL de solução metanol 20%.

Para análise em FSCE tomou-se uma alíquota de 1,0 mL. Adicionou-se o padrão interno hidroclorotiazida tomando-se 0,25 mL da solução estoque e completou-se para 5,0mL com solução de metanol 20% a fim de obter concentração final de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para furosemida e hidroclorotiazida. Esta solução foi filtrada em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Para análise em HPLC tomou-se uma alíquota 0,1 mL e completou-se o volume para 5,0 mL com água a fim de obter concentração final de $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta solução foi filtrada em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e injetada no equipamento de cromatografia líquida.

5.2.3.3 Degradação por hidrólise alcalina

Para preparo da solução tomou-se 1,25 mL da solução estoque de furosemida ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e transferiu-se para frasco âmbar. Acrescentou-se 1,25 mL de hidróxido de sódio 0,1M. Os frascos foram levados para o banho-maria a 60°C por 24 horas. Após degradação, a solução foi neutralizada com 1,25 mL de ácido clorídrico 0,1M. Completou-se a solução com 1,25 mL de solução de metanol 20%.

Para análise em FSCE tomou-se uma alíquota de 1,0 mL. Adicionou-se o padrão interno hidroclorotiazida tomando-se 0,25 mL da solução estoque e completou-se para 5,0 mL com solução de metanol 20% a fim de obter concentração final de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para furosemida e hidroclorotiazida. Esta solução foi filtrada em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Para análise em HPLC tomou-se uma alíquota 0,1 mL e completou-se o volume para 5,0 mL com água a fim de obter concentração final de 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta solução foi filtrada em filtro de 0,45 μm e injetada no equipamento de cromatografia líquida.

5.2.3.4 Degradação por oxidação

Para preparo da solução tomou-se 1,25 mL da solução estoque de furosemida (2,0 mg.mL^{-1}) e transferiu-se para frasco âmbar. Acrescentou-se 1,25 mL de peróxido de hidrogênio 3,0%. Os frascos foram levados para o banho-maria a 60°C por 24 horas. Após degradação, completou-se a solução com 2,5 mL de solução de metanol 20%.

Para análise em FSCE tomou-se uma alíquota de 1,0 mL. Adicionou-se o padrão interno hidroclorotiazida tomando-se 0,25 mL da solução estoque e completou-se para 5,0 mL com solução de metanol 20% a fim de obter concentração final de 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para furosemida e hidroclorotiazida. Esta solução foi filtrada em filtro de 0,45 μm e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Para análise em HPLC tomou-se uma alíquota 0,1 mL e completou-se o volume para 5,0 mL com água a fim de obter concentração final de 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta solução foi filtrada em filtro de 0,45 μm e injetada no equipamento de cromatografia líquida.

5.2.3.5 Degradação por termólise

Pesou-se 10,0 mg de furosemida e transferiu para frasco âmbar. Os frascos foram levados para estufa a 80°C por 24 horas. Após degradação, adicionou-se 5,0 mL de metanol ao frasco. Tomou-se 1,25 mL da solução e transferiu para outro frasco completou-se a solução com metanol 20% para 5,0 mL para obter concentração final de 0,5 mg mL^{-1} .

Para análise em FSCE tomou-se uma alíquota de 1,0 mL. Adicionou-se o padrão interno hidroclorotiazida tomando-se 0,250 mL da solução estoque

e completou-se para 5,0 mL com solução de metanol 20% a fim de obter concentração final de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para furosemida e hidroclorotiazida. Esta solução foi filtrada em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Para análise em HPLC tomou-se uma alíquota 0,1 mL e completou-se o volume para 5,0 mL com água a fim de obter concentração final de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta solução foi filtrada em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e injetada no equipamento de cromatografia líquida.

5.2.3.6 Degradação por Fotólise

Uma quantidade de furosemida, amostra de comprimido de furosemida e o placebo foram colocados em placas de petri e expostos à condição ICH, opção 2, por 60 horas (ICH, 1996), sob temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Manteve-se os controles protegidos da luz com papel alumínio durante o mesmo período. Após a exposição pesou-se 100,0 mg de furosemida para um balão volumétrico de 50,0 mL e completou-se o volume com metanol (concentração final de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$). Tomou-se 1,25 mL da solução e transferiu para outro frasco completou-se a solução com metanol 20% para balão volumétrico de 5,0 mL para obter concentração final de $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para análise em FSCE tomou-se uma alíquota de 1,0 mL. Adicionou-se o padrão interno hidroclorotiazida tomando-se 0,25 mL da solução estoque e completou-se para 5,0 mL com solução de metanol 20% a fim de obter concentração final de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para furosemida e hidroclorotiazida. Esta solução foi filtrada em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Para análise em HPLC tomou-se uma alíquota 0,1 mL e completou-se o volume para 5,0 mL com água a fim de obter concentração final de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta solução foi filtrada em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e injetada no equipamento de cromatografia líquida.

5.2.4 Validação de metodologia analítica

5.2.4.1 Eletroforese capilar

5.2.4.1.1 Condições cromatográficas

Após testes preliminares foram escolhidos os seguintes parâmetros para a validação:

- Colunas capilares de sílica fundida com 50,0 μm d.i. e 30,2 cm de comprimento total (20,0 cm até detector).
- Temperatura da coluna: +20,0 °C
- Tempo de injeção: 3,0 segundos
- Detecção: 273 nm
- Eletrólito: 20,0 mM tetraborato de sódio (TBS),
- pH 9,3
- Concentração de metanol: 10%

5.2.4.1.2 Especificidade

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

- **Pesquisa de interferentes a partir do placebo**

Pesou-se 372,4mg de placebo de furosemida comprimidos para balão volumétrico de 50,0 mL, adicionou-se 30,0 mL de metanol. A solução foi sonicada por 15 minutos. Depois completou-se a solução com metanol. Desta solução pipetou-se 0,5 mL para balão de 10,0 mL e completou-se o volume com metanol 20% (concentração final de 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Esta solução foi filtrada em filtro de 0,45 μm e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

- **Pesquisa de interferentes a partir do teste de degradação forçada**

A especificidade de um método também é determinada através do

teste de estresse que irá avaliar os possíveis produtos de degradação que possam interferir na quantificação do pico de interesse.

Para a avaliação do teste de estresse, o padrão, a amostra e o placebo foram submetidas as seguintes condições: hidrólise, hidrólise alcalina (NaOH 0,1M), hidrólise ácida (HCl 0,1M), oxidação (H₂O₂ 3%), aquecimento e fotoestabilidade.

As amostras foram submetidas as condições de estresse por 2h, 4h, 24h e 48h. Sendo que os testes eram interrompidos assim que a decomposição atingia 10 a 30 %. E caso não houvesse degradação depois de sete dias de estudo o ativo seria considerado estável.

5.2.4.1.3 Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, foram preparadas sete soluções padrões em diferentes concentrações para os fármacos variando de 70% a 130% da concentração nominal de trabalho. Considerando que a concentração nominal para furosemida é de 100,0 µg mL⁻¹. Estas soluções foram preparadas partir de uma solução estoque e os valores médios encontrados foram plotados da concentração da amostra (eixo X) pela resposta do detector (eixo Y) para avaliar a linearidade nas concentrações testadas.

Para o ensaio de linearidade utilizou-se a solução estoque de furosemida em concentrações que variaram conforme demonstrado na Tabela 6. A todas as soluções foram acrescentadas 500µL de solução estoque de hidroclorotiazida, substância utilizada como padrão interno. O volume foi completado para 10,0 mL com solução de metanol 20%. O teste foi realizado em triplicata.

Tabela 6: Preparo de soluções para o teste de linearidade

Concentração (%)	Volume da solução estoque FUR (2,0 mg.mL ⁻¹) (μL)	Volume da solução estoque HID (2,0 mg.mL ⁻¹) (μL)	Volume final (mL)	Concentração final teórica de FUR (μg.mL ⁻¹)
70	350	500	10	70
80	400	500	10	80
90	450	500	10	90
100	500	500	10	100
110	550	500	10	110
120	600	500	10	120
130	650	500	10	130

5.2.4.1.1 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados para o método de eletroforese capilar de zona (FSCE) através do desvio padrão da curva de calibração (DP) e a inclinação (I) da curva de calibração. (Equação 9 e 10). Foram efetuadas 3 leituras para cada concentração.

$$LD = \left[\frac{3,3 \times DP}{b} \right]$$

Equação 9: Limite de detecção

$$LQ = \left[\frac{10 \times DP}{b} \right]$$

Equação 10: Limite de quantificação

5.2.4.1.2 Precisão do sistema

Foi tomada a alíquota de 0,5 mL da solução estoque de furosemida ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) para balão volumétrico de 10,0 mL, concentração final foi de $100,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100%). Adicionou-se o padrão interno hidroclorotiazida, para concentração final de $100,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. O volume foi completado com metanol 20%. Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de $0,45 \mu\text{m}$. Esta solução foi injetada no sistema dez vezes.

5.2.4.1.3 Precisão intermediária

Foi tomada a alíquota de 0,4, 0,5 e 0,6 mL da solução estoque de amostra de furosemida comprimidos ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) para balão volumétrico de 10,0 mL. Para concentração final de 80,0 100,0 e $120,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. Adicionou-se 0,5 mL da solução estoque de hidroclorotiazida, padrão interno, tendo concentração final de $100,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. O volume foi completado com metanol 20%. Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de $0,45 \mu\text{m}$. O procedimento foi repetido 3 vezes para cada concentração e as leituras foram feitas em triplicata. O procedimento foi repetido três dias seguidos.

5.2.4.1.4 Repetibilidade

Foi tomada a alíquota de 0,5 mL da solução estoque de amostra de furosemida comprimidos ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) para balão volumétrico de 10,0 mL, concentração final foi de $100,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100%). Adicionou-se o padrão interno hidroclorotiazida, para concentração final de $100,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. O volume foi completado com metanol 20%. Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de $0,45 \mu\text{m}$. O procedimento foi repetido seis vezes e cada repetição foi determinada em triplicata

5.2.4.1.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através de nove

determinações em três diferentes concentrações, 80%, 100% e 120% da concentração nominal. Para isto, primeiramente, preparou-se uma solução estoque de placebo. Em seguida alíquotas da solução estoque de furosemida, placebo e hidroclorotiazida ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) foram transferidas para os balões de 5,0 mL conforme Tabela 7. Completou-se o volume com metanol 20%. Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de $0,45\mu\text{m}$. O procedimento foi repetido três vezes e cada leitura feita em triplicata.

Tabela 7: Procedimento experimental para teste de exatidão em método de FSCE.

Concentração teórica (%)	Volume solução estoque placebo (mL)	Volume solução estoque FUR (mL)	Volume solução estoque HID (mL)	Volume final (mL)	Concentração teórica de furosemida ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
80	0,20	0,20	0,25	5,0	80
100	0,25	0,25	0,25	5,0	100
120	0,30	0,30	0,25	5,0	120

5.2.4.1.6 Robustez

Foi tomada a alíquota de 0,5 mL da solução estoque de amostra de furosemida comprimidos ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) para balão volumétrico de 10,0 mL, concentração final foi de $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100%). Adicionou-se o padrão interno hidroclorotiazida, para concentração final de $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O volume foi completado com metanol 20%. Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de $0,45\mu\text{m}$.

As variações utilizadas para o teste de robustez são descritas na Tabela 8.

Tabela 8: Variações empregadas no teste de robustez para FSCE.

Parâmetro modificado	Condição inicial	Modificação A	Modificação B
Tempo de injeção	5s	4s	6s
Proporção de metanol no eletrólito	10%	8%	12%
Voltagem	25kV	24kV	26kV

5.2.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

5.2.4.2.1 Condições cromatográficas

Após testes preliminares foram escolhidos os seguintes parâmetros para a validação:

- Coluna Shim-pack CLC-ODS(M) 250mm x 4,6mm, 5µm
- Fase móvel: acetonitrila:água acidificada com ácido fórmico 0,1%
- Detecção: 273nm
- Temperatura: 30°C
- Fluxo 1,0 mL.min⁻¹
- Volume de injeção 20,0 µL

5.2.4.2.2 Especificidade

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

- **Pesquisa de interferentes a partir do placebo**

Pesou-se 372,4mg de placebo de furosemida comprimidos para balão volumétrico de 50,0 mL, adicionou-se 30,0 mL de metanol. A solução foi

sonicada por 15 minutos. Depois completou-se a solução com metanol. A solução foi filtrada em filtro de 0,45 μm . Desta solução pipetou-se 0,25 mL para balão de 50,0 mL e completou-se o volume com água milli-Q (concentração final de 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esta solução foi filtrada em filtro de 0,45 μm e injetada no equipamento de cromatografia líquida.

- **Pesquisa de interferentes a partir do teste de degradação forçada**

A especificidade de um método também é determinada através do teste de estresse que irá avaliar os possíveis produtos de degradação que possam interferir na quantificação do pico de interesse.

Para a avaliação do teste de estresse, o padrão, a amostra e o placebo foram submetidas as seguintes condições: hidrólise, hidrólise alcalina (NaOH 0,1M), hidrólise ácida (HCl 0,1M), oxidação (H_2O_2 3%), aquecimento e fotoestabilidade.

As amostras foram submetidas as condições de estresse por 24h. Sendo que os testes eram interrompidos assim que a decomposição atingia 10 a 30 %. E se não houver degradação depois de sete dias de estudo o ativo seria considerado estável.

5.2.4.2.3 Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, foram preparadas sete soluções padrões em diferentes concentrações para o fármaco variando de 70% a 130% da concentração nominal de trabalho. Considerando que a concentração nominal para furosemida é de 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque e os valores médios encontrados foram plotados da concentração da amostra (eixo X) pela resposta do detector (eixo Y) para avaliar a linearidade nas concentrações testadas.

Para o ensaio de linearidade utilizou-se a solução estoque de furosemida em concentrações que variaram conforme demonstrado na Tabela 9. O volume foi completado para 10,0 mL com água milli-Q. O teste foi realizado em triplicata.

Tabela 9: Preparo de soluções para o teste de linearidade

Concentração (%)	Volume da solução estoque (500,0 µg mL ⁻¹) (µL)	Concentração final teórica (µg.mL ⁻¹)
70	140,0	7,0
80	160,0	8,0
90	180,0	9,0
100	200,0	10,0
110	220,0	11,0
120	240,0	12,0
130	260,0	13,0

5.2.4.2.1 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados para o método cromatográfico através do desvio padrão da curva de calibração (DP) e a inclinação (b) da curva de calibração. (Equação 9 e 10). Foram efetuadas três leituras para cada concentração.

5.2.4.2.2 Precisão do sistema

Foi tomada a alíquota de 0,2 mL da solução estoque de furosemida (500,0 µg.mL⁻¹) para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com água milli-Q. A concentração final foi de 10,0 µg.mL⁻¹ (100%). Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de 0,45µm. Esta solução foi injetada no sistema dez vezes.

5.2.4.2.3 Precisão intermediária

Foi tomada a alíquota de 0,16, 0,20 e 0,24 mL da solução estoque de amostra de furosemida comprimidos (500,0 µg.mL⁻¹) para balão volumétrico de 10,0 mL. Para concentração final de 8,0 10,0 e 12,0 µg.mL⁻¹ respectivamente. O volume foi completado com água milli-Q. Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de 0,45µm. O procedimento

foi repetido três vezes para cada concentração e as leituras foram feitas em triplicata. O procedimento foi repetido três dias seguidos

5.2.4.2.4 Repetibilidade

Foi tomada a alíquota de 0,2 mL da solução estoque de amostra de furosemida comprimidos ($500,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para balão volumétrico de 10,0 mL, concentração final foi de $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100%). O volume foi completado com água milli-Q. Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de $0,45 \mu\text{m}$. O procedimento foi repetido seis vezes e cada repetição foi determinada em triplicata.

5.2.4.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através de nove determinações em três diferentes concentrações, 80%, 100% e 120% da concentração nominal. Para isto, primeiramente, preparou-se uma solução estoque de placebo. Em seguida alíquotas da solução estoque de furosemida e placebo ($500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram transferidas para os balões de 5,0 mL conforme Tabela 10. Completou-se o volume com água milli-Q. Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de $0,45 \mu\text{m}$. O procedimento foi repetido três vezes e cada leitura determinada em triplicata.

Tabela 10: Procedimento experimental para teste de exatidão em método de HPLC.

Concentração teórica (%)	Volume solução estoque placebo (mL)	Volume solução estoque FUR (mL)	Volume final (mL)	Concentração teórica de furosemida ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
80	0,80	0,80	5,0	8
100	0,10	0,10	5,0	10
120	0,12	0,12	5,0	12

5.2.4.2.6 Robustez

Foi tomada a alíquota de 0,2 mL da solução estoque de furosemida ($500,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para balão volumétrico de 10,0 mL, concentração final foi de $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100%).O volume foi completado com água milli-Q. Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de $0,45\mu\text{m}$.

As variações utilizadas para o teste de robustez são descritas na Tabela 11.

Tabela 11: Variações empregadas no teste de robustez para HPLC.

Parâmetro modificado	Condição inicial	Modificação A	Modificação B
Fluxo	$1,0 \text{ mL.min}^{-1}$	$0,9 \text{ mL.min}^{-1}$	$1,1 \text{ mL.min}^{-1}$
Proporção de acetonitrila na fase móvel	50%	48%	52%
Temperatura	30°C	29°C	31°C

5.2.4.2.7 Adequabilidade do sistema (System Suitability)

Foi tomada a alíquota de 0,2 mL da solução estoque de furosemida ($500,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para balão volumétrico de 10,0 mL, concentração final foi de $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100%).O volume foi completado com água milli-Q. Em seguida filtrou-se em membrana de PDVF de porosidade de $0,45\mu\text{m}$. Foram feitas seis leituras.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização e identificação da furosemida

6.1.1 Temperatura de fusão

A literatura determina que o ponto de fusão da furosemida é de 206°C, no corrente trabalho a faixa de fusão experimental foi de 210 a 212°C (O'NEIL, 2013).

6.1.2 Espectrofotometria no ultravioleta (UV):

Os espectros de absorção para o furosemida obtidos por varredura de 200 a 600 nm (BUNDGAARD; NØRGAARD; NIELSEN, 1988; RAUBER, 2013) podem ser observados na Figura 7 e Tabela 12. Os comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) correspondem aos encontrados na literatura (O'NEIL, 2013).

Tabela 12: Comprimentos de onda teórico e experimental dos padrões de furosemida

Fármaco	$\lambda_{\text{máx}}$ literatura (NaOH 0,1M)	$\lambda_{\text{máx}}$ experimental (NaOH 0,1M)
Furosemida	226nm,	228nm,
	273nm	270nm
	336nm	333nm

Figura 7: Espectro de absorção na região UV para a furosemida 5,0 µg/mL em NaOH 0,1M

6.1.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV):

Experimentos de absorção na região do IV foram conduzidos utilizando equipamento VERTEX 70 Series FT-IR Spectrometers. A Figuras 8 apresenta o resultado obtido.

Figura 8: Espectro de absorção da furosemida na região do infravermelho (IV).

A Tabela 13 mostra as bandas do espectro de absorção da furosemida.

Tabela 13: Bandas do espectro de absorção da furosemida

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3350 - 3400	C-NH
1671	Grupo COOH–
1596	Grupo NH ₂ –
1322	Grupo SO ₂ –
582	C-Cl

O espectro de absorção de infravermelho encontrado experimentalmente para o fármaco concorda com o da literatura, identificando a matéria-prima: furosemida.

6.1.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC):

No estudo de caracterização térmica para a furosemida foi empregado a técnica de calorimetria exploratória diferencial.

De acordo com a Figura 9, a matéria-prima de furosemida apresentou pico exotérmico em 219,80°C, que está associado com a decomposição do fármaco. Este pico foi precedido por pico endotérmico em 215°C que está associado ao ponto de fusão do fármaco. E segundo Spamer et al, o pico endotérmico em 266,59°C pode estar associado ao produto de degradação da furosemida (GARNERO; CHATTAH; LONGHI, 2013; SHIN; KIM, 2003; SPAMER et al., 2002).

Figura 9: Curva DSC da furosemida obtida no intervalo de 50 a 400°C, razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de 50,0ml/min.

6.1.5 Análise por termogravimetria

Para TGA o fármaco perdeu 28,79% da massa até a temperatura de 305°C. Um segundo evento teve perda de massa de 76,05% com término em 755°C. A curva TGA mostrou perda de massa acima de 200 ° C, o que correspondeu à decomposição da furosemida. No intervalo até 150°C não há perda de massa, mostrando que não há decomposição do fármaco (Figura 10) (GARNERO; CHATTAH; LONGHI, 2013)

Figura 10: Curva TGA da furosemida obtida no intervalo de 0 a 800°C, razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de 50,0ml/min

6.2 Eletroforese capilar

6.2.1 Desenvolvimento de metodologia analítica

A eletroforese capilar de solução livre (FSCE) foi o método utilizado neste trabalho por se tratar do método mais simples de separação por diferença de potencial elétrico. A furosemida é ionizável tanto em pH ácido quanto básico, como demonstra a Figura 11, o que torna a técnica de FSCE uma boa escolha.

Figura 11: Estrutura química e ionização da furosemida (“Chemicalize.org”, 2015)

O TBS foi escolhido para compor o eletrólito devido ao pKa da furosemida, que é de 9,83 no grupamento amina. O TBS em solução aquosa tem pH básico. Em pH básico, de 7,0 a 10,0, a furosemida forma íons que em solução representam de 50 a 100% da solução (Figura 11) (“Chemicalize.org”, 2015).

O desenvolvimento da metodologia analítica foi realizado mudando diferentes parâmetros, tais como: voltagem, volume de injeção, concentração da amostra, concentração de eletrólito e concentração de metanol. Sabe-se que a mudança desses parâmetros influencia o tempo de migração, sensibilidade,

assimetria e resolução (ALTRIA, 1996). Após essas mudanças foi verificado número de pratos teóricos, assimetria, e resolução entre os picos dos produtos de degradação.

6.2.1.1 Degradação forçada da furosemida

O estudo de estresse da furosemida foi realizado para determinar a estabilidade intrínseca do fármaco. Estas degradações consistiram em submeter o fármaco a condições drásticas de temperatura, hidrólise neutra, ácida e alcalina, oxidação e luz.

Os testes de degradação foram feitos com a matéria-prima, inicialmente, na fase de desenvolvimento, em solução ou em estado sólido, disposto em recipientes de vidro âmbar.

As degradações passaram por uma análise inicial para saber qual o melhor tempo que a furosemida deveria ser exposta à solução degradante. As determinações foram feitas em eletroforese capilar. Após analisar qual a melhor condição para se obter bons resultados com as degradações, a matéria-prima, o comprimido e o placebo foram submetidos às condições de estresse e avaliados em eletroforese capilar e cromatografia líquida.

A Anvisa determina perda de massa após degradação mínima de 10% (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013). Existem estudos que demonstram que o tempo de exposição pode ser de 1, 3 e 5 dias, em diferentes temperaturas e concentrações do estressante. Tudo isso deve ser avaliado para que se tenha um melhor desenvolvimento do estudo de estresse (NGWA, 2010).

Como mostra a Figura 12 as degradações em todas as condições de estresse geraram produtos de degradação, com exceção da hidrólise alcalina. A hidrólise neutra após 48 horas gerou um produto de degradação, porém a perda da massa de furosemida foi inferior a 10%, por este motivo, considerou-se fazer o teste após sete dias.

Figura 12: Eletroferograma da degradação forçada da Furosemida em diferentes meios degradantes. Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20mmol/L, metanol 20%, pH 9,3; tensão 20kV; temperatura de 25°C; detecção UV a 273nm e injeção por pressão 0,5psi/8s.

Ao submeter a furosemida aos testes de degradação forçada foi possível determinar as melhores condições de estresse, para que houvesse formação de produto de degradação e que a perda de massa após degradação fosse superior a 10% (Tabela 14).

Tabela 14: Condições empregadas no teste de estresse

Condições de estresse	Temperatura de exposição (°C)	Tempo de exposição (horas)
Hidrólise neutra	60	196
Hidrólise alcalina	60	196
Hidrólise ácida	60	24
Oxidação	60	24
Temperatura	80	24
Luz	25	60

- **Possíveis produtos de degradação**

A furosemida mostra ser estável em soluções alcalinas, porém sofre facilmente degradação em meio ácido (BUNDGAARD; NØRGAARD; NIELSEN, 1988).

A furosemida tem um grupo de amina secundária e é por isso susceptível a hidrólise catalisada por ácido que leva a formação do ácido-5-sulfamoil-4-cloro antranílico (saluamine) e do álcool furfuril (Figura 13) (BUNDGAARD; NØRGAARD; NIELSEN, 1988; CARDA-BROCH; ESTEVE-ROMERO; GARCIA-ALVAREZ-COQUE, 2000)

Figura 13: Esquema da degradação de furosemida em meio ácido (Adaptado de BUNDGAARD; NØRGAARD; NIELSEN, 1988)

A fotodegradação da furosemida é algo bastante descrito na literatura, mas em sua maioria a degradação é feita com soluções aquosas ácidas ou básicas ou em meios oxidativos. Mostrando que a luz UV acelera a degradação quando a furosemida encontra-se nestes meios (BUNDGAARD; NØRGAARD; NIELSEN, 1988; CARDA-BROCH; ESTEVE-ROMERO; GARCIA-ALVAREZ-COQUE, 2000; EM FARMÁCIA, 2013; FIORI et al., 2003). Neste trabalho, a fotodegradação foi realizada somente com o estado sólido do fármaco. E foi verificado perda de área do pico principal, mas nenhum pico adicional foi encontrado no tempo e no comprimento de onda do método desenvolvido.

O ácido 4-cloro-5-sulfoantranílico é formado por oxidação do grupo sulfamoil para sulfônico, com a hidrólise do grupo furfuril, que também é formado por oxidação com peróxido de hidrogênio (BUNDGAARD; NØRGAARD; NIELSEN, 1988). A oxidação por peróxido também causa

declorificação da furosemida e do ácido 4-cloro-5-sulfoantranílico formando o ácido N-furfuril-5-sulfamoilantranílico (FSA) e ácido 5-sulfamoilantranílico, respectivamente (CARDA-BROCH; ESTEVE-ROMERO; GARCIA-ALVAREZ-COQUE, 2000).

6.2.1.1 Padrão interno

Para melhorar a precisão do método e sistema foi preciso escolher um padrão interno. Para tanto, diversas substâncias foram testadas. E para escolher o melhor padrão interno foi verificado os seguintes parâmetros: melhor resposta, melhor tempo de migração, melhor assimetria e melhor resolução com o pico da furosemida e pico de degradação. A Tabela 15 mostra as substâncias testadas e seus tempos de migração.

Tabela 15: Substâncias analisadas para padrão interno em FSCE.

Fármacos	Tempo de migração
Buspirona	2,30
Ciprofloxacina	2,53
Clorotiazida	4,35
Clorpropamida	3,32
Hidroclorotiazida	3,24
Metoprolol	1,42

As condições de trabalho para escolha do padrão interno foram: 20mM de TBS, 20% de metanol, pH 9,3, voltagem de 20kV, volume de injeção de 5 segundos, comprimento de onda de 273nm e comprimento do capilar de 20cm até o detector e 50µm de diâmetro interno.

Para poder escolher o padrão interno foi preciso analisar o tempo de migração da furosemida (4,29). Além disso, previamente fez-se a degradação da furosemida para avaliar os tempos de migração dos picos correspondentes aos produtos de degradação. A degradação por hidrólise básica não

apresentou produtos de degradação. A degradação oxidativa e por hidrólise ácida e neutra apresentou produtos de degradação. Porém, somente a degradação oxidativa apresentou um pico correspondente a um produto de degradação com tempo de migração anterior ao da furosemida (2,83). Com isso, este tempo também foi analisado para a escolha do padrão interno.

A buspirona apresentou baixa resposta, além de uma baixa assimetria. Por isso, foi descartada, apesar do bom tempo de migração. O metoprolol foi utilizado como padrão interno nas primeiras análises deste trabalho, mas foi descartado, pois, seu tempo de migração (1,42) está bem próximo do fluxo osmótico (FEO) da corrida. A ciprofloxacina, também foi descartada devido seu tempo de migração (2,53), próximo do tempo de migração de um dos picos referentes a um produto de degradação. Além, de ter baixa assimetria do pico.

A clorpropamida e a hidroclorotiazida tiveram bom tempo de migração, porém a clorpropamida obteve baixa resposta. Com isso a hidroclorotiazida foi escolhida como o padrão interno deste trabalho. Como pode ser visto na Figura 14 a hidroclorotiazida obteve boa resolução, assimetria e bom tempo de migração.

Figura 14: Eletroferograma da furosemida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) e hidroclorotiazida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$). Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20mmolL^{-1} , metanol 20%, pH 9,3; tensão 20kV; temperatura de 25°C ; detecção UV a 273nm e injeção por pressão 0,5psi/8s.

6.2.1.2 Eletrólito

Para avaliar o melhor eletrólito usou-se como resposta desejada melhor tempo de migração do pico referente a furosemida. Além disso, utilizou-se como parâmetro uma solução degradada em meio oxidativo, pois foi neste meio que se obteve maior número de produtos de degradação e estes precisavam ser separados com boa resolução entre eles e o pico da furosemida e do padrão interno.

Após inúmeros testes (Figura 15 e 16) definiu-se os melhores parâmetros para a determinação de furosemida. Pode-se perceber que, assim como diz a literatura, o aumento de voltagem e diminuição de metanol diminui o tempo de migração. Além disso, o aumento da concentração de TBS, aumenta a viscosidade do eletrólito levando a um aumento no tempo de migração. Com isso os parâmetros escolhidos para a determinação de furosemida foram: 20mM de TBS, 10% de metanol, com voltagem de 25kV.

Figura 15: Eletroferograma da furosemida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) e hiroclorotiazida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) com diferentes concentrações de TBS, metanol e diferentes voltagens. A) 20mM TBS, 20% MeOH, 20kV; B) 20mM TBS, 20% MeOH e 25kV; C) 20mM TBS, 10% MeOH e 20kV; D) 20mM TBS, 10% MeOH e 25kV.

Figura 16: Eletroferograma da furosemda ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) e hiroclorotiazida ($500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) com diferentes concentrações de TBS, metanol e diferentes voltagens. A) 30mM TBS, 20% MeOH, 20kV; B) 30mM TBS, 20% MeOH e 25kV; C) 30mM TBS, 10% MeOH e 25kV; D) 30mM TBS, 10% MeOH e 20kV

O pH não foi alterado pois, a sua mudança, mesmo que pequena causava grande diferença na resposta. O pH 9,2 foi testado mas, sua resposta foi insatisfatória em assimetria e resposta em μA .

Portanto as condições escolhidas para a validação são as seguintes:

- Temperatura da coluna: $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Tempo de injeção: 3,0 segundos
- Detecção: 273 nm
- Eletrólito: 20 mM tetraborato de sódio (TBS),
- pH 9,3
- Concentração de metanol: 10%

A Figura 17 representa o eletroferograma da furosemda nas condições otimizadas.

Figura 17: Eletroferograma do padrão de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), adicionada do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ i.d; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR.

6.2.2 Validação de metodologia analítica por eletroforese capilar

6.2.2.1 Especificidade

A especificidade é a habilidade de um método analítico em determinar inequivocamente o composto em uma amostra, considerando a possibilidade da presença de outros compostos que possam interferir em sua determinação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; ICH, 2005).

As Figuras 18 a 36 apresentam os resultados obtidos da pesquisa de interferentes a partir dos excipientes da amostra comercial e da degradação forçada, o que mostrou que não há interferência na quantificação da furosemida. Portanto, o método se mostrou ser aplicável à quantificação de furosemida em amostras comerciais.

Figura 18: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm .

Figura 19: Eletroferograma da solução padrão de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto á degradação forçada neutra, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR.

Figura 20: Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta a degradação forçada neutra, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR.

Figura 21: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto a degradação forçada neutra. Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm.

Figura 22: Eletroferograma do padrão de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) expostos à degradação forçada ácida, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5,0 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm. Picos: HID, FUR e Pd1.

Figura 23: Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta a degradação forçada ácida, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 5 s; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm. Picos: HID, FUR e Pd1.

Figura 24: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto a degradação forçada ácida. Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m d.i.}$; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm .

Figura 25: Eletroferograma do padrão de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto à degradação forçada básica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m d.i.}$; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR.

Figura 26: Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta a degradação forçada básica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m d.i.}$; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR.

Figura 27: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto a degradação forçada básica. Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm .

Figura 28: Eletroferograma do padrão de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto à degradação forçada oxidativa, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 2735 nm . Picos: Pd2, HID, FUR, Pd3 e Pd4.

Figura 29: Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta a degradação forçada oxidativa, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: Pd2, HID, FUR, Pd3 e Pd4.

Figura 30: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto a degradação forçada oxidativa. Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm .

Figura 31: Eletroferograma do padrão de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto à degradação forçada térmica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR.

Figura 32: Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta a degradação forçada térmica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR.

Figura 33: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto a degradação forçada térmica. Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm .

Figura 34: Eletroferograma do padrão de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto à degradação forçada fotolítica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR.

Figura 35: Eletroferograma da amostra de comprimidos de furosemida ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta a degradação forçada fotolítica, adicionada da solução do padrão interno hidroclorotiazida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m}$ d.i.; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm . Picos: HID e FUR.

Figura 36: Eletroferograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto a degradação forçada fotolítica. Condições: eletrólito contendo $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9,3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50,0 \mu\text{m d.i.}$; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por $5,0 \text{ s}$; voltagem aplicada: $+25 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 273 nm .

No presente estudo observou-se a formação de três produtos de degradação na degradação oxidativa e um produto de degradação na degradação ácida, neutra (196 horas) e básica (196 horas). Na degradação térmica e por fotoanálise houve perda de massa, mas nenhum produto de degradação foi formado nas condições analíticas avaliadas (Tabela 16).

Tabela 16: Resultados obtidos empregando FSCE após condições de estresse da furosemida usando método validado.

Condições	Perda após degradação forçada (%)	
	Matéria-prima	Comprimidos
Hidrólise ácida	42,9	44,5
Hidrólise alcalina	2,0	8,6
Hidrólise neutra	10,4	9,9
Hidrólise oxidativa	27,8	25,3
Termólise	21,2	23,7
Fotólise	24,1	24,2

6.2.2.2 Linearidade

O Método de FSCE mostrou boa linearidade com determinação do coeficiente $R > 0,99$ (Tabela 17). O valor indicou clara correlação entre as concentrações das áreas dos picos dentro do intervalo do teste (70,0 a 130,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 37).

O teste de variância (ANOVA) mostrou que o ajuste do modelo linear é adequado para a curva analítica construída, pois o valor de p foi inferior ao valor de F crítico. Os valores de F observados na análise de validade de regressão foram considerados maiores que F crítico, indicando a existência de relação linear entre as variáveis X e Y . A análise do Lack of Fit (erro associado ao modelo) mostra que o erro não está associado a modelo, com $p < 0,5$. Ao observarmos a Figura 38 vemos que a distribuição do resíduo é aleatória, mostrando assim que não há dependência entre os valores.

6.2.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram 6,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 20,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 17: Resultados obtidos em curvas analíticas da furosemda

Concentração média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área média* (μAu) $\pm$ DP (Analito/PI)
70,0	0,85 $\pm$ 0,014
80,0	0,93 $\pm$ 0,016
90,0	1,07 $\pm$ 0,030
100,0	1,17 $\pm$ 0,019
110,0	1,31 $\pm$ 0,032
120,0	1,44 $\pm$ 0,025
130,0	1,55 $\pm$ 0,021
Intercepto da curva (a)	-0,0069
Inclinação da curva (b)	0,0120
Desvio Padrão	0,02434
Coeficiente de correlação (R^2)	0,991

*Média de 3 determinações para cada concentração

Figura 37: Curva analítica da solução padrão de furosemda na faixa de 70,0 a 130,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando FSCE

Figura 38: Esquema do resíduo da furosemida

6.2.2.4 Precisão do Sistema

Dez injeções foram realizadas para a determinação da precisão do sistema na concentração nominal $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100%). O resultado indica que o desvio padrão relativo (DPR) foi de 1,77%. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação (BLIESNER, 2006).

6.2.2.5 Precisão intermediária

A Tabela 15 mostra os resultados obtidos para a precisão intermediária do método por FSCE. Pode-se observar que o %DPR para a razão das áreas dos picos foi menor que 5% para as três concentrações com as que se trabalhou nos três dias consecutivos. Portanto, a precisão foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

6.2.2.6 Repetibilidade

O desvio-padrão relativo (DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 5% (Tabela 18). Portanto a precisão de injeção foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Tabela 18: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da

precisão intermediária do método por FSCE.

($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Repetibilidade do método (DPR)	Precisão intermediária do método (DPR)
80	--	2,44
100	1,67	3,32
120	--	1,26

6.2.2.7 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação, em três níveis de concentração. A recuperação média encontrada para a furosemida foi de 102,13%, indicando assim boa concordância entre as quantidades adicionadas de solução padrão e as quantidades recuperadas. A Tabela 19 mostra os resultados para o teste de recuperação.

Tabela 19: Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por FSCE.

Quantidade de padrão adicionado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Quantidade de padrão recuperado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação* (%)
80,0	83,43	104,29
100,0	100,67	100,67
120,0	121,71	101,43

* média de três determinações

6.2.2.8 Robustez

O teste de robustez indicou que modificações no tempo de injeção podem interferir na quantificação dos resultados de furosemida quando este tempo é aumentado (DPR maior que 2%). Porém, a diminuição no tempo de injeção de 5 para 4 segundos não interfere (DPR menor que 2%). Alterações na proporção de metanol no eletrólito não ocasionam diferenças no resultado da quantificação de furosemida (DPR menor que 2%). Aumento ou diminuição

na voltagem da corrida pode interferir no resultado (DPR maior que 2%).

Todas as alterações ocasionaram diferença no tempo de migração da furosemida, quando comparado com a condição inicial.

Os resultados obtidos nos ensaios de robustez, empregando-se o método por FSCE, podem ser observados na Tabela 20.

Tabela 20: Resultados obtidos nos testes de robustez com variação no tempo de injeção, proporção de metanol no eletrólito e voltagem para a determinação de furosemida por FSCE em comparação com condição inicial

Parâmetro modificado	Condições	Tempo de migração	Área	Assimetria	Concentração (%)
Tempo de injeção (s)	4	1,88	1,54	0,96	97,93
	5	1,85	1,57	0,93	100,00
	6	1,85	1,62	0,89	103,18
Proporção metanol no eletrólito (%)	8	1,89	1,57	0,86	99,81
	10	1,85	1,57	0,93	100,00
	12	2,09	1,55	0,80	98,48
Voltagem (kV)	24	1,95	1,61	0,89	102,64
	25	1,85	1,57	0,93	100,00
	26	1,78	1,60	0,86	102,00

6.2.2.9 Adequabilidade do sistema (System Suitability)

A adequabilidade do sistema foi feita fazendo seis leituras da solução de furosemida em concentração $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos podem ser verificados na Tabela 21.

Tabela 21: Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema para FSCE.

Parâmetros*	Furosemida
Tempo de migração (min)	1,88 ± 1,46
Razão das Áreas	1,44 ± 1,57
Pratos teóricos	24786,67 ± 1,99
Assimetria	0,88 ± 1,90
Resolução	7,84 ± 1,80

* Média de 6 determinações

6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

6.3.1 Desenvolvimento de metodologia analítica

Com a finalidade de encontrar uma metodologia eficiente alguns testes preliminares foram realizados para encontrar um método adequado para a identificação da furosemida por Cromatografia Líquida.

No desenvolvimento do método analítico por HPLC utilizou-se uma coluna de fase reversa (C18), e foram definidos parâmetros iniciais, baseados nos dados de literaturas, nas semelhanças entre metodologias existentes para quantificação de furosemida (ABDEL-HAMID, 2000; JANKOWSKI; SKOREK-JANKOWSKA; LAMPARCZYK, 1997; RAM; DAVE; JOSHI, 2012; SORA et al., 2010).

O comprimento de onda foi de 273nm, o mesmo utilizado para a análise em FSCE e a corrida foi feita em sistema de eluição isocrático.

Inúmeras combinações com solventes foram realizadas: acetonitrila: tampão acetato de amônio (10 mM), acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico (0,1%) e metanol e água acidificada com ácido fosfórico (0,1%).

A fim de se obter um melhor desenvolvimento utilizou-se um solução de furosemida exposta a solução degradante oxidativa, podendo com isso avaliar a resolução entre os picos dos produtos de degradação e escolher a

melhor fase móvel.

Os primeiros testes foram feitos com acetonitrila e tampão acetato de amônio (pH 7,0). Como previsto, ao se aumentar a quantidade de solvente orgânico, acetonitrila (ACN), o tempo de retenção diminuiu, passando de 5,25 minutos para 2,25 minutos. Com esta mesma fase móvel a solução contendo furosemida exposta a solução oxidativa, mostrou que os picos coeluíram na proporção ACN:tampão de acetato de amônio (70:30 v/v). E na proporção ACN:tampão acetato de amônio (30:70 v/v) os picos não coeluíram, mas possuíam baixa resolução entre eles e o pico referente teve tempo de retenção de 5,34 minutos.

Outro teste foi realizado mudando o pH da fase móvel de 7,0 para 5,5. Na proporção ACN:tampão acetato de amônio (30:70 v/v) o tempo de migração foi de 5,18, porém os picos referentes aos produtos de degradação coeluíram.

Como intuito de melhorar a resolução entre os picos dos produtos de degradação, mudou-se a fase móvel. A fase aquosa de tampão acetato foi trocada por uma solução aquosa acidificada com ácido fosfórico 0,1% (pH 2,6).

Testes com diferentes proporções de ACN foram feitos, a fim de verificar qual levava ao menor tempo de retenção e melhor resolução entre os picos. Como visto na Figura 39 o melhor resultado foi encontrado na corrida em que a proporção de ACN:água acidificada com ácido fórmico 0,1% estava 50:50 (v/v).

Figura 39: Cromatograma furosemida obtido com: A) ACN: água acidificada com ácido fórmico 0,1% 30:70 v/v; B) ACN: tampão água acidificada com ácido fórmico 0,1% 50:50 v/v; C) ACN:

tampão água acidificada com ácido fórmico 0,1% 70:30 v/v

Para melhorar ainda mais o tempo de retenção o fluxo do método também foi alterado, passando de 0,8 mL.min⁻¹ para 1,0 mL.min⁻¹. O tempo de retenção foi diminuído em aproximadamente 1 minuto. E as resoluções entre os picos referentes aos produtos de degradação e furosemida permaneceram boas.

Portanto as condições escolhidas para a validação são as seguintes:

- Fase móvel: acetonila:água acidificada com ácido fórmico 0,1%
- Amostra 10 µg.mL⁻¹ diluída em água
- Fluxo 1,0 mL.min⁻¹
- Volume de injeção 20µL

A Figura 40 representa o cromatograma da furosemida nas condições otimizadas.

Figura 40: Cromatograma da determinação do padrão de furosemida (10,0 µg mL⁻¹). Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR

6.3.2 Validação de metodologia analítica por HPLC

6.3.2.1 Especificidade

A especificidade é a habilidade de um método analítico em determinar inequivocamente o composto em uma amostra, considerando a possibilidade da presença de outros compostos que possam interferir em sua determinação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; ICH, 2005).

As Figuras de 41 a 58 mostram os resultados da pesquisa de interferentes a partir dos excipientes da amostra comercial e da degradação forçada.

Figura 41: Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm.

Figura 42: Cromatograma do padrão de furosemida (10,0 µg mL⁻¹) exposta à degradação forçada neutra. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, 20,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR

Figura 43: Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemda ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta à degradação forçada neutra. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR

Figura 44: Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemda exposto à degradação forçada neutra. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm.

Figura 45: Cromatograma do padrão de furosemda ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto à degradação forçada ácida. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Picos: PD1 e FUR.

Figura 46: Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta à degradação forçada ácida. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Picos: PD1 e FUR.

Figura 47: Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida exposto à degradação forçada ácida. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm.

Figura 48: Cromatograma do padrão de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto à degradação forçada básica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μl de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR.

Figura 49: Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta à degradação forçada básica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR.

Figura 50: Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida exposto à degradação forçada básica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm.

Figura 51: Cromatograma do padrão de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto à degradação forçada oxidativa. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Picos: PD2, PD3, PD4 e FUR

Figura 52: Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta à degradação forçada oxidativa. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Picos: PD2, PD3, PD4 e FUR

Figura 53: Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida exposto à degradação forçada oxidativa. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm.

Figura 54: Cromatograma do padrão de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposto à degradação forçada térmica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR

Figura 55: Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta à degradação forçada térmica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR

Figura 56: Cromatograma do placebo da amostra de comprimidos de furosemida exposto à degradação forçada térmica. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm.

Figura 57: Cromatograma do padrão de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta à degradação forçada fotólise. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR

Figura 58: Cromatograma da amostra de comprimidos de furosemida ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) exposta à degradação forçada fotólise. Condições: Coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por água:acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fosfórico 0,1%. Velocidade do fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 273nm. Pico: FUR

No presente estudo observou-se a formação de 3 produtos de degradação na degradação oxidativa e um produto de degradação na degradação ácida, neutra (196 horas) e básica (196 horas). Na degradação térmica e por fotoanálise houve perda de massa, mas nenhum produto de degradação foi formado nas condições analíticas avaliadas (Tabela 22).

Tabela 22: Resultados obtidos empregando HPLC após condições de estresse da furosemida

Condições	Perda após degradação forçada (%)	
	Matéria-prima	Comprimidos
Hidrólise ácida	23,6	32,6
Hidrólise alcalina	3,4	8,7
Hidrólise neutra	-2,0	-2,6
Hidrólise oxidativa	12,6	13,6
Termólise	27,1	21,4
Fotólise	14,6	11,0

6.3.2.2 Linearidade

O método por cromatografia líquida mostrou boa linearidade com

determinação do coeficiente $R > 0,99$ (Tabela 23). O valor indicou clara correlação entre as concentrações das áreas dos picos dentro do intervalo do teste (7,0 a 13,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 59).

O teste de variância (ANOVA) mostrou que o ajuste do modelo linear é adequado para a curva analítica construída, pois o valor de p foi inferior ao valor de F crítico. Os valores de F observados na análise de validade de regressão foram considerados maiores que F crítico, indicando a existência de relação linear entre as variáveis X e Y . A análise do Lack of Fit (erro associado ao modelo) mostra que o erro não está associado a modelo, com $p < 0,5$. Ao observarmos a Figura 60 vemos que a distribuição do resíduo é aleatória, mostrando assim que não há dependência entre os valores.

6.3.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram 0,56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1,93 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 23: Resultados obtidos em curvas analíticas da furosemida

Concentração média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área média* (μAu) $\pm$ DP
7,0	10718140,3 $\pm$ 241689,7
8,0	12829702,8 $\pm$ 433892,3
9,0	14427016,6 $\pm$ 285456,7
10,0	15544690,8 $\pm$ 562816,2
11,0	17321429,7 $\pm$ 103240,0
12,0	19320653,3 $\pm$ 22775,4
13,0	21033891,8 $\pm$ 160565,1
Intercepto da curva (a)	-827628
Inclinação da curva (b)	167227
Desvio Padrão	356266
Coeficiente de correlação (R)	0,990

*Média de 3 determinações para cada concentração

Figura 59: Curva analítica da furosemida por HPLC.

Figura 60: Esquema do resíduo da furosemida

6.3.2.4 Precisão do Sistema

Dez injeções foram realizadas para a precisão do sistema para a concentração nominal 10 µg.mL⁻¹ (100%). O resultado indica que o desvio padrão relativo (DPR) foi de 0,12%. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação (BLIESNER, 2006).

6.3.2.5 Precisão intermediária

A Tabela 24 mostra os resultados obtidos para a precisão intermediária do método por FSCE. Pode-se observar que o DPR para a razão

das áreas dos picos foi menor que 5% para as três concentrações com as que se trabalhou nos três dias consecutivos. Portanto, a precisão foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

6.3.2.6 Repetibilidade

O desvio-padrão relativo (DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 5% (Tabela 24). Portanto a precisão de injeção foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Tabela 24: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método por HPLC

($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Repetibilidade do método (%DPR)	Precisão intermediária do método (%DPR)
80	--	1,81
100	2,07	2,63
120	--	2,91

6.3.2.7 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação, em três níveis de concentração. A recuperação média encontrada para a furosemida foi de 105,12%, indicando assim boa concordância entre as quantidades adicionadas de solução padrão e as quantidades recuperadas. A Tabela 25 mostra os resultados para o teste de recuperação.

Tabela 25: Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por HPLC.

Quantidade de padrão adicionado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Quantidade de padrão recuperado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação* (%)
8,0	8,47	105,92
10,0	10,47	104,78
12,0	12,56	104,67

* média de três determinações

6.3.2.8 Robustez

O teste de robustez indicou que modificações no fluxo da fase móvel podem interferir na quantificação dos resultados de furosemida (DPR maior que 2%). Alterações na proporção de acetonitrila na fase móvel e temperatura, por sua vez, não foram capazes de comprometer na quantificação da furosemida (DPR menor que 2%). Todas as alterações ocasionaram diferença no tempo de migração da furosemida, quando comparado com a condição inicial.

Os resultados obtidos nos ensaios de robustez, empregando-se o método por HPLC, podem ser observados na Tabela 26.

Tabela 26: Resultados obtidos nos testes de robustez com variação no fluxo, proporção de acetonitrila na fase móvel e temperatura para a determinação de furosemida por HPLC em comparação com condição inicial.

Parâmetro modificado	Condições	Tempo de retenção	Área	Assimetria	Concentração (%)
Fluxo (mL.min^{-1})	0,9	5,40	14592171	1,26	109,91
	1,0	4,83	13276685	1,27	100,00
	1,1	4,42	11915731	1,27	89,75
Proporção de acetonitrila na fase móvel	48	5,24	13130443	1,29	98,90
	50	4,83	13276685	1,27	100,00

(%)	52	4,44	13275319	1,27	99,99
Temperatura (°C)	29	4,40	13244649	1,30	99,76
	30	4,83	13276685	1,27	100,0
	31	4,39	13250934	1,26	99,81

6.3.2.9 Adequabilidade do sistema (System Suitability)

A adequabilidade do sistema foi feita fazendo seis leituras da solução de furosemida em concentração $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos podem ser verificados na Tabela 27.

Tabela 27: Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema para HPLC.

Parâmetros*	Furosemida
Tempo de retenção (min)	$4,93 \pm 0,10$
Área	$16363408 \pm 0,31$
Altura de picos	$2423352 \pm 0,48$
Pratos teóricos	$12840,5 \pm 0,70$
Fator de capacidade	$1,19 \pm 0,20$
Assimetria	$1,29 \pm 2,0$

* Média de 6 determinações

6.4 Comparação entre técnicas de FSCE e HPLC para a quantificação de furosemida

Os resultados obtidos na quantificação de furosemida podem ser observados na Tabela 28.

Tabela 28: Parâmetros estatísticos e estudo comparativo entre FSCE e HPLC, para a determinação de furosemida, de concentração 40,0 mg/cp.

Parâmetros	FSCE	HPLC
Concentração*	40,53 ± 1,73	39,65 ± 1,51
DPR	1,56	
Teste F^a	0,73	
Teste t^b	-2,35	

*média n=6

^a valor crítico F com P = 95% , de significância P= 95% e Fcrit = 5,05

^b valor crítico t student com P=95% de significância e tcrit = 2,57

DPR= Desvio padrão relativo

Grau de liberdade= 5

Para cada método foram realizadas seis determinações, portanto o número de grau de liberdade (n-1) em cada caso é cinco. Para o teste F e teste t, o valor crítico de t(P=0,05) é 2,57 para 95% de certeza. Como o valor experimental é menor que esse valor, não existe diferença significativa entre os dois métodos. Porém o teste F indica que há diferença entre as duas técnicas, pois o valor de F calculado foi maior que F tabelado O teste t (TOST) também mostra que os métodos são semelhantes, ou seja não há diferença entre eles (p<0,000). É possível verificar isso, porque ao se assumir o intervalo de -4,0 e 4,0 os resultados de ambos os métodos estão neste intervalo e t valor de 12,91 e -8,24, respectivamente.

7. CONCLUSÃO

A partir das condições experimentais nas quais foi realizado o presente trabalho pode-se concluir:]

- Os métodos proposto para determinação quantitativa de furosemida em comprimidos são simples, rápidos eficientes e econômicos.
- Os excipientes da amostra não interferem nas análises, o que demonstra um método seletivo.
- A metodologia por HPLC permite análise em menos de 10 minutos, tendo boa separação entre a furosemida e seus produtos de degradação.
- A metodologia po FSCE permite análise em menos de 5 minutos, tendo boa separação entre a furosemida, seus produtos de degradação e o padrão interno (hidroclorotiazida).
- As duas metodologias foram validadas com resultados satisfatórios.
- Estatisticamente não existem diferenças entre os dois métodos.
- O método por HPLC mostrou redução no tempo de retenção, mais simples e menor custo quando comparado com os métodos oficiais existentes
- Os métodos podem ser utilizados em laboratórios de controle de qualidade para análise de rotina de furosemida em comprimidos.
- Uma oportunidade futura para este trabalho será a caracterização dos produtos de degradação gerados a fim de determinar suas estruturas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, M.E. High-performance liquid chromatography–mass spectrometric analysis of furosemide in plasma and its use in pharmacokinetic studies. **Farmaco**, v.55, n.6, p.448–454, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n.58, de 20 de dezembro de 2013**. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0058_20_12_2013.pdf. Acesso em: 20 mar.2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução n.899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; fica revogada a Resolução RE n.475, de 19 de março de 2002. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 18 mar. 2015.

ALLEN Jr., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ALSANTE, K.M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T.D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, n.1, p.29–37, 2007.

ALTRIA, K.D. **Capillary electrophoresis guidebook**: principles, operation, and applications. Totowa: Humana, 1996. 349p. (Methods in Molecular Biology, 52).

ALTRIA, K.D. Highly efficient and selective separations of a wide range of analytes obtained by an optimised microemulsion electrokinetic chromatography method. **Chromatographia**, v.49, n.7/8, p.457–464, 1999.

BAERTSCHI, S.W.; ALSANTE, K.M.; REED, R.A. **Pharmaceutical stress testing**: predicting drug degradation. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. 482p. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 153).

BAKER, D.R. **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley, 1995. 244p. (Techniques in analytical chemistry series).

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods: critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.28, n.6, p.1011–1040, 2002.

BLESSY, M.; PATEL, R.D.; PRAJAPATI, P.N.; AGRAWAL, Y.K. Development

of forced degradation and stability indicating studies of drugs: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.4, n.3, p.159–165, 2014.

BLIESNER, D.M. **Validating chromatographic methods**: a practical guide. Hoboken: John Wiley, 2006. 291p.

BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: Stationary Office, 2009. v.1.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C., eds. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana, 2006. 1821p.

BUNDGAARD, H.; NØRGAARD, T.; NIELSEN, N.M. Photodegradation and hydrolysis of furosemide and furosemide esters in aqueous solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.42, n.1, p.217–224, 1988.

CARDA-BROCH, S.; ESTEVE-ROMERO, J.; GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C. Furosemide assay in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography: study of the stability of the drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, n.5, p.803–817, 2000.

CHEMICALIZE. Furosemide. 2015. Disponível em: <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=furosemide&source=calculate>. Acesso em: 19 ago. 2015.

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

CZAPLICKI, S. Chromatography in bioactivity analysis of compounds. In: MARTIN, D.F.; MARTIN, B.B., eds. **Column chromatography**. Rijeka: InTech Open Access, 2013. cap.4. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/column-chromatography/chromatography-in-bioactivity-analysis-of-compounds>. Acesso em: 20 jul. 2015.

DIAS, I.L.T.; OLIVEIRA NETO, G.; MARTINS, J.L.S. Metodologias analíticas para a determinação da furosemida. **Lecta**, v.22, n.1/2, p.19–26, 2004.

FARIA, E.A.; LELES, M.I.G.; IONASHIRO, M.; ZUPPA, T.O.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, v.27, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702002000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 27 jan. 2015.

FARMACOPEIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Fundação Oswaldo Cruz, 2010. 1448p.

FDA. **Guidance for industry**: analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. Silver Spring: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2014. 15p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/>

[guidances/ucm386366.pdf](#). Acesso em: 24 mar. 2015.

FIORI, J.; BALLARDINI, R.; ANDRISANO, V.; CAVRINI, V. Photostability studies on the furosemide–triamterene drug association. **Farmaco**, v.58, n.9, p.867–873, 2003.

FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A.; ROCHE, V.F.; ZITO, S.W., eds. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1377p.

GARNERO, C.; CHATTAH, A.K.; LONGHI, M. Supramolecular complexes of maltodextrin and furosemide polymorphs: a new approach for delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v.94, n.1, p.292–300, 2013.

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

HEIDARIMOGHADAM, R.; FARMANY, A. Rapid determination of furosemide in drug and blood plasma of wrestlers by a carboxyl-MWCNT sensor. **Materials Science & Engineering, C: Materials for Biological Applications**, v.58, p.1242–1245, 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN. Quality Guidelines. Q1A - Q1F Stability. ICH Q1A (R2). **Stability testing of new drug substances and products**. 2003. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf. Acesso em: 20 mar. 2015

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN. Quality Guidelines. Q2 Analytical Validation. ICH Q2 (R1). **Validation analytical procedures methodology**: text and methodology. 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Acesso em: 23 mar. 2015.

JANKOWSKI, A.; SKOREK-JANKOWSKA, A.; LAMPARCZYK, H. Determination and pharmacokinetics of a furosemide–amiloride drug combination. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.693, n.2, p.383–391, 1997.

KOR, K.; ZAREI, K. Development and characterization of an electrochemical sensor for furosemide detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer. **Talanta**, v.146, p.181–187, 2016.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. 783p.

LANÇAS, F.M. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde? **Scientia Chromatographica**, v.3, n.1, p.17–23, 2011.

MARCHI, G.; SILVA, C.A.; GUILHERME, L.R.G.; PIRES, A.M.M.; GUERREIRO, M.C. **Princípios da determinação de íons em amostras ambientais por eletroforese capilar**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 76p.

MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Cambridge: RSC Publishing, 2013. p. 4308.

MIZUMA, T.; BENET, L.Z.; LIN, E.T. High-performance liquid chromatographic determination and identification of acyl migration and photodegradation products of furosemide 1-O-acyl glucuronide. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.718, n.1, p.153–162, 1998.

MORIWAKI, C.; BRESCANSIN, E.G.; HIOKA, N.; MAIONCHI, F.; MATIOLI, G. Estudo da degradação do fármaco Nabumetona por fotólise direta. **Acta Scientiarum, Health Science**, v.23, p.651–654, 2008.

NGWA, G. Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development. **Drug Delivery Technology**, v.10, n.5, p.56–59, 2010.

PICO, Y.; RODRIGUEZ, R.; MANES, J. Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n.3, p.133–151, 2003.

QUEIROZ, S.C.N.; JARDIM, I.C.S.F. Eletroforese capilar. **Chemkeys**, v.1, p.1–9, 2001.

RAM, V.R.; DAVE, P.N.; JOSHI, H.S. Development and validation of a stability-indicating HPLC assay method for simultaneous determination of spironolactone and furosemide in tablet formulation. **Journal of Chromatographic Science**, v.50, n.8, p.721-726, 2012.

RAUBER, G.S. **Cocristais farmacêuticos de furosemida: obtenção, caracterização e estudos de estabilidade**. Florianópolis, 2013. 235p. Dissertação de Mestrado - Centro de Ciências da Saúde - Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Universidade Federal de Santa Catarina.

REYNOLDS, D.W.; FACCHINE, K.L.; MULLANEY, J.F.; ALSANTE, K.M.; HATAJIK, T.D.; MOTTO, M.G. Conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, p.48–56, 2002.

SANTOS, M.R.; TAVARES, M.F.; RUBIM, J.C. Development of a laser induced fluorescence detection scheme for capillary electrophoresis. **Química Nova**, v.23, n.5, p.585–589, 2000.

SHIN, S.-C.; KIM, J. Physicochemical characterization of solid dispersion of furosemide with TPGS. **International Journal of Pharmaceutics**, v.251, n.1,

p.79–84, 2003.

SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v.30, n.3, p.740–744, 2007.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade 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. WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de química analítica**. 8.ed. São Paulo: Thomson, Leaning 2006. 999p.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3.ed. Hoboken: John Wiley, 2010. 912p.

SORA, D.I.; UDRESCU, S.; ALBU, F.; DAVID, V.; MEDVEDOVICI, A. Analytical issues in HPLC/MS/MS simultaneous assay of furosemide, spironolactone and canrenone in human plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.52, n.5, p.734–740, 2010.

SPAMER, E.; MÜLLER, D.G.; WESSELS, P.L.; VENTER, J.P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.16, n.4/5, p.247–253, 2002.

SWARTZ, M.; KRULL, I. Developing and validating stability-indicating methods. **LCGC North America**, v.23, n.6, p.586–593, 2005.

TAVARES, M.F. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v.19, n.2, p.173–181, 1996.

TAVARES, M.F. Mecanismo de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v.27, p.493–511, 1997.

UNITED States Pharmacopeia: USP 37; National Formulary 32. Rockville: United States Pharmacopeia, 2014. 3000p.

VALLADÃO, D.M.S.; IONASHIRO, M.; ZUANON NETTO, J. Determinação de fármacos diuréticos em associação por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria. **Química Nova**, v.31, n.1, p.44–46, 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 8719430/1 - Aline de Souza

Email: alinesza.sp@gmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)

Data de Nascimento: 18/04/1985

Cédula de Identidade: RG - 43.567.041-0 - SP

Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2011

Curso: Mestrado

Programa: Fármaco e Medicamentos

Área: Produção e Controle Farmacêuticos

Data de Matrícula: 03/07/2013

Início da Contagem de Prazo: 03/07/2013

Data Limite para o Depósito: 04/01/2016

Orientador: Prof(a). Dr(a). Erika Rosa Maria Kedor - 03/07/2013 até o presente. Email: ermkedor@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 03/07/2013

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 27/08/2014

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 03/07/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015

Impresso em: 04/11/2015 08:44:16

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 8719438/1 - Aline de Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
PBC5803-3/2	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	09/08/2013	19/08/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5805-1/2	Desenvolvimento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2013	17/09/2013	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5722-6/3	Espectrofotometria Diferencial no Controle da Qualidade de Medicamentos	14/08/2013	17/09/2013	45	0	-	-	N	Turma cancelada
FBF5777-3/1	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	15/08/2013	27/11/2013	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5784-2/2	Eletroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	10/09/2013	11/11/2013	90	6	87	A	N	Concluída
FBA5728-3/8	Aprimoramento Didático	15/10/2013	11/11/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5704-6/2	Análise Espectrométrica de Fármacos	17/02/2014	01/05/2014	150	10	96	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:	
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.	
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.	

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015

Impresso em: 04/11/2015 08:44:18

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 8719430/1 - Aline de Souza

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
33633	Erika Rosa Maria Kedor	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015
Impresso em: 04/11/2015 08:44:18