UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamento
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Determinação do 17β -estradiol em formas farmacêuticas
utilizadas na terapia de reposição hormonal

Clarice Yakabe

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientador:
Prof. Titular. João F. Magalhães

São Paulo

2004

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

Yakabe, Clarice
Y15de Determinação do 17 β -estradiol em formas farmacêuticas
 utilizadas na terapia de reposição hormonal / Clarice
 Yakabe. -- São Paulo, 2004.
 156p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Magalhães, João Fernandes

1. Medicamento : Controle de qualidade 2.
Espectrofotometria : Análise de medicamento 1.
T. II. Magalhães, João Fernandes, orientador.

615.19015 CDD

Clarice Yakabe

Determinação do 17β -estradiol em formas farmacêuticas utilizadas
na terapia de reposição hormonal

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof Titular. João Fernandes Magalhães
orientador/presidente

Profa Dra Akimi Mori Honda
1º. examinador

Profa Dra Maria Palmira Daflon Gremião
2º. examinador

Profa Dra Telma Mary Kaneko
3º. examinador

Prof Dr Jorge Luiz Seferin Martins
4º. examinador

São Paulo, 30 de setembro de 2004

A Deus e à minha família por ter-me apoiado em todos os momentos para elaboração deste trabalho.

*Ao Prof. Titular João Fernandes
Magalhães pela orientação e apoio na
realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À amiga e Profa. Dra Akimi Mori Honda pelo estímulo e orientação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Seferin Martins pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr Anil Kumar Singh pela amizade e sugestões.

À Profa Dra Telma Mary Kaneco pelo apoio e sugestões.

Aos colegas, Ixis, Pedro, Tatiane, Elisangela, Najla, Andréia, Carla, Zaim pela colaboração e amizade.

Às funcionárias do laboratório, Regina, Iria e Raquel, pela atenção.

Aos bibliotecários da Biblioteca do Conjunto das Químicas pelos serviços prestados.

Ao Laboratório FARMASA pelo fornecimento dos materiais e amostra.

Ao Laboratório Biolab-Sanus pelo fornecimento de materiais.

Ao Laboratório Janssen-Cilag pelo fornecimento de amostra.

À Laureci D. Costa do SINC do Brasil, pela realização do espectro do estradiol no infravermelho.

Ao Sr Augusto da Seção de Compras do IAMSPE pelos serviços prestados.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Conceitos.....	4
2.2 Fisiologia.....	5
2.2.1 Estrogênio.....	6
2.2.2 Progesterona.....	6
2.2.3 Androgênios.....	7
2.3 Deficiência de estrogênios.....	7
2.3.1 Sintomas vasomotores.....	7
2.3.2. Atrofia da genitália.....	8
2.3.3 Sintomas psicológicos.....	8
2.3.4 Osteoporose.....	9
2.3.5 Doenças cardiovasculares.....	10
2.4 Tratamento da menopausa.....	11
2.4.1 Terapia de reposição hormonal.....	12
2.4.1.1 Com estrogênios.....	13
2.4.1.2 Com progestogênio.....	16
2.4.1.3 Com androgênios.....	18
2.4.1.4 Com tibolona.....	18
2.4.2 Esquema de utilização.....	19
2.5 Terapia de reposição hormonal: benefícios e riscos.....	19
2.5.1 TRH e sintomas da menopausa.....	20
2.5.2 TRH e doenças mentais.....	22
2.5.3 TRH e osteoporose.....	24
2.5.4 TRH e doença cardiovascular.....	26

2.5.5 TRH e doenças ginecológicas.....	30
2.5.6 TRH e outras doenças.....	31
2.6 Efeitos colaterais dos estrogênios e progestogênios.....	33
2.7 Estradiol.....	34
2.7.1 Propriedades físicas e químicas.....	34
2.7.2 Biossíntese.....	36
2.7.3 Síntese.....	37
2.7.4 Propriedades farmacodinâmicas.....	37
2.7.5 Propriedades farmacocinéticas.....	38
2.7.5.1 Absorção.....	38
2.7.5.2 Distribuição.....	38
2.7.5.3 Biotransformação.....	39
2.7.5.4 Eliminação.....	39
2.8 Metodologia analítica.....	40
2.8.1 Em produtos farmacêuticos.....	40
2.8.2 Em material biológico.....	43
2.8.3 Meio ambiente.....	46
2.8.4 Espectrometria na região do visível.....	48
2.9 Produtos comercializados no mercado brasileiro.....	50
 3 OBJETIVOS.....	 52
 4 MATERIAL E MÉTODOS.....	 53
4.1 Material.....	53
4.1.1 Reagentes.....	53
4.1.2 Soluções.....	53
4.1.3 Substância de referência.....	53
4.1.4 Matérias primas.....	54

4.1.5 Amostras de medicamentos.....	54
4.1.6 Preparação da amostra de gel simulada e placebo.....	57
4.1.7 Preparação da amostra de comprimido simulada e placebo.....	57
4.1.8 Equipamentos.....	57
4.2 Métodos.....	58
4.2.1 Identificação do 17 β -estradiol.....	58
4.2.2 Método espectrofotométrico na região do ultravioleta.....	59
4.2.2.1 Padronização do método.....	59
4.2.2.1.1 Espectro de absorção.....	59
4.2.2.1.1.1 Preparação da solução padrão de 17 β -estradiol.....	59
4.2.2.1.2 Seleção do comprimento de onda para leitura.....	60
4.2.2.1.3 Determinação da estabilidade da solução.....	60
4.2.2.1.4 Construção da curva de Ringbom.....	60
4.2.2.1.5 Construção da curva analítica.....	62
4.2.2.1.6 Aplicação do método na análise de amostras comerciais e simuladas.....	62
4.2.2.1.6.1 Estudo da influência dos excipientes do comprimido no espectro de absorção do 17 β -estradiol.....	62
4.2.2.1.6.2 Preparação da solução padrão para comprimido.....	62
4.2.2.1.6.3 Preparação do branco para comprimido.....	63
4.2.2.1.6.4 Preparação das amostras comerciais e simuladas.....	63
4.2.2.1.6.5 Ensaio.....	63
4.2.2.1.6.6 Cálculo.....	64
4.2.2.1.7 Teste de recuperação para comprimido.....	64
4.2.2.1.8 Teste de linearidade para comprimido.....	65
4.2.2.1.8.1 Preparação da solução de 17 β -estradiol para teste de linearidade.....	65
4.2.2.1.9 Preparação do padrão para gel.....	66
4.2.2.1.10 Preparação da amostra para gel.....	66
4.2.2.1.11 Preparação do branco para gel.....	66
4.2.2.1.12 Ensaio.....	67

4.2.2.1.13 Preparação da amostra para adesivo.....	67
4.2.2.1.14 Preparação do padrão para adesivo.....	67
4.2.2.1.15 Ensaio.....	68
4.2.2.1.16 Cálculo.....	68
4.2.2.1.17 Teste de recuperação para adesivo.....	68
4.2.2.2 Determinação do limite de detecção e de quantificação.....	68
4.2.3 Estudo do doseamento do 17 β -estradiol pelo método espectrofotométrico na região do visível (reação colorimétrica).....	70
4.2.3.1 Padronização do método.....	70
4.2.3.1.1 Espectro de absorção.....	70
4.2.3.1.2 Seleção do comprimento de onda para leitura.....	71
4.2.3.1.3 Determinação da estabilidade do produto colorido.....	72
4.2.3.1.4 Influência da concentração dos reagentes.....	72
4.2.3.1.5 Construção da curva de Ringbom.....	73
4.2.3.1.6 Construção da curva analítica.....	75
4.2.3.2 Aplicação do método na análise de amostras comerciais e simuladas..	75
4.2.3.2.1 Preparação da solução padrão para gel.....	75
4.2.3.2.2 Preparação da amostra para gel.....	76
4.2.3.2.3 Preparação do branco para gel.....	76
4.2.3.2.4 Ensaio.....	76
4.2.3.2.5 Cálculo.....	77
4.2.3.2.6 Teste de recuperação para gel.....	77
4.2.3.2.7 Teste de linearidade para gel.....	78
4.2.3.2.7.1 Preparação da solução de 17 β -estradiol para teste de linearidade.	78
4.2.3.3.1 Preparação da solução padrão para comprimido.....	78
4.2.3.3.2 Preparação da amostra para comprimido.....	78
4.2.3.3.3 Preparação do branco para comprimido.....	79
4.2.3.3.4 Ensaio.....	79
4.2.3.3.5 Cálculo.....	79
4.2.3.3.6 Teste de recuperação para comprimido.....	79

4.2.3.3.7 Teste de linearidade para comprimido.....	80
4.2.3.4.1 Preparação do padrão para adesivo.....	80
4.2.3.4.2 Preparação da amostra para adesivo.....	80
4.2.3.4.3 Ensaio.....	80
4.2.3.4.4 Cálculo.....	81
4.2.3.4.5 Teste de recuperação para adesivo.....	81
4.2.3.4.6 Determinação do limite de detecção e de quantificação.....	81
4.2.4 Comparação estatística dos métodos propostos para forma farmacêutica comprimido.....	82
5 RESULTADOS.....	85
5.1 Identificação.....	85
5.2 Estudo do doseamento do 17 β -estradiol pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.....	90
5.2.1 Escolha do solvente.....	90
5.2.2 Seleção do comprimento de onda para leitura.....	92
5.2.3 Determinação da estabilidade da solução.....	93
5.2.4 Construção da curva de Ringbom.....	94
5.2.5 Construção da curva analítica.....	96
5.2.6 Resultados das análises de amostras comerciais e simuladas.....	98
5.2.7 Teste de recuperação.....	102
5.2.8 Teste de linearidade.....	104
5.2.9 Determinação do limite de detecção e de quantificação UV.....	105
5.3 Estudo do doseamento do 17 β -estradiol pelo método espectrofotométrico na região do visível (reação colorimétrica).....	105
5.3.1 Espectro de absorção.....	105
5.3.2 Seleção do comprimento de onda para leitura.....	106
5.3.3 Determinação da estabilidade do produto colorido.....	107
5.3.4 Influência da concentração dos reagentes.....	109

5.3.5 Curva de Ringbom.....	110
5.3.6 Curva analítica.....	112
5.3.7 Resultado das análises de amostras comerciais e simuladas.....	113
5.3.8 Teste de recuperação.....	115
5.3.9 Teste de linearidade para gel.....	116
5.3.10 Teste de linearidade para comprimido.....	119
5.3.11 Limite de detecção e de quantificação para método colorimétrico.....	120
5.4 Comparação estatística dos métodos propostos.....	121
 6 DISCUSSÃO.....	 122
 7 CONCLUSÕES.....	 129
 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 131

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Preparação das soluções de 17 β -estradiol em etanol absoluto para construção da curva de Ringbom.....	61
Esquema 2- Preparação das diluições para determinação do espectro de absorção do método colorimétrico.....	71
Esquema 3- Preparação das diluições para seleção do comprimento de onda (λ) do método colorimétrico.....	72
Esquema 4- Variação da concentração dos reagentes na reação colorimétrica.....	73
Esquema 5- Preparação das soluções para obtenção da curva de Ringbom....	74
Esquema 6- Preparação das soluções para reação colorimétrica das amostras comerciais e simuladas.....	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Espectros de absorção na região do infravermelho obtidos a partir do 17 β -estradiol padrão de referência (-----) e matéria prima (-----).....85
- Figura 2- Espectros de absorção na região do infravermelho obtidos a partir do 17 β -estradiol padrão de referência (-----) e padrão secundário (-----).....86
- Figura 3- Espectros de absorção na região do infravermelho obtidos a partir do 17 β -estradiol padrão de referência (-----) e matéria prima (-----).....87
- Figura 4- Espectro do 17 β -estradiol no UV, padrão secundário, em solução etanólica, de concentração 50 μ g/mL, e varredura entre 200 - 400nm.....88
- Figura 5- Espectro de absorção da solução de 17 β -estradiol 60 μ g/mL no UV em diferentes solventes: acetona (-----), acetonitrila (-----), etanol absoluto (-----), metanol (-----) e tetraidrofurano (-----), no intervalo entre 200 - 400nm.....90
- Figura 6- Espectro de absorção do 17 β -estradiol 60 μ g/mL no UV nos solventes: acetonitrila (-----), etanol absoluto (-----), metanol (-----) e tetraidrofurano (-----).....91
- Figura 7- Espectro de absorção da solução de 17 β -estradiol no UV nas concentrações: 40 (-----), 80 (-----), 120 (-----) e 160 (-----) μ g/mL em etanol absoluto.....92
- Figura 8- estabilidade da solução de 17 β -estradiol 60 μ g/mL em etanol absoluto, no período de 12 horas.....93

Figura 9- Curva de Ringbom para 17 β -estradiol em etanol absoluto, em 281nm.....	96
Figura 10- Curva analítica para o 17 β -estradiol em etanol absoluto, em 281nm.....	98
Figura 11- Espectro de absorção do placebo de comprimido (----) e padrão de 17 β -estradiol 60 μ g/mL (----) em etanol absoluto.....	100
Figura 12- Espectro de absorção da amostra simulada de comprimidos 2 mg (---) e padrão de 17 β -estradiol 60 μ g/mL (----) em etanol absoluto.....	101
Figura 13- Espectro de absorção da amostra comercial de comprimidos 2 mg (---) e padrão de 17 β -estradiol 60 μ g/mL (----) em etanol absoluto.....	101
Figura 14- Espectro de absorção da amostra comercial de adesivo transdérmico 3,20mg (----) e padrão de 17 β -estradiol 64 μ g/mL (----) em etanol absoluto.....	102
Figura 15- Teste de linearidade para comprimidos do método no UV.....	104
Figura 16- Espectro de absorção do 17 β -estradiol nas concentrações de 8,0, 16,0, 24,0 e 32,0 μ g/mL do produto da reação colorimétrica da sulfanilamida diazotada e estradiol.....	106
Figura 17: Estabilidade do azo composto formado pelo acoplamento da sulfanilamida diazotada com 17 β -estradiol, no período de 3 horas.....	108

Figura 18: Influência da concentração dos reagentes na reação colorimétrica.....	109
Figura 19- Curva de Ringbom do produto colorido resultante da reação entre estradiol e sulfanilamida diazotada, em 480 nm.....	110
Figura 20- Curva analítica obtida a partir de soluções coloridas do produto de reação entre 17 β -estradiol e sulfanilamida diazotada nas concentrações de 10 a 28 μ g/mL, e leitura a 480 nm.....	113
Figura 21- Teste de linearidade, para forma farmacêutica gel, do método espectrofotométrico no VIS.....	117
Figura 22- Espectro de absorção da amostra simulada de gel e padrão de 17 β -estradiol do método colorimétrico.....	118
Figura 23- Espectro de absorção da amostra comercial de gel e padrão de 17 β -estradiol do método espectrofotométrico no visível.....	119
Figura 24- Teste de linearidade em comprimido, do método colorimétrico.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais estrogênios, vias e formas de apresentação usados na TRH.....	13
Tabela 2- Principais progestogênios, vias e formas de apresentação.....	17
Tabela 3- Principais androgênios usados, vias e doses.....	18
Tabela 4- Medicamentos contendo 17 β -estradiol comercializados no Brasil.....	53
Tabela 5- Valores da faixa de fusão apresentados pela matéria prima do 17 β -estradiol micronizado.....	89
Tabela 6- Comprimento de onda máximo e respectiva absorvância nos diferentes solventes.....	91
Tabela 7- Valores obtidos na seleção do comprimento de onda (λ) para leitura no UV.....	93
Tabela 8- Estabilidade da solução de 17 β -estradiol em etanol absoluto.....	94
Tabela 9- Valores empregados para construção da curva de Ringbom do 17 β -estradiol em etanol absoluto, em 281 nm.....	95
Tabela 10- Valores das absorvâncias das soluções de 17 β -estradiol, em etanol absoluto, empregado para a construção da curva analítica, do método UV.....	97

Tabela 11- Precisão intradia do método espectrofotométrico, na região do UV, para comprimido e adesivo transdérmico.....	99
Tabela 12- Precisão interdía do método espectrofotométrico, na região do UV, para comprimido e adesivo transdérmico, em 3 dias diferentes.....	99
Tabela 13- Teste de recuperação intradia, do método espectrofotométrico no UV, para comprimido e adesivo transdérmico, em 3 níveis de concentração e em triplicata.....	103
Tabela 14- Teste de recuperação interdía, do método espectrofotométrico no UV, para comprimido e adesivo transdérmico, em 3 níveis de concentração e em e em 3 dias diferentes.....	103
Tabela 15- Teste de linearidade para o 17 β -estradiol, realizado em triplicata para cada concentração e em 3 dias diferentes, em comprimidos, para o método espectrofotométrico no UV.....	104
Tabela 16- Resultados obtidos na determinação do espectro de absorção do método espectrofotométrico no visível.....	105
Tabela 17- Resultados obtidos para seleção do comprimento de onda (λ) de leitura do método espectrofotométrico na região do visível.....	107
Tabela 18- Estabilidade do produto colorido formado.....	108
Tabela 19- Influência da concentração dos reagentes na reação colorimétrica.....	109

Tabela 20- Valores que resultaram das leituras das soluções coloridas dos produtos da reação entre estradiol e sulfanilamida diazotada e usados na construção da curva de Ringbom do 17 β -estradiol – reação colorimétrica, que pode ser observada na figura 18.....111

Tabela 21- Valores das absorvâncias em função das concentrações do produto colorido da reação entre estradiol e sulfanilamida diazotada, em 480nm, usados na construção da curva analítica do 17 β estradiol.....112

Tabela 22- Precisão intradia do método colorimétrico para doseamento do 17 β estradiol em medicamentos (gel, comprimido e adesivo transdérmico).....114

Tabela 23- Precisão interdia do método colorimétrico baseado na reação da sulfanilamida diazotada com 17 β estradiol para medicamentos, em 3 dias diferentes.....114

Tabela 24- Teste de recuperação intradia aplicadas às amostras comerciais e simuladas de gel, comprimido e adesivo transdérmico, para o método colorimétrico, em 3 níveis de concentração.....115

Tabela 25- Teste de recuperação interdia aplicadas às amostras comerciais e simuladas de gel, comprimido e adesivo transdérmico, para o método colorimétrico, em 3 níveis de concentração, e em 3 dias diferentes.....116

Tabela 26- Resultados do teste de linearidade da forma farmacêutica gel, para o método colorimétrico.....117

Tabela 27- Resultados do teste de linearidade da forma farmacêutica comprimido, para o método colorimétrico.....120

Tabela 28- Valores obtidos para o teste F do método espectrofotométrico no UV e colorimétrico.Valor tabelado de F para 95% nível de confiança e 9 graus de liberdade no numerador e denominador: 3,18 (em três dias diferentes).....121

Tabela 29- Valores obtidos para o teste t do método espectrofotométrico no UV e colorimétrico.Valor tabelado de t para 95% nível de confiança e 18 graus de liberdade: 2,101 (em três dias diferentes).....121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP: acetato de medroxiprogesterona
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP: British Pharmacopoeia (Farmacopéia Britânica)
DEF: Dicionário de Especialidades Farmacêuticas
ECE: estrogênios conjugados eqüinos
FSH: abreviação inglesa de hormônio folículo estimulante
GnRH: abreviação inglesa de hormônio liberador de gonadotropina
HDL: abreviação inglesa de lipoproteínas de alta densidade
HERS: Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH: International Conference on Harmonization (Conferência ternacional de Harmonização)
LDL: abreviação inglesa de lipoproteínas de baixa densidade
LH: abreviação inglesa de hormônio luteinizante
MWS: Million Women Study
PEPI: Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions
TRH: terapia de reposição hormonal
USP: United States Pharmacopeia (Farmacopéia Americana)
VLDL: abreviação inglesa de lipoproteínas de muita baixa densidade
WHI: Women's Health Initiative
WISDOM: Women's International Study of Long Duration Oestrogen after Menopause

RESUMO

Atualmente, na terapia de reposição hormonal (TRH), o estrogênio é o tratamento de escolha para os sintomas da menopausa. Para o tratamento adequado, um dos estrogênios amplamente usado em TRH é o 17β -estradiol, o qual está disponível em diversas formas farmacêuticas. Um método espectrofotométrico na região do visível foi desenvolvido para quantificação do 17β -estradiol em gel, comprimido e adesivo transdérmico. O método baseou – se na reação de diazotização da sulfanilamida seguida de acoplamento ao 17β -estradiol, produzindo um azo composto de cor marrom – avermelhada. O comportamento da reação foi verificado quanto à concentração dos reagentes, espectro de absorção, estabilidade do produto colorido. A linearidade foi observada no intervalo de concentração entre 10,0 a 28,0 $\mu\text{g/mL}$, com um coeficiente de correlação de 0,9996. O limite de detecção foi de 0,76 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação, de 2,30 $\mu\text{g/mL}$. O método padronizado foi aplicado na amostra comercial e simulado, e os resultados do desvio padrão relativo foram abaixo de 2 %, e a médias da porcentagem de recuperação do padrão variaram de 98 a 101 %. O método colorimétrico demonstrou ser preciso e exato, podendo ser usado para determinação quantitativa do 17β -estradiol nas formas farmacêuticas estudadas. No método espectrofotométrico na região do UV, o 17β -estradiol foi extraído com etanol absoluto. Determinados os parâmetros analíticos, o método mostrou – se muito simples, rápido, preciso, exato e mais econômico que o método colorimétrico, porém sendo aplicável somente aos comprimidos.

ABSTRACT

Nowadays, estrogen – based hormonal replacement therapy (HRT) is the treatment of choice for menopause symptoms. For adequate treatment, one of the most widely used estrogens in HRT is 17β -estradiol, which is available in several pharmaceutical dosage forms. A visible spectrophotometric method was developed for quantification of 17β -estradiol in gel , tablets and patches. The method was based on the diazotization reaction of sulfanilamide and azo coupling with 17β -estradiol, forming the brown – reddish azo compound. The reaction behavior was observed for reagent concentration, absorption spectra and color stability. The linearity of the method was observed in a concentration range from 10,0 to 28,0 $\mu\text{g/mL}$, with correlation coefficient of 0,9996. The detection limit was 0,76 $\mu\text{g/mL}$ and the quantitation limit was 2,30 $\mu\text{g/mL}$. The standardized method was applied to dosage formulations and simulated samples; the relative standard deviations (RSD) were below of 2 % and the average percentage recoveries of standards varied from 98 to 101 %. The colorimetric method showed precise, accurate and inexpensive, and can be used for quantitative determination of 17β -estradiol in pharmaceutical formulations studied. On the UV spectrophotometric method, the 17β -estradiol was extracted with ethanol absolute. After determining analytical parameters, this method showed very simple, fast, precise, accurate and more economic than colorimetric method but only be applied for tablet formulations.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos e a evolução da medicina nas últimas décadas resultaram numa conquista importante para todos – o aumento da longevidade.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2001), a expectativa de vida do brasileiro vem crescendo paulatinamente. Em 1980, enquanto as mulheres possuíam uma esperança de vida ao nascer de 66,0 anos, os homens detinham uma vida média de 59,6 anos, representando uma diferença de 6,4 anos. Vinte e um anos mais tarde esta diferença aumentou para 7,8 anos, tendo a mulher uma vida média de 72,9 anos e o homem 65,1 anos.

Esta perspectiva otimista de viver mais tem despertado grande interesse quanto à atenção à mulher no climatério, pois ela viverá um número maior de anos após a menopausa e os outros motivos são os benefícios e controvérsias que envolvem o uso da reposição hormonal no combate a doenças degenerativas que ocorrem a partir deste período de vida.

Considera-se o climatério como o período de transição entre a vida reprodutiva e a senilidade, oficialmente iniciada aos 65 anos (MARINHO, 2000).

A deficiência estrogênica na pós-menopausa acarreta modificações muito significativas, sendo as mais importantes a atrofia do sistema genito-urinário, instabilidades vasomotoras, alterações no comportamento ou humor, e a longo prazo, osteoporose e doenças cardiovasculares (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

Os estudos observacionais das últimas duas décadas tinham sugerido que a terapia de reposição hormonal (TRH) reduziria os riscos de fraturas osteoporóticas e doenças coronárias. E, baseada nesta evidência, a TRH era recomendada para aquelas mulheres com alto risco para estas doenças. Mas, no começo dos anos 90, iniciaram-se vários estudos clínicos aleatórios

envolvendo grande número de mulheres para prover evidência em relação aos riscos e benefícios da TRH (GRADY, HERRINGTON, BITTNER, 2003).

Em julho de 2002, o National Institute of Health (NHI) dos Estados Unidos da América, ao anunciar a interrupção do maior estudo sobre TRH, o Women's Health Initiative (WHI), derrubou a tese de que um dos tipos de terapia hormonal, uma combinação de estrogênio e progestogênio, protegeria mulheres saudáveis de doenças cardiovasculares na menopausa.

O impacto causado por esta publicação tem influenciado no comportamento da prescrição e uso, como mostra as investigações dos pesquisadores da Universidade de Toronto, os quais detectaram que o uso no último trimestre de 2002 foi 32% mais baixo que no mesmo período do ano anterior (AUSTIN, MAMDANI, JAAKKIMAINEN, 2003).

No final de fevereiro de 2004, o NHI cancelou a segunda pesquisa de grande porte sobre TRH, que analisava os efeitos do estrogênio usado isoladamente, porque parece aumentar o risco de derrame embora reduza o de fratura de quadril (WHI STEERING COMMITTEE, 2004).

Segundo Gann e Morrow (2003), os riscos e benefícios do uso da TRH, a curto prazo para sintomas da menopausa, necessitam ser esclarecidas em investigações rigorosas e estudos examinando formulações com dosagens mais baixas e métodos alternativos de administração, como adesivos cutâneos.

Portanto, a decisão em receber TRH é altamente pessoal, e deve ser baseado no acordo entre paciente e o médico, analisando-se os benefícios e seus riscos.

A TRH é bastante antiga, data de 1896, quando extratos ovarianos crus foram dispensados em uma grande variedade de alimentos na Clínica Landau em Berlin (HUPPERT, 1987). Porém, hoje contamos com uma variedade de substâncias ativas, formas farmacêuticas e esquemas de utilização para a TRH.

Atualmente existe no mercado brasileiro, várias formas farmacêuticas contendo 17 β -estradiol, tanto isolado como associado a um progestogênio. Segundo o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas (DEF 2003/4) as

seguintes formas farmacêuticas estão disponíveis em forma isolada: adesivo transdérmico, comprimido, gel e implante.

O 17 β -estradiol é o estrogênio mais potente de ocorrência natural nos seres humanos. Como sofre substancial metabolismo pré-sistêmico se administrada via oral, a via transdérmica torna-se mais adequada, sendo o gel, uma das formas farmacêuticas utilizadas para esta finalidade.

O primeiro artigo relatando o uso de uma preparação comercial de estrogênio foi publicado no Journal of the American Medical Association em 1935 (HUPPERT, 1987) e o primeiro método oficial de análise de 17 β -estradiol em comprimidos está descrito na Farmacopéia Americana de 1950.

Apesar da TRH ser uma terapia antiga, há carência de métodos analíticos para o controle de qualidade de medicamentos contendo 17 β -estradiol.

A publicação de pesquisas ora satisfatória ora alarmante tem causado muita polêmica e assustado as mulheres, por isso tivemos o propósito de fazer uma revisão sobre os benefícios e riscos da TRH à luz das novas evidências e desenvolver metodologia analítica alternativa para os métodos oficiais de diversas formas farmacêuticas contendo 17 β -estradiol, utilizados na TRH.

Como não existe método oficial para formas farmacêuticas, gel e adesivo, transdérmico, o propósito deste trabalho foi desenvolver e padronizar métodos eficientes e de fácil aplicabilidade, pois, nem sempre os modernos e sofisticados métodos cromatográficos podem ser aplicados, particularmente, nos casos das formas farmacêuticas: gel, creme, pomadas, etc.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CONCEITOS:

Os termos menopausa, climatério e perimenopausa são distintos. A principal diferença entre estes termos é que a menopausa é um evento discreto, enquanto os eventos do climatério e da perimenopausa se estendem por vários anos (PUGH, MULLINS, 1999).

Menopausa é a cessação permanente da menstruação que resulta da perda da atividade folicular ovariana (PUGH, MULLINS 1999; HURD, 1998; MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

Entende-se por climatério como sendo o período de transição entre a vida reprodutiva e a senilidade, oficialmente iniciada aos 65 anos (MARINHO, 2000). A perimenopausa, que compreende o período antes, durante e após a menopausa têm significado clínico muito maior (HURD, 1998).

A menopausa é assinalada pelo último período menstrual de uma mulher. Esta ocorrência só pode ser diagnosticada retrospectivamente, e é usualmente considerado o último evento, quando for seguido por um intervalo de doze meses, livre de hemorragia. O início da menopausa natural tem permanecido constante e ocorre em uma idade média de 51 anos (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999; PUGH, MULLINS, 1999; BEERS, BERKOW, 1999).

A menopausa prematura refere-se à falha ovariana de causa desconhecida que ocorre antes dos 40 anos. Pode estar associada com tabagismo, vivência em altas altitudes ou estado nutricional pobre. A menopausa artificial pode resultar da ooforectomia, quimioterapia, radiação da pelve ou qualquer outro processo que prejudique o suprimento sanguíneo do ovário (BEERS, BERKOW, 1999).

2.2 FISILOGIA:

Os ovários humanos contêm aproximadamente 700.000 folículos ao nascer. Este número cai progressivamente com o aumento da idade e assim ao atingir 50 anos, o número de folículos aproxima-se de zero. A taxa de perda dos folículos é mais alta durante o período de 40 a 50 anos de idade, possivelmente devido ao aumento da taxa de degeneração (atresia) dos folículos (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999; FERRIANI, 2000).

A função ovariana inclui dois principais papéis: a produção de óvulos (gametogênese) e a síntese e secreção de hormônios (hormonogênese). Os estrogênios e os progestogênios são hormônios endógenos que produzem numerosas ações fisiológicas. Nas mulheres, estas incluem efeitos no desenvolvimento, ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, preparo cíclico do trato reprodutor para fertilização e implantação do óvulo e as principais ações no metabolismo mineral, dos carboidratos, das proteínas e dos lipídeos. Muitas características sexuais secundárias femininas são influenciadas por esses hormônios (LOOSE-MITCHELL, STANCEL, 2001). Ambas as funções sofrem mudanças discretas com o envelhecimento; assim menos óvulos são produzidos e são menos prontamente fertilizados, e os níveis de hormônios se tornam irregular. É o folículo em desenvolvimento que normalmente secreta estradiol, e a ausência desta atividade folicular, resulta na diminuição da secreção estrogênica e no aumento da secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) pela glândula pituitária anterior (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

A menopausa pode ser caracterizada pelo nível alto de FSH (acima de 20 U/L) e nível baixo de estradiol (abaixo de 100 pmol/L) no soro. Desde que os óvulos não estão sendo liberados, a produção de progesterona do ovário também cessa, e os níveis do hormônio luteinizante (LH) eventualmente aumentam (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

Portanto, durante a menopausa, os hormônios mais afetados incluem aqueles produzidos pelos ovários: estrogênio, progesterona e androgênios.

Além disso, os seus níveis, a forma como são produzidos e seus papéis se modificam.

2.2.1 ESTROGÊNIO:

Em mulheres não-grávidas, há três tipos de estrogênios naturais: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3) (STROBL, 1996, CAMARGOS, LAMAITA, LEMOS, 2000).

O principal estrogênio circulante durante os anos reprodutivos é o 17 β -estradiol. Na mulher pré-menopáusica, o estradiol é produzido principalmente pelo ovário, e quantidades adicionais são sintetizadas no tecido periférico pela conversão da testosterona ou estrona. Após a menopausa, o principal estrogênio circulante é a estrona. Concentrações de estrona excedem a do estradiol cerca de quatro vezes, mas ela tem aproximadamente um terço da potência estrogênica do estradiol. Na mulher pós-menopáusica, a maioria da estrona é derivada da conversão periférica da androstenediona pela enzima aromatase extraglandular encontrada principalmente no tecido adiposo (PUGH, MULLINS, 1999).

2.2.2 PROGESTERONA:

A progesterona protege o endométrio da estimulação estrogênica excessiva durante os anos reprodutivos. Basicamente, regula os receptores de estrogênio, mas também exerce efeitos intranucleares diretos que inibem os efeitos trópicos do estrogênio sobre o endométrio (HURD, 1998).

A produção de progesterona cessa após a menopausa. Níveis diminuídos de progesterona afetam órgãos, tais como o endométrio e a mama, que são responsivos aos esteróides gonadais (HURD, 1998).

2.2.3 ANDROGÊNIOS:

Antes da menopausa, o ovário produz aproximadamente 50 % de androstenediona circulante e 25 % de testosterona. Após a menopausa, a produção total de androgênios diminui, devido principalmente à diminuição da produção ovariana, associada à diminuição da produção pela supra-renal (HURD, 1998).

O papel fisiológico da testosterona e as consequências de sua deficiência ainda não são conhecidos, mas é possível que contribua para a libido, energia, massa muscular e força, e densidade mineral óssea (SNYDER, 2001).

2.3 DEFICIÊNCIA DE ESTROGÊNIOS:

Os principais sintomas associados com a deficiência de estrogênios, nos períodos pós-menopáusicos e perimenopausicos, são a curto prazo, sintomas vasomotores, os distúrbios menstruais, atrofia da genitália e problemas psicológicos. O hipoestrogenismo persistente, a mais longo prazo, terá repercussões mais sérias como osteoporose e doença cardiovascular (FERRIANI, 2000; HURD, 1998; MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999; PUGH, MULLINS, 1999).

2.3.1 SINTOMAS VASOMOTORES:

Os sintomas vasomotores ocorrem em cerca de 70 % das mulheres, resultando em desconforto físico. Dura cerca de cinco anos para aproximadamente um quarto das mulheres. Incluem fogachos, cefaléia, insônia, vertigens e desmaios (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

Os fogachos ou ondas de calor são experimentados por 75 a 85 % das mulheres que seguem a menopausa natural e por 37 a 50 % das mulheres pré-menopáusicas que sofreram ooforectomia bilateral, mas

somente 30 % das mulheres os descrevem como severo e procuram tratamento médico (PUGH, MULLINS, 1999).

O fogacho é descrito como períodos transitórios e recorrentes de rubor, sudorese e uma sensação de calor, freqüentemente acompanhados por palpitações, sensações de ansiedade e algumas vezes seguidos de calafrio (HURD, 1998; FERRIANI, 2000). Geralmente, dura não mais do que um a três minutos, e pode reaparecer até 30 vezes por dia, embora 5 a 10 vezes por dia, provavelmente, sejam mais frequente. A causa desses sintomas é a deficiência de estrogênio, possivelmente conduzindo a ondas anormais de LH ou hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), que afetam os neurônios hipotalâmicos que controlam o centro de regulação da temperatura corpórea (FERRIANI, 2000; HURD, 1998; PUGH, MULLINS, 1999).

2.3.2 ATROFIA DA GENITÁLIA:

O tecido vaginal e os tecidos da uretra e a base da bexiga são conhecidos como estrogênio-sensível. Dentro de 4 a 5 anos após a menopausa, aproximadamente um terço das mulheres, que não estão recebendo estrogênio-terapia, desenvolve atrofia sintomática. Os sintomas vaginais incluem ressecamento, dispáurenia e infecções vaginais recorrentes, também podem ocorrer eventuais sangramentos. Entre os sintomas urinários estão relacionados disúria, infecção do trato urinário, incontinência urinária e urgência urinária (HURD, 1998; MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

2.3.3 SINTOMAS PSICOLÓGICOS:

Os sintomas psicológicos incluem depressão, irritabilidade, exaustão, falta de concentração e memória fraca, ataques de pânico e diminuição da libido (HURD, 1998; MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999, PUGH, MULLINS, 1999).

A depressão é um dos mais freqüentes distúrbios clínicos observados nas pacientes pelos prestadores de assistência primária. Múltiplos estudos não constataram evidência de que a maioria dos sintomas psicológicos apresentados durante a transição menopáusica esteja relacionada à deficiência de estrogênio (HURD, 1998; MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999, PUGH, MULLINS, 1999).

A ansiedade e a irritabilidade aumentadas associadas a este período estão mais claramente associadas a fatores psicossociais que ao estado estrogênico (HURD, 1998).

A atrofia vaginal é um fator que pode contribuir para uma diminuição da satisfação sexual, porém a libido é um fenômeno cerebral complexo que depende de impulsos de múltiplas fontes. As evidências disponíveis sugerem que a satisfação sexual entre mulheres pós-menopáusicas não diminui com o tempo (HURD, 1998).

2.3.4 OSTEOPOROSE:

A osteoporose é uma doença metabólica caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, ocasionando maior fragilidade e maior suscetibilidade a fraturas. É uma doença silenciosa que, freqüentemente, permanece assintomática e não detectada até que ocorra uma fratura (PETRACCO, BADALOTTI, GOMES, 2000).

A causa da osteoporose é multifatorial. Os fatores primários associados à osteoporose incluem hereditariedade, idade, estado estrogênico e ingestão alimentar de cálcio. A idade é o fator mais importante associado à perda óssea. Todas as mulheres começam a perder massa óssea no início da quarta década de vida. Antes da menopausa, a velocidade de perda é menor que 1 % de tecido ósseo total por ano (HURD, 1998). A perda óssea nos primeiros cinco anos da menopausa é, usualmente, de 2 a 5 % ao ano e a partir daí, cai para cerca de 0,5 a 1 % ao ano. Algumas mulheres perdem rapidamente, chegando a perder até 15 a 18

% de sua massa óssea nos primeiros seis anos da menopausa. Cerca de 30 a 50 % da perda óssea nas mulheres pode ser atribuída à menopausa (GRIS, 2000).

As considerações sócio-econômicas e médicas da administração da osteoporose pós-menopáusia é o principal interesse. A razão deste interesse, nos países desenvolvidos, é a estimativa de que 95 % das mulheres chegam à menopausa, e 50 % destas aos 75 anos de idade. Estudos estatísticos prevêm que 86 % das mulheres nascidas nos anos 70 ultrapassarão os 75 anos de idade, o que determinará um risco maior de desenvolvimento da osteoporose. Na faixa etária dos 60 a 70 anos, mais de 30 % das mulheres têm osteoporose, e a incidência aumenta para 70 % aos 80 anos (PETRACCO, BADALOTTI, GOMES, 2000).

É difícil precisar sua real incidência, visto que a maioria delas é assintomática em sua ocorrência. No entanto, sabe-se que a relação mulher/homem é cerca de 7/1 para as fraturas vertebrais em contraste com a relação 2/1 encontrada entre as fraturas do quadril. Aproximadamente 85 % das fraturas de quadril ocorrem em mulheres, sendo que a incidência aumenta exponencialmente com a idade, indo de 9/100 000 entre as idades de 35 a 40 anos para 3 317/100 000 mulheres/ano em pacientes com 85 anos ou mais (OLIVEIRA, 2000).

2.3.5 DOENÇAS CARDIOVASCULARES:

Com o aumento progressivo da expectativa de vida média, as doenças cardiovasculares assumiram, atualmente, o papel da principal causa de morte entre as mulheres acima de 50 anos de idade (MACHADO, 2000).

A doença cardiovascular inclui a doença coronariana e a doença vascular cerebral. Foi associada a múltiplas causas, das quais a mais importante pode ser a idade. Embora o risco de morte por doença coronariana seja no mínimo três vezes maior para os homens que para as mulheres antes da menopausa, o risco relativo para as mulheres aumenta

significativamente após a menopausa. É essencial estar atento aos fatores de risco evitáveis para a doença cardiovascular como hipertensão, hiperlipidemia, diabetes e tabagismo, e incentivar as mulheres a minimizar estes fatores de risco (HURD, 1998).

A diabetes e as dislipidemias, principalmente aquelas com elevação do colesterol de baixa densidade (LDL) e redução do colesterol de alta densidade (HDL), além do aumento dos triglicerídeos, na menopausa, estão relacionadas com a doença aterosclerótica, infarto agudo do miocárdio e morte cardíaca. A hipertensão arterial também é um dos fatores de risco para desenvolvimento da doença aterosclerótica e parece ocorrer uma elevação pequena e progressiva dos níveis da pressão arterial com os anos do climatério, principalmente da pressão sistólica (BASSAN, 1999).

2.4 TRATAMENTO DA MENOPAUSA:

A partir dos 40 anos de idade, a manutenção rotineira de saúde deve incluir a triagem de problemas relacionados a alterações hormonais. A detecção precoce dos problemas e a intervenção apropriada são importantes (HURD, 1998).

A deficiência de estrogênio foi considerada por muitos como uma condição fisiológica e não patológica, provavelmente porque a insuficiência ovariana é geneticamente programada. Entretanto, com o aumento da expectativa de vida das mulheres, o impacto negativo da deficiência de estrogênio prolongada torna-se mais significativo (HURD, 1998).

A maioria dos sintomas clínicos presentes no período menopáusico está associada diretamente com deficiência de estrogênio, assim, as medidas não farmacológicas não são geralmente úteis. Alguns dos problemas em mulheres menopáusicas, incluindo doenças cardiovasculares, obesidade, fraqueza muscular e osteoporose também estão relacionados ao estilo de vida e envelhecimento. Estes sintomas podem responder à modificação da dieta e exercícios físicos. Sintomas comportamentais podem responder ao aconselhamento. Quanto à medicina alternativa e

medicamentos naturais, a segurança e eficácia desses tratamentos não têm sido estabelecidos (PUGH, MULLINS, 1999).

Quanto à importância das atividades físicas para prevenção de eventos cardiovasculares, os resultados do estudo prospectivo Women's Health Initiative Observacional Study indicam que tanto andar como exercícios vigorosos reduzem substancialmente a incidência de eventos cardiovasculares entre as mulheres pós-menopáusicas (MANSON, GREENLAND, LACROIX *et al.*, 2002).

Mudanças de hábito como parar de fumar e melhorar o padrão dietético, isto é, consumir mais gorduras insaturadas em relação às saturadas, fibras de cereais, alimentos marinhos entre outros, proporcionou um declínio de 31 % na incidência de doenças coronárias no grupo das mulheres do Nurses' Health Study (HU, STAMPFER, MANSON *et al.*, 2000).

O tratamento do climatério pode ser hormonal e não-hormonal.

2.4.1 TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL (TRH):

A TRH consiste basicamente na reposição estrogênica. O uso de um progestogênio tem o objetivo único de proteger o endométrio do estímulo estrogênico excessivo. Em algumas situações pode estar indicada, também, a adição de androgênios como complemento à reposição hormonal convencional (MARINHO, 2000).

A TRH é indicada para qualquer mulher com sinais e sintomas de hipoestrogenemia, que não tenha contra-indicação. Um resultado adequado da TRH dependerá da manutenção dos níveis plasmáticos adequados e constantes de um estrogênio biologicamente ativo (MARINHO, 2000).

Os diversos produtos e vias de administração disponíveis facilitam a escolha de um medicamento que se ajuste a cada paciente, individualmente, facilitando a adesão ao tratamento.

2.4.1.1 COM ESTROGÊNIOS:

Atualmente são utilizados estrogênios naturais, isto é, aqueles produzidos pelos ovários, como o 17 β -estradiol, a estrona e o estriol ou compostos que, no plasma, produzem estrogênios idênticos em estrutura aos secretados pelos ovários (MARINHO, 2000; MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

Os principais estrogênios utilizados na TRH estão relacionados na tabela 1:

Tabela 1: Principais estrogênios, vias e forma de apresentação usados na TRH:

Estrogênio	Via de administração	Forma de apresentação
Estradiol micronizado	Oral	1 – 2 mg
Estrógenos eqüinos conjugados	Oral	0,3 – 0,625 – 1,25 mg
Valerato de estradiol	Oral	1 – 2 mg
Estradiol	Transdérmico	25 – 37,5 – 50 – 75 – 100 μ g
Estradiol	Percutâneo	1,0 – 3,0 mg
Estradiol	Implante	25 mg
Estrógenos eqüinos conjugados	Vaginal	0,625 mg/g
Estriol	Vaginal	1 – 2 mg
Promestrieno	Vaginal	10 mg

Fonte: Marinho, 2000

O uso de estrogênios naturais reduz o risco de efeitos estrogênicos potencialmente perigosos, tais como aumento da pressão sanguínea, alteração nos fatores da coagulação e um perfil lipídico indesejável, que algumas vezes ocorre com estrogênios sintéticos mais potentes, usados nos contraceptivos orais. A proporção no plasma de estradiol para estrona é normalmente em torno de 1 : 1 a 2 : 1, e o objetivo da TRH é preservar esta proporção (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

As preparações orais são convenientes para a paciente, mas possuem efeitos metabólicos diferentes devido ao metabolismo hepático pré-sistêmico. Os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) são diminuídos, e os níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) são aumentados, por isso dando proteção contra aterosclerose, embora tenha sido notado que os níveis de triglicérides tende a aumentar em mulheres que tomam estrogênios orais. A desvantagem de uma terapia oral uma vez ao dia é a variação diurna considerável no nível de estrogênio plasmático alcançado (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999; MARINHO, 2000). Esta via será escolhida quando houver um perfil lipoprotéico alterado, especialmente uma diminuição de HDL-colesterol (MARINHO, 2000).

As formulações para uso transdérmico têm sido usadas para melhorar a biodisponibilidade, prolongar a atividade e otimizar o perfil metabólico.

Níveis mais constantes de estrogênios resultam do uso de adesivos transdérmicos contendo estradiol, e estes têm a vantagem adicional de uma proporção estradiol: estrona mais fisiológico. Entretanto, o material adesivo usado nestes adesivos transdérmicos é a base de álcool e pode causar irritação cutânea. O adesivo é aplicado à pele sem pêlo na parte baixa do corpo, tomando cuidado para aplicar longe do tecido mamário. O adesivo é trocado a cada uma ou duas vezes por semana, provendo desta forma, um reservatório constante de estradiol para proporcionar uma liberação controlada na circulação (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

O estradiol é também disponível na forma de gel que é aplicada diariamente sobre a pele de forma padronizada para assegurar dosagem correta, mas esta é uma formulação a qual não foi inteiramente avaliada (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

As vias percutânea e transdérmica serão as de primeira escolha nas hipertensas, nas pacientes com maior risco para fenômenos tromboembólicos, nas com hipertrigliceridemia, enxaqueca (pela menor

flutuação dos níveis hormonais), nas com resistência insulínica aumentada, intolerância à glicose ou diabetes e nas fumantes (MARINHO, 2000).

Segundo os dados obtidos por Araya, Contreras, Aguirre, *et al.* (1995), existe uma grande variabilidade individual na absorção do 17 β -estradiol da formulação de gel hidroalcoólico, dependendo também da zona de aplicação, sendo a zona dos antebraços, a mais apropriada, segundo os autores.

Em um estudo aberto, 23 mulheres pós-menopáusicas e saudáveis foram tratadas com gel contendo 0,5; 1,0 e 1,5 mg de estradiol ao dia. Os resultados obtidos neste estudo indicaram que a absorção percutânea do estradiol foi dose-proporcional e linear entre as doses testadas, quando aplicadas sobre o mesmo tamanho de área cutânea (JARVINEN, GRANANDER, LAINE, *et al.*, 2000).

Duas formulações de gel, contendo estradiol, Sandrena gel 0,1 % (p/p) e Oestrogel 0,06 % (p/p), foram comparadas quanto à permeação do estradiol através da pele humana *in vitro*. Os resultados obtidos sugerem que as duas formulações são bioequivalentes na dose recomendada pelos fabricantes (WATERS, BRAIN, GREEN *et al.*, 1998).

O implante de estrogênio dá um nível constante de estrogênio desde poucos dias após a inserção para além de seis meses. Esta formulação mantém a melhor proporção estradiol : estrona, e é um método conveniente de administração. Como os níveis de estrogênio estão sendo elevados constantemente, haverá aumento no número de receptores de estrogênios, e isto pode conduzir a recorrência de sintomas de deficiência de estrogênio devido à presença de receptores de estrogênios desocupados. Nestes casos, não é adequado tratar com estrogênio adicional, a paciente deve receber recomendações e talvez a mudança de preparação. A desvantagem do implante é que, uma vez implantada, não pode ser removido prontamente, e mesmo que seja removido, o nível de estrogênio levará pelo menos um mês para cair (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

Cremes vaginais contendo estrogênio estão disponíveis, mas geralmente falham em produzir níveis plasmáticos confiáveis que possa proteger contra os efeitos em longo prazo da deficiência de estrogênio. Eles promovem alívio de curta duração dos sintomas da menopausa, e praticamente são utilizados no tratamento dos sintomas urogenitais em pacientes que não têm sintomas sistêmicos de deficiências estrogênicas e não desejam a terapia convencional (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999; MARINHO, 2000).

Estrogênios devem ser usados isolados em mulheres que sofreram histerectomia. Se o útero está presente, o endométrio será estimulado, e este aumento no crescimento endometrial pode ser um precursor para o desenvolvimento de condição maligna (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

2.4.1.2 COM PROGESTOGÊNIO:

A única razão para adicionar progestogênio é proteger o endométrio das mulheres com o útero intacto de hiperplasia e possível neoplasia.

O progestogênio apresenta efeito antipromotor sobre o endométrio, reduzindo o número de mitoses e a síntese de DNA pelas células endometriais. Além disso, os progestogênios promovem uma redução do número de receptores para o estradiol, inibição da síntese de novos receptores estrogênicos e estimulação da enzima 17β -ol-desidrogenase, que propicia a conversão do estradiol em estrona e diminui a atividade biológica do estradiol no endométrio. Ativando a enzima sulfotransferase endometrial, o progestogênio também promove a transformação de estrona e estradiol nos seus respectivos sulfatos, os quais são menos ativos (MARINHO, 2000).

Os principais progestogênios estão na tabela 2:

Tabela 2: Principais progestogênios, vias e forma de apresentação:

Progestogênio	Via de administração	Forma de apresentação
Progesterona natural micronizada	Oral	200 – 300 mg
Progesterona natural micronizada	Vaginal	200 – 300 mg
Progesterona natural micronizada	Gel vaginal de liberação lenta 4 %	45 mg
Sintéticos C21		
Acetato medroxiprogesterona	Oral	2,5 – 5 – 10 mg
Acetato ciproterona	Oral	1mg
Acetato nomegestrol	Oral	2,5 – 5 – 10 mg
Derivados da 19- nortestosterona		
Noretindrona(noretisterona)		0,35 – 0,7 – 1,05 mg
Acetato noretindrona	Oral	1,0 mg
Acetato noretindrona	Transdérmico	125 – 170 – 250 µg
Levonorgestrel		0,75 mg
Levonorgestrel	Transdérmico	250 µg

Fonte: Marinho, 2000

Existem várias preparações que contêm progestogênios para um número de dias por mês, mas para prevenir efetivamente hiperplasia endometrial, o progestogênio deve ser tomado por um mínimo de doze dias. A dose mínima de progestogênio requerida para proteger contra hiperplasia depende da potência do composto usado (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

A progesterona é o único progestogênio que atua sozinho no receptor de progesterona, mas possui biodisponibilidade oral pobre e, portanto é difícil encontrar concentrações plasmáticas satisfatórias, embora as

preparações micronizadas sejam melhores absorvidas. A progesterona também pode ser administrada à noite na forma de óvulo vaginal, ou por injeção na forma de um implante subdérmico de longa duração. É mais comum a administração oral e usualmente um dos progestogênicos sintéticos é usado (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

2.4.1.3 COM ANDROGÊNIOS:

Os principais androgênios usados em mulheres na pós-menopausa estão na tabela 3:

Tabela 3: Principais androgênios usados, vias e doses.

Androgênio	Via de administração	Dose
Metiltestosterona	Oral	1,25 mg diário associado à reposição estrogênica
Undecanoato de testosterona	Oral	40 mg/dia por períodos intercalados de 15 dias
Propionato de testosterona 2%	Tópico	Uso no clitóris e pequenos lábios ao deitar de segunda à quinta feira
Adesivo de testosterona	Transdérmico	Trocar duas vezes por semana

Fonte: Marinho, 2000

2.4.1.4 COM TIBOLONA:

A tibolona é um esteróide sintético, relacionado estruturalmente a derivados da 19-nortestosterona, utilizado de forma contínua, na dose de 2,5 mg/dia. Apresenta propriedades estrogênicas, progestogênicas e androgênicas em diferentes tecidos. Induz a atrofia endometrial e melhora o trofismo vaginal e a libido. Em relação ao aparelho cardiovascular, um efeito

desfavorável seria a diminuição dos níveis de HDL - colesterol e aumento do LDL - colesterol (MARINHO, 2000, LISBOA, WANMACHER, 2001).

2.4.2 ESQUEMAS DE UTILIZAÇÃO:

Devido aos diversos compostos e vias de utilização disponíveis, dezenas de esquemas podem ser empregados. Não existe um esquema ideal, existem recomendações para determinado tipo de paciente, e para cada uma delas a terapia deve ser individualizada e modificada, de acordo com a necessidade ou mesmo a aceitabilidade de cada composto ou via. A mesma paciente pode usar diferentes produtos ao longo da vida. Os principais esquemas utilizados são: (MARINHO, 2000)

- estrogênio apenas
- estrogênio contínuo ou cíclico associado a um progestogênio cíclico
- estrogênio associado a um progestogênio de forma contínua
- esquemas alternativos

A associação de estrogênio ao progestogênio é utilizada em mulheres com útero intacto devido ao risco aumentado de hiperplasia endometrial e câncer verificado no uso isolado do estrogênio em um dos estudos do ensaio Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) (WRITING GROUP-PEPI, 1996).

Os dados de um estudo multicêntrico, prospectivo e aberto sugerem que a terapia combinada contínua de estrogênio-progestogênio pode prover uma proteção do endométrio a longo prazo, em comparação com a terapia seqüencial (STURDEE, ULRICH, BARKOW *et al.*, 2000).

2.5 TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL: BENEFÍCIOS E RISCOS

Todos os indícios de efeitos benéficos e maléficos da TRH anteriores aos ensaios clínicos aleatórios com grande número de mulheres foram obtidos de estudos observacionais do tipo coorte ou caso - controle e de

meta - análises destes estudos, sendo necessário cautela na interpretação destes resultados.

Somente os estudos prospectivos, aleatorizado, duplo - cego e placebos controlados respondem com maior fidelidade se uma forma terapêutica se relaciona com um evento em análise.

As evidências nas quais embasarão as tomadas de decisão vem sendo construídas nos Estados Unidos e na Europa por meio de grandes estudos aleatórios – Women's Health Initiative (WHI), Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention (PEPI) Trial, Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study (HERS), Women's International Study of Long Duration Oestrogen after Menopause (WISDOM) e Million Women Study – que procuram responder as questões sobre TRH (LISBOA, WANMACHER, 2001), e já se dispõe de resultados de alguns estudos.

2.5.1 TRH E SINTOMAS DA MENOPAUSA:

TRH é indicada para qualquer mulher com sinais e sintomas de hipoestrogenemia, como fogachos, sudorese noturna, secura vaginal, dispaurenia, disúria e urgência urinária, que não tenha contra-indicação, embora não seja totalmente desprovida de riscos (HURD, 1998; MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999; PUGH, MULLINS, 1999, LISBOA, WANMACHER, 2001). O tratamento a curto prazo mostra-se eficaz em suprimir esses sintomas como indica diversos ensaios.

Os fogachos são os fatores mais comuns que motivam as mulheres a iniciar e continuar a reposição hormonal (HURD, 1998). Na maioria das mulheres, o período de preocupação, com os fogachos, dura de três a cinco anos, e a terapia para estes sintomas podem ser limitados a este período de tempo (PUGH, MULLINS, 1999). Os fogachos podem interferir com o ciclo do sono normal, resultando em insônia, e em casos graves, também, podem interferir com a concentração (HURD, 1998).

A administração de estrogênio via percutânea em estudos prospectivos, a curto prazo, demonstraram melhora significativa dos

sintomas climatéricos, com maior tolerância e aceitabilidade durante o período de observação por parte das pacientes (FERREIRA, NAVARRETE, 2001; GRUPO MULTICÊNTRICO, 2001; WEHBA, FERREIRA, GRINBAUN *et al.*, 1997).

Em um estudo duplo - cego, placebo controlado, de curta duração, 39 mulheres pós - menopáusicas foram tratadas com gel hidroalcoólico de estradiol (Oestrogel) ou placebo. Neste estudo, houve um decréscimo na frequência e severidade dos fogachos e reversão nos sintomas vaginais, com reações adversas fracas, exceto para dor à palpação das mamas (KORNAFEL, MARCH, 1992).

A TRH, com gel contendo 17β -estradiol, por curto período de tempo, mostrou ser efetiva para pacientes hipertensas, quanto aos sintomas menopáusicos, com aumento da concentração sérica de estradiol e diminuição dos níveis de gonadotrofinas durante a hormonioterapia (OSÓRIO-WENDER, VITOLA, SPRITZER, 1997).

Em um estudo aberto, não comparativo, de acordo com um protocolo estabelecido, utilizando um sistema transdérmico matricial de estradiol em associação a noretisterona, por via oral, 22 mulheres foram avaliadas, durante 28 semanas, demonstrando a terapia ser eficaz em controlar e reduzir significativamente os principais sintomas da menopausa, com discreta incidência de reações cutâneas (WEHBA, MACHADO, YONEDA *et al.*, 1998).

A TRH com adesivo transdérmico foi comparada ao tratamento sintomático com veraliprida, num período de seis meses, em um estudo aberto, multicêntrico e aleatorizado, mostrando a TRH uma eficácia clínica superior e melhor qualidade de vida (LIMOUZIN-LAMOTHE, MAIRON, JOICE *et al.*, 1994).

Na revisão feita por Bennink (2004), estradiol e estrogênios conjugados eqüinos foram igualmente efetivos no tratamento de fogachos e atrofia urogenital, sendo superior a outras opções terapêuticas. Devido aos riscos e benefícios, a solução apropriada, segundo o autor, é a escolha individualizada do tratamento.

Após os primeiros resultados do WHI, têm-se focado o uso apropriado da TRH, direcionando para sintomas para os quais o seu uso é benéfico (NELSON (a), 2004). Em uma revisão sistemática e meta-análise de 32 ensaios encontrou-se que o uso de estrogênios eqüinos conjugados e 17 β -estradiol transdérmico e oral possuem efeitos comparáveis e consistentes no tratamento de fogachos e pode ter efeitos adversos similares (NELSON (b), 2004).

Os estrogênios são eficazes nos tratamentos de: coceira vaginal, queimação, e outros sintomas associados com mudanças no epitélio vaginal, causada pela menopausa. O objetivo da terapia é restaurar o epitélio ao seu estado pré-menopáusico e assim reduzir esses sintomas (PUGH, MULLINS, 1999).

2.5.2 TRH E DOENÇAS MENTAIS

Os sintomas depressivos são comuns durante a transição para a menopausa. Pesquisadores da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e outras instituições conduziram um ensaio, randomizado, duplo - cego, controlado com placebo, com 50 mulheres, entre 40 e 55 anos, na perimenopausa, confirmado endocrinologicamente, e apresentando depressão. O 17 β -estradiol, administrado transdermicamente, mostrou aliviar os sintomas da depressão (SOARES, ALMEIDA, JOFFE *et al.*, 2001).

Em um estudo experimental, randomizado e placebo - controlado, mulheres pós - menopáusicas, sem transtorno depressivo maior, apresentaram uma melhora no humor, com TRH via oral e a curto prazo, embora os resultados tenham apresentado um marcante efeito placebo (SOUZA, FILIZOLA, SOUZA *et al.*, 2001).

Os dados obtidos do ensaio Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) sobre qualidade de vida sugerem que, entre as mulheres que apresentavam fogachos, a TRH melhorou significativamente a

saúde mental e sintomas depressivos (HLATKY, BOOTHROYD, VITTINGHOFF *et al.*, 2002).

A demência é uma síndrome que se caracteriza por alteração da personalidade, controle deficiente dos impulsos e desenvolvimento de múltiplas deficiências cognitivas. São em geral quadros crônicos e progressivos, caracterizados por perda progressiva da capacidade intelectual (deficiência de memória, capacidade de julgamento e pensamento abstrato) e inabilidade física dos pacientes acometidos. Inúmeras são as causas de estados demenciais, havendo entre estes, grande interesse pela doença de Alzheimer, face à sua alta e crescente incidência, mormente após os 65 anos de idade. As mulheres são mais acometidas que os homens na proporção de 3 : 1, demonstrando a maior vulnerabilidade do sexo feminino (MASSAD, 2000).

Em um estudo descritivo com mulheres cardiopatas no climatério as alterações cognitivas observadas com mais frequência foram diminuição da memória e percepção, e de confusão em relação aos afazeres domésticos (ROSA, 2002).

A influência do estrogênio sobre funções cognitivas é muito mais difícil de ser estabelecida, portanto, Shaywitz, Shaywitz, Pugh *et al.* (1999) utilizaram imagens de ressonância magnética funcional para medidas de modelos de ativação cerebral, durante tarefas envolvendo trabalhos de memória verbal e não - verbal. Os pesquisadores observaram que a TRH altera os modelos de ativação cerebral em regiões específicas do cérebro, durante a realização de várias espécies de funções de memória que são obrigadas a fazer no cotidiano, sugerindo que o estrogênio afeta a organização do cérebro para memória.

De acordo com os resultados de um estudo de coorte prospectivo, o uso da TRH está associado com a melhora global das funções cognitivas e retardamento da taxa de declínio cognitivo em mulheres mais idosas e saudáveis. Foram estudadas 2.073 mulheres, com mais de 65 anos, de Cashe County, uma população uniforme com hábitos saudáveis, onde foi

observado um maior retardamento do declínio cognitivo em mulheres de 85 anos ou mais (CARLSON, ZANDI, PLASSMAN *et al.*, 2001).

O estudo Women's Health Initiative Memory Study (WHIMS), um estudo subordinado ao ensaio WHI, não verificou, em mulheres acima de 65 anos, efeitos benéficos da terapia estrogênio e progestogênio, via oral, nas funções cognitivas globais, e um pequeno aumento de risco no declínio cognitivo clinicamente significativo (RAPP, ESPELAND, SHUMAKER *et al.*, 2003). Além disso, os resultados indicaram que o risco para demência provável foi o dobro quando comparado ao grupo placebo e também que esta terapia não previne contra diminuição moderada da cognição (SHUMAKER, LEGAULT, RAPP *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos por Hays, Ockene, Brunner, *et al.* (2003) provêm evidências de que a TRH não melhora a qualidade de vida das mulheres mais velhas sem sintomas da menopausa. Após um ano, havia diferenças significativas, estatisticamente, favorecendo o grupo das que faziam uso da TRH, em três das medidas de qualidade de vida, mas estas diferenças não foram clinicamente importantes, representando um aumento de 1 a 4 % sobre a avaliação basal.

Demência frontotemporal é a forma mais comum de um grupo de doenças neurovegetativas, que afeta principalmente os lobos, frontal e/ou temporal. O trabalho conduzido por Levine e Hewett (2003) sugere haver evidências que indicam uma alta correlação entre TRH e desenvolvimento desta doença.

2.5.3 TRH E OSTEOPOROSE

A TRH ajuda a manter a massa óssea e a integridade do esqueleto, protegendo assim, contra a osteoporose. O estrogênio conserva o cálcio tanto promovendo uma eficaz absorção intestinal quanto aumentando a conservação do cálcio pelo rim (HURD, 1998). Para o máximo de benefício, a TRH deve começar tão logo que for possível após a menopausa, de

preferência, dentro de três anos (PUGH, MULLINS, 1999), porém ainda não se saiba a duração ideal.

Os dados do estudo conduzido por Greendale, Wells, Marcus *et al.* (2000) sugerem que as mulheres pós-menopáusicas, usuárias da TRH, têm pouca perda óssea na coluna vertebral e quadril.

Lindsay, Gallagher, Kleerekoper *et al.* (2002) usaram terapias com doses menores de estrogênios conjugados eqüinos (ECE) ou ECE associado a acetato de medroxiprogesterona em mulheres pós-menopáusicas (faixa etária de 40 - 65 anos), as quais se mostraram efetivas em aumentar a densidade mineral óssea e conteúdo ósseo. Segundo os autores, este fato pode aumentar a adesão à terapia ou iniciá-la, pelo aumento da relação benefício - risco.

A osteoporose é considerada como um fator de risco para a perda de dentes e desdentamento em velhos. Segundo o ensaio placebo - controlado, duplo - cego e aleatório, conduzido por Civitelli, Pilgram, Dotson *et al.* (2002), a TRH pode promover a saúde dentária, pois nas usuárias de TRH houve aumento da densidade mineral óssea do fêmur proximal e teve um benefício adicional de aumento da massa óssea alveolar, que pode proteger contra perda de dentes.

Em um pequeno ensaio (n=167), placebo controlado, aleatório, com o uso de doses bem baixas de 17β -estradiol (0,25 mg/dia), houve aumento da densidade mineral óssea no quadril, punho, espinha e no corpo total (PRESTWOOD, KENNY, KLEPPINGER *et al.*, 2003).

Após a publicação dos resultados do estudo denominado WHI, houve uma mudança nos paradigmas básicos para o tratamento da osteoporose em mulheres pós - menopáusicas. Até então, o estrogênio era o principal tratamento (BUKATA, HEALEY, 2003).

Uma das opções para o tratamento da osteoporose é o uso de bisfosfonatos, reconhecidos há muito tempo pela sua habilidade em reduzir taxas de fraturas em indivíduos osteoporóticos (BUKATA, HEALEY, 2003).

Quando a TRH foi associada com uso do alendronato, houve um aumento da densidade óssea, em três anos, maior do que com TRH ou alendronato isolados (GREENSPAN, RESNICK, PARKER, 2003).

O hormônio paratiroide estimula a formação de osso e conseqüentemente aumenta a massa óssea e força. E, segundo Neer, Arnaud, Zanchetta *et al.* (2001), este hormônio parece ser útil na prevenção de fraturas de mulheres pós-menopáusicas com osteoporose.

O tratamento com teriparatide, um hormônio paratireóide recombinante humano, por um período de 14 meses, quando comparado com a terapia do alendronato, por um mesmo período, demonstrou um aumento maior na densidade mineral óssea da espinha lombar, além de diminuir a incidência de fraturas não-vertebral (BODY, GAICH, SCHEELE *et al.*, 2002)

Um ensaio clínico investigou os benefícios da combinação da terapia com hormônio paratiroide e bisfosfonatos no tratamento da osteoporose feminina. Porém, os dados sugerem que estas duas terapias não são sinérgicas (BLACK, GREENSPAN, ENSRUD, *et al.*, 2003).

2.5.4 TRH E DOENÇA CARDIOVASCULAR

A longo prazo, desenvolve-se doença cardiovascular associada à deficiência estrogênica. Mortalidade cardiovascular é altamente prevalente em mulheres pós-menopáusicas.

Os resultados de um estudo observacional, conduzidos por pesquisadores do National Institute on Aging e Johns Hopkins University School of Nursing, que avaliaram o impacto da TRH contínua sobre pressão sanguínea, em 226 mulheres pós-menopáusicas, normotensas e saudáveis, demonstraram que a TRH conferiram proteção contra mudanças na pressão sistólica, com o envelhecimento (SCUTERI, BOS, BRANT *et al.*, 2001).

É importante conhecer a concentração sérica de lipídios e lipoproteínas para o uso seguro da TRH.

A revisão feita por Godsland (2001), dos trabalhos publicados entre 1974 a 2000 (cerca de 295), mostra que o efeito da TRH depende da via de administração do estrogênio e do tipo de progestogênio associado. Como por exemplo, todos os regimes com estrogênio isolado aumentam HDL - colesterol e diminuem LDL e colesterol total, sendo que a via oral aumenta triglicérides, enquanto que com 17 β -estradiol, via transdérmica, o efeito é contrário. A inclusão do acetato de medroxiprogesterona aos estrogênios conjugados eqüinos diminuiu o aumento da HDL induzido por estrogênio cerca de 60 % e, além disso, ocorreu oposição ao aumento de triglicérides. Em 41 estudos, com diferentes formas farmacêuticas, a TRH, geralmente, diminuiu a lipoproteína (a).

Herrington, Reboussin, Brosnihan *et al.* (2000) aleatorizaram um total de 309 mulheres com doença coronariana, verificada angiograficamente, para receber estrogênios conjugados, 0,625 mg/dia, estrogênios conjugados 0,625 mg associado com acetato de medroxiprogesterona 2,5 mg/dia, ou placebo. No seguimento de três anos, foi observado que o estrogênio e estrogênio associado a acetato de medroxiprogesterona produziram reduções significantes nos níveis de LDL - colesterol e aumentos significantes no HDL - colesterol. Entretanto, nenhum dos dois tratamentos alterou a progressão da aterosclerose coronariana.

Os estudos que examinam os efeitos da TRH sobre doenças coronarianas têm focado mulheres menopáusicas com menos de 75 anos, e pouco se sabe sobre os efeitos da TRH quando ela é iniciada ou re - instituída em idades mais avançadas. Binder, Williams, Schechtman *et al.* (2001) observaram após nove meses de tratamento, com terapia oral, que houve melhora do perfil lipídico, particularmente sobre os níveis de HDL e LDL - colesterol.

Baseado em dados de diversos ensaios clínicos, a American Heart Association recomenda que a TRH não deve ser iniciada para prevenção secundária de doença cardiovascular e também que não existem dados suficientes para justificar seu uso somente com propósito de prevenção primária (MOSCA, COLLINS, HERRINGTON *et al.*, 2001).

Os pesquisadores da Universidade de Yale conduziram um ensaio aleatório, utilizando 1,0 mg de 17- β estradiol/dia, em 664 mulheres pós-menopáusicas, com média etária de 71 anos, que tinham recentemente tido AVC (acidente vascular cerebral) isquêmico ou ataque isquêmico passageiro. Após um seguimento de aproximadamente três anos, os autores concluíram que o estradiol não reduz mortalidade ou a recorrência de AVC em mulheres com doença cerebrovascular, portanto, não devendo ser prescrito para prevenção secundária (VISCOLI, BRASS, KERNAN *et al.*, 2001).

Os resultados do estudo de coorte prospectivo, que envolveu 2.489 mulheres pós - menopáusicas com doença coronariana estabelecida (infarto do miocárdio prévio ou aterosclerose documentada) registradas no Nurses' Health Study, demonstraram que o risco para eventos coronariano maior recorrente parece aumentar entre as usuárias de hormônio de curta duração (< 1 ano), mas diminui com uso de longa duração ($\geq$ 2 anos), sendo que o tipo de hormônio usado não interferiu no resultado (GROSTEIN, MANSON, STAMPFER, 2001).

Alguns estudos anteriores tinham sugerido que a TRH poderia baixar o risco de uma doença cardíaca. Entretanto, pela meta - análise realizada pelos pesquisadores do US Preventive Services Task Force, dos estudos encontrados no banco de dados do MEDLINE e COCHRANE (no período de 1966 a dezembro de 2000), sobre a relação entre TRH e doença cardiovascular e doença arterio-coronariana, encontraram que a TRH não reduz o risco de ambas e concluíram que fatores como o consumo de álcool, exercício ou condições sócio-econômicas podem ter confundido o resultado dos estudos anteriores (HUMPHREY, CHAN, SOX, 2002).

Os resultados do seguimento de 6,8 anos do Heart and Estrogen Replacement Study (HERS II) não demonstraram benefícios especiais em termos de efeitos cardiovasculares. Enfatizaram também que a TRH não pode ser usada somente com o propósito de reduzir riscos para eventos coronarianos em mulheres com doenças coronarianas (GRADY, HERRINGTON, BITTNER *et al.*, 2002).

Um grande estudo aleatório denominado Women's Health Initiative (WHI), patrocinado pelo Instituto de Saúde dos EUA, avaliou 16.608 mulheres pós - menopáusicas, entre 50 - 79 anos, com útero intacto, divididas em dois grupos: um usuário da TRH e outro de placebo. O estudo mostrou que a TRH com a associação estrogênio conjugado eqüino (ECE/0,625 mg) e acetato de medroxiprogesterona (AMP/2,5 mg) utilizados de forma ininterrupta em mulheres após a menopausa (média etária 63,2 anos) promoveram em cada 10.000 usuárias do referido regime, em comparação a não usuárias, 8 casos adicionais de câncer de mama invasivo, 7 de ataques cardíacos, 8 de derrames cerebrais e 8 fenômenos tromboembólicos pulmonares. Por outro lado, foi constatada redução de 6 casos de câncer de cólon e 5 fraturas de bacia. O estudo foi desenhado para 8,5 anos, mas foi interrompido aos 5,2 anos, devido aos riscos superarem os benefícios de saúde (WHITING GROUP FOR THE WHI INVESTIGATORS, 2002).

No fim de fevereiro de 2004 foi encerrada a pesquisa que avaliava o uso de ECE isolado por aumentar o risco de derrame, mas diminuindo o de fratura de bacia. Porém, se estes resultados se aplicam a outras formas farmacêuticas, não pode ser determinado (WHI STEERING COMMITTEE, 2004).

É importante salientar que o WHI apresenta outros segmentos, em que analisa o impacto da dieta, e outro, que investiga o uso de vitamina D e cálcio. Todos continuam em andamento e está planejado para terminar em março de 2005.

Quanto ao efeito da via de administração de estrogênio, sobre o risco de tromboembolismo venoso, investigado em um estudo caso-controle, este sugere que a via transdérmica pode ser mais segura que a via oral (SCARABIN, OGER, PLU-BUREAU, 2003).

2.5.5 TRH E DOENÇAS GINECOLÓGICAS

Câncer de mama é uma das maiores preocupações das mulheres que fazem TRH ou daquelas que pretendem fazer uso dela. É sabido que o tecido mamário é sensível ao efeito dos estrogênios e que os hormônios podem estar envolvidos em alguns cânceres de mama, mas de qualquer forma isto é significativo para as usuárias da TRH e permanece sem conclusão (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999).

O uso de longa duração da TRH está associado com risco aumentado de câncer de mama, particularmente tumores lobulares, de acordo com dados obtidos de um estudo de caso-controle entre 205 mulheres pós-menopáusicas registradas no Group Health Cooperative of Puget Sound (CHEN, WEISS, NEWCOMB *et al.*, 2002).

Os resultados de um estudo caso-controle, envolvendo 975 mulheres, de 65 a 79 anos, com diagnóstico de câncer de mama invasivo, no período de 01/04/1997 a 31/05/1999, sugerem que o uso da TRH combinada está associado com aumento do risco de câncer de mama, particularmente tumor lobular invasivo, quer o progestogênio seja tomado seqüencial quer de forma contínua (LI, MALONE, PORTER *et al.*, 2003).

Outro grande estudo de coorte realizado no Reino Unido, o Million Women Study, obteve resultados semelhantes ao do WHI, com um aumento da incidência cumulativa de câncer de mama de 6 por 1000 para 5 anos de uso e 19 por 1000 para 10 anos de uso da TRH com estrogênio associado a progestogênio (BANKS, BERAL, BULL, *et al.*, 2003).

A mamografia é reconhecida como um importante instrumento de rastreamento de câncer. Os resultados obtidos do ensaio WHI evidenciaram que a associação, estrogênio e progestogênio, aumentam a densidade mamária, quando comparada ao uso do estrogênio isolado ou ao placebo, e também o risco de incidência de câncer mamário, o qual é diagnosticado num estágio mais avançado (CHLEBOWSKI, HENDRIX, LANGER *et al.*, 2003).

No estudo de coorte prospectivo, o Câncer Prevention Study II, do American Cancer Society, dos 944 casos de câncer ovariano fatal, entre 211.581 mulheres pós - menopáusicas, que fizeram uso da TRH, de 1982 a 1996, foi constatado aumento do risco de câncer ovariano fatal associado com uso da TRH por dez ou mais anos (RODRIGUEZ, PATEL, CALLE *et al.*, 2001).

Em um outro estudo, com participantes do programa de triagem do Breast Cancer Detection Demonstration Project, que foram seguidas durante 13,4 anos, 329 mulheres, do total de 44.241, desenvolveram câncer ovariano neste período. Os pesquisadores verificaram que as usuárias, somente da TRH por 10 ou mais anos, tiveram um risco aumentado de desenvolver câncer ovariano (LACEY, MINK, LUBIN *et al.*, 2002).

2.5.6 TRH E OUTRAS DOENÇAS

A catarata, relacionada à idade, é a principal causa de diminuição visual e cegueira no mundo, e a sua prevalência está aumentada nas mulheres pós-menopáusicas em relação aos homens de idade equivalente. Os dados do Framingham Heart Study sugerem um benefício adicional da TRH, reduzindo o risco de opacidade do cristalino. Neste estudo, as mulheres usuárias da TRH, por 10 anos ou mais, tiveram uma redução no risco de 60 %, da presença de opacidade do cristalino nuclear, em comparação com as não - usuárias (WORZALA, HILLER, SPERDUTO *et al.*, 2001).

Sintomas do olho seco, isto é, secura, queimação e desconforto, são comuns particularmente em mulheres e se manifesta freqüentemente após o começo da menopausa. Dos hormônios sexuais testados (prolactina, testosterona, estradiol e progesterona), a prolactina demonstrou maior correlação com função da lágrima. Os pesquisadores concluíram existir uma relação complexa entre níveis de hormônio e função lacrimal (MATHERS, STOVALL, LANE *et al.*, 1998).

Os dados obtidos do Women's Health Study, com 25.665 participantes sugerem que as usuárias da TRH têm um risco aumentado da síndrome do olho seco (SHAUMBERG, BURING, SULLIVAN *et al.*, 2001).

Após a menopausa, os níveis de testosterona ficam reduzidos a 50 %, para cerca de 0,6 nmol/L. Níveis baixos de estrogênio e testosterona estão correlacionados com osteoporose, depressão e obesidade. A reposição de testosterona em mulheres pós-menopáusicas pode proteger contra obesidade gínóide (obesidade do quadril) e reduzir o risco de doenças ligadas a ela como diabetes tipo II e doenças coronarianas (ROHR, 2002).

Um estudo clínico retrospectivo sugere que a tibolona, um esteróide sintético com propriedades estrogênica, progestogênica e androgênica, utilizado como TRH, provocam menos sintomas mamários e menores alterações de densidades mamárias, quando comparada a TRH convencional (NAHÁS Neto, DELUCA, NAHÁS *et al.*, 2001).

No ensaio placebo - controlado, aleatório, multicêntrico, com isoflavona do extrato de trevo vermelho, mulheres pós - menopausicas, com fogacho, utilizaram dois produtos Promensil e Rimostil. Apesar dos Promensil possuir alguma evidência biológica, nenhum dos suprimentos teve um efeito significativo clinicamente sobre fogachos ou outros sintomas da menopausa, quando comparado com placebo (TICE, ETTINGER, ENSRUD *et al.*, 2003).

A TRH, como tratamento de saúde, desde a sua promoção nos meados de 1970, tem provocado calorosa discussão. A grande influência da industria farmacêutica foi usada para promove - la junto aos médicos (financiando clínicas de menopausa) e diretamente às pacientes (revistas femininas, folhetos, websites) reforçando o processo de negligenciar os riscos. Portanto, o TRH é uma lição para a medicina, para que ela tenha extrema precaução em promover terapias hormonais, em geral, e também

como introduzir novos desenvolvimentos (LAGRO-JANSSEN, ROSSER, VANWEEL, 2003).

O resultado dos estudos reforça a necessidade de avaliar caso a caso. É necessário pesar os riscos e benefícios para cada mulher, em particular, verificando os reais benefícios que terá com a reposição hormonal. O rumo das pesquisas também fortalece a tendência de não se recomendar a terapia para prevenção ou combate de alguma doença. A TRH parece ser útil para aliviar os sintomas relacionados à deficiência de estrogênios como ondas de calor, sudorese, secura vaginal, insônia entre outros. Portanto, para os sintomas da menopausa, deve-se seguir as recomendações da Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos que aconselha os médicos no uso da menor dose eficaz e durante o período o mais curto possível para minimizar as reações adversas (STEPHENSON, 2003).

2.6 EFEITOS COLATERAIS DOS ESTROGÊNIOS E PROGESTOGÊNIOS:

Os efeitos colaterais dos estrogênios em geral são pouco comuns e controláveis e incluem: mastalgia, sensibilidade no mamilo, náuseas e dor nas pernas. Cerca de 4 % das mulheres em uso de terapia oral e 2 % daquelas usando estrogênios transdérmicos queixam-se de desconforto epigástrico no início do tratamento. São mais comuns em pacientes que ficaram muito tempo sem tratamento. Esses sintomas são importantes no início da medicação, ou quando a dose é aumentada, melhorando após seis a oito semanas (MARINHO, 2000).

Os efeitos colaterais dos progestogênios estão relacionados à dose, diminuindo com doses menores. Progestogênios derivados da 19-nortestosterona podem levar a sintomas relacionados com seus efeitos androgênicos, como acne, pele oleosa ou hirsutismo. Em mais de 90 % dos casos com TRH combinada cíclica existirá um sangramento regular. Os

efeitos colaterais dos progestogênios são responsáveis pelos maiores problemas no controle das pacientes: mastalgia, flatulência, náusea, cefaléia, edema e cólicas abdominais. Sintomas psicológicos também são semelhantes aos sintomas pré-menstruais, e incluem depressão, ansiedade, irritabilidade, falta de concentração e labilidade emocional (MARSHALL, SENIOR, CLAYTON, 1999; MARINHO, 2000).

2.7 ESTRADIOL

2.7.1 PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS:

- nome: estradiol
- sinônimos: oestradiol, β estradiol, diidrofoliculina, diidroteelina, diidroxiestrina, estradiolium (MARTINDALE, 2002, SALOLE, 1986)
- nome químico: (MARTINDALE, 2002, MERCK, 2001; USP-26, 2003)
 - estra-1,3,5(10)-trieno-3,17-diol, (17- β)-
 - estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β diol
- estrutura química:

- fórmula molecular: $C_{12}H_{24}O_2$ (MARTINDALE, 2002, MERCK, 2001; USP-26, 2003)
- peso molecular (PM): 272,39 (MERCK, 2001; USP-26, 2003)
- composição molecular (%): C 79,37 %, H 8,88 %, O 11,75 % (MERCK, 2001)
- registro no CAS: 50-28-2 (estradiol anidro) (MATINDALE, 2002, USP-26, 2003)
- descrição: pó cristalino, ou pequenos cristais higroscópicos, branco ou branco creme e inodoro. (USP-26, 2003)
- solubilidade: (MARTINDALE, 2002, MERCK, 2001; USP-26, 2003; MOFFAT, 1986)
 - praticamente insolúvel em água
 - muito pouco solúvel em óleos vegetais
 - solúvel :1 em 28 de álcool
 - 1 em 435 de clorofórmio
 - 1 em 150 de éter
 - 1 em 17 de acetona
 - dioxano
 - solução de hidróxido de álcalis fixos
- faixa de fusão: entre 173 °C e 179 °C. (MERCK, 2001; USP-26, 2003)
- rotação específica: entre +76 ° e +83 °, em solução de teste contendo 10 mg/mL, em dioxano. (MERCK, 2001; USP-26, 2003)
- λ máximo: 225, 280 nm (MERCK, 2001)

- acondicionamento e estocagem: conservar em recipientes hermeticamente fechados e proteger da luz. (MARTINDALE, 2002, USP-26, 2003)

Os dois isômeros do estradiol existentes naturalmente diferem no arranjo β ou α do grupo hidroxila no átomo de carbono 17, e seus nomes são 17 β -estradiol e 17 α -estradiol. Desde que a molécula tem cinco centros quirais, o número de estereoisômeros quirais é 32. Os estudos conduzidos por Dobrowolski, Sonowska, Tychmanowicz (2002) sugerem a existência de todos os estereoisômeros quirais na natureza.

2.7.2 BIOSSÍNTESE:

A biossíntese ovariana, de estrogênios e progestogênios, origina-se do colesterol e do acetato. O colesterol sofre uma clivagem e uma oxidação da cadeia lateral para formar a pregnenolona, o precursor de todos os hormônios esteróides. A progesterona é diretamente sintetizada a partir da pregnenolona, ao passo que a biossíntese do estrogênio é levada a cabo mediante a conversão da pregnenolona em androstenediona e testosterona (STROBL, 1996).

Portanto, os estrogênios são formados tanto da androstenediona como da testosterona. A reação envolve a aromatização do anel A e é catalizada em três passos pelo complexo enzimático citocromo P450 monooxigenase (aromatase ou CYP19), que usa NADPH e oxigênio molecular como co-substratos. No primeiro passo desta reação, C19 é hidroxilado. A segunda hidroxilação resulta na eliminação do grupo hidroximetil C19, recentemente formado, e a terceira hidroxilação resulta na formação de um intermediário instável que se rearranja para formar o anel fenólico A. A reação inteira consome três moléculas de oxigênio e três moléculas de NADPH (LOOSE-MITCHEL, STANCEL, 2001).

2.7.3 SÍNTESE:

Inicialmente, os hormônios esteróides obtidos eram isolados de fontes de mamíferos. Aliado à dificuldade no isolamento e a necessidade de obter compostos quimicamente modificados conduziram à pesquisa de materiais que fossem abundantes e acessíveis entre os esteróides vegetais (LEDNICER, 1998).

A diosgenina, obtida da raiz de inhame silvestre mexicana, *Dioscorea*, constituiu a primeira fonte vegetal para fármacos esteróides. Os hormônios esteróides também podem ser obtidos dos esteróis da soja, que consistem principalmente de estigmasterol e sitosterol, a chamada fração insaponificável do óleo de soja (LEDNICER, 1998).

A síntese total de estradiol partindo-se de precursores acíclicos, através de vários passos, descrito por Opplzer e Roberts (1980), obteve um rendimento de 60 %, sendo o produto obtido idêntico ao de ocorrência natural em suas características físicas.

Também pode ser preparado pela redução de estrona, por vários métodos, como, por exemplo, reação com boroidreto (LEDNICER 1998).

2.7.4 PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS

Acredita-se que os estrogênios, como os outros hormônios esteróides, agem principalmente como reguladores da expressão dos genes. Esses hormônios lipófilos difundem-se passivamente através das membranas celulares e ligam-se a um receptor presente no núcleo que é altamente homólogo com receptores para os outros hormônios esteróides, o hormônio da tireóide, a vitamina D e os retinóides (LOOSE-MITCHELL, 2001).

Os receptores estrogênicos são encontrados no trato reprodutivo feminino, nas mamas, na hipófise, no hipotálamo, nos ossos, no fígado e em outros tecidos e também em vários tecidos nos homens. O receptor estrogênico presente em todos os tecidos parece ser codificado por um único gene e o receptor tem uma massa molecular de cerca de 66.000

daltons com um único local de ligação hormonal (LOOSE-MITCHELL, STANCEL, 2001).

O receptor interage com seqüências nucleotídicas específicas denominadas elementos da resposta estrogênica (ERE), presentes nos genes-alvos, e esta interação aumenta, ou em alguns casos diminui, a transcrição dos genes regulados pelos hormônios. Além dos ERE, muitos genes responsivos aos hormônios contêm elementos que mediam as ações dos outros fatores regulatórios. Isto pode proporcionar um mecanismo pelo qual os sinais dos estrogênios e outros agentes convergem em locais genômicos comuns para integrarem as respostas celulares aos múltiplos estímulos (LOOSE-MITCHELL, STANCEL, 2001).

2.7.5 PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS:

2.7.5.1 Absorção:

Quando administrados oralmente, os estrogênios são absorvidos pela parede intestinal, onde uma fração é convertida a estrona ou conjugada a glucuronida. Após absorção, o estrogênio alcança a circulação porta, chegando ao fígado em altas concentrações. Pela via parenteral, é bem absorvida pela pele e gordura subcutânea, vagina, mucosa nasal e sublingual. A absorção, de todas as formas parenterais, tem em comum uma característica importante: evita-se o metabolismo pré-sistêmico no fígado. A concentração de estrogênio que chega ao fígado é fisiológica (BAKER, 1994).

2.7.5.2 Distribuição:

Os estrogênios ligam-se extensamente a proteínas plasmáticas. Os estrogênios que ocorrem naturalmente estão firmemente ligados à globulina ligadora dos esteróides sexuais (SSBG) (LOOSE-MITCHELL, STANCEL, 2001, MARTINDALE, 2002), sendo, para o estradiol, de 0,29, a constante de

afinidade de ligação com globulina ligadora dos esteróides sexuais (O'CONNELL, 1995).

2.7.5.3.Biotransformação:

Os estrogênios naturais, como o estradiol, sofrem extenso metabolismo pré - sistêmico no trato gastrointestinal e fígado, após a administração oral. Portanto, geralmente, não são ativos oralmente, embora uma preparação micronizada de estradiol tenha biodisponibilidade suficiente (3 a 5 %) para ser ativo oralmente. O estradiol é biotransformado no fígado em parte para estrogênios menos ativos como estriol e estrona (LOOSE-MITCHELL, STANCEL, 2001, MARTINDALE, 2002, CAMARGOS, LAMAITA, LEMOS, 2000).

Devido a biotransformação pela parede intestinal e pelo fígado, os estrogênios orais produzem concentrações de estrona circulante mais altas que nos anos reprodutivos ou pela via parenteral (BAKER, 1994).

2.7.5.4 Eliminação:

Os estrogênios são biotransformados no fígado. Uma variedade de conjugados, sulfato e glucuronida, são formadas, e estes são excretados na urina e na bile. Aqueles que são excretados na urina sofrem recirculação entero - hepática ou são excretados nas fezes (LOOSE-MITCHELL, STANCEL, 2001, MARTINDALE, 2002).

O tempo de meia-vida do estradiol é aproximadamente uma hora, independente da via de administração, e a taxa de depuração é entre 650 e 900 L/dia/m² (BALFOUR, HEEL, 1990).

2.8 METODOLOGIA ANALÍTICA:

2.8.1 EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS:

O primeiro método para quantificação do estradiol base apresentado pela Farmacopéia Americana é um método colorimétrico para comprimidos, no qual, após várias extrações, o extrato final é submetido a uma reação colorimétrica com reagente de fenol - ferro (USP-14, 1950). Já na edição de 1980, utiliza - se cromatografia gasosa para doseamento da matéria - prima, comprimidos e "pellets". Porém, para suspensão estéril, o método descrito é o colorimétrico com reagente fenol - ferro, após separação em coluna cromatográfica contendo terra de silício (USP-20, 1980). A partir de 1990, e na edição de 2003, a metodologia apresentada para quantificação é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para matéria - prima, creme vaginal e comprimido, enquanto que para suspensão injetável e "pellets" continua sendo colorimétrico com reagente fenol-ferro (USP-26, 2003).

O método oficial de análise da AOAC internacional, 17º edição de 2000 para matéria - prima, é o mesmo descrito na 11º edição de 1970, e trata - se de um método colorimétrico com reagente de ferro de Kober (fenol - ferro) que é bastante trabalhosa e demorada (AOAC, 1970).

No adendo de 1994 da Farmacopéia Britânica de 1993, é descrito um método espectrofotométrico na região do UV, no qual o estradiol hemi - hidratado é diluído em etanol, e em seguida, em solução de hidróxido de sódio 0,1M e a medida da absorvância efetuada a 238 nm (BP-1993, addendum, 1994). O mesmo método consta na Farmacopéia Européia (EP-1997) e nas edições seguintes da Farmacopéia Britânica (BP-1999 e BP-2002).

Na Farmacopéia Brasileira III (1977) não existe nenhuma metodologia para estradiol base, somente para as matérias primas dos sais de estradiol. No doseamento do benzoato de estradiol prepara - se uma solução metanólica de concentração 0,5 mg/mL (p/v), fazendo - se a leitura de sua absorvância a 230 nm. Quanto ao cipionato de estradiol, o método utilizado

é a cromatografia gasosa, usando n-heptilato de colestera como solução padrão interno. Um método espectrofotométrico na região do visível está descrito para dipropionato de estradiol, tendo como solução corante, a solução reagente de fenol-ferro.

Bowron e Lodge (1970) desenvolveram um método espectrofotométrico simples, semiquantitativo para determinação de estradiol, prednisona e testosterona em propilenoglicol. O estradiol foi isolado da solução de cloreto de metileno da formulação por extração em álcali, acidificação e re - extração em cloreto de metileno. A solução foi lavada com água e solução salina saturada, desidratada com sulfato de magnésio, e preparada para um volume conhecido. Uma alíquota desta solução foi evaporada à secar e redissolvida em igual volume de etanol. A absorvância foi medida no comprimento de onda a 280 nm, sendo comparada com uma solução padrão de estradiol.

Toral, Soro e Richter (2002) desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação simultânea de estradiol e acetato de medroxiprogesterona em comprimidos. A escolha da derivada de 2º ordem foi devido ao sinal do estradiol ser cinco vezes maior que na derivada de 1º ordem, permanecendo o sinal do acetato de medroxiprogesterona semelhante em ambas ordens. A linearidade foi observada no intervalo de $4,7 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-4}$ e $7,2 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L para estradiol e acetato de medroxiprogesterona, respectivamente. O solvente utilizado foi o metanol, sendo, segundo os autores, um método simples, rápido, barato e sensível.

Salci e Biryol (2002) estudaram a eletrodeposição do 17 β -estradiol, usando eletrodo de carbono transparente, por voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. O método padronizado foi aplicado para quantificação do estradiol diretamente em comprimido, adesivo transdérmico, e após tratamento adequado, a soro, sendo preciso, exato e com a vantagem de ser mais rápido e econômico que o método CLAE, segundo os autores.

Kotiyan e Vavia (2000) desenvolveram e validaram um método cromatográfico em camada delgada de alta eficiência, rápido, seletivo, preciso e exato para estudo da estabilidade e determinação rotineira de estradiol em matéria prima e em adesivo transdérmico. Como fase estacionária foi utilizada placa de alumínio para cromatografia em camada delgada coberta com sílica gel 60 F₂₅₀, e para fase móvel, um sistema de solventes de composição clorofórmio – acetona – álcool isopropílico – ácido acético glacial, na proporção de 9 : 1 : 0,4 : 0,1 (v/v/v/v).

Para validação do procedimento de limpeza de equipamentos para produção de esteróides, Katona, Vincze, Végh *et al.* (2000) desenvolveram e validaram um método cromatográfico em camada sobrepessurizado, adequado para separar e controlar cinco hormônios esteróides (alilestrenol, estradiol, diacetato de etinodiol, levonorgestrel, noretisterona) produzido no mesmo equipamento, em diferentes tempos. O método proposto, segundo seus autores, é cerca de 30 vezes mais rápido que o método CLAE, é econômico por utilizar pequeno volume de solvente e precisar somente de uma validação para os cinco compostos, e tendo sensibilidade aproximada ao do método CLAE.

No desenvolvimento de um método para quantificação de estradiol e levonorgestrel em adesivo transdérmico, pela CLAE em fase reversa, a interferência do cetolevonorgestrel, impureza do levonorgestrel, foi eliminada pela fase móvel ternária de acetonitrila – metanol – água (30 : 15 : 55 %), cuja composição foi prevista pela relação de energia de solvatação linear. Esta relação também foi aplicada na predição dos candidatos a padrão interno, otimizando a seletividade (LI e SHAH, 2002).

Os adesivos transdérmicos contêm uma quantidade significativa de polímero como excipiente na formulação. Para eliminar a interferência deste polímero na quantificação das impurezas, isto é, de produtos de degradação do estradiol por cromatografia líquida em fase reversa, foi utilizada uma mistura contendo 40 % de formamida e 60 % de acetonitrila na preparação da amostra. A inclusão da formamida fez com que os dois picos de

impurezas fossem extremamente delgadas e a resolução, excelente (LI, 2002)

Para separação dos estereoisômeros (α e β) e equilina, por cromatografia líquida em fase reversa, Lamparczyk e Zarzycki (1995) obtiveram bons resultados modificando a composição da fase móvel, com adição de β -ciclodextrina e variação da temperatura. A melhor resolução foi obtida com concentração de 6 mM de β -ciclodextrina e temperatura de 5 °C.

Enantiômeros podem exibir atividades farmacológicas diferentes. Portanto, o registro de fármacos quirais requer informações sobre sua pureza enantiomérica. Kummer e Werner (1998) utilizaram Chiralpak AD sob condição de fase reversa para separação quiral de 26 esteróides, pelo método CLAE. Verificaram que a enantioseletividade dependeu da concentração de água no eluente, acima de 10 %, e da temperatura. O aumento da temperatura diminuiu a enantioseletividade, porém aumentou a eficiência cromatográfica. Também, foi validada a determinação de ent-estradiol em lotes de matéria prima, na faixa de 0,05 % a 4,8 %.

2.8.2 EM MATERIAL BIOLÓGICO:

Yasui, Yamada, Kinoshita *et al.* (1999) desenvolveram um sistema CLAE – RIE altamente sensível para determinação de níveis baixos de estrona e estradiol em soro, como encontrado em mulheres pós-menopáusicas. O método consistiu na extração dos esteróides em fase sólida, usando cartucho de Sep pack tC18, seguida da separação dos hormônios no sistema CLAE, e a quantificação realizada por radioimunoensaio. O limite de detecção da estrona e estradiol foram 1,04 pg/mL e 0,64 pg/mL, respectivamente.

Para verificar a adequação do método RIE para medir hormônios esteróides sexuais em estudos de população, Dorgan, Fears, McMahon *et al.* (2002) compararam as medidas dos hormônios sexuais no soro por RIE e espectrometria de massa. Foi utilizado “pool” de soro masculino e feminino. No soro feminino, foram medidos: estradiol, estrona, androstenediona,

testosterona e deidroepiandrosterona. E, no soro masculino, testosterona, diidrotestosterona, androstenediona e sulfato de deidroepiandrosterona. Apesar de alguns hormônios diferirem em suas concentrações, os dois métodos podem fornecer estimativas similares.

Choi, Kim e Chung (2000) investigaram a presença de estrona e 17β -estradiol em cabelo humano, utilizando cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massa. A nandrolona foi utilizada como padrão interno e o método de derivatização usou isobutilcloroformato (isoBCF) e anidrido do clorodifluoroacético (CDFAA). A extração com hexano, após isobutiloxicarbonilação com isoBCF, melhorou a detecção da estrona e 17β -estradiol, pela remoção de substâncias polares. O método validado possibilitou a determinação de estrogênios na faixa de 0,24 – 1,30 ng/g.

Na otimização do ensaio imunoenzimático (ELISA) com detecção eletroquímica, para determinação do 17β -estradiol em soro bovino, o uso de anticorpo policlonal resultou em um ensaio mais sensível, com limite de detecção de 20 pg/mL. Este método, quando comparado com o método de imunoensaio fluorescente de tempo controlado (DELFA), que é inteiramente automatizado e não necessitando de extração, mostrou - se preciso, exato e sensível, com a vantagem de um custo menor (DRAISCI, VOLPE, COMPAGNONE, *et al*, 2000).

Elliot, Francis, Shortt, *et al* (1995) adaptaram kit de DELFA para doseamento de progesterona, estradiol e testosterona, usado em hospital, para determinação de esteróides no soro bovino para verificar a possibilidade do abuso de anabolizante durante a produção. Este método quando comparado com radioimunoensaio e ensaio imunoenzimático, mostrou maior sensibilidade e melhor precisão. Sua maior vantagem é de não precisar de solventes orgânicos para extração de esteróides das amostras e também não requerer radioisótopos e fluidos de cintilação, porém o seu custo é mais alto.

O fosfato de estramustina, usado no tratamento de câncer de próstata avançado, é um agente antimitótico com propriedades estrogênicas, devido aos seus metabólitos, estradiol e estrona, formado pela quebra do éster de

carbamato da estramustina e estromustina, respectivamente. Para determinação destes compostos no plasma, foram desenvolvidos CLAE com detector de fluorescência para fosfato de estramustina, cromatografia gasosa com detector de nitrogênio – fósforo para estramustina e estromustina, e cromatografia gasosa com espectrometria de massa para estradiol e estrona. Os métodos validados mostraram boa linearidade, seletividade, precisão e exatidão, sendo adequados para estudos farmacocinéticos e clínicos (EDMAN, SVENSSON, ERIKSSON *et al.*, 2000).

Imunoensaio com eletroforese capilar para determinação direta do estradiol no soro, sem necessidade de incubação, foi descrito por Su, Wang, Zhang *et al* (2000). Para realizar a separação com eletroforese capilar foi usado hidrogel reversível termicamente ligado a anticorpo monoclonal específico para o antígeno do estradiol. Vários parâmetros que afetam a qualidade e a velocidade de separação foram estudados para otimização, incluindo força iônica do tampão, concentração do hidrogel no tampão, voltagem aplicada, pH do tampão e temperatura. Apesar de ser um método simples e rápido, sua sensibilidade é cerca de 10^{-10} mol/L, sendo menor do que aquela encontrada pelo método RIE (cerca de 10^{-12} mol/L).

Um método alternativo para o radioimunoensaio é um método baseado no deslocamento, pelo analito, de um composto fluorescente de locais de ligação específico dentro do polímero marcado. Polímeros marcados molecularmente possuem alta seletividade ao substrato e uma boa estabilidade mecânica e química. O 17β -estradiol é o único composto que é fortemente marcado molecularmente e emite luz a 307 nm após excitação a 283 nm, produzindo um sinal. O método proposto, baseado na combinação de polímero marcado molecularmente e CLAE, mostrou uma alta seletividade, de medição rápida e efetiva na faixa de concentração de 0,1 – 4 μ M, com reprodutibilidade satisfatória, porém não sendo tão sensível como o método RIE para determinação dos hormônios esteróides no soro e outros fluídos biológicos (RACHKOV, McNIVEN, EL'SKAYA, *et al*, 2000)

2.8.3 NO MEIO AMBIENTE:

Segundo o European Commission, os estrogênios são considerados substâncias que causam efeitos adversos à saúde dos organismos ou à sua prole, devido à alteração na função endócrina (JEANNOT, SABIK, SAUVARD *et al.*, 2002). Por isso, tem sido bastante investigado e existem inúmeras publicações a este respeito.

Nas determinações dos esteróides, poluentes do meio ambiente, são exigidos métodos com grande sensibilidade, já que a sua presença é da ordem de ng/g.

Uma das etapas importantes na análise de amostras do meio ambiente é a extração de compostos em estudo, devido a sua complexidade. Alda e Barceló (2001) utilizaram para detecção de estrogênios e progestogênios em amostras de água e sedimento de rio, tanto métodos automatizados como manual na preparação de amostras, através de extração em fase sólida com diferentes cartuchos. E o sistema utilizado na análise consistiu em cromatografia líquida com detecção de diodo ordenado e espectrometria de massa. O método automatizado provou ser mais vantajoso devido apresentar melhor repetitividade, exatidão, linearidade e sensibilidade, além de ser mais rápido, porém de custo elevado e limitada combinação de diferentes materiais de extração. Por outro lado, o método manual é uma boa opção para análise de pequenos volumes de amostras, além de econômico.

Cromatografia gasosa com espectrometria de massa de ionização química negativa, dos derivados do pentafluorobenzoil, para análise da água do rio e efluentes mostrou-se sensível e específico, quando precedida de extração em fase sólida com discos impregnados de partículas poliméricas. A utilização de discos permite a extração de estrogênios de um volume grande de água, deste modo, fornecendo boa recuperação da maioria dos estrogênios (estrone, estradiol, estriol e etinilestradiol) em níveis de ng/L (XIAO, McCALLEY e McEVOY, 2001).

Coille, Reder, Bucher *et al* (2002) descreveram dois métodos de imunoensaio por fluorescência capazes de detectar estrona, estradiol e etinilestradiol em água de esgoto. O método de detecção da total refletância da fluorescência interna (TIRF) é um ensaio de inibição de ligação, enquanto que o outro, trata-se de um teste competitivo, usando a transferência de energia (ETIA) para detecção. A sensibilidade de ambos os métodos é alta para estrona e mais baixa para estradiol e etinilestradiol. Os limites de detecção estão entre 10 e 850 ng/L para todos os analitos e a taxa de recuperação, na faixa de 70 – 120 % para os dois métodos. Os métodos são econômicos, sendo que a vantagem do ETIA é a sua alta rapidez na medição, enquanto que o TIRF é de fácil automação.

Alda, Gil, Paz *et al.* (2002) investigaram a presença de estrogênios (estradiol, estriol, estrona, etinilestradiol e dietilestilbestrol) e progestogênios (progesterona, noretindrona e levonorgestrel) em sedimento de rio. Como procedimento de análise utilizaram para extração, ultra - som e coluna de octadecilsilica, para separação, cromatografia líquida com detector de diodo ordenado, e a determinação foi realizada por espectrometria de massa. O monitoramento, usando este sistema, detectou a presença de estrogênios e progestogênios na faixa de concentração usual, de pg/g, ou mais baixas como ng/g.

Seinfert, Haindl e Hock (1999) desenvolveram e validou um ensaio de receptores ligados a enzima (ELRA) para estrogênios e xenoestrogênios. Receptor α de estrogênio humano foi usado para ligação de substâncias estrogênicas de amostras do meio ambiente. O biosensor BIAcore foi aplicado para caracterização do receptor e desenvolvimento do ensaio. O método proposto consiste num ensaio sensível, não radioativo, econômico, que pode ser usado no monitoramento de alimentos, água potável e meio ambiente.

Boer, Otjens, Muntendam *et al* (2004) desenvolveram dois ensaios com receptores de estrogênios recombinante humano, subtipos α e β , usando o sistema CLAE com detecção de fluorescência. Enquanto dietilestilbestrol, tamoxifeno e 17β -estradiol mostraram maior afinidade para

o subtipo α , genisteína apresentou maior afinidade pelo subtipo β . Os métodos quando validados demonstraram possuir alta sensibilidade, além de ser rápido, preciso, exato e robusto, podendo ser usado no monitoramento de estrogênio em produtos alimentícios e no meio ambiente.

Para determinação de 4-nonilfenol (4-NP), 4-tert-octilfenol (4-t-OP), bisfenol A, 17 β -estradiol, estrona, testosterona, 17 α -etinilestradiol, colesterol, coprostano-3-ol, coprostano e coprostano-3-ona, tanto em água como sedimento de esgoto, foram empregadas cromatografia gasosa e espectrometria de massa, após derivatização com N, O-bis(trimetil-silil) trifluoroacetamida (BSTFA). E, para determinação de álcool polietoxilato e nonilfenol e octilfenol polietoxilato (NPEOn e OPEOn) foi aplicada cromatografia líquida e espectrometria de massa com técnica de ionização eletrospray no modo positivo, e no modo negativo, para determinação de 4-nonilfenol e 4-octilfenol. Os métodos padronizados possibilitaram a detecção de concentração na faixa de ppt a ppb de compostos como coprostano e bisfenol A (JEANNOT, ABBIK, SAUVARD *et al*, 2002).

2.8.4 ESPECTROMETRIA NA REGIÃO DO VISÍVEL

Ensaio espectrofotométricos indiretos estão baseados na conversão de um analito por reagente químico para um derivado que possui propriedades espectrais diferentes. A maioria destes procedimentos envolve a conversão do analito em um derivado que tem $\lambda_{\text{máx}}$ mais longo ou absorvidade mais alta. Uma das razões para adotar este procedimento é para promover a seletividade do ensaio, de uma substância que absorve no UV numa amostra que contém outros componentes que absorvem no UV (BECKETT, STENLAKE, 1988).

Um dos exemplos de espectrofotometria indireta é a diazotação e acoplamento de aminas aromáticas primárias. A amina é, inicialmente, diazotada em uma solução aquosa de ácido nitroso (gerado *in situ* pela

reação do ácido clorídrico e nitrito de sódio a 0 – 5 °C), de acordo com o esquema:

O sal de diazônio é muito reativo e quando tratado com um reagente acoplante adequado ($\text{Ar}' - \text{H}$), sofre uma reação de substituição eletrofílica para produzir um azo - componente (BECKETT e STENLAKE, 1988; CONNORS, 1975), segundo o esquema:

Os azo - derivados são coloridos e conseqüentemente têm uma absorção máxima na região do visível. O $\lambda_{\text{máx}}$ e $\epsilon_{\text{máx}}$ dependem dos grupos Ar e Ar' , com seus substituintes e com pH (BECKETT e STENLAKE, 1988; CAREY, 2003).

Bratton e Marshall (1939) desenvolveram um método para análise de sulfanilamida no sangue e urina. Após diazotação da sulfanilamida, extraída previamente do material biológico, foi adicionada solução de sulfamato de amônio para destruição do excesso de ácido nitroso, antes do acoplamento com N-(1-naftil) etilenodiamina, sendo em 545 nm, o pico de absorção do azo composto formado.

A propriedade de diazotação seguida de acoplamento foi investigada empregando - se outros reagentes químicos e com isto opções para o aumento da seletividade dos métodos que empregam o mesmo princípio. Para os derivados do indol: tartarato de ergotamina, maleato de metilergometrina, metanossulfato de diidroergonovina, metanossulfato de diidroergocristina, metanossulfato de diidroergocriptina e pindolol foi padronizado um método, baseado na reação do indol com 4-nitroanilina diazotada, em uma solução tampão de pH 6,0, produzindo um azo composto de cor amarela. Especialmente para pindolol, tartarato de ergotamina e

maleato de metilergometrina, o método mostrou - se preciso, exato e altamente sensível (ZAKHARI, HASSAN e EL-SHABRAWY, 1989).

Magalhães (a) e Piros (1970) estudando métodos de doseamento para 1,4-benzodiazepinas observaram que, as aminobenzofenonas, formadas do tratamento destes fármacos com ácido clorídrico, em ampolas fechadas e a 100 °C, apresentavam grande semelhança estrutural. Mesmo assim, empregando-se sulfoguaiacolato de potássio como acoplante, os grupos azóicos que se formam podem ser diferenciados pela coloração e com isto aumentam a seletividade dos métodos analíticos quantitativos.

Na mesma linha de pesquisa Magalhães (b) e Piros (1970) estudaram o grupo de diuréticos benzotiadiazínicos. Neste caso, os compostos foram aquecidos a 100 °C em ampolas fechadas e com hidróxido de sódio. As dissulfonamidas formadas quando diazotadas e acopladas com sulfoguaiacolato de potássio formaram grupos azóicos com diferentes colorações que proporcionaram aumento da especificidade e com isto, possibilitam a identificação de alguns fármacos deste grupo, além da proposta quantitativa.

Honda (1996) desenvolveu um método para doseamento da cisaprida, empregando a reação de diazo acoplamento com os reagentes: N-(1-naftil) etilenodiamina e sulfoguaiacolato de potássio, sendo este último mais vantajoso por ser mais simples e econômico.

2.9 PRODUTOS COMERCIALIZADOS NO MERCADO BRASILEIRO:

Atualmente existem, no mercado brasileiro, várias formas farmacêuticas contendo 17 β -estradiol, tanto isolado como associado a um progestogênio, usado na TRH. Dentre as formulações com estradiol isolado temos, segundo o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas DEF-2003/04, as formas farmacêuticas que constam da tabela 4:

Tabela 4: Medicamentos contendo 17 β -estradiol comercializados no Brasil

Forma farmacêutica	Nome comercial	Forma de apresentação	Laboratório
Adesivo transdérmico	Estraderm matrix 25, 50, 100	0,77; 1,5; 3,0 mg	Novartis
Adesivo transdérmico	Estraderm TTS 25, 50, 100	2,0. 4,0; 8,0 mg	Novartis
Comprimido	Estreva	1,5 mg	Merck
Gel	Estreva	0,1 g/100 g de gel	Merck
Comprimido	Estrofem	1,0 e 2,0 mg	Medley
Adesivo transdérmico	FEM 7	1,5 mg	Merck
Adesivo transdérmico	Ginedisc 25, 50, 100	2,0; 4,0; 8,0 mg	Schering
Gel	Hormodose	0,75 mg/1,25 g	Farmasa
Adesivo transdérmico	Lindisc 50	3,9 mg	Schering
Comprimido	Natifa	1,0 mg	Libbs
Gel	Oestrogel	60 mg/100 g	Enila
Implante	Riselle	25 mg	Organon
Gel	Sandrena gel	0,5 mg/0,5 g	Organon
Adesivo transdérmico	System 25, 50, 100	1,60; 3,20; 6,40 mg	Janssen-Cilag

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Desenvolver e padronizar método espectrofotométrico na região do ultravioleta e visível para determinação quantitativa do 17 β -estradiol.
- Aplicar os métodos nas diferentes formas farmacêuticas existentes no mercado brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 MATERIAL:

4.1.1 REAGENTES:

- etanol absoluto PA, Merck, lote k28659183 104, val. 01/06
- acetonitrila para cromatografia, Merck, lote 16/05/01, val. 05/06
- acetona PA, Merck, lote 2707814/009, val. 02/05
- metanol PA, Merck, lote k28561409/049, val. 12/05
- tetraidrofurano para cromatografia, lote 404006, val. 05/01
- ácido clorídrico fumegante a 37 % (v/v) PA, Merck, lote K2770317 015, val. 04/05
- carbonato de sódio anidro PA-ACS, Synth, lote 40884, val. 01/02
- cloreto de sódio PA, Quimesp, lote 1123, val. 09/02
- nitrito de sódio PA-ACS, Merck, lote A144949 946, val. 10/03
- sulfanilamida pura, Sigma, lote 28H1005, val. 05/01

4.1.2 SOLUÇÕES

- solução de carbonato de sódio a 10 % (p/v)
- solução de cloreto de sódio a 10 % (p/v)
- solução de nitrito de sódio a 0,5 % (p/v)
- solução de sulfanilamida a 0,1 % (em HCl 0,1 M, p/v)

Obs: todas as soluções foram preparadas no dia do teste

4.1.3 SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA:

- 17 β -estradiol, Padrão USP, lote K1B007, código 25000, cedido pelo Laboratório Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.

- 17 β -estradiol, padrão secundário, Heartwell, lote ESMO1/002, val. 03/03, com teor de 100,41 %, cedido pelo Laboratório Americano de Farmacoterapia SA (FARMASA)

4.1.4 MATÉRIAS PRIMAS:

- Carbopol[®] 940, B.F. Goldrich, lote kk127kc726, val. 02/2005
- trietanolamina, Rudnik, lote 02051883, val. 11/2003
- estradiol micronizado, Akzo Nobel, lote L00023591, val. 05/08
- estradiol micronizado Akzo Nobel, lote L00012623, val. 05/03
- Nipagin[®], Palmares, lote 200104097m, val. 03/2006
- Nipasol[®], Palmares, lote 04020603, val. 06/2004
- lactose supertab, Ciel Confiança, lote 83802, val. 30/01/2005
- amido de milho, Açucareira, lote 82671, val. 08/07/2004
- gelatina pó, Rebiere Gelatinas, lote 69040, val. 23/11/2003
- talco, Labsynth, lote 81940, val. 30/06/2008
- estearato de magnésio, Barlcher, lote 76946, val. 30/09/2003
- Opadry White[®] YS-1-7003, Colorcon, lote wp564226, val. 24/04/2004
- indigotina laca alumínio, Makeni Chemicals, lote 55987, val. 30/10/2004

4.1.5 AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS:

Amostra 1: amostra comercial na forma farmacêutica gel com teor declarado de 0,06 g % de 17 β -estradiol. Excipientes: Carbopol, trietanolamina e álcool etílico. Lote 2053, val. 04/05

Amostra 2: amostra simulada de gel contendo 0,06 g % de 17 β -estradiol

Formulação (100 g de gel):

17 β -estradiol micronizado	0,060 g
Carbopol® 940	0,160 g
trietanolamina	0,160 mL*
Nipagin®	0,180 g
Nipasol®	0,020 g
etanol 96%	16 mL
água destilada q.s.p.	100 g

* a trietanolamina foi colocada na quantidade suficiente para atingir um pH entre 7,0-7,5.

Amostra 3: placebo da amostra simulada 3: mesma composição, sem a substância ativa.

Amostra 4: amostra comercial de comprimido com teor declarado de 2 mg de estradiol, Excipientes: lactose monohidratada, amido de milho, gelatina, talco, estearato de magnésio, dióxido de titânio, metil-hidroxipropilcelulose e pasta azul. Lote NF70461, fab. 07/2002, val. 06/2006

Amostra 5: amostra simulada de comprimido contendo 2 mg de 17 β -estradiol micronizado

Formulação (um comprimido de 2 mg):

Núcleo:

17 β -estradiol micronizado	2,00 mg
lactose	69,68 mg
amido de milho	7,20 mg
gelatina	0,72 mg
talco	0,80 mg
estearato de magnésio	1,60 mg

Revestimento:

Opadry White® YS-1-7003	2,000 mg
indigotina laca alumínio	0,008 mg

peso do comprimido: 84,008 mg

Amostra 6: placebo da amostra simulada, tendo a mesma composição, sem a substância ativa.

Amostra 7: amostra comercial de adesivo transdérmico com teor declarado de 3,20 mg de estradiol, plano, transparente e auto-adesivo, com superfície de 16 cm² e 0,1 mm de espessura. Excipientes: goma guar e adesivo acrílico. Lote 02BS24D, fab. 02/02, val. 02/05; Lote 03C592R, fab. 03/06, val. 03/06.

As matérias primas utilizadas nas formulações foram de grau farmacêutico.

4.1.6 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE GEL SIMULADA E PLACEBO:

Foram preparadas 2000 g de cada gel. A amostra simulada foi preparada em um recipiente adequado, dispersando - se o Carbopol® 940 em água. Em paralelo, o estradiol, Nipagin® e Nipasol® foram dissolvidos no etanol absoluto e adicionados à dispersão. Em seguida foi adicionada a trietanolamina até atingir um pH entre 7,0 e 7,5. O placebo foi preparado da mesma forma, sem a adição da substância ativa. Os géis preparados apresentaram uma consistência mole, de cor branca, sendo o gel placebo mais translúcido que a amostra simulada.

4.1.7 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE COMPRIMIDO SIMULADA E PLACEBO:

Os comprimidos utilizados no experimento foram preparados gentilmente pelo Laboratório Biolab Sanus Farmacêutica Ltda, na quantidade de 500 unidades de cada comprimido.

4.1.8 EQUIPAMENTOS

Espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU, modelo UV-1601, com impressora EPSON, modelo LQ - 570+ e cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura.

Balança analítica eletrônica OHAUS, modelo AS200.

Balança eletrônica GEHAKA, modelo BG 2000.

Banho de ultra-som THORNTON, modelo T14.

Aparelho de espectrometria no infravermelho, FTIR BOMEM MB 100.

Aparelho de ponto de fusão Melting Point SMPI Stuart Scientific

4.2 MÉTODOS:

4.2.1 IDENTIFICAÇÃO DO 17 β -ESTRADIOL:

- Espectro na região do infravermelho

O 17 β -estradiol foi identificado por espectrometria no infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio, no intervalo de 500,0 a 4000,0 cm^{-1} .

- Espectro na região do ultravioleta

Para identificação por espectrometria no ultravioleta foi preparada uma solução de concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ 17 β -estradiol de em etanol absoluto e foi feita uma varredura entre 200 e 400 nm.

- Determinação da faixa de fusão

A amostra da matéria - prima, previamente dessecada, foi introduzida em capilar de vidro e submetida à determinação da faixa de fusão aumentando - se gradativamente a temperatura padronizada em 3 $^{\circ}\text{C/min}$ (USP-26).

4.2.2 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

4.2.2.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO:

4.2.2.1.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO:

Para obtenção do espectro de absorção foram testados inicialmente alguns solventes nos quais o 17β -estradiol é solúvel. Para esta finalidade foram preparadas soluções de 17β -estradiol em: acetona, acetonitrila, etanol absoluto, metanol e tetraidrofurano, na concentração de $60\text{ }\mu\text{g/mL}$. Estas soluções foram submetidas à varredura espectrofotométrica entre 200 e 400 nm, usando-se os respectivos solventes como branco.

4.2.2.1.1.1 Preparação da solução - padrão de 17β -estradiol:

A solução - padrão de 17β -estradiol foi preparada transferindo - se $250,0\text{ mg}$ de 17β -estradiol, exatamente pesados, para um balão volumétrico de 100 mL e adicionando - se cerca de 80 mL de etanol absoluto. Colocou - se no banho de ultra - som por cinco minutos e completou - se com o mesmo solvente. Desta solução, transferiu - se exatamente 20 mL para um balão volumétrico de 100 mL e completou - se com etanol absoluto, obtendo - se uma solução contendo $500,0\text{ }\mu\text{g/mL}$ de 17β -estradiol.

A partir desta última diluição, foram realizadas diluições adequadas em balões volumétricos de 50 mL para obtenção de soluções contendo 40 , 80 , 120 e $160\text{ }\mu\text{g/mL}$ de 17β -estradiol.

As soluções foram submetidas a varreduras espectrofotométricas para verificação do perfil de absorção de 250 a 310 nm , usando - se etanol absoluto como branco, em cubetas de quartzo de $1,0\text{ cm}$ de espessura.

4.2.2.1.2 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA PARA LEITURA

A partir da solução contendo 500 $\mu\text{g/mL}$ de 17β -estradiol e através de diluições adequadas, foram preparadas soluções contendo 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 $\mu\text{g/mL}$, fazendo - se a varredura entre 250 a 310 nm, selecionando desta forma o comprimento de onda (λ) a ser utilizado.

4.2.2.1.3 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO

Seguindo - se o procedimento 4.2.2.1.1.1, em uma solução contendo 60 $\mu\text{g/mL}$, foi determinada a absorvância após os tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 540 e 720 minutos, realizando - se as leituras em 281 nm.

4.2.2.1.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE RINGBOM

Utilizando - se o procedimento 4.2.2.1.1.1 foi preparada a solução contendo 500,0 $\mu\text{g/mL}$ de 17β -estradiol.

Desta solução, foram transferidas 25 alíquotas, cujos volumes variaram de 0,5 a 24,0 mL, para balões volumétricos de 50 mL, completando - se o volume com etanol absoluto. Foram obtidas soluções com concentrações variando entre 5,0 e 240,0 $\mu\text{g/mL}$ de 17β -estradiol. Foi utilizado o esquema 1 para preparação das soluções de 17β -estradiol.

As leituras de transmitância destas soluções foram efetuadas contra um branco de etanol absoluto, no comprimento de onda de 281 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1cm de espessura.

Esquema 1: Preparação das soluções de 17 β -estradiol em etanol absoluto para construção da curva de Ringbom

Balão n°	Volume de solução padrão 500 μ g/mL (mL)	Volume de etanol absoluto (mL)	Concentração final (μ g/mL)
1	0,5	49,5	5
2	1,0	49,0	10
3	2,0	48,0	20
4	3,0	47,0	30
5	4,0	46,0	40
6	5,0	45,0	50
7	6,0	44,0	60
8	7,0	43,0	70
9	8,0	42,0	80
10	9,0	41,0	90
11	10,0	40,0	100
12	11,0	39,0	110
13	12,0	38,0	120
14	13,0	37,0	130
15	14,0	36,0	140
16	15,0	35,0	150
17	16,0	34,0	160
18	17,0	33,0	170
19	18,0	32,0	180
20	19,0	31,0	190
21	20,0	30,0	200
22	21,0	29,0	210
23	22,0	28,0	220
24	23,0	27,0	230
25	24,0	26,0	240

4.2.2.1.5 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA:

Conhecendo - se a faixa de concentração mais conveniente para os trabalhos experimentais, de acordo com a curva de Ringbom, foram preparadas 10 soluções de 17 β -estradiol pelo mesmo procedimento de 4.2.2.1.4, cujas concentrações variaram de 30 a 120 μ g/mL. As leituras das absorvâncias foram efetuadas no comprimento de onda de 281 nm.

A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados, empregando-se software Excel-2000.

4.2.2.1.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS E SIMULADAS

4.2.2.1.6.1 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS EXCIPIENTES DO COMPRIMIDO NO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO 17 β -ESTRADIOL:

Para verificar a influência dos excipientes na absorção do espectro de absorção na região do ultravioleta foi preparada a solução de placebo do comprimido, equivalente a 60 μ g/mL de 17 β -estradiol. O espectro de absorção foi determinado entre 200 e 350 nm, utilizando - se como branco, o etanol absoluto.

4.2.2.1.6.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO PARA COMPRIMIDO:

A solução de 17 β -estradiol foi preparada transferindo - se 60,0 mg de 17 β -estradiol, exatamente pesados, para um balão volumétrico de 100 mL, adicionando - se cerca de 80mL de etanol absoluto. Após cinco minutos no banho de ultra - som, completou-se o volume com o mesmo solvente.

Para um balão volumétrico de 50 mL, foi transferido o correspondente a três comprimidos de placebo e 10 mL da solução padrão de 17 β -estradiol 60,0 mg%. Adicionou - se cerca de 30 mL de etanol absoluto e colocou - se no banho de ultra - som por cinco minutos. Completou - se o volume com o

etanol absoluto, e a solução filtrada através de papel de filtro quantitativo adequado.

4.2.2.1.6.3 PREPARAÇÃO DO BRANCO PARA COMPRIMIDO:

Para um balão volumétrico de 50 mL, foi transferido quantidade de pó correspondente a três comprimidos de placebo. Adicionou - se cerca de 40 mL de etanol absoluto e colocou - se no banho de ultra - som por cinco minutos. Completou - se o volume com o etanol absoluto, e a solução filtrada através de papel de filtro quantitativo adequado.

4.2.2.1.6.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS E SIMULADAS:

Foram pesados 30 comprimidos e triturados até pó fino. Deste efetuou - se uma tomada de ensaio equivalente a 6,0 mg de 17 β -estradiol que foram transferidas para balão volumétrico de 50 mL, adicionou - se cerca de 40mL de etanol absoluto e após cinco minutos no banho de ultra - som, os volumes foram completados com o mesmo solvente. As soluções foram filtradas através de papel de filtro quantitativo adequado.

4.2.2.1.6.5 ENSAIO:

Transferiu - se 25,0 mL de filtrado para balões volumétricos de 50 mL e diluídos com etanol absoluto para obtenção de soluções contendo 60 μ g/mL de estradiol. Foram realizados 10 replicatas para o ensaio de cada amostra intradia para verificação da precisão intradia e em três dias diferentes para cálculo da precisão interdia (ICH-Q2B, 1996).

As leituras das absorvâncias foram efetuadas no comprimento de onda de 281 nm, em cubetas de quartzo, utilizando etanol absoluto como branco.

4.2.2.1.6.6 CÁLCULO:

O cálculo das análises foi efetuado utilizando - se a expressão:

Concentração real por dose: C (mg/dose)

$$\frac{A_a \times C \times PM \times D}{A_p \times TE \times 1000} = \text{mg / comp}$$

Sendo:

Aa= absorvância da amostra

Ap= absorvância do padrão

C= concentração do padrão em µg/ml

PM= peso médio do comprimido em mg

D= diluição

TE= tomada de ensaio em mg

4.2.2.1.7 TESTE DE RECUPERAÇÃO PARA COMPRIMIDO:

A exatidão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método e o valor aceito como referência (USP-26, 2003, BRITAIN, 1998)

O teste de recuperação foi realizado adicionando - se quantidades conhecidas de solução padrão às soluções de amostra simulada e comercial, contendo concentrações equivalentes de estradiol, em três níveis de concentração, fazendo - se três replicatas de cada concentração (USP-26, 2003, ICH-Q2B, 1996).

Para execução do ensaio, foram preparadas soluções de amostra e padrão contendo 100 µg/mL, e branco. Às alíquotas dos filtrados, da amostra comercial e simulada, correspondentes a 30 µg/mL, foram

transferidas para balão volumétrico de 50 mL. Em seguida, foram adicionadas 10; 15 e 20 mL da solução padrão, e o volume foi completado com etanol. As soluções apresentaram concentrações finais equivalentes a 50, 60 e 70 µg/mL de estradiol. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 281 nm, usando etanol como branco, em cubetas de quartzo de 1,0 cm. As determinações foram realizadas conforme descrito em 4.2.2.1.6.6.

4.2.2.1.8 TESTE DE LINEARIDADE PARA COMPRIMIDOS:

Ao placebo foram acrescentadas quantidades de padrão que correspondem a 50, 75, 100, 125 e 150 % do valor rotulado. O teste foi realizado em três dias diferentes, em intervalos de uma semana para verificação de possíveis interferências com o princípio ativo, em triplicata (ICH-Q2B, 1996).

4.2.2.1.6.8.1 Preparação da solução de 17β-estradiol para o teste de linearidade:

Numa série de cinco balões volumétricos de 50 mL, contendo em cada um deles uma quantidade de pó placebo correspondente a três comprimidos, foram transferidos 5,0, 7,5, 10,0, 12,5 e 15,0 mL da solução de estradiol a 0,60 mg/mL, respectivamente. Os volumes foram completados com etanol.

Os filtrados foram diluídos como descrito em 4.2.2.1.6.5, e a leitura das absorvâncias efetuadas contra branco de etanol absoluto, no comprimento de onda de 281 nm, em cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura.

4.2.2.1.9 PREPARAÇÃO DO PADRÃO PARA GEL:

Foram transferidos para um béquer de 50 mL, 10 g de gel - placebo, exatamente pesado, e adicionou - se 2,5 mL da solução de cloreto de sódio 10 %. Após desestabilização do gel, foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de etanol absoluto. Transferiu - se 10 mL da solução de 17 β -estradiol 0,60 mg/mL, preparadas de acordo com o procedimento 4.2.2.1.1.1, no balão contendo gel - placebo, adicionando-se cerca de 20 mL de etanol absoluto.

Colocou - se no banho de ultra - som por cinco minutos e completou - se o volume com etanol absoluto, e a solução resultante filtrada através de papel de filtro quantitativo adequado. Esta solução contém 120 μ g/mL de estradiol.

4.2.2.1.10 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA GEL:

Foram pesados 10 g de gel para um béquer de 50 mL, adicionou - se 2,5 mL da solução de cloreto de sódio 10 %, e após desestabilização do gel, esta solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de etanol absoluto. Colocou - se no banho de ultra - som por cinco minutos e completou - se o volume com etanol absoluto, e esta solução foi filtrada através de papel de filtro quantitativo adequado.

4.2.2.1.11 PREPARAÇÃO DO BRANCO PARA GEL:

Foram pesados 10,0 g de gel - placebo para um béquer de 50 mL, adicionou - se 2,5 mL de cloreto de sódio 10 %, e após desestabilização do gel, esta solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL com auxílio de etanol absoluto. Colocou - se no banho de ultra - som por cinco minutos, completou - se com etanol absoluto e a solução foi filtrada através de papel de filtro quantitativo adequado.

4.2.2.1.12 ENSAIO:

Transferiu – se 25,0 mL do filtrado para os respectivos balões volumétricos de 50 mL e diluídos com etanol absoluto. As leituras das absorvâncias foram efetuadas no comprimento de onda de 281 nm, em cubetas de quartzo, contra o branco.

4.2.2.1.13 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ADESIVO TRANSDÉRMICO:

Um adesivo contendo 3,2 mg de estradiol foi transferido para um béquer de 50 mL, adicionou-se cerca de 15 mL de etanol absoluto e colocou - se no banho de ultra-som por 30 minutos. Transferiu - se para um balão volumétrico de 25 mL, quantitativamente com etanol absoluto e completou - se com o mesmo solvente. Esta solução contém 128 µg/mL e foi filtrada antes de proceder a próxima diluição. Cinco mililitros desta solução foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e completado com etanol absoluto, obtendo solução de concentração de 64 µg/mL.

4.2.2.1.14 PREPARAÇÃO DO PADRÃO PARA ADESIVO TRANSDÉRMICO:

A solução padrão de 17β-estradiol foi preparada transferindo - se 64 mg de 17β-estradiol, exatamente pesados para um balão volumétrico de 100 mL, e adicionando - se cerca de 80 ml de etanol absoluto. Após cinco minutos no banho de ultra - som, completou - se o volume com o mesmo solvente. A partir desta solução, foi preparada a solução de uso, transferindo - se 1 ml para um balão volumétrico de 10 mL, completando - se o volume com etanol absoluto. Esta solução contém 64 µg/mL de estradiol.

4.2.2.1.15 ENSAIO:

As leituras das absorvâncias foram efetuadas no comprimento de onda de 281 nm, em cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura, contra o etanol absoluto.

4.2.2.1.16 CÁLCULO:

A seguinte expressão foi usada no cálculo da concentração:

$$\text{Concentração real por adesivo} = \frac{A_a}{A_p} \times C$$

Sendo:

Aa = absorvância da amostra

Ap = absorvância do padrão

C = concentração teórica por adesivo

4.2.2.1.17 TESTE DE RECUPERAÇÃO PARA ADESIVO TRANSDÉRMICO:

Para execução do ensaio foram preparadas soluções de padrão e amostra contendo 128 µg/mL de 17β-estradiol. Às alíquotas da amostra correspondente a 32 µg/mL foi adicionada solução padrão nas concentrações: 25,6; 32,0 e 38,4 µg/mL respectivamente, e completado com etanol absoluto

4.2.2.2 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados com solução contendo 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL de 17β-

estradiol, nas mesmas condições anteriores. O ensaio foi feito em triplicata e o desvio padrão calculado entre os resultados obtidos. Para o cálculo dos parâmetros foi utilizado Excel 2000 (ICH-Q2B,1996).

O cálculo para o LD e LQ foi realizado segundo as fórmulas:

$$LD = \frac{\text{desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva analítica}} \times 3,3$$

$$LQ = \frac{\text{desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva analítica}} \times 10$$

4.2.3 ESTUDO DO DOSEAMENTO DO 17 β -ESTRADIOL PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO VISÍVEL (REAÇÃO COLORIMÉTRICA)

Foi realizado um estudo, baseado no princípio do método de Bratton e Marshall (1939), isto é, diazotação da sulfanilamida com nitrito de sódio seguida de reação de acoplamento com 17 β -estradiol.

4.2.3.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO:

4.2.3.1.1 Espectro de absorção:

A solução padrão de 17 β -estradiol foi preparada transferindo - se 100,0 mg de 17 β -estradiol, exatamente pesados, para um balão volumétrico de 100 mL e adicionou - se cerca de 80 mL de etanol absoluto. Colocou - se no banho de ultra - som por 5 minutos e completou - se com o mesmo solvente. A partir desta solução foi preparada uma solução contendo 200,0 μ g/mL de 17 β -estradiol. Através de diluições adequadas, foram preparadas soluções contendo 8,0, 16,0, 24,0 e 32,0 μ g/mL, com as quais foi realizada a reação colorimétrica em balão volumétrico de 50 mL, em banho de gelo. A preparação destas soluções foi feita de acordo com o esquema 2.

Esquema 2: Preparação das diluições para determinação do espectro de absorção do método colorimétrico:

Balão	Solução padrão 200,0 $\mu\text{g/mL}$ (mL)	Sulfanilamida 0,1 % (mL)	Nitrito de sódio 0,5% (mL)	Carbonato de sódio 10% (mL)	Água destilada (mL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	2,0	10,0	10,0	5,0	23,0	8,0
2	4,0	10,0	10,0	5,0	21,0	16,0
3	6,0	10,0	10,0	5,0	19,0	24,0
4	8,0	10,0	10,0	5,0	17,0	32,0
5	0,0	10,0	10,0	5,0	25,0	0,0

Estas soluções foram submetidas à varredura espectrofotométrica de 400 a 600 nm para verificação do perfil de absorção, em cubetas de quartzo de 1,0 cm, usando o balão 5 como branco.

4.2.3.1.2 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA PARA LEITURA:

A partir da solução contendo 200,0 $\mu\text{g/mL}$ de 17 β -estradiol, e através de diluições adequadas, foram preparadas soluções contendo entre 10,0 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$ com as quais foi realizada a reação colorimétrica em balão volumétrico de 50 mL, em banho de gelo, fazendo - se varredura entre 400 e 600 nm, determinou - se o comprimento de onda (λ) a ser utilizado. A preparação destas soluções foi feita de acordo com o esquema 3.

Esquema 3: Preparação das diluições para seleção do comprimento de onda (λ) do método colorimétrico:

Solução padrão (200 $\mu\text{g/mL}$)	Sulfanilamida 0,1 % (mL)	Nitrito de sódio 0,5% (mL)	Carbonato de sódio 10% (mL)	Água destilada (mL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
2,5	10,0	10,0	5,0	22,5	10,0
3,0	10,0	10,0	5,0	22,0	12,0
3,5	10,0	10,0	5,0	21,5	14,0
4,0	10,0	10,0	5,0	21,0	16,0
4,5	10,0	10,0	5,0	20,5	18,0
5,0	10,0	10,0	5,0	20,0	20,0
5,5	10,0	10,0	5,0	19,5	22,0
6,0	10,0	10,0	5,0	19,0	24,0
6,5	10,0	10,0	5,0	18,5	26,0
7,0	10,0	10,0	5,0	18,0	28,0
7,5	10,0	10,0	5,0	17,5	30,0
0,0	10,0	10,0	5,0	25,0	0,0

4.2.3.1.3 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PRODUTO COLORIDO:

Seguindo - se o procedimento 4.2.3.1.1, em uma solução contendo 24,0 $\mu\text{g/mL}$ de estradiol, foi determinada a absorvância após os tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150 e 180 minutos, realizando - se as leituras a 480 nm.

4.2.3.1.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES:

Realizou - se uma experiência utilizando - se diferentes concentrações de nitrito de sódio (1,0 e 0,5 %), sulfanilamida (0,1 e 0,5 %) e carbonato de sódio (5,0 e 10,0 %), segundo o esquema 4:

Esquema 4: Variação da concentração dos reagentes na reação colorimétrica

Balão n°	Sulfanilamida 10 mL	Nitrito de sódio 10mL	Carbonato de sódio 5mL	Solução padrão 5 mL	Água destilada 20 mL
1	0,1 %	0,5 %	5,0 %	200,0 µg/mL	
2	0,1 %	0,5 %	10,0 %	200,0 µg/mL	
3	0,5 %	0,5 %	5,0 %	200,0 µg/mL	
4	0,5 %	0,5 %	10,0 %	200,0 µg/mL	
5	0,1 %	1,0 %	5,0 %	200,0 µg/mL	
6	0,1 %	1,0 %	10,0 %	200,0 µg/mL	
7	0,5 %	1,0 %	5,0 %	200,0 µg/mL	
8	0,5 %	1,0 %	10,0 %	200,0 µg/mL	

4.2.3.1.5 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE RINGBOM

Para um balão volumétrico de 100 mL foram transferidos 100,0 mg de 17 β -estradiol, pesados exatamente, e adicionou - se cerca de 80 mL de etanol absoluto. Colocou - se no banho de ultra - som por 5 minutos e completou - se o volume com o mesmo solvente.

Efetuuou - se uma tomada de ensaio de 50 mL desta solução, transferindo - se para um balão volumétrico de 250 mL e completando - se o volume com etanol absoluto. Esta solução contém 200,0 µg/mL de 17 β -estradiol.

Foram transferidas 25 alíquotas desta solução, cujos volumes variaram de 0,5 a 12,5 mL para balões volumétricos de 50 mL, obtendo - se soluções com concentrações variando entre 2,0 e 50,0 µg/mL conforme o esquema 5. Em seguida, procedeu - se à reação colorimétrica.

As leituras de transmitância destas soluções, após a reação colorimétrica, foram efetuadas no comprimento de onda de 480nm, utilizando - se cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura.

Esquema 5: Preparação das soluções para obtenção da curva de Ringbom

Solução padrão 200,0 µg/mL (mL)	Solução de sulfanilamida 0,1 % (mL)	Solução de nitrito de sódio 0,5 % (mL)	Solução de carbonato de sódio 10 % (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (µg/mL)
0,5	10,0	10,0	5,0	24,5	2,0
1,0	10,0	10,0	5,0	24,0	4,0
1,5	10,0	10,0	5,0	23,5	6,0
2,0	10,0	10,0	5,0	23,0	8,0
2,5	10,0	10,0	5,0	22,5	10,0
3,0	10,0	10,0	5,0	22,0	12,0
3,5	10,0	10,0	5,0	21,5	14,0
4,0	10,0	10,0	5,0	21,0	16,0
4,5	10,0	10,0	5,0	20,5	18,0
5,0	10,0	10,0	5,0	20,0	20,0
5,5	10,0	10,0	5,0	19,5	22,0
6,0	10,0	10,0	5,0	19,0	24,0
6,5	10,0	10,0	5,0	18,5	26,0
7,0	10,0	10,0	5,0	18,0	28,0
7,5	10,0	10,0	5,0	17,5	30,0
8,0	10,0	10,0	5,0	17,0	32,0
8,5	10,0	10,0	5,0	16,5	34,0
9,0	10,0	10,0	5,0	16,0	36,0
9,5	10,0	10,0	5,0	15,5	38,0
10,0	10,0	10,0	5,0	15,0	40,0
10,5	10,0	10,0	5,0	14,5	42,0
11,0	10,0	10,0	5,0	14,0	44,0
11,5	10,0	10,0	5,0	13,5	46,0
12,0	10,0	10,0	5,0	13,0	48,0
12,5	10,0	10,0	5,0	12,5	50,0

4.2.3.1.6.CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA:

Da curva de Ringbom, obteve - se a faixa de concentração mais adequada para o cálculo da equação da curva analítica. Foram preparadas 10 soluções de 17 β -estradiol cujas concentrações variaram de 10,0 a 28,0 μ g/mL, utilizando o procedimento 4.2.3.1.5. As leituras da absorvância foram efetuadas no comprimento de onda de 480 nm. A equação da reta e coeficiente de correlação foi calculada empregando - se Software Excel-2000.

4.2.3.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS E SIMULADAS:

4.2.3.2.1. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO PARA GEL:

A solução de 17 β -estradiol foi preparada transferindo - se 60,0 mg de 17 β -estradiol, exatamente pesados, para um balão volumétrico de 100 mL, adicionando - se cerca de 80 mL de etanol absoluto. Após cinco minutos no banho de ultra - som, completou - se o volume com o mesmo solvente.

Transferiu - se, para um béquer de 100 mL, 20,0 g de gel - placebo, exatamente pesados, e adicionou - se 5 mL de solução de cloreto de sódio a 10 %, homogeneizando para transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de etanol absoluto.

Transferiu - se 20 mL de solução de 17 β -estradiol 0,60 mg/mL para o balão contendo gel - placebo, adicionando - se cerca de 40 mL de etanol absoluto, e colocou - se no banho de ultra - som por cinco minutos. Completou - se o volume com o etanol absoluto, e a solução foi filtrada através de papel de filtro quantitativo adequado.

4.2.3.2.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA GEL:

Foram pesados 20,0 g de gel para um béquer de 100 mL, adicionou - se 5 mL de solução de cloreto de sódio a 10 %, homogeneizando para transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de etanol absoluto. Colocou - se no banho de ultra - som por 5 minutos e completou - se o volume com o etanol absoluto, e a solução foi filtrada através de papel de filtro quantitativo adequado.

4.2.3.2.3 PREPARAÇÃO DO BRANCO PARA GEL:

Foram pesados 20,0 g de gel - placebo para um béquer de 100 mL, adicionou - se 5 mL de solução de cloreto de sódio a 10 %, homogeneizando para transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de etanol absoluto. Colocou - se no banho de ultra - som por cinco minutos e completou - se o volume com o etanol absoluto, e a solução foi filtrada através de papel de filtro quantitativo adequado.

4.2.3.2.4 ENSAIO:

Os filtrados foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL e submetidos à reação colorimétrica, segundo o esquema 6, em banho de gelo.

Esquema 6: Preparação das soluções para reação colorimétrica das amostras comerciais e simuladas

Balão	Filtrado (mL)	Sulfanilamida 0,1 % (mL)	Nitrito de sódio 0,5% (mL)	Carbonato de sódio 10% (mL)	Água destilada (mL)
Padrão	10,0	10,0	10,0	5,0	15,0
Amostra	10,0	10,0	10,0	5,0	15,0
Branco	10,0	10,0	10,0	5,0	15,0

As leituras das absorvâncias foram efetuadas no comprimento de onda de 480 nm, em cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura, contra o branco.

4.2.3.2.5 CÁLCULO:

O cálculo dos resultados das análises realizou - se conforme a expressão:

$$\frac{A_a \times P_p \times T \times DT}{A_p \times TE \times 5} = \text{mg / dose terapêutica}$$

Sendo:

A_a = absorvância da amostra

A_p = absorvância do padrão

T = teor do padrão expresso em decimal

P_p = peso do padrão (mg)

DT = peso da dose terapêutica de cada forma farmacêutica

TE = tomada de ensaio

4.2.3.2.6 TESTE DE RECUPERAÇÃO PARA GEL:

Para o teste de recuperação foram preparadas soluções padrão e amostras contendo 150 µg/mL de estradiol.

O filtrado das amostras comerciais e simuladas, correspondentes a 12 µg/mL, foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL . Foram adicionados posteriormente 3, 4 e 5 mL da solução padrão. A reação

colorimétrica foi realizada de acordo com o item 4.2.3.2.4, e estas soluções apresentaram concentrações equivalentes a 21, 24 e 27 µg/mL.

4.2.3.2.7 TESTE DE LINEARIDADE PARA GEL:

Ao placebo foi acrescentado 30,0, 45,0, 60,0, 75,0 e 90,0 mg de padrão que correspondem a 50, 75, 100, 125 e 150 % do valor usual para avaliação da linearidade. O teste foi realizado em triplicata, em três dias diferentes, em intervalos de uma semana para verificação de possíveis interferências com o princípio ativo.

4.2.3.2.7.1 Preparação da solução de estradiol para o teste de linearidade:

A solução de 17β-estradiol foi preparada de acordo com o item 4.2.3.2.1., sendo preparados cinco balões volumétricos de gel - placebo, aos quais foram transferidos 10, 15, 20, 25 e 30 mL de solução de 17β-estradiol a 0,60 mg/mL respectivamente, para obtenção dos filtrados, que foram submetidos à reação colorimétrica, de acordo com o item 4.2.3.2.4.

4.2.3.3.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO PARA COMPRIMIDO:

Foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, 10 mL da solução contendo 0,60 mg/mL, pó de placebo correspondente a 3 comprimidos e 30 mL de etanol absoluto. Após 5 minutos no banho de ultra-som, completou - se com o mesmo solvente. Esta solução contém 120 µg/mL de 17β-estradiol, sendo filtrado através de papel de filtro adequado.

4.2.3.3.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA COMPRIMIDO:

Foram triturados 30 comprimidos de 17β-estradiol. Do pó obtido tomou - se uma alíquota correspondente a tres comprimidos (6 mg) de 17β-

estradiol e transferiu - se para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionou - se cerca de 40 mL de etanol absoluto e após 5 minutos no banho de ultra - som, completou - se o volume com mesmo solvente. Filtrou - se através de um papel de filtro adequado, obtendo - se uma solução contendo 120 $\mu\text{g/mL}$ de 17 β -estradiol.

4.2.3.3.3 PREPARAÇÃO DO BRANCO PARA COMPRIMIDO:

Para um balão volumétrico de 50 mL foram transferidos pó de placebo correspondente a 3 comprimidos e cerca de 40 mL de etanol absoluto. Após 5 minutos no banho de ultra - som, completou - se o volume com o mesmo solvente e filtrou - se em papel de filtro adequado.

4.2.3.3.4 ENSAIO:

A reação colorimétrica foi realizada como descrito no item 4.2.3.2.4, filtrando - se a solução antes da leitura a 480 nm em papel de filtro adequado.

4.2.3.3.5 CÁLCULO:

O cálculo foi realizado utilizando - se a expressão de 4.2.3.2.5.

4.2.3.3.6 TESTE DE RECUPERAÇÃO PARA COMPRIMIDO:

Para o teste de recuperação foram preparadas soluções padrão e amostras contendo 150 $\mu\text{g/mL}$ de estradiol.

O filtrado das amostras comerciais e simuladas, correspondentes a 12 $\mu\text{g/mL}$, foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados posteriormente 3, 4 e 5 mL da solução padrão. A reação colorimétrica foi realizada de acordo com o item 4.2.3.2.4 e estas soluções apresentaram concentrações equivalentes a 21, 24 e 27 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.3.3.7 TESTE DE LINEARIDADE PARA COMPRIMIDO:

Para balões volumétricos de 50 mL, contendo pó de placebo correspondente a 3 comprimidos foram transferidos quantidades da solução padrão 0,60 mg/mL correspondentes a 1,0, 1,5, 2,0 2,5 e 3,0 mg de 17 β -estradiol. O filtrado obtido foi submetido à reação colorimétrica segundo o item 4.2.3.2.4. Este teste foi realizado em triplicata e em três dias diferentes.

4.2.3.4.1.PREPARAÇÃO DO PADRÃO PARA ADESIVO:

Pesou - se exatamente 64 mg de 17 β -estradiol para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionou - se cerca de 80 mL de etanol absoluto e colocou - se no banho de ultra - som por 5 minutos. Completou - se com etanol absoluto. Transferiu - se 10 mL desta solução para um balão volumétrico de 50 mL, obtendo - se uma solução com 128 μ g/mL de 17 β -estradiol.

4.2.3.4.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ADESIVO:

Colocou - se cuidadosamente cada adesivo em um béquer com auxílio de um bastão de vidro e cobriu - se com aproximadamente 15 mL de etanol absoluto. Em seguida, colocou - se no banho de ultra - som por 30 minutos e transferiu - se quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL e completou - se com o mesmo solvente. A solução obtida, contendo 128 μ g/mL de 17 β -estradiol, foi filtrada em papel de filtro adequado.

4.2.3.4.3 ENSAIO:

Procedeu - se como descrito no item 4.2.3.2.4, utilizando como branco, 10 mL de etanol absoluto. A solução colorida foi filtrada antes da leitura a 480 nm, em papel de filtro adequado.

4.2.3.4.4 CÁLCULO:

Foi utilizada a seguinte expressão para o cálculo da concentração:

$$\text{Concentração real por adesivo} = \frac{A_a}{A_p} \times C$$

Onde:

Aa = absorvância da amostra

Ap = absorvância do padrão

C = concentração teórica por adesivo

4.2.3.4.5. TESTE DE RECUPERAÇÃO PARA ADESIVO:

A solução padrão foi preparada de acordo com o item 4.2.3.4.1 e a solução da amostra, de acordo com o item 4.2.3.4.2. Em seguida foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL, alíquotas da solução da amostra correspondente a 12,8 µg/mL de 17β-estradiol. A estes balões foram acrescentados quantidades de solução padrão correspondentes a 10,24, 12,80 e 15,36 µg/mL de 17β-estradiol. A reação colorimétrica foi realizada segundo o item 4.2.3.4.3.

4.2.3.5 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ):

Foram preparadas soluções contendo 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 µg/mL de 17β-estradiol. A reação colorimétrica foi realizada em triplicata para cada concentração e calculado o desvio padrão entre os resultados obtidos. A inclinação da curva de calibração foi calculada utilizando - se Software Excel-2000.

4.2.4 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS

Testes de significância F e t foram aplicados para comparar os métodos: espectrofotométrico no UV e o colorimétrico de diazotação e acoplamento para a forma farmacêutica comprimidos.

O teste F ou comparação de variâncias é um parâmetro estatístico que é usado para comparar precisão de dois grupos de dados, isto é, os resultados de dois métodos diferentes (HADJIOANNOU, CHRISTIAN, EFSTATHIOU *et al*, 1988; MILLER, MILLER, 1993)

O valor de F é calculado pela equação:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Onde:

S_1^2 = maior desvio padrão

S_2^2 = menor desvio padrão

É verificada a significância do valor de F por comparação com valores da tabela F para um determinado nível de confiança. Se o valor encontrado de F excede o valor tabelado, considera - se que a diferença entre os resultados dos dois métodos é significativa, para um determinado nível de significância (HADJIOANNOU, CHRISTIAN, EFSTATHIOU *et al*., 1988; MILLER, MILLER, 1993).

Outro teste de significância é o teste t, usado para verificar a significância de uma média ou da diferença entre duas médias dos valores

experimentais obtidos para dois métodos diferentes para um determinado nível de significância.

Sejam $\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ as médias obtidas das análises de uma mesma amostra, através de dois métodos diferentes. A variância baseada em ambas amostras é dada pela equação:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Onde:

s_1^2 = variância da amostra pelo método 1

s_2^2 = variância da amostra pelo método 2

n_1 = número de determinações pelo método 1

n_2 = número de determinações pelo método 2

O valor de t é calculado pela equação:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{S \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

$\bar{x}_1$ = média da amostra pelo método 1

$\bar{x}_2$ = média da amostra pelo método 2

S = desvio padrão, baseado em ambos métodos, obtido a partir da raiz quadrada da variância calculada para os mesmos.

t tem $(n_1 + n_2) - 2$ graus de liberdade

Se o valor encontrado para t excede o valor tabelado, considera - se que a diferença entre os resultados dos dois métodos é significativa, para um determinado nível de significância (HADJIOANNOU, CHRISTIAN, EFSTATHIOU *et al.*, 1988; MILLER, MILLER, 1993).

RESULTADOS

5 RESULTADOS:

5.1: IDENTIFICAÇÃO

ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

As figuras 1, 2 e 3 ilustram os espectros obtidos na região do infravermelho do 17β -estradiol substância química de referência e matéria prima utilizada nas formulações e como padrão secundário.

17β -estradiol, AKZONOBEL, L00023591, T 100,5 %

Figura 1: Espectros de absorção na região do infravermelho obtidos a partir do 17β -estradiol padrão de referência (—) e matéria prima (—)

17 β -estradiol, HEARTWELL, L ESMO1/002, T 100,41 %

Figura 2: Espectros de absorção na região do infravermelho obtidos a partir do 17 β -estradiol padrão de referência (—) e padrão secundário (—)

17 β -estradiol, AKZONOBEL, L 00012623, T 97,95 %

cm⁻¹

Figura 3: Espectros de absorção na região do infravermelho obtidos a partir do 17 β -estradiol padrão de referência (-----) e matéria prima (—)

ESPECTRO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

O espectro do 17β -estradiol na região do ultravioleta está ilustrado na figura 4.

Figura 4: Espectro do 17β -estradiol na região do UV, padrão secundário, em solução etanólica, de concentração $50 \mu\text{g/mL}$, e varredura entre 200 - 400 nm.

O espectro do 17β -estradiol na região do UV apresenta picos nos seguintes comprimentos de onda: 225; 281 e 288 nm, e com valores de absorvância de 1,1992; 0,3204 e 0,2866, respectivamente.

FAIXA DE FUSÃO

Na tabela 5 estão relacionados os valores obtidos na determinação da faixa de fusão.

Tabela 5: Valores de faixa de fusão apresentados pelas matérias primas de 17 β -estradiol micronizado

Amostra (matéria-prima)	Faixa de fusão (°C)
Akzo L 00023591	173 – 179
Heartwell L ESMO1/002	172 – 178
Akzo L 00012623	173 – 178

5.2 ESTUDO DO DOSEAMENTO DO 17 β -ESTRADIOL PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

5.2.1 ESCOLHA DO SOLVENTE:

Na figura 5 estão os espectros obtidos nos solventes orgânicos testados.

Figura 5: Espectro de absorção da solução de 17 β -estradiol 60 μ g/mL no UV em diferentes solventes: acetona (---), acetonitrila (-----), etanol absoluto (—), metanol (—•—) e tetraidrofurano (—•—), no intervalo entre 200 - 400 nm.

Na avaliação do espectro de absorção na faixa restritiva entre 230 e 320 nm, os resultados estão evidenciados na figura 6.

Figura 6: Espectro de absorção do 17 β -estradiol 60 μ g/mL no UV nos solventes: acetonitrila (---), etanol absoluto (----), metanol (....) e tetraidrofurano (—).

Os picos máximos obtidos para os diferentes solventes encontram - se na tabela 6.

Tabela 6 Comprimento de onda máximo, e respectiva absorvância nos diferentes solventes.

Solvente	λ máximo (nm)	Absorvância
Acetonitrila	280,4	0,4510
Etanol absoluto	281,2	0,3954
Metanol	281,2	0,4231
Tetraidrofurano	282,4	0,4829

O espectro de absorção da solução de 17β -estradiol em etanol absoluto, nas concentrações de 40, 80, 120 e 160 $\mu\text{g/mL}$ está ilustrada na figura 7.

Figura 7: Espectro de absorção da solução de 17β -estradiol no UV nas concentrações: 40 (----), 80 (---), 120 (—) e 160 (—) $\mu\text{g/mL}$ em etanol absoluto.

5.2.2 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA PARA LEITURA:

Na tabela 7 encontram - se os valores obtidos na seleção do comprimento de onda para leitura no etanol absoluto. Selecionou - se o comprimento de onda de leitura em 281 nm.

Tabela 7: Valores obtidos na seleção do comprimento de onda (λ) para leitura no UV.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Comprimento de onda (λ)	Absorvância
30	281,2	0,2209
40	281,2	0,2982
50	281,3	0,3723
60	281,3	0,4468
70	281,3	0,5305
80	281,5	0,6066
90	281,3	0,6796

5.2.3 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO:

Os valores relacionados na tabela 8 mostram que não houve variações significativas dentro do intervalo de 12 horas. Estes dados podem ser mais bem visualizados na figura 8.

Figura 8: Estabilidade da solução de 17 β -estradiol 60 $\mu\text{g/mL}$ em etanol absoluto, no período de 12 horas.

Tabela 8: Estabilidade da solução de 17 β -estradiol em etanol absoluto.

Tempo (minutos)	Absorvância
0	0,4252
5	0,4266
10	0,4276
15	0,4286
20	0,4294
25	0,4302
30	0,4346
45	0,4395
60	0,4412
120	0,4365
180	0,4395
240	0,4330
300	0,4366
360	0,4366
540	0,4355
720	0,4374

5.2.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE RINGBOM:

Na tabela 9 encontram - se os valores da concentração e absorvência (100-T) para construção da curva de Ringbom.

Tabela 9: Valores empregados para construção da curva de Ringbom do 17 β -estradiol em etanol absoluto, em 281 nm.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Transmitância T (%)	100 – T (%)
5	98,91	1,09
10	92,49	7,75
20	77,50	22,50
30	65,88	34,12
40	55,32	44,68
50	46,81	53,19
60	39,33	60,67
70	32,58	67,42
80	27,55	72,45
90	23,13	76,87
100	19,21	80,79
110	16,10	83,90
120	13,75	86,25
130	11,49	88,51
140	9,58	90,42
150	8,11	91,89
160	6,98	93,02
170	5,93	94,07
180	4,77	95,23
190	4,19	95,81
200	3,37	96,63
210	2,98	97,02
220	2,59	97,41
230	2,27	97,73
240	1,95	98,05

A curva de Ringbom da figura 9, foi construída com os valores experimentais da tabela 9.

Figura 9: Curva de Ringbom para 17β -estradiol em etanol absoluto, em 281 nm.

5.2.5 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA:

Na tabela 10, encontram - se os valores das absorvâncias das respectivas concentrações utilizadas na construção da curva analítica.

Tabela 10: Valores das absorvâncias das soluções de 17 β -estradiol, em etanol absoluto, empregado para a construção da curva analítica, do método UV.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância
30,0	0,216
40,0	0,292
50,0	0,368
60,0	0,443
70,0	0,525
80,0	0,598
90,0	0,675
100,0	0,755
110,0	0,833
120,0	0,902

Com os valores de absorvâncias da tabela 10 foi construída a curva analítica, conforme pode ser observado na figura 10. Obteve - se uma correlação próxima de 1 ($r = 0,9999$).

Figura 10: Curva analítica para o 17 β -estradiol em etanol absoluto, em 281 nm.

5.2.6 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS E SIMULADAS

Nas tabelas 11 e 12 encontram - se os resultados obtidos das análises (média de 10 valores para o comprimido e 6 para o adesivo transdérmico) das amostras comerciais e simuladas, pelo método espectrofotométrico na região do UV, para avaliação da precisão intradia e interdia, respectivamente.

Tabela 11: Precisão intradia do método espectrofotométrico, na região do UV, para comprimido e adesivo transdérmico.

amostra	Concentração teórica por dose (mg)	Concentração obtida por dose (mg)	Média (%)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Intervalo de confiança da média (p=0,05)
Comprimido simulado*	2,00	2,00	100,00	0,03	1,33	2,00±0,02
Comprimido comercial*	2,00	1,98	99,00	0,02	1,12	1,98±0,02
Adesivo transdérmico**	3,20	3,51	109,69	0,08	2,15	3,51±0,08

os valores estão expressos como média, *n=10 e **n=6

Tabela 12: Precisão interdia do método espectrofotométrico, na região do UV, para comprimido e adesivo transdérmico, em três dias diferentes.

amostra	Concentração teórica por dose (mg)	Concentração obtida por dose (mg)	Média (%)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Intervalo de confiança da média (p=0,05)
Comprimido simulado	2,00	2,03	101,50	0,03	1,40	2,03±0,02
Comprimido comercial	2,00	2,01	100,50	0,03	1,43	2,01±0,07
Adesivo transdérmico	3,20	3,49	109,06	0,02	0,60	3,49±0,05

Nas figuras 11 a 13 estão ilustrados os espectros de absorção das amostras de comprimido, para comparação com os espectros da solução padrão de 17β -estradiol, e na figura 14, o espectro de absorção da amostra de adesivo transdérmico.

Figura 11: Espectro de absorção do placebo de comprimido (----) e padrão de 17β -estradiol 60 $\mu\text{g/mL}$ (—) em etanol absoluto.

Figura 12: Espectro de absorção da amostra simulada de comprimidos 2 mg (—) e padrão de 17β-estradiol 60 µg/mL (----) em etanol absoluto

Figura 13: Espectro de absorção da amostra comercial de comprimidos de 2 mg (—) e padrão de 17β-estradiol 60 µg/mL (----) em etanol absoluto.

Figura 14: Espectro de absorção da amostra comercial de adesivo transdérmico 3,20 mg (---) e padrão de 17 β -estradiol 64 μ g/mL (—) em etanol absoluto

5.2.7 TESTE DE RECUPERAÇÃO:

Nas tabelas 13 e 14 estão ilustrados os resultados das análises do teste de recuperação do padrão, intradia e interdia, do método espectrofotométrico na região do UV, para as formas farmacêuticas, comprimido e adesivo transdérmico, respectivamente.

Tabela 13: Teste de recuperação intradia, do método espectrofotométrico no UV, para comprimido, e adesivo transdérmico, em três níveis de concentração e em triplicata.

amostra	Quantidade de padrão adicionado $\mu\text{g/mL}$	Quantidade de padrão recuperado $\mu\text{g/mL}$ (DP)	Recuperação (%)
Comprimido	20,00	19,91 (0,18)	99,55
simulado	30,00	29,61 (0,11)	98,70
(30 $\mu\text{g/mL}$)	40,00	40,34 (0,25)	100,85
Comprimido	20,00	20,14 (0,18)	101,55
comercial	30,00	29,88 (0,24)	99,60
(30 $\mu\text{g/mL}$)	40,00	40,54 (0,25)	101,35
Adesivo	25,60	25,60 (0,55)	100,00
transdérmico	32,00	31,72 (0,35)	99,13
(32 $\mu\text{g/mL}$)	38,49	37,76 (0,13)	98,33

Tabela 14: Teste de recuperação interdia, do método espectrofotométrico no UV, para comprimido, e adesivo transdérmico, em três níveis de concentração e em três dias diferentes.

amostra	Quantidade de padrão adicionado $\mu\text{g/mL}$	Quantidade de padrão recuperado $\mu\text{g/mL}$ (DP)	Recuperação (%)
Comprimido	20,00	19,98 (0,15)	99,90
simulado	30,00	30,27 (0,65)	100,90
(30 $\mu\text{g/mL}$)	40,00	40,69 (0,31)	101,73
Comprimido	20,00	20,18 (0,12)	100,90
comercial	30,00	30,05 (0,20)	100,17
(30 $\mu\text{g/mL}$)	40,00	40,66 (0,29)	101,65
Adesivo	25,60	25,63 (0,03)	100,12
transdérmico	32,00	31,73 (0,48)	99,16
(32 $\mu\text{g/mL}$)	38,49	37,27 (0,47)	99,66

5.2.8 TESTE DE LINEARIDADE

Na tabela 15 estão relacionados os resultados obtidos no teste de linearidade para comprimidos.

Tabela 15: Teste de linearidade para 17 β -estradiol, realizado em triplicata para cada concentração e em três dias diferentes, em comprimidos, para o método espectrofotométrico no UV.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	1° ensaio		2° ensaio		3° ensaio	
	Abs	*(DP)	Abs	*(DP)	Abs	*(DP)
30	0,2270	(0,01)	0,2099	(0,01)	0,2214	(0,003)
45	0,3362	(0,01)	0,3320	(0,01)	0,3320	(0,004)
60	0,4439	(0,01)	0,4478	(0,01)	0,4469	(0,003)
75	0,5622	(0,01)	0,5671	(0,01)	0,5593	(0,004)
90	0,6765	(0,01)	0,6754	(0,01)	0,6645	(0,004)

*os valores estão expressos como média, n=3 e (DP)

Figura 15: Teste de linearidade para comprimidos do método no UV.

5.2.9 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção para o método espectrofotométrico no UV foi de 0,40 µg/mL e o limite de quantificação de 1,23 µg/mL de 17β-estradiol.

5.3 ESTUDO DO DOSEAMENTO DO 17β-ESTRADIOL PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO VISÍVEL (REAÇÃO COLORIMÉTRICA)

5.3.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO

Espectro de absorção do 17β-estradiol nas concentrações de 8,0, 16,0, 24,0 e 32,0 µg/mL. Os resultados obtidos estão na tabela 16 e o espectro obtido na figura 16.

Tabela 16: Resultados obtidos na determinação do espectro de absorção do método espectrofotométrico no visível.

Concentração (µg/mL)	λ(nm)	Absorvância
8,0	462,0	0,186
16,0	480,0	0,369
24,0	479,5	0,592
32,0	479,5	0,790

Figura 16: Espectro de absorção do 17β-estradiol nas concentrações de 8,0, 16,0, 24,0 e 32,0 µg/mL do produto da reação colorimétrica da sulfanilamida diazotada e estradiol.

5.3.2 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA PARA LEITURA:

Os resultados relacionados na tabela 17 mostraram que no intervalo entre 10,0 e 30,0 µg/mL não houve flutuação significativa no comprimento de máxima absorção, permanecendo por volta de 480 nm.

Tabela 17: Resultados obtidos para seleção do comprimento de onda (λ) de leitura do método espectrofotométrico na região do visível.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	λ (nm)	Absorvância
10,0	478,0	0,217
12,0	478,0	0,272
14,0	480,0	0,326
16,0	481,5	0,393
18,0	480,5	0,447
20,0	480,0	0,498
22,0	480,5	0,582
24,0	480,5	0,604
26,0	478,0	0,660
28,0	479,0	0,681
30,0	474,5	0,698

5.3.3 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PRODUTO COLORIDO:

Pelos valores exibidos na tabela 18, estes podem ser considerados semelhantes até 120 minutos. A figura 17 exibe o gráfico com estes valores.

Tabela 18: Estabilidade do produto colorido formado.

Tempo (min)	Absorvância
0	0,6448
5	0,6305
10	0,6289
15	0,6296
20	0,6317
25	0,6342
30	0,6348
45	0,6405
60	0,6414
75	0,6387
90	0,6424
105	0,6418
120	0,6400
150	0,6846
180	0,6749

Figura 17: Estabilidade do azo composto formado pelo acoplamento de sulfanilamida diazotada com 17 β -estradiol, no período de 3 horas.

5.3.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES:

A formação do produto colorido entre a sulfanilamida diazotada e o estradiol sofre influência da concentração dos reagentes conforme visto nos resultados da tabela 19. As melhores concentrações foram: nitrito de sódio 0,5 %, sulfanilamida 0,1 %, e carbonato de sódio 10 %.

Tabela 19: Influência da concentração dos reagentes na reação colorimétrica

Balão n°	Absorvância ($\lambda = 480 \text{ nm}$)
1	0,441
2	0,486
3	0,359
4	0,420
5	0,422
6	0,460
7	0,337
8	0,393

Figura 18: Influência da concentração dos reagentes na reação colorimétrica

5.3.5 CURVA DE RINGBOM

Na tabela 20 estão relacionados os valores de: T , $100 - T$, que resultaram das leituras das soluções coloridas dos produtos da reação entre sulfanilamida diazotada e o estradiol, no intervalo grande de concentrações do fármaco. E, na figura 19, está desenhado o gráfico da curva de Ringbom.

Figura 19: Curva de Ringbom do produto colorido resultante da reação entre estradiol e sulfanilamida diazotada, em 480 nm.

Tabela 20: Valores que resultaram das leituras das soluções coloridas dos produtos da reação entre estradiol e sulfanilamida diazotada e usados na construção da curva de Ringbom do 17 β -estradiol – reação colorimétrica, que pode ser observada na figura 18.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	T	100 – T
2,0	96,8 ^o	3,20
4,0	89,45	10,55
6,0	79,69	20,31
8,0	70,97	29,03
10,0	62,28	37,72
12,0	54,83	45,17
14,0	48,40	51,60
16,0	43,60	56,40
18,0	37,13	62,87
20,0	32,42	67,58
22,0	28,86	71,14
24,0	25,37	74,63
26,0	21,96	78,04
28,0	19,92	80,08
30,0	16,89	83,11
32,0	14,44	84,56
34,0	13,92	86,08
36,0	11,91	88,09
38,0	10,06	89,94
40,0	9,14	90,86
42,0	8,02	91,98
44,0	6,88	93,12
46,0	5,92	94,08
48,0	4,87	95,13
50,0	4,75	95,25

5.3.6 CURVA ANALÍTICA:

Na tabela 21, encontram-se os valores experimentais das concentrações e absorvâncias usadas na construção da curva analítica do método colorimétrico.

Tabela 21: Valores das absorvâncias em função das concentrações do produto colorido da reação entre estradiol e sulfanilamida diazotada, em 480 nm, usados na construção da curva analítica do 17 β estradiol

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância
10,0	0,217
12,0	0,274
14,0	0,327
16,0	0,364
18,0	0,435
20,0	0,492
22,0	0,541
24,0	0,594
26,0	0,653
28,0	0,692

Figura 20: Curva analítica obtida a partir de soluções coloridas do produto de reação entre 17 β -estradiol e sulfanilamida diazotada nas concentrações de 10 a 28 $\mu\text{g/mL}$, e leitura a 480nm.

5.3.7 RESULTADO DAS ANÁLISES DAS AMOSTRAS COMERCIAIS E SIMULADAS DO 17 β -ESTRADIOL, PARA O MÉTODO COLORIMÉTRICO.

Nas tabelas 22 e 23 encontram - se os valores obtidos das análises de medicamentos contendo 17 β -estradiol para as formas farmacêuticas gel, comprimido e adesivo transdérmico, pelo método espectrofotométrico na região do visível, para determinação da precisão intradia e interdia (em três dias diferentes), respectivamente.

Tabela 22: Precisão intradia do método colorimétrico para doseamento do 17 β -estradiol em medicamentos (gel, comprimido e adesivo transdérmico).

Amostra	Concentração teórica por dose (mg)	Concentração obtida por dose (mg)	Média %	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Intervalo de confiança da média (p=0,05)
Gel* simulado	0,75	0,75	100,00	0,01	1,43	0,75 $\pm$ 0,01
Gel* comercial	0,75	0,79	105,40	0,01	0,98	0,79 $\pm$ 0,01
Comprimido* simulado	2,00	2,02	101,00	0,04	1,96	2,02 $\pm$ 0,03
Comprimido* comercial	2,00	2,03	101,50	0,04	1,84	2,03 $\pm$ 0,03
Adesivo** comercial	3,20	3,19	99,70	0,05	1,60	3,19 $\pm$ 0,05

Os valores estão expressos como média, *n = 10 e **n= 6

Tabela 23: Precisão interdia do método colorimétrico baseado na reação da sulfanilamida diazotada com 17 β -estradiol para medicamentos, realizado em 3 dias diferentes.

Amostra	Concentração teórica por dose (mg)	Concentração obtida por dose (mg)	Média %	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Intervalo de confiança da média (p=0,05)
Gel simulado	0,75	0,75	100,00	0,01	0,35	0,75 $\pm$ 0,01
Gel comercial	0,75	0,80	106,70	0,01	1,39	0,80 $\pm$ 0,03
Comprimido simulado	2,00	2,04	102,00	0,03	1,42	2,04 $\pm$ 0,07
Comprimido comercial	2,00	2,02	101,00	0,02	1,15	2,02 $\pm$ 0,06
Adesivo comercial	3,20	3,17	99,06	0,03	0,83	3,17 $\pm$ 0,07

5.3.8 TESTE DE RECUPERAÇÃO

Nas tabelas 24 e 25 estão relacionados os resultados obtidos das análises do teste de recuperação intradia e interdia (em três dias diferentes) pelo método espectrofotométrico na região do visível, para as formas farmacêuticas gel, comprimido e adesivo transdérmico em três níveis de concentração respectivamente.

Tabela 24 Teste de recuperação intradia aplicadas às amostras comerciais e simuladas de gel, comprimido e adesivo transdérmico, para o método colorimétrico, em três diferentes níveis de concentração.

Amostra	Quantidade de padrão adicionada (µg/mL)	Quantidade de padrão recuperada µg/mL (DP)	Recuperação (%)
Gel comercial (12,00 µg/mL)	9,00	8,83 (0,12)	98,10
	12,00	12,21 (0,21)	101,75
	15,00	15,28 (0,22)	101,87
Gel simulado (12,00 µg/mL)	9,00	8,83 (0,08)	98,10
	12,00	11,97 (0,20)	99,75
	15,00	14,63 (0,14)	97,53
Comprimido comercial (12,00 µg/mL)	9,00	8,96 (0,50)	99,56
	12,00	11,78 (0,29)	98,17
	15,00	15,12 (0,10)	100,80
Comprimido simulado (12,00 µg/mL)	9,00	9,01 (0,21)	100,11
	12,00	12,06 (0,27)	100,50
	15,00	14,70 (0,19)	98,00
Adesivo comercial (12,80 µg/mL)	10,24	10,18 (0,21)	99,41
	12,80	13,05 (0,36)	101,95
	15,36	15,18 (0,31)	98,83

*Os valores estão expressos como média, n = 3

Tabela 25 Teste de recuperação interdia aplicadas às amostras comerciais e simuladas de gel, comprimido e adesivo transdérmico, para o método colorimétrico, em três diferentes níveis de concentração e em três dias diferentes.

Amostra	Quantidade de padrão adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade de padrão recuperada $\mu\text{g/mL}$ (DP)	Recuperação (%)
Gel comercial (12,00 $\mu\text{g/mL}$)	9,00	8,99 (0,29)	99,89
	12,00	11,95 (0,23)	99,58
	15,00	14,82 (0,40)	98,80
Gel simulado (12,00 $\mu\text{g/mL}$)	9,00	8,94 (0,17)	99,33
	12,00	11,98 (0,24)	99,83
	15,00	14,86 (0,29)	99,07
Comprimido comercial (12,00 $\mu\text{g/mL}$)	9,00	9,11 (0,17)	101,22
	12,00	11,80 (0,10)	98,33
	15,00	15,10 (0,16)	100,67
Comprimido simulado (12,00 $\mu\text{g/mL}$)	9,00	8,91 (0,14)	99,00
	12,00	11,96 (0,11)	99,67
	15,00	14,98 (0,45)	99,87
Adesivo comercial (12,80 $\mu\text{g/mL}$)	10,24	10,15 (0,13)	99,12
	12,80	12,74 (0,31)	99,53
	15,36	15,32 (0,43)	99,74

5.3.8 TESTE DE LINEARIDADE PARA GEL:

Na figura 21 e na tabela 26, estão ilustrados os resultados obtidos no teste de linearidade para o método espectrofotométrico no visível.

Tabela 26: Resultados do teste de linearidade da forma farmacêutica gel, para o método colorimétrico.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	1° ensaio*		2° ensaio *		3° ensaio*	
	A	(DP)	A	(DP)	A	(DP)
12	0,288	(0,003)	0,311	(0,001)	0,310	(0,005)
18	0,428	(0,002)	0,461	(0,005)	0,466	(0,009)
24	0,582	(0,002)	0,611	(0,009)	0,634	(0,003)
30	0,723	(0,010)	0,769	(0,006)	0,771	(0,001)
36	0,886	(0,007)	0,948	(0,009)	0,921	(0,008)

*os valores estão expressos como média, n=3 e (desvio padrão)

Figura 21: Resultados do teste de linearidade, para forma farmacêutica gel, do método espectrofotométrico na região do Vis.

Nas figuras 22 e 23 estão ilustrados os espectros de absorção das amostras: comercial e simulada de gel, comparados com o padrão.

Figura 22: Espectro de absorção da amostra simulada de gel e padrão de 17β-estradiol do método colorimétrico.

Figura 23: Espectro de absorção da amostra comercial de gel e padrão de 17β-estradiol do método espectrofotométrico no visível.

5.3.10 TESTE DE LINEARIDADE PARA COMPRIMIDO:

Na tabela 27 estão expostos os dados do teste de linearidade para o comprimido, e na figura 24 a representação gráfica destes dados.

Tabela 27: Resultados do teste de linearidade da forma farmacêutica, comprimido, para o método colorimétrico.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	1° ensaio A (DP)	2° ensaio A *(DP)	3° ensaio A *(DP)
12	0,219 (0,007)	0,223 (0,014)	0,215 (0,007)
18	0,312 (0,011)	0,302 (0,007)	0,303 (0,002)
24	0,404 (0,013)	0,407(0,002)	0,394 (0,008)
30	0,493 (0,024)	0,493 (0,024)	0,487 (0,008)
36	0,585 (0,020)	0,580 (0,010)	0,592 (0,012)

* os valores estão expressos como média, n=3 e (desvio padrão)

Figura 24: Teste de linearidade em comprimido, do método colorimétrico

5.3.11 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ):

O limite de detecção para o método colorimétrico foi de 0,76 $\mu\text{g/mL}$ e o valor para o limite de quantificação, de 2,30 $\mu\text{g/mL}$.

5.4 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA COMPRIMIDOS.

As tabelas 28 e 29 apresentam valores de F e t respectivamente na comparação dos métodos UV e colorimétrico para a forma farmacêutica comprimido.

Tabela 28: Valores obtidos para o teste F do método espectrofotométrico no UV e colorimétrico. Valor tabelado de F para 95% nível de confiança e 9 graus de liberdade no numerador e denominador: 3,18 (em três dias diferentes)

Amostra	Valores experimentais de F (1° ensaio)	Valores experimentais de F (2° ensaio)	Valores experimentais de F (3° ensaio)
Simulada	1,551	1,317	2,081
Comercial	1,907	2,330	2,153

Tabela 29: Valores obtidos para o teste t do método espectrofotométrico no UV e colorimétrico. Valor tabelado de t para 95% nível de confiança e 18 graus de liberdade: 2,101 (em três dias diferentes)

Amostra	Valores experimentais de t (1° ensaio)	Valores experimentais de t (2° ensaio)	Valores experimentais de t (3° ensaio)
Simulada	0,826	0,048	0,504
Comercial	0,125	0,063	0,041

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO:

Atualmente, é inegável a eficiência dos métodos cromatográficos, aplicados no controle da qualidade de medicamentos, na grande maioria dos casos. Entretanto, são métodos que exigem equipamento caro, pessoal altamente qualificado, instalações sofisticadas e manutenção rigorosa, aumentando os custos operacionais. Além disto, alguns componentes comuns nas formulações transdérmicas, acarretam sérios problemas nas colunas cromatográficas, obrigando a prévias extrações ou separações, e que, mesmo assim, não resolvem muito destes casos.

Inicialmente procedeu - se à identificação do estradiol - base, utilizado no experimento. O espectro no infravermelho está ilustrado nas figuras 1, 2 e 3. Estes espectros quando comparado com o do padrão de referência USP, existe uma grande concordância, somente não havendo a sobreposição completa destes, pois as pastilhas de KBr foram preparadas com quantidades aproximadas.

Um dos ensaios de qualidade, baseado em medida física, é a determinação da faixa de fusão. Todas as amostras apresentaram faixa de fusão dentro dos limites da farmacopéia.

A espectrofotometria é um método fácil de usar, barato e robusto, oferecendo boa precisão para determinação quantitativa de fármacos em formulações farmacêuticas, se não houver interferência de excipientes, como por exemplo, conservantes e corantes, e também a presença de materiais suspensos que possam causar a dispersão da luz (WATSON,1999).

Como os hormônios sexuais possuem na sua estrutura molecular o anel benzênico cromóforo, esta característica pode ser aproveitada para sua determinação. O espectro do 17 β -estradiol tem absorvância máxima em dois comprimentos de onda, a saber, 225 e 280 nm (MERCK, 2001) e é muito solúvel em alguns solventes orgânicos como acetona, dioxano, etanol, metanol, tetraidrofurano, acetonitrila entre outros (SALOLE,1986, MERCK, 2001, MARTINDALE, 2002).

Foi experimentado um método espectrofotométrico no ultravioleta, para algumas formas farmacêuticas. Foram testados etanol absoluto, metanol, acetonitrila, acetona e tertaidrofurano como solventes para estudar o seu efeito sobre o comportamento espectral do estradiol.

Os resultados observados, nas figuras 5 e 6, demonstram que o perfil dos espectros de absorção não varia muito em relação aos solventes testados. Os álcoois têm bom poder solubilizante e boa transparência no comprimento de onda abaixo de 250 nm. O etanol foi escolhido por possuir menor “cut off” de comprimento de onda (207 nm) dos solventes testados (THOMAS, 1996). Além disso, o custo, facilidade de manuseio e aquisição, foi considerado para seleção do etanol absoluto para uso neste trabalho.

Embora o espectro de absorção do β -estradiol em solução etanólica não apresente simetria perfeita, há um perfil razoável para medidas espectrométricas, conforme pode ser visto na figura 7, fato que ocorre com inúmeros outros fármacos, em razão das complicadas estruturas químicas destas substâncias. A comprovação disto reside no fato de que o ponto de máxima absorção manteve - se por volta de 281 nm, no intervalo de concentração entre 30,0 e 90,0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 7).

Outra propriedade favorável da solução etanólica de estradiol foi sua grande estabilidade, o que está evidente nos dados da tabela 8. A solução ficou estável por 12 horas.

As características espectrofotométricas quantitativas, determinadas pela curva de Ringbom (Figura 9) e curva analítica (Figura 10), foram muito satisfatórias, e abriu boas perspectivas para padronização do método analítico para doseamento do estradiol em preparações farmacêuticas.

Este método foi satisfatoriamente aplicável aos comprimidos. Os resultados das tabelas 11 e 12 demonstram que o método é preciso, e se pode observar pelas figuras 11 a 13, onde ocorreu a sobreposição dos espectros com a das amostras e não houve interferência dos excipientes, quando o placebo foi comparado com o padrão, contra o etanol absoluto (figura 11).

Os bons resultados na análise de comprimidos de estradiol foram confirmados pelo teste de recuperação, como podem ser observados nas tabelas 13 e 14. Da mesma forma, o teste de linearidade apresentou resultados que reforçaram a eficiência do método (tabela 15 e figura 15).

Ao testar o método, para a forma farmacêutica gel, tanto comercial como simulada, os sinais produzidos não foram muito definidos. Na tentativa de solucionar este problema, aventou-se a possibilidade de lançar mão da espectrofotometria derivada, porém quando o placebo foi comparado com o padrão, contra etanol absoluto, houve sobreposição completa do espectro do padrão pelo placebo, devido à grande quantidade de conservantes parabenos presente no gel. Portanto, não há possibilidade da existência de um ponto onde não haja interferência do excipiente, e que possa determinar a substância ativa na presença do excipiente, impossibilitando o seu uso.

Outra forma farmacêutica testada foi o adesivo transdérmico. Como não foi possível obter o placebo do laboratório fabricante, o estudo do método ficou prejudicado. Não foi possível padronizá-lo da maneira usual. Entretanto, os dados obtidos nas tabelas 11 e 12 e figura 14, permitem admitir que o método pode ser aplicável nesta forma farmacêutica. Há pequena interferência na exatidão dos resultados, podendo perfeitamente ser atribuído a um excesso programado do estradiol na formulação, prática comum na indústria farmacêutica nos casos de produtos instáveis, ou de difícil dispersão, o que não seria exagero tratando-se de um produto para uso externo. O perfil dos espectros de absorção do padrão e de amostra fala a favor desta suposição. Outra possibilidade é a interferência dos constituintes do adesivo que se encontra em grande quantidade na formulação.

A clássica reação de Bratton e Marshall, datada de 1939, tem proporcionado a aplicação de inúmeros métodos para análise de uma infinidade de fármacos contendo amino grupo aromático. Originalmente, este método foi desenvolvido para análise de sulfanilamida, e empregou como

reagente colorimétrico o N-(1-naftil) etilenodiamina, selecionado entre vários agentes acoplantes.

Os sais de diazônio formados da diazotação dos fármacos contendo amino grupo aromático podem ser acoplados tanto como aminas aromáticas como com fenóis. Neste último caso as aplicações são em muito menor número, mas são bastante eficientes.

Portanto, normalmente, o fármaco em análise, tendo o amino grupo aromático, após diazotação é acoplado com amino ou fenol. No caso de 17 β -estradiol a sistemática foi modificada, pois, o fármaco passa a ser o agente acoplante, sem prejuízo para o desenvolvimento da reação.

Com base na observação prévia do sucesso desta reação foram estudadas as condições experimentais para padronização de um método para análise do 17 β -estradiol, uma vez que, na literatura são poucas as opções de metodologia para determinação quantitativa deste fármaco.

O método da Farmacopéia Americana para doseamento de comprimidos é a CLAE. Ainda não existem monografias oficiais para as formas farmacêuticas: adesivo transdérmico e gel.

Mesmo na Farmacopéia Americana, que preconiza o uso da CLAE, constatamos que para as formas farmacêuticas: suspensão injetável e "pellets", o método continua sendo o colorimétrico com reagente fenol - ferro.

O método oficial da AOAC Internacional também é um método colorimétrico, sendo uma técnica bastante trabalhosa, que utiliza reagente de ferro de Kober (fenol - ferro).

O método proposto utiliza etanol absoluto para extração da substância ativa, com a ajuda do ultra - som. A reação colorimétrica é realizada no filtrado alcoólico. Comparando o método proposto com as oficiais, há um menor consumo de tempo e reagente.

Para o desenvolvimento do método baseado na reação de diazotação e acoplamento, algumas aminas aromáticas primárias foram testadas para formação do sal de diazônio. Dentre as substâncias testadas, isto é, sulfanilamida, sulfadiazina, bromexina e metoclopramida, somente com as sulfas a reação foi positiva. A escolha da sulfanilamida deveu - se ao fato da

reação geralmente ocorrer rapidamente e sem complicações (WOODS e SCHNELLER, 1961) e também por ser solúvel em etanol (MERCK, 2001).

A proporcionalidade entre concentração e absorção do produto colorido, resultante de reação, logo ficou demonstrada com as primeiras experiências para observação do espectro de absorção, conforme pode ser observada na figura 16. O ponto de máxima absorção ficou bem definido em 480 nm, de acordo com os dados da tabela 17.

A estabilidade da solução do produto colorido foi outra característica muito favorável da reação. Os valores apresentados na tabela 18 mostram que as pequenas variações no período de duas horas permanecem dentro do intervalo aceitável de um experimento, não podendo ser atribuídas à decomposição do produto formado.

Quanto à influência da concentração dos reagentes de acordo com a tabela 19, parece que as proporções dos reagentes influem na formação do produto colorido. Mesmo assim, foi possível selecionar as concentrações mais favoráveis, que não diferem significativamente daquelas empregadas na maioria dos métodos com a reação de Bratton e Marshall. É também conhecido o fato de que o acoplamento com fenóis, em meio alcalino, resultaram em produto menos estável do que quando a reação é com aminas, em meio ácido. Mesmo assim, no caso do 17 β -estradiol, a estabilidade do produto colorido foi bastante satisfatória.

A formação do azo composto ocorreu da seguinte forma: a sulfanilamida, dissolvida em uma solução de ácido clorídrico 0,1M, tratada com nitrito de sódio, em banho de gelo, reagiu formando o íon diazônio. O íon diazônio atacou o anel aromático do 17 β -estradiol, que possui uma hidroxila no carbono 3, isto é, o grupo ativante, que é um potente liberador de elétron. O acoplamento é uma substituição aromática eletrofílica, ocorrendo usualmente na posição para do grupo ativante ou podendo ocorrer na posição orto (MORRISON, 1992). Através da espectrometria de ressonância magnética nuclear do azo composto formado, foi possível constatar que houve substituição de hidrogênio no anel aromático, porém não podendo precisar em qual das posições orto ocorreu a substituição.

Após a formação do azo composto, adicionou uma solução de carbonato de sódio para deter a reação. Os azo compostos são uma classe de compostos fortemente coloridos, que depende da estrutura da molécula e do pH. O azo composto, formado pelo acoplamento da sulfanilamida diazotada com 17 β -estradiol, possui uma coloração marron – avermelhada, que absorve em 480 nm.

Na parte quantitativa, a curva de Ringbom (figura 19) e curva analítica (figura 20), demonstram claramente que a reação conduziu a valores muito satisfatórios em relação à proporcionalidade entre concentração e absorvância, com coeficiente de correlação de 0,9996.

A grande dificuldade na análise do 17 β -estradiol, em medicamentos reside nas características particulares destes produtos, principalmente nas formas transdérmicas. De fato, formas farmacêuticas como gel, pomada, creme, adesivo, etc., traz em suas composições, uma série de adjuvantes farmacêuticos tais como emulsificantes, polímeros, conservantes etc., que costumam interferir nos processos analíticos por conta de suas propriedades físico-químicas. Na maioria das vezes as tentativas de separações dos princípios ativos fracassaram ou por turvação das soluções ou por ineficiência das extrações.

Além das dificuldades causadas pelos adjuvantes das formulações, os medicamentos, em que os princípios ativos estão com dose reduzida, as dificuldades analíticas são muito maiores. Este é o caso do 17 β -estradiol, em que não foi possível aplicar a espectrofotometria no ultravioleta, apesar das tentativas de se contornar o problemas das interferências. Acreditamos que outras tentativas poderão resultar em sucesso, por eliminação dos interferentes na extração, ou na separação dos mesmos.

Com o método colorimétrico, as interferências existem, mas dentro de intervalo aceitável de variação se considerarmos o tipo de produto em questão. A exatidão está sendo influenciada por algum componente de formulação que interfere na reação colorimétrica e que não foi possível detecta-lo. Tal possibilidade ainda não pode ser descartada, ou que em outras formulações poderá não existir a presença de tal componente. Ficará,

portanto, em cada caso, a necessidade de adaptação do método. De qualquer maneira, os dados das tabelas 22 e 23, abrem boas perspectivas para aplicação do método. Demonstram a favor disto os resultados dos testes de recuperação (tabelas 24 e 25) e de linearidade (tabela 26).

A aplicação do método colorimétrico para análise das formas farmacêuticas adesivo transdérmico e de comprimidos, forneceu resultados compatíveis com os critérios de avaliações adotadas nos laboratórios de controle de qualidade de medicamentos. Os dados das tabelas 22 e 23 demonstram que o método apresentou desempenho favorável. Os testes de recuperação, linearidade e os limites de detecção e de quantificação confirmam a padronização do método.

Dados experimentais raramente concordam completamente com os dados esperados, por isso, testes de significância são usados a fim de verificar se a diferença entre dois resultados é significativa ou pode se atribuída ao acaso (HADJIOANNOU, CHRISTIAN, EFSTATHIOU *et al.*, 1988, MILLER, MILLER, 1993).

Como se pode verificar pelas tabelas 28 e 29, os valores de F e t, para comprimidos não ultrapassaram o valor tabelado para um nível de confiança de 95%.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1- O método espectrofotométrico no ultravioleta pode ser aplicado na análise de medicamentos contendo 17β -estradiol, nas formas farmacêuticas, comprimido e adesivo transdérmico.

2- Na forma de adesivo transdérmico o método espectrofotométrico no ultravioleta apresentou precisão em torno de 2% e a exatidão foi por volta de 110%, mas há evidências de que isto se deve ou ao excesso programado na formulação do medicamento comercial ou interferência do excipiente.

3- Não foi possível aplicar o método espectrofotométrico no ultravioleta na análise do estradiol, na forma farmacêutica em gel, porque os componentes da formulação interferem drasticamente nas características espectrofotométricas do fármaco.

4- A reação de Bratton e Marshall, usando a sulfanilamida diazotada como reagente, produziu com o 17β -estradiol um azo composto com características espectrofotométricas favoráveis para análise quantitativa de fármaco.

5- O azo composto formado possui uma coloração marrom - avermelhada, que é estável pelo menos por duas horas, à temperatura ambiente.

6- O espectro de absorção do azo composto apresenta um pico máximo em 480 nm e existe adequada proporcionalidade com a concentração.

7- A linearidade da reação foi observada no intervalo de 10,0 a 28,0 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente de correlação (r) de 0,9996.

8- O método espectrofotométrico com base na reação de Bratton e Marshall foi aplicado com sucesso na análise de 17β -estradiol nas formas farmacêuticas: comprimidos, gel e adesivo transdérmico.

9- O método colorimétrico proposto é relativamente simples, preciso, exato e econômico, e aplicável a qualquer laboratório de controle de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. Use of solid-phase extration in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.938, p.145-153, 2001.

ALDA, M.J.L.; GIL, A.; PAZ, E.; BARCELÓ, D. Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Analyst**, Letchworth, v.127, p.1299-1304, 2002.

ARAYA, V.; CONTRERAS, P.; AGUIRRE, C.; FORADORI, A. Efecto de un preparado en forma de gel de 17 β -estradiol sobre deferentes parámetros hormonales en mujeres menopáusicas. **Rev. Med. Chile**, Santiago, v.123, p.1.116-1.121, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 11.ed. Washington: AOAC, 1970. p.662-664.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Drugs. In: _____. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17.ed. Gathersbury: AOAC International, 2000. part.IV.

AUSTIN, P.; MAMDANI, M.M.; TU, K.; JAAKKIMAINEN, L. Prescriptions for estrogen replacement therapy in Ontario before and after publication of the Women's Health Iniciative Study. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.289, n.24, p.3241-3242, 2003.

BALFOUR, J.A.; HEEL, R.C. Transdermal Estradiol: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic

efficacy in the treatment of menopausal complaints. **Drugs**, Auckland, v.40, n.4, p.561-582, 1990.

BAKER, V.L. Alternatives to oral estrogen replacement: transdermal patches, percutaneous gels, vaginal creams and rings, implants, and other methods of delivery. **Obstet Gynecol Clin of North Am**, Philadelphia, v.21, n.2, p.271-297, 1994.

BANKS, E.; BERAL, V.; BULL, D.; REEVES, G.; AUSTOKER, J.; ENGLISH, R.; PATNICK, J.; PETO, R.; VESSEY, M.; WALLIS, M.; ABBOTT, S.; BAILEY, E.; BAKER, K.; BALKWILL, A.; BARNES, I.; BLACK, J.; BROWN, A.; CAMERON, B.; CANFELL, K.; CLIFF, A.; CROSSLEY, B.; COUTO, E.; DAVIES, S.; EWART, D.; EWART, S.; FORD, D.; GERRARD, L.; GOODILL, A.; GREEN, J.; GRAY, W.; HILTON, E.; HOGG, A.; HOOLEY, J.; HURST, A.; KAN, S.W.; KEENE, C.; LANGSTON, N.; RODDAM, A.; SAUNDERS, P.; SHERMAN, E.; SIMMONDS, M.; SPENCER, E.; STRANGE, H.; TIMADJER, A.; MILLION WOMEN STUDY COLLABORATORS. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. **Lancet**, London, v.362, n.9382, p.419-427, 2003.

BASSAN, R. Menopausa e o coração. Efeitos da reposição hormonal. Visão do cardiologista. **Femina**, Rio de Janeiro, v.27, n.1, p.57-62, 1999.

BECKETT, A.H.; STENLAKE, J.B. **Practical pharmaceutical chemistry**. 4.ed. London: The Athlone Press, 1988. part.2, p.278-325.

BEERS, M.H.; BERKOW, R. **The Merck manual of diagnosis and therapy**. 17.ed. Whitehouse Station: Merck Research Laboratories, 1999. p.1942-1944.

BENNINK, H.J.T.C. Are all estrogens the same? **Maturitas**, Amsterdam, v.47, p.269-275, 2004.

BINDER, E.F.; WILLIAMS, D.B.; SCHECHTMAN, K.B.; JEFFE, D.B.; KOHRT, W.M. Effects of hormone replacement therapy on serum lipids in elderly women. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.134, n.9, p.754-760, 2001.

BLACK, D.M.; GREENSPAN, S.L.; ENSRUD, K.E.; PALERMO, L.; McGOWAN, J.A.; LANG, T.F.; GARNERO, P.; BOUXSEIN, M.L.; BILEZIKIAN, J.P.; ROSEN, C.J. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.349, n.13, p.1207-1215, 2003.

BODY, J.J.; GAICH, G.A.; SCHEELE, W.H.; KULKARNI, P.M.; MILLER, P.D.; PERETZ, A.; DORE, R.K.; ROTTER, R.L.; PAPAIOANNOU, A.; CUMMING, D.C.; HOSDMAN, A.B. A randomized double –blind trial to compare the efficacy of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1-34)] with alendronate in postmenopausal women with osteoporosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v.87, n.10, p.4528-4535, 2002.

BOER, T.; OTJENS, D.; MUNTENDAM, A.; MEULMAN, E.; OOSTIJEN, M.; ENSING, K. Development and validation of fluorescent receptor assays based on the human recombinant estrogen receptor subtypes α and β . **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.34, p.671-679, 2004.

BOWRON, M.; LODGE, B.A. A procedure for estimation of oestradiol, prednisone and testosterone in propylene glycol. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.22, n.7, p.537, 1970. [Letter].

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. População. Tábua de vida. 2001. Metodologia - Texto da Evolução da Mortalidade. **Evolução da mortalidade - 2001 - Brasil**. Disponível em: http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/tabuadevida/evolucao_da_mortalidade_2001.shtm. Acesso em: 24 nov. 03.

BRATTON, A.C., MARSHALL, E.K. A new coupling component for sulfanilamide determination. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.128, p.537-550, 1939.

BRITISH Pharmacopoeia 1993: addendum 1994. London: Her Majesty's Stationery Office, 1994. p.1354-1355.

BRITISH Pharmacopoeia 1999. London: Stationery Office, 1999. v.1, p.585-586.

BRITISH Pharmacopoeia 2002. London: Stationery Office, 2002. v.1, p.692.

BRITAIN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. **Pharm. Technol., Ed. Bras.**, São Paulo, v.2, n.3, p.4-9, 1998.

BUKATA, S.V.; HEALEY, J.H. Osteoporosis treatment : the winds of change. **Curr. Opin. Orthop.**, Philadelphia, v.14, n.6, p.438-439, 2003.

CAMARGOS, A.F; LAMAITA, R.M; LEMOS, C.N.D. Esteróides sexuais. In: MARINHO, R. **Climatério**. 2.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. p.23-31.

CAREY, F.A. **Organic chemistry**. 5.ed. Boston, New York: McGrawHill, 2003. p.946-952.

CARLSON, M.C.; ZANDI, P.P.; PLASSMAN, B.L.; TSCHANZ, J.T.; WELSH-BOHMER, K.A.; STEFFENS, D.D.; BASTIAN, L.A.; MEHTA, K.M.; BREITNER, J.C.S. Hormone replacement therapy and reduced cognitive decline in older women: the Cache County Study. **Neurology**, Hagerstown, v.57, p.2210-2216, 2001.

CHEN, C.L.; WEISS, N.S.; NEWCOMB, P.; BARLOW, W.; WHITE, E. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.287, n.6, p.734-741, 2002.

CHLEBOWSKI, R.T.; HENDRIX, S.L.; LANGER, R.D.; STEFANICK, M.L.; GASS, M.; LANE, D.; RODABOUGH, R.J.; GILLIGAN, M.A.; CYR, M.G.; THOMSON, C.A.; KHANDEKAR, J.; PETROVITCH, H.; MCTIERNAN, A.; WHI INVESTIGATORS. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative randomized trial. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.289, n.24, p.3243-3253, 2003.

CHOI, M.H.; KIM, K.R.; CHUNG, B.C. Determination of estrone and 17 β -estradiol in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. **Analyst**, Letchworth, v.125, p.711-714, 2000.

CIVITELLI, R.; PILGRAM, T.K.; DOTSON, M.; MUCKERMAN, J.; LEWANDOWSKI, N.; VILLAREAL, R.A.; CROTHERS, N.Y.; KARDARIS, E.E.; HAUSER, J.; COHEN, S.; HILDEBOLT, C.F. Alveolar and postcranial bone density in postmenopausal women receiving hormone/estrogen replacement therapy. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.162, p.1409-1415, 2002.

COILLE, I.; REDER, S.; BUCHER, S.; GAUGLITZ, G. Comparison of two fluorescence immunoassay methods for the detection of endocrine

disrupting chemicals in water. **Biomol. Eng.**, Amsterdam, v.18, n.6, p.273-280, 2002.

CONNORS, K.A. **A textbook of pharmaceutical analysis**. 2.ed. New York: John Wiley, 1975. p.216-218.

DEF 2003/04: dicionário de especialidades farmacêuticas. 32.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2003. 1294p.

DOBROWOLSKI, J.C.; SONOWSKA, N.S.; TYCHMANOWICZ, M. Family of the estradiol chiral stereoisomers: can they all exist? **J. Mol. Struct.**, Amsterdam, v.618, p.109-116, 2002.

DORGAN, J.F.; FEARS, T.R.; McMAHON, R.P.; FRIEDMAN, L.A.; PATTERSON, B.H.; GRENHUT, S.F. Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. **Steroids**, New York, v.67, n.3-4, p.151-158, 2002.

DRAISCI, R.; VOLPE, G.; COMPAGNONE, D.; PURIFICATO, L.; QUADRI, F.; PALLESCHI, G. Development of an electrochemical ELISA for the screening of 17 β -estradiol and application to bovine serum. **Analyst**, Letchworth, v.125, p.1419-1423, 2000.

EDMAN, K.; SVENSSON, L.; ERIKSSON, B.; GUNNARSSON, P.O. Determination of estramustine phosphate and its metabolites estromustine, estramustine, estrone and estradiol in human plasma by liquid chromatography with fluorescence detection and gas chromatography with nitrogen-phosphorus and mass spectrometric detection. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.738, n.2, p.267-279, 2000.

ELLIOT, C.T.; FRANCIS, R.S.; SHORTT, H.D.; McCAUGHEY, W.J.
Determination of the concentrations of the steroids estradiol, progesterone and testosterone in bovine sera: comparison of commercial dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay kits with conventional radio and enzyme immunoassays. **Analyst**, Letchworth, v.120, p.1827-1830, 1995.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 1997.
p.816-817. (European treaty series, n.50).

FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977.
p.140-142, 208-210, 408-410.

FERREIRA, J.A.S; NAVARRETE, M.S. Análise da eficácia no alívio dos sintomas climatéricos e da aceitabilidade de um gel contendo 1mg de 17- β estradiol (Sandrena gel) em mulheres climatéricas. **Reprod. Clim.**, Ribeirão Preto, v.16, n.4, p.265-271, 2001.

FERRIANI, R.A. Alterações hormonais no climatério: repercussões ao curto prazo. In: MARINHO, R. **Climatério**. 2.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000.
p.13-22.

GANN, P.; MORROW, M. Combined hormone therapy and breast cancer: a single-edged sword. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.289, n.24, p.3304-3306, 2003.

GODSLAND, I.F. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein (a) concentrations: analysis of studies published from 1974-2000. **Fertil. Steril.**, Birmingham, v.75, n.5, p.898-915, 2001.

GRADY, D.; HERRINGTON, D.; BITTNER, V.; BLUMENTHAL, R.; DAVIDSON, M.; HLATKY, M.; HSIA, J.; HULLEY, S.; HERD, A.; KHAN, S.; NEWBY, L.K.; WATERS, D.; VITTINGHOFF, E.; WENGER, N. Cardiovascular disease outcomes during 6,8 years of hormone therapy (HERS II). **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.288, n.1, p.49-57, 2002.

GREENDALE, G.A.; WELLS, B.; MARCUS, R.; CONNOR, E.B. How many women lose bone mineral density while taking hormone replacement therapy? **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.160, p.3065-3071, 2000.

GREENSPAN, S.L.; RESNICK, N.M.; PARKER, R.A. Combination therapy with hormone replacement and alendronate for prevention of bone loss in elderly woman. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.289, n.19 p.2525-2533, 2003.

GRIS, L. Estrógeno e SERMs na prevenção e tratamento da osteoporose. In: BANDEIRA, F.; MACEDO, G.; CALDAS, G.; GRIZ, L.; FARIA, M. **Osteoporose**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. p.337-350.

GRODSTEIN, F.; MANSON, J.E.; STAMPFER, M.J. Postmenopausal hormone use and secondary prevention of coronary events in the Nurses' Health Study. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.135, n.1, p.1-8, 2001.

GRUPO MULTICÊNTRICO. Estudo multicêntrico sobre a eficácia e a tolerabilidade do 17- β estradiol na forma de gel associado ao acetato de nomegestrel em mulheres na pós-menopausa. **Reprod. Clim.**, Ribeirão Preto, v.16, n.2, p.129-133, 2001.

HADJIIOANNOU, T.P.; CRHISTIAN, G.D.; EFSTATHIOU, C.E.; NIKOLELIS, D.P. **Problem solving in analytical chemistry**. Oxford: Pergamon Press, 1988, p.1-33.

HAYS, J.; OCKENE, J.K.; BRUNNER, R.L.; KOTCHEN, J.M.; MANSON, J.E.; PATTERSON, R.E.; ARAGAKI, A.K.; SHUMAKER, S.A., BRZYSKI, R.G.; LACROIS, A.Z.; GRANEK, I.A., VALANIS, B.G. Effects of estrogen plus progestin on health-related quality of life. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.348, n.19, p.1839-1854, 2003.

HERRINGTON, D.M.; REBOUSSIN, D.M.; BROSNIHAN, K.B.; SHARP, P.C.; SHUMAKER, S.A.; SNYDER, T.E.; FURBERG, C.D.; KOWALCHUK, G.J.; STUCKEY, T.D.; ROGERS, W.J.; GIVENS, D.H.; WATERS, D. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.343, n.8, p.522-529, 2000.

HLATKY, M.; BOOTHROYD, D.; VITTINGHOFF, E.; SHARP, P.; WHOOLEY, M.A. Quality-of-life and depressive symptoms in postmenopausal women after receiving hormone therapy. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.287, n.5, p.591-597, 2002.

HONDA, A.M. Determinação espectrofotométrica da cisaprida em medicamento. São Paulo, 1996. 113p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo.

HU, F.B.; STAMPFER, J.; MANSOSN, J.E.; GRODSTEIN, F.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C. Trends in incidence of coronary heart disease and changes in diet and lifestyle in women. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.343, p.530-537, 2000.

HUMPHREY, L.L.; CHAN, B.S.; SOX, H.C. Postmenopausal hormone replacement therapy and primary prevention of cardiovascular disease. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.137, p.273-284, 2002.

HUPPERT, L.C. Hormonal replacement therapy: benefits, risks and doses. **Med. Clin. North Am.**, Orlando, v.71, n.1, p.23-39, 1987.

HURD, W.N. Menopausa. In: BEREK, J.S.; ADASHI, E.Y.; HILLARD, P.A., eds. **NOVAK tratado de ginecologia**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.696-716.

ICH- Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Q2B. 1996 p.1-8. Disponível em: <http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@ID=418@MODE=GLB>. Acesso em: 05 jan. 2004.

JARVINEN, A.; GRANANDER, M.; LAINE, T.; VIITANEN, A. Effect of dose on the absorption of estradiol from a transdermal gel. **Maturitas**, Amsterdam, v.35, n.1, p.51-56, 2000.

JEANNOT, R.; SABIK, K.; SAUVARD, E.; DAGNAC, T.; DOHRENDORF, K. Determination of endocrine disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.974, p.143-159, 2002.

KATONA, Z.; VINCZE, L.; VÉGH, Z.; TROMPLER, A.; FERENCZI-FODOR, K. Cleaning validation procedure eased by using overpressured layer chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.22, n.2, p.349-353, 2000.

KORNAFEL, K.L.; MARCH, C.M. Estradiol gel in the treatment of menopausal symptoms: a placebo-controlled double-blind case study of efficacy and safety. **South. Med. J.**, Birmingham, v.85, n.3, p.270-273, 1992.

- KOTIYAN, P.N.; VAVIA, P.R. Stability indicating HPTLC method for the estimation of estradiol. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.22, p.667-671, 2000.
- KUMMER, M.; WERNER, G. Chiral resolution of enantiomeric steroids by high-performance liquid chromatography on amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) under reversed-phase conditions. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.825, p.107-114, 1998.
- LACEY, J.V.; MINK, P.J.; LUBIN, J.H.; SHERMAN, M.E.; TROISI, R.; HARTGE, P.; SCHATZKIN, A.; SCHAIRER, C. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.288, n.3, p.334-341, 2002.
- LAGRO-JANSSEN, T.; ROSSER, W.W.; VANWEEL, C. Breast cancer and hormone-replacement therapy: up to general practice to pick up the pieces. **Lancet**, London, v.362, p.414-415, 2003.
- LAMPARCZYK, H.; ZARZYCKI, P.K. Effect of temperature on separation of estradiol stereoisomers and equilin by liquid chromatography using mobile phases modified with β -cyclodextrin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.13, n.4/5, p.543-549, 1995.
- LEDNICER, D. **Strategies for organic drug synthesis and design**. New York: John Wiley, 1998. p.84-92.
- LEVINE, A.J.; HEWETT, L. Estrogen replacement therapy and frontotemporal dementia. **Maturitas**, Amsterdam, v.45, n.2, p.83-88, 2003.
- LI, C.I.; MALONE, K.E.; PORTER, P.L.; WEISS, N.S.; TANG, M.T.C.; CUSHING-HAUGEN, K.L.; DALING, J.R. Relationship between long

- durations and different regimens of hormone therapy and risk of breast cancer. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.289, n.24, p.3254-3263, 2003.
- LI, J.; SHAH, D.S. Prediction of internal standards in reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.954, n.1/2, p.159-171, 2002.
- LI, J. Elimination of polymer interference in chromatographic analysis of estradiol degradation products in transdermal drug delivery formulation by proper selection of extraction solvents. **J. Pharm.Sci**, v.91, n.8, p.1873-1879, 2002.
- LIMOUSIN-LAMOTHE, M.A.; MAIRON, N.; JOICE, C.R.B.; LeGAL, M. Quality of life after the menopause: influence of hormonal replacement therapy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.170, n.2, p.618-624, 1994.
- LINSLEY, R.; GALLAGHER, J.C.; KLEEREKOPER, M.; PICKAR, J.H. Effect of lower doses of conjugated equine estrogens with and without medroxyprogesterone acetate on bone in early postmenopausal women. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.287, n.20, p.2668-2676, 2002.
- LISBOA, K.O; WANMACHER, L. Reposição hormonal na menopausa: benefícios e riscos. **Reprod. Clim.**, Ribeirão Preto, v.16, n.1, p.11-19, 2001.
- LOOSE-MITCHELL, D.S.; STANCEL, G.M. Estrogen and progestin. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap.58, p.1597-1634.

MACHADO, L.V. Repercussões sobre o aparelho cardiovascular. In: MARINHO, R. **Climatério**. 2.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. p.61-67.

MAGALHÃES (a), J.F; PIROS, M.G. Doseamento espectrofotométrico de 1,4-benzodiazepina. **Rev. Brás. Farm.**, Rio de Janeiro, v.51, n.4, p.195-203, 1970.

MAGALHÃES (b), J.F; PIROS, M.G. Contribuição à análise espectrofotométrica de diuréticos benzodiatiazínicos. **Rev. Brás. Bioq. Uni. São Paulo**, v.8, n.2, p.273-280, 1970.

MANSON, J.E.; GREENLAND, P.; LACROIX, A.Z.; STEFANICK, M.L.; MOUTON, C.P.; OBERMAN, A.; PERRI, M.G.; SHEPS, D.S.; PETTINGER, M.B.; SISCOVICK, D.S. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.347, n.10, p.716-725, 2002.

MARINHO, R. Terapia de reposição hormonal: como fazer. In: _____. **Climatério**. 2.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. p.281-297.

MARSHALL, K.; SENIOR, J.; CLAYTON, J. Menopause and hormone replacement therapy. In: WALKER, R.; EDWARDS, C., eds. **Clinical pharmacy and therapeutics**. 2.ed. Edinburgh, New York: Churchill Livingstone, 1999. p.669-679.

MARTINDALE: the complete drug reference. 33.ed. London: Pharmaceutical Press, 2002. p.1452, 1460-1465, 1473.

MASSAD, A.M. Terapia de reposição hormonal: onde estamos? Para onde vamos? **Femina**, Rio de Janeiro, v.28, n.6, p.299-310, 2000.

MATHERS, W.D.; STOVALL, D.; LANE, J.A.; ZIMMERMAN, M.B.; JOHNSON, S. Menopause and tear function: the influence of prolactin and sex hormones on human tear production. **Cornea**, Hagerstown, v.17, n.4, p.353-358, 1998.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13.ed. Whitehouse Station: Merck Research, 2001. p.659-660.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Estadística para química analítica**. 2.ed. Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana, 1993. p.40-66.

MOFFAT, A.C.; JACKSON, J.V.; MOSS, M.S.; WIDDOP, B.; GREENFIELD, E.S.; CLARKE, E.G.C., eds. **Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals**. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.830-831.

MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. **Organic Chemistry**. 6 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1992, cap. 23, p. 845-883.

MOSCA, L.; COLLINS, P.; HERRINGTON, D.; MENDELSON, M.E.; PASTERNAK, R.C.; ROBERTSON, R.M.; SCHENCK-GUSTAFSSON, K.; SMITH, S.C.; TAUBERT, K.A.; WENGER, N.K. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. **Circulation**, Baltimore, v.104, n.4, p.499-503, 2001.

NAHÁS NETO, J.; DELUCA, L.A.; NAHÁS, E.A.P.; TRAIMAN, P.; UEMURA, G.; PONTES, A.; Avaliação da densidade mamográfica em mulheres na menopausa, sob terapia de reposição hormonal convencional e tibolona. **Rev. Bras. Mastol.**, Rio de Janeiro, v.11, p.21-29, 2001.

NEER, R.M.; ARNAUD, C.D.; ZANCHETTA, J.R.; PRINCE, R.; GAICH, G.A.; REGINSTER, J.Y.; HODSMAN, A.B.; ERIKSEN, E.F.; ISH-SHALOM, S.; GENANT, H.K.; WANG, °; MITLAK, B.H. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **N. Engl. J. Med**, Waltham, v.344, n.19, p.1434-1441, 2001.

NELSON (a), H.D. Commonly used types of postmenopausal estrogen for treatment of hot flushes. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.291, n.13, p.1610-1620, 2004.

NELSON (b), H.D. Postmenopausal estrogen for treatment of hot flushes. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.291, n.13, p.1621-1625, 2004.

O'CONNELL, M.B. Pharmacokinetic and pharmacologic variation between different estrogen products. **J. Clin. Pharmacol.**, Thousand Oaks, v.35, p.18S-24S, 1995.

OLIVEIRA, S.A. Osteoporose: uma visão atual. **Femina**, Rio de Janeiro, v.28, n.8, p.407-418, 2000.

OPPOLZER, W.; ROBERTS, D.A. The enantioselective synthesis of (+)-estradiol from 1,3-dihydro-benzo [c] thiophene -2,2-dioxide by successive thermal SO₂-extrusion and cycloaddition reactions. **Helv. Chim. Acta**, Weinheim, v.63, n.6, p.1703-1705, 1980.

OSÓRIO-WENDER, M.C.; VITOLA, D.; SPRITZER, P.M. Percutaneous 17 β -estradiol replacement therapy in hypertensive postmenopausal women. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.30, n.9, p.1047-1053, 1997.

- PETRACCO, A.; BADALOTTI, M.; GOMES, D.F. Repercussões sobre o sistema ósseo. In: MARINHO, R. **Climatério**. 2.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. p.47-56.
- PRESWOOD, K.M.; KENNY, A.M.; KLEPPINGER, A.; KULDORFF, M. Ultralow-dose micronized 17 β -estradiol and bone density and bone metabolism in older women. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.290, n.8, p.1042-1048, 2003.
- PUGH, M.C.; MULLINS, P.M. Hormone replacement therapy. In: DIPIRO, J.T.; TALBERT, R.L.; YEE, G.C.; MATZKE, G.R.; NELLIS, B.G.; POSEY, L.M., eds. **Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach**. 5.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1999. p.1355-1365.
- RACHKOV, A.; McNIVEN, S.; EL SKAYA, A.; YANO, K.; KARUBE, I. Fluorescence detection of β -estradiol using a molecularly imprinted polymer. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.405, p.23-28, 2000.
- RAPP, S.R.; ESPELAND, M.A.; SHUMAKER, S.A.; HENDERSON, V.W.; BRUNNER, R.L.; MANSON, J.E.; GASS, M.L.S.; STEFANICK, M.L.; LANE, D.S.; HAYS, J.; JOHNSON, K.C.; COKER, L.H.; DAYLEY, M.; BOWEN, D.; WHIMS INVESTIGATORS. Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study, a randomized controlled trial. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.289, n.20, p.2663-2672, 2003.
- RODRIGUEZ, C.; PATEL, A.V.; CALLE, E.E.; JACOB, E.J.; THUN, M.J. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.285, n.11, p.1460-1465, 2001.

- ROHR, U.D. The impact of testosterone imbalance on depression and women's health. **Maturitas**, Amsterdam, v.41, suppl.1, p.525-546, 2002.
- ROSA, D.P. Repercussões emocionais do climatério em mulheres cardiopatas. **Rev. Soc. Cardiol. Estado São Paulo**, São Paulo, v.12, n.3, supl.A, p.11-16, 2002.
- SALCI, B.; BIRYOL, I. Voltametric investigation of β -estradiol. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.28, n.3/4, p.753-759, 2002.
- SALOLE, E.G. Estradiol. **Anal. Profiles Drug Subst.**, New York, v.15, p.283-318, 1986.
- SCARABIN, P.Y.; OGER, E.; PLU-BUREAU, G. Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk. **Lancet**, London, v.362, p.428-432, 2003.
- SCHAUMBERG, D.; BURING, J.E.; SULLIVAN, D.A.; DANA, M.R. Hormone replacement therapy and drug eye syndrome. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.286, n.17, p.2114-2119, 2001.
- SCUTERI, A.; BOS, A.J.G.; BRANT, L.J.; TALBOT, L.; LAKATTA, E.G.; FLEG, J.L. Hormone replacement therapy and longitudinal changes in blood pressure in postmenopausal women. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.135, n.4, p.229-238, 2001.
- SEIFERT, M.; HAINDL, S.; HOCK, B. Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.386, p.191-199, 1999.
- SHAYWITZ, S.E.; SHAYWITZ, B.A.; PUGH, K.R.; FULBRIGHT, R.K.; SKUDLARSKI, P.; MENCL, W.E.; CONSTABLE, R.T.; NAFTOLIN, F.;

PALTER, S.F.; MARCHIONE, K.E.; KATZ, L.; SHANKWEILER, D.P.; FLETCHER, J.M.; LACADIE, C.; KELTZ, M.; GORE, J.C. Effect of estrogen on brain activation patterns in postmenopausal women during working memory tasks. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.281, n.13, p.1197-1202, 1999.

SHUMAKER, S.A.; LEGAULT, C.; RAPP, S.R.; THAL, L.; WALLACE, R.B.; OCKENE, J.K.; HENDRIX, S.L.; JONES, B.N.; ASSAF, A.R.; JACKSON, R.D.; KOTCHEN, J.M.; WASSERTHEIL-SMOLLER, S.; WACTAWSKI-WENDE, J.; WHIMS INVESTIGATORS. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in posmenopausal women: the Women's Health Iniciative Memory Study, a randomized controlled trial. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.289, n.20, p.2651-2662, 2003.

SNYDER, P.J. Androgens. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.1635-1648.

SOARES, C.N.; ALMEIDA, O.; JOFFE, H.; COHEN, L. Efficacy of estradiol for the treatment of depressive disorders in perimenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Arch. Gen. Psychiatry**, Chicago, v.58, n.6, p.529-534, 2001.

SOUZA, R.L.; FILIZOLA, R.G.; SOUZA, E.S.S.; MORAES, J.L.R. Efeito de hormônios sexuais femininos sobre sintomatologia depressiva no climatério. **Reprod. Clim.**, Ribeirão Preto, v.16, n.2, p.118-122, 2001.

STEPHENSON, J. FDA Orders estrogens safety warnings: Agency offers guidance for HRT use. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.289, n.5, p.537-538, 2003.

STROBL, J.S. Estrogênios, progestogênios e antiestrogênios. In: CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. **Farmacologia moderna**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.671-681.

STURDEE, D.W.; ULRICH, L.G.; BARKOW, D.H.; WELLS, M.; CAMPBELL, M.J.; VESSEY, M.P.; NIELSEN, B.; ANDERSON, M.C.; BRAGG, A.J. The endometrial response to seqüencial and continuous combined oestrogen-progestogen replacement therapy. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, Oxford, v.107, p.1392-1400, 2000.

SU, P.; WANG, Y.C.; ZHANG, X.X.; SUN, L.; CHANG, W.B. Thermally reversible hydrogel modified capillary eletrophoretic immunoassay of estradiol with laser induced fluorescence detection. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.418, n.2, p.137-143, 2000.

TICE, J.A.; ETTINGER, B.; ENSRUD, K.; WALLACE, R.; BLACKWELL, T.; CUMMINGS, S.R. Phytoestrogen supplements for the treatmant of hot flashes: the isoflavone clover extract (ICE) study. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.290, n.2, p.207-214, 2003.

THOMAS, M.J.K. **Ultraviolet and visible spectroscopy**. 2.ed. Chichester: John Wiley, 1996. p.67-75.

TORAL, M.I.; SORO, C.; RICHTER, P. Simultaneous determination of estradiol and medroxyprogesterone acetate in pharmaceutical formulations by second-derivative spectrometry. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.85, n.4, p.883-888, 2002.

UNITED States Pharmacopeia: USP14. Easton: Mack, 1950. p.227-228.

UNITED States Pharmacopeia: USP20: the National Formulary: NF15. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1980. p.293-295.

UNITED States Pharmacopeia: USP26. The National Formulary: NF21. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p.742-744, 2054, 2176-2177, 2439-2442.

VISCOLI, C.M.; BRASS, L.M.; KERNAN, W.N.; SARREL, P.M.; SUISSA, S.; HORWITZ, H.V. A clinical trial of estrogen replacement therapy after ischemic stroke. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.345, n.17, p.1243-1249, 2001.

WATERS, K.A.; BRAIN, K.R.; GREEN, D.M.; JAMES, V.J.; WATKINSON, A.C.; SANDS, R.H. Comparison of the transdermal delivery of estradiol from two gel formulations. **Maturitas**, Amsterdam, v.29, n.2, p.189-195, 1998.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical analysis**: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999. p.75-96.

WEHBA, S.; FERREIRA, J.A.S.; GRINBAUM, M.L.; YONEDA, V.R.; FERNANDES, C.E.; AZEVEDO, L.H. Efeitos clínicos e biológicos da administração do estrogênio percutâneo em mulheres menopausadas. **Reprod. Clim.**, Ribeirão Preto, v.12, n.4, p.194-196, 1997.

WEHBA, S.; MACHADO, R.B.; YONEDA, V.; FERNANDES, C.E.; FERREIRA, J.A.S. Eficácia, tolerabilidade e aceitabilidade do estradiol transdérmico matricial no tratamento dos sintomas decorrentes da menopausa. **Femina**, Rio de Janeiro, v.26, n.4, p.341-195, 1998.

WOMEN'S HEALTH INICIATIVE STEERING COMMITTEE: Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with

- hysterectomy – WHI randomized controlled trial. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.291, n.14, p.1701-1712, 2004.
- WOODS, J.T.; SCHNELLER, G.H. Sulfonamidas and sulfonas. In: HIGUCHI, T.; BROCHMANN-HANSEN, E.; BODIN, I.J. **Pharmaceutical analysis**. New York: Interscience Publishers, 1961. p.137-177.
- WORZALA, K.; HILLER, R.; SPERDUTO, R.; MUTALIK, K.; MURABITO, J.; MOSKOWITZ, M.; D'AGOSTINHO, R.; WILSON, P. Postmenopausal estrogen use, type of menopause, and lens opacities: The Framingham Studies. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.161, p.1448-1454, 2001.
- WRITING GROUP FOR THE PEPI TRIAL. Effects of hormone replacement therapy on endometrial histology in postmenopausal women. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.275, n.5, p.370-375, 1996.
- WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INICIATIVE INVESTIGATORS. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.288, p.321-333, 2002.
- XIAO, X.Y.; McCALLEY, D.V.; McEVORY, J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.923, p.195-204, 2001.
- YASUI, T.; YAMADA, M.; KINOSHITA, H.; UEMURA, H.; YONEDA, N.; IRAHARA, M.; AONO, T.; SUNAHARA, S.; MITO, Y.; KURIMOTO, F.; HATA, K. Combination of automatic HPLC-RIA method for determination of estrone and estradiol in serum. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.13, p.266-272, 1999.

ZAKHARI, N.A.; HASSAN, S.M.; EL-SHABRAWY, Y. Dazotized 4-nitroaniline as a chromogenic reagent for the determination of ondole derivatives in certain pharmaceutical preparations. **An. Lett.**, New York, v.22, n.15, p.3011-3024, 1989.