

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

UNIFAL-MG

LINDSAY PAIVA DE ARAÚJO

ESTUDO ANALÍTICO DA ASSOCIAÇÃO DE
LISINOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA CÁPSULAS
MAGISTRAIS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA

Alfenas/MG
2010

LINDSAY PAIVA DE ARAÚJO

**ESTUDO ANALÍTICO DA ASSOCIAÇÃO DE
LISINOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA CÁPSULAS
MAGISTRAIS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.
Orientadora: Prof^a Dr^a Magali Benjamim de Araújo.

Alfenas/MG
2010

LINDSAY PAIVA DE ARAÚJO

**ESTUDO ANALÍTICO DA ASSOCIAÇÃO DE
LISINOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA CÁPSULAS
MAGISTRAIS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Avaliação físico-química e microbiológica de fármacos e medicamentos.

Aprovada em:

Prof.
Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof.
Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof.
Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof^a: Magali Benjamim de Araújo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** _____

Dedico este trabalho a Deus e a todos que me incentivaram durante toda a minha vida acadêmica contribuindo com a minha formação profissional e aos meus pais Maria de Lourdes Araújo e Osvaldo Ordair de Araújo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor meu Deus, por minha vida e pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional que me foram dadas durante esses anos, pela força, coragem, fé e dedicação para vencer aos obstáculos encontrados durante esta caminhada me proporcionando a oportunidade de mais uma conquista.

Aos meus pais, essência da minha vida. Obrigada por acreditarem em mim, pelo encorajamento e apoio incansável durante a execução do meu trabalho e por terem me ensinado a lutar pelos meus objetivos.

Aos meus irmãos e a minha cunhada Lucélia, pelo carinho e a amizade.

Ao meu noivo Gustavo, pelo companheirismo e por cada palavra e gesto de carinho.

A todos familiares que estiveram presentes em algum momento nesta caminhada.

À professora Dr^a Magali Benjamim de Araújo, orientadora, pelo exemplo, confiança depositada e conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários e pesquisadores que integram o Centro de Equivalência Farmacêutica do Núcleo de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG) pelo auxílio e convívio durante a execução da parte experimental deste trabalho.

Às Farmácias Natural Fórmulas, Azuleno e Farmácia Escola pelas amostras de cápsulas de hidroclorotiazida e lisinopril cedidas.

À UNIFAL-MG pela bolsa institucional.

Aos amigos de mestrado, aos amigos conquistados recentemente, aos antigos amigos e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram e torceram pelo o meu sucesso.

Começar de novo... É um ciclo que se fecha, mas é apenas o início. A todos vocês minha eterna gratidão.

“Se não puderes ser um pinheiro no topo da colina,
sê um arbusto no vale, mas sê
o melhor arbusto à margem do regato.
Sê um ramo se não puderes ser uma árvore...
Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva,
e dá alegria a algum caminho.
Se não puderes ser estrada, sê vereda.
Se não puderes ser o sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor naquilo que fores...”

Douglas Malloch

RESUMO

Associações de fármacos têm tido eficácia no controle de várias doenças, dentre elas a hipertensão arterial. Fármacos como lisinopril e hidroclorotiazida, em baixas dosagens, para hipertensão moderada a grave, sem produzir efeitos colaterais pronunciados, tem sido recomendados. Devido à inexistência de monografia específica para análise de associação de fármacos, o objetivo do trabalho consiste em desenvolver metodologia analítica para avaliar o perfil de dissolução de cápsulas contendo estes ativos, face aos diferentes processos e excipientes utilizados na manipulação. Para a quantificação dos ativos, na forma farmacêutica cápsula, foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência e para o estudo de liberação *in vitro*, utilizou-se HCl 0,1 mol L⁻¹ (volume 900 mL) como meio de dissolução, aparato cesta, velocidade de 100 rpm e tempo de coleta de 60 minutos. A validação do método analítico e do ensaio de dissolução seguiu a RE nº 899 da ANVISA. O método analítico demonstrou linearidade nas concentrações de 11 a 21 µg/mL e 18 a 33 µg/mL, com $r > 0,99$ para hidroclorotiazida e lisinopril, respectivamente. Não houve interferência dos excipientes no estudo de seletividade. A precisão do método apresentou valor de DPR < 2 %, indicando precisão satisfatória. Para a exatidão do método, os valores de recuperação para as amostras A, B e C, respectivamente, variaram de 98 a 102 %. O método foi robusto ao se variar a temperatura do forno (50 ± 5 °C) e da vazão de fase móvel (0,4; 0,5 e 0,6 mL/min). A validação do ensaio *in vitro* mostrou linearidade nas faixas de concentração de 3 a 17 µg/mL e 4 a 26 µg/mL, com $r > 0,99$ para hidroclorotiazida e lisinopril, respectivamente. O ensaio foi seletivo, não havendo interferência dos excipientes e dos invólucros. O valor de DPR foi inferior a 5 %, indicando precisão satisfatória. Os valores médios de exatidão para as amostras A, B e C variaram de 95 a 105 %. Todas as cápsulas analisadas (A, B e C) foram aprovadas nos ensaios de qualidade. Este estudo forneceu subsídios para a elaboração de uma monografia farmacopéica visando o controle de qualidade dos fármacos em cápsulas manipuladas em farmácias magistrais, visto que não há método oficial descrito.

Palavras-chave: Hidroclorotiazida. Lisinopril. Cápsulas. Dissolução. Estudos de Validação.

ABSTRACT

Combinations of drugs have been effective in controlling hypertension pressure. Drugs such as hydrochlorothiazide and lisinopril, in low dosages, for moderate to severe hypertension, without effects pronounced side, has been recommended. Due to lack of monograph for specific analysis of drug combination, the objective work is to develop analytical methodology to assess the dissolution profile of tablets containing these assets and their quantify, given the different processes and ingredients used in manipulation. For the quantification of the assets in the pharmaceutical form capsule, liquid chromatography was used to high efficiency and the in vitro release study, we used 0.1 mol L⁻¹ HCl (volume 900 mL) as dissolution medium, basket apparatus, speed of 100 rpm and time collection of 60 minutes. The analytical method validation and testing of dissolution followed the RE N° 899 of ANVISA. The analytical method demonstrated linearity at concentrations from 11 to 21 µg mL⁻¹ and 18 to 33 µg mL⁻¹, with $r > 0.99$ for hydrochlorothiazide and lisinopril, respectively. There was no interference from excipients in the study of selectivity. The accuracy of method had a value of RSD < 2 %, indicating satisfactory precision. For the accuracy of the method, the recovery values for samples A, B and C, respectively, from 98 to 102 %. The method was robust to varying the oven temperature (50 ± 5 ° C) and the flow of mobile phase (0.4, 0.5 and 0.6 mL/min). Validation of the in vitro showed linearity in the concentration ranges from 3 to 17 µg mL⁻¹ and 4 to 26 µg mL⁻¹, $r > 0.99$ for hydrochlorothiazide and lisinopril, respectively. The assay was selective, with no interference from excipients and wrappers. The assay precision showed RSD value of less than 5 % indicating satisfactory precision. The average values of accuracy for samples A, B and C ranged from 95 to 105 %. All the capsules analyzed (A, B and C) were adopted in testing of quality. This study provided support for the preparation of a pharmacopoeial monograph order to control quality of the drugs in capsules manipulated in pharmacies, as there is no official method described.

Keywords: Hydrochlorothiazide. Lisinopril. Capsules. Dissolution. Validation Estudios.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da hidroclorotiazida.....	17
Figura 2	Estrutura química do lisinopril	19
Figura 3	Processos relacionados à liberação do fármaco da forma farmacêutica sólida.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT1	-	Angiotensina I
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
ECA	-	Enzima conversora de angiotensina
EHL	-	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
HCl	-	Ácido clorídrico
HCTZ	-	Hidroclorotiazida
HPLC	-	High-performance liquid chromatography
IECA	-	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
K _{dd}	-	Taxa de desintegração da fórmula
K _{di}	-	Taxa de dissolução intrínseca do fármaco
LIS	-	Lisinopril
PA	-	Pressão arterial
PTFE	-	Politetrafluoretileno
Q	-	Quantidade dissolvida/liberada
r	-	Coefficiente de correlação
rpm	-	Rotações por minuto
RSD	-	Relative standard deviation
RP-HPLC	-	Reverse-phase high-performance liquid chromatography
SCB	-	Sistema de classificação biofarmacêutica
TGI	-	Trato gastrointestinal
UV	-	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	11
1.2	TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	12
1.2.1	Associações medicamentosas	14
1.3	HIDROCLOROTIAZIDA.....	15
1.3.1	Propriedades farmacológicas e indicações	15
1.3.2	Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas	16
1.4	LISINOPRIL	17
1.4.1	Propriedades farmacológicas e indicações	17
1.4.2	Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas	19
1.5	ANÁLISE QUANTITATIVA E CONTROLE DE QUALIDADE	20
1.6	DISSOLUÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA.....	20
1.6.1	Características do ensaio de dissolução	23
1.6.2	Sistema de classificação biofarmacêutica (SCB)	23
1.6.3	Fatores que interferem na dissolução relacionados ao fármaco e à formulação	25
1.6.3.1	Solubilidade, tamanho de partícula e higroscopicidade	25
1.6.3.2	Natureza química e comportamento estereoquímico de moléculas	26
1.6.3.3	Forma farmacêutica, excipientes e tecnologia de fabricação	27
1.6.4	Fatores que interferem na dissolução relacionados com o equipamento	28
1.6.4.1	Aparato utilizado, geometria e vibração do sistema	28
1.6.4.2	Velocidade de agitação e posição da haste	29
1.6.4.3	Posição e método de amostragem	29
1.6.4.4	Dispositivo para formas farmacêuticas que flutuam	29
1.6.5	Fatores que interferem na dissolução relacionados ao meio de dissolução	30
1.6.5.1	Volume, presença de ar/gases e bolhas de ar	30
1.6.5.2	Efeito do pH, evaporação, temperatura e viscosidade do meio	31
1.6.5.3	Força iônica/pressão osmótica e uso de tensoativos	32
1.6.6	Fatores que interferem na dissolução relacionados ao meio ambiente	32
1.6.7	Fatores que interferem na dissolução relacionados ao método analítico	33
1.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	33

2	OBJETIVOS	36
3	RESULTADOS	37
3.1	ARTIGO I	38
3.2	ARTIGO II	56
4	CONCLUSÃO GERAL	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	APÊNDICE A	89

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial é um mal que acomete a humanidade e pode ter várias definições, dependendo de cada caso. É uma doença crônica que apresenta elevado custo médico-social, pois é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Integra a quinta causa de internação hospitalar, possuindo uma alta prevalência em idosos (AZEVEDO; PEREIRA; ARAÚJO, 2007; KOROLKOVAS, 2007; PEIXOTO et al., 2005).

Trata-se de um distúrbio comum e geralmente progressivo o qual, se não for tratado eficazmente, aumenta consideravelmente a probabilidade de trombose coronariana, acidentes vasculares cerebrais e insuficiência renal (ARAÚJO; BRITTO; CRUZ, 2000). A longo prazo, pode causar danos em órgãos alvo que comprometem a saúde ou a expectativa de vida do paciente (BRASIL, 2001).

A hipertensão arterial é definida como a pressão sangüínea diastólica permanentemente aumentada acima de 90 mmHg e acompanhada por elevação na pressão sangüínea sistólica (> 140 mmHg). A hipertensão é resultado do tono da musculatura lisa dos vasos periféricos, o que leva ao aumento da resistência arteriolar e redução da capacitância do sistema venoso (KATZUNG, 2006).

O quadro de hipertensão essencial caracteriza-se por, na maioria das vezes, não ser possível determinar a causa específica para o nível pressórico elevado. Este diagnóstico abrange 95 % dos casos. Nestes pacientes, dependendo de suas características (idoso, diabético, jovem, etc), o médico vai optar por uma ou outra classe de fármacos que possa controlar os níveis pressóricos, pois a doença não tem cura (KATZUNG, 2006).

Vários fatores de risco estão associados com a hipertensão essencial, dentre eles uma predisposição genética, consumo elevado de álcool e inatividade física. Fatores ambientais, como modo de vida estressante, elevada taxa diária de ingestão de sal, obesidade e fumo são fatores predisponentes à ocorrência de hipertensão (HOFFMAN et al., 2004; KATZUNG, 2006).

A hipertensão secundária contribui para 5-10 % dos casos e resulta de uma causa identificável, geralmente uma patologia renovascular, que eleva a pressão sanguínea por ativar o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Pode ser subdividida em quatro diferentes formas: renal, neurogênica, endócrina e cardiovascular (HOFFMAN et al., 2004; KOROLKOVAS, 2007).

A redução da pressão arterial em pacientes com hipertensão crônica moderada ou grave diminui consideravelmente os riscos de acidente vascular cerebral, insuficiência renal e insuficiência cardíaca e também pode reduzir o risco de isquemia do miocárdio (GRAHAME-SMITH; ARONSON, 2004). A incidência da morbidade e da mortalidade diminuem significativamente quando a hipertensão é diagnosticada precocemente e tratada adequadamente (MYCEK; HARVEY; CHAMPE, 1998).

1.2 TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL

Os objetivos principais do tratamento da hipertensão arterial compreendem a melhoria da qualidade de vida, prevenção de complicações agudas e crônicas relacionadas direta ou indiretamente com a hipertensão, tratamento das doenças concomitantes e a redução da mortalidade (MINAS GERAIS, 2006).

Segundo dados de Hoffman et al (2004) e da Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde (2003), o tratamento não medicamentoso é a terapia de primeira escolha. Os pacientes com hipertensão são aconselhados a evitar atividades que podem predispor à doença cardiovascular, além de mudanças de hábitos relacionados a uma alimentação dietética adequada; a praticar exercícios físicos; abandonar o fumo; tratar o alcoolismo e diminuir a ingestão excessiva de sal e gorduras insaturadas. O paciente deve fazer estas mudanças durante 3 meses, caso isto não seja suficiente para abaixar os níveis pressóricos deverá ser utilizado o tratamento farmacológico.

Em estudo realizado por Labbadia e Cury Júnior (1997) é demonstrado que não basta apenas controlar cifras tensionais de um paciente hipertenso, mas o estabelecimento de um programa de atenção a esse paciente, com a participação de uma equipe multiprofissional, envolvendo médicos, psicólogos, enfermeiros e nutricionistas, visando à melhoria da qualidade de vida do mesmo. Se utilizando medidas higienodietéticas não houver a redução da PA (pressão arterial), deve-se ajustar um tratamento farmacológico iniciando com a

monoterapia, utilizando medicamentos que possuem efeitos colaterais menos intensos (HOFFMAN et al., 2004).

A escolha do medicamento deverá ser pautada em critérios nos quais o medicamento deve ser eficaz por via oral, ser bem tolerado, permitir a administração do menor número possível de tomadas diárias. Em situações onde a monoterapia não produz resultados satisfatórios pode-se optar por aumentar a dosagem do medicamento até a máxima para surgir algum efeito; substituir por fármaco de outra classe, pois o paciente pode ter uma boa resposta com uma classe e não ter com outra e por último associar fármacos de classes diferentes, ficando sempre atento ao aumento dos efeitos colaterais (BRASIL, 2006).

No mercado nacional, há mais de 250 especialidades farmacêuticas, com único princípio ativo ou associação de dois ou mais princípios ativos sendo, portanto, uma das patologias contra a qual a medicina dispõe das mais variadas opções terapêuticas, fazendo da hipertensão arterial a causa mais freqüente de prescrição de medicamentos (COUTO; BOTTEOU, 1991; ESQUINAZI, 1996; KOROLKOVAS, 2007).

De acordo com Rang, Dale, Ritter (2004) as ações desses fármacos se resumem a:

- diuréticos: reduzem depleção do sódio, levando a diminuição do fluido extracelular e do débito cardíaco;
- inibidores do sistema simpático central: deprimem o tônus simpático por ação agonista nos receptores pré-sinápticos alfa-adrenérgicos e imidazólicos do sistema nervoso central, diminuindo a eficácia de liberação da norepinefrina;
- inibidores da enzima conversora de angiotensina: inibem a formação de angiotensina II, bloqueando esse sistema e, portanto, reduzindo a pressão arterial;
- vasodilatadores diretos: possuem efeito relaxante direto no músculo liso vascular sem intermediação de receptores específicos;
- antagonistas dos canais de cálcio: diminuem as concentrações de cálcio livre intracelular, levando à potente vasodilatação arteriolar;
- antagonistas do receptor da angiotensina II: antagoniza as respostas endógenas a angiotensina II, levando principalmente a vasodilatação, excreção de sódio e diminuição da atividade noradrenérgica.

A decisão terapêutica baseia-se nas informações sobre a classificação dos níveis de pressão arterial e da estratificação do risco individual, obtidos durante a avaliação clínica. Quanto maior o risco de complicações cardiovasculares e de lesões em órgãos-alvo, mais intensivo deverá ser o tratamento. Esta decisão deverá ser sempre individualizada, levando

sempre em conta: idade, condições sócio econômicas, como restrições financeiras, apoio familiar, entre outros fatores (MINAS GERAIS, 2006).

De acordo com estudos realizados (BRASIL, 2006) os medicamentos preferenciais para o controle da pressão arterial em monoterapia inicial são diuréticos, betabloqueadores, antagonistas dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina e antagonistas do receptor da angiotensina II sendo o objetivo primordial do tratamento da hipertensão arterial a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares do paciente hipertenso, aumentadas em decorrência dos altos níveis tensionais, sendo utilizadas tanto medidas não-medicamentosas isoladas como associadas a medicamentos anti-hipertensivos.

Todavia em pacientes com hipertensão moderada a grave é freqüentemente possível controlar a pressão sem produzir efeitos colaterais através da combinação de baixas doses de diferentes fármacos com mecanismos de ação complementares. As associações podem potencializar determinados efeitos em relação ao uso isolado de um dos agentes. Os diuréticos são recomendados como adjuvantes em todos os tratamentos, a não ser que haja contra-indicação (MINAS GERAIS, 2006; RANG; DALE; RITTER, 2004).

1.2.1 Associações medicamentosas

Algumas associações anti-hipertensivas consideradas eficazes envolvem os fármacos de ação central e diuréticos, betabloqueadores e diuréticos, bloqueadores do receptor AT1 (angiotensina I) e diuréticos, inibidores de enzima conversora de angiotensina (ECA) e diuréticos; bloqueadores dos canais de cálcio e inibidores da ECA; bloqueadores dos canais de cálcio (MINAS GERAIS, 2006). Os inibidores da ECA e os antagonistas dos canais de cálcio são utilizados isoladamente ou em combinação, enquanto os antagonistas dos receptores AT1 são particularmente úteis para pacientes que não toleram os IECA (inibidores da enzima conversora de angiotensina) em virtude da ocorrência de tosse (KOROLKOVAS, 2007; RANG; DALE; RITTER, 2004).

Na hipertensão resistente à terapia dupla, podem ser prescritos três ou mais medicamentos. O uso de diuréticos é fundamental nesta situação. Quando não há uma resposta terapêutica adequada, pode-se associar até quatro medicamentos, incluindo sempre um diurético (MINAS GERAIS, 2006).

A associação entre lisinopril e hidroclorotiazida propicia atividade anti-hipertensiva e diurética. Os dois componentes da combinação foram usados isolados e concomitantemente para o tratamento da hipertensão e seus efeitos anti-hipertensivos são aproximadamente aditivos. Além disso, o componente lisinopril mostrou atenuar a perda de potássio associada à hidroclorotiazida. O lisinopril e a hidroclorotiazida tem esquemas posológicos semelhantes; portanto, a formulação associada para a administração concomitante de lisinopril e hidroclorotiazida é considerada eficaz e segura clinicamente (BRASIL, 2009c).

De acordo com dados obtidos no Dicionário de especialidades farmacêuticas (Dicionário de especialidades farmacêuticas – DEF 2007/08), PRINZIDE[®] é o medicamento referência produzido pela Merck Sharp & Dohme que associa lisinopril e hidroclorotiazida, na forma farmacêutica comprimidos, nas concentrações de 10/12,5 mg ou 20/12,5 mg de lisinopril e hidroclorotiazida, respectivamente. Existem no mercado medicamentos genéricos com esta associação, produzidos pelos laboratórios Astrazeneca, Biossintética e Merck.

1.3 HIDROCLOROTIAZIDA

1.3.1 Propriedades farmacológicas e indicações

A hidroclorotiazida (HCTZ) é um diurético tiazídico amplamente utilizado no tratamento de edemas, doença cardíaca congestiva e diversas formas de disfunção renal e hepática. É indicada no tratamento da hipertensão arterial, no tratamento de edema associado à insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática e terapia com corticosteróides ou estrógenos, sendo eficaz também no edema relacionado a várias formas de disfunção renal, como síndrome nefrótica, glomerulonefrite aguda e insuficiência renal crônica (BRASIL, 2009a). Geralmente é administrada conjuntamente a anti-hipertensivos, com redução efetiva da pressão por mecanismos associados, como a diminuição da resistência periférica (KATZUNG, 2006; KOROLKOVAS, 2007).

As tiazidas pertencem à classe dos saluréticos, ou seja, diuréticos que inibem a reabsorção de sódio, cloreto e água, além de aumentarem a excreção urinária de íons bicarbonato. Atua aumentando a renina plasmática e a secreção de aldosterona, resultando na diminuição do potássio sérico (BRASIL, 2009a; KOROLOKOVAS, 2007).

No mercado brasileiro, o fármaco apresenta-se sob a forma farmacêutica de comprimidos contendo 50 mg do fármaco. O medicamento referência é o Drenol[®], fabricado pelo Laboratório Pharmacia Brasil Ltda. e atualmente existem medicamentos genéricos registrados conforme Lei nº 9.787/99 (BRASIL, 1999), sendo estes produzidos por vários laboratórios brasileiros, além da manipulação do fármaco em farmácias, na forma farmacêutica cápsula.

Visto seu efeito conjugado no tratamento da hipertensão, na maioria das vezes a hidroclotiazida encontra-se associada à anti-hipertensivos de diferentes classes farmacológicas, em concentrações diversas, como: amilorida, reserpina, sulfato de diidralazina, irbesartano, losartano, enalapril, fumarato de bisoprolol, valsartano, metildopa, triantereno, lisinopril, metoprolol, propranolol, entre outros (Dicionário de especialidades farmacêuticas – DEF 2007/08), além de estar sendo, também, manipulada em associação com estas classes.

A terapia deve ser individualizada de acordo com a resposta do paciente. A dose deve ser ajustada para se obter a resposta terapêutica desejada, bem como para determinar a menor dose capaz de manter esta resposta. Pode ser administrada em adultos, lactentes e crianças até 2 anos e idosos, sempre acompanhados de aconselhamento médico e respeitando-se as restrições farmacocinéticas dos pacientes em tratamento, (BRASIL, 2009a).

1.3.2 Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas

A hidroclorotiazida ou 6- cloro - 3, 4 - 2H - 1, 2, 4 - benzotiadiazina - 7 - sulfonamida - 1,1 - dióxido (Figura 1), possui fórmula e peso molecular de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ e 297,74 g/mol, respectivamente. Apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco a amarelado, com ponto de fusão entre 273-275°C. É praticamente insolúvel em água, solúvel em acetona, etanol e soluções alcalinas diluídas. É um ácido fraco, com $pK_a = 7,9$ e coeficiente de partição $\log P = -0,07$. A DL_{50} , determinada em ratos, é de 590 mg/kg por via endovenosa e de mais de 8 g/kg por via oral (BRITISH, 2009; EUROPEAN, 2008; THE MERCK INDEX, 2006).

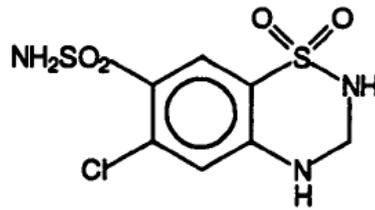


Figura 1. Estrutura química da hidroclorotiazida (Adaptação: Farmacopéia Brasileira IV, 1996).

A hidroclorotiazida é rapidamente absorvida a partir do duodeno e jejuno superior. A absorção é sítio - específica e incompleta após administração oral, possuindo biodisponibilidade de aproximadamente 65 %. A administração após as refeições aumenta a absorção, devido à diminuição do trânsito gastrintestinal. A meia-vida plasmática é cerca de 5 horas e a de eliminação cerca de 15 horas. Possui eliminação renal, sendo excretada inalterada na urina. Atravessa a barreira placentária sendo encontrada no leite materno. Concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em cerca de 2 horas após a administração, quando a diurese se inicia, alcançando o máximo da atividade em cerca de 4 horas (HARRIS, 1989; KOROLKOVAS, 2007). A meia-vida plasmática é de 5,6 a 14,8 horas. A hidroclorotiazida não é metabolizada, mas é eliminada rapidamente pelo rim; pelo menos 61 % da dose oral é eliminada inalterada em 24 horas. Atravessa a placenta, mas não a barreira hematoencefálica (BRASIL, 2009a).

1.4 LISINOPRIL

1.4.1 Propriedades farmacológicas e indicações

Com base em dados do Dicionário de especialidades farmacêuticas (DEF 2007/08), o lisinopril é indicado para o tratamento da hipertensão essencial e renovascular, podendo ser usado como monoterapia ou associado a outras classes de agentes anti-hipertensivos. Também é indicado para o controle da insuficiência cardíaca congestiva, como

tratamento adjuvante com diuréticos não poupadores de potássio e onde apropriado, digitálicos. Doses elevadas reduzem o risco de mortalidade e hospitalização.

O efeito essencial desses agentes no sistema renina - angiotensina é inibir a conversão da angiotensina I relativamente inativa para angiotensina II ativa. Portanto os inibidores da ECA atenuam ou eliminam as respostas a angiotensina I, mas não a angiotensina II. Sob este aspecto, os inibidores da ECA são fármacos altamente seletivos. Não interagem diretamente com outros componentes do sistema renina - angiotensina, e os principais efeitos farmacológicos e clínicos derivam da supressão da síntese da angiotensina II (JACKSON, 2006). A angiotensina II possui uma variedade de efeitos que contribui para a elevação da pressão sanguínea, provocando contração das arteríolas e estimulando a liberação de aldosterona pelo córtex adrenal; por sua vez, estimula a reabsorção de Na^+ nos rins (CURTIS; PUGSLEY, 2004).

No mercado brasileiro, o lisinopril apresenta-se sob a forma farmacêutica de comprimidos contendo 5, 10, 20 ou 30 mg do fármaco. O medicamento referência é o Zestril[®], fabricado pelo Astrazeneca e atualmente existem medicamentos genéricos registrados conforme Lei nº 9.787/99 (BRASIL, 1999), sendo este produzido por diversos laboratórios, entre eles Biosintética, Brainfarma, Cinfa, Cristália, EMS, Hexal, Ipca, Medley, Mepha, Merck, Natures Plus, Novartis, Ranbaxy, Sigma Pharma, Teuto (BRASIL, 2009b; Dicionário de especialidades farmacêuticas – DEF 2007/08).

Considerando seu efeito conjugado no tratamento da hipertensão, o lisinopril pode ser associado à hidroclorotiazida nas concentrações de 10 mg/12,5 mg ou de 20 mg/12,5 mg de lisinopril e hidroclorotiazida, respectivamente (Dicionário de especialidades farmacêuticas – DEF 2007/08) Atualmente o fármaco vem sendo, também, manipulado em associação em farmácias magistrais.

A posologia é normatizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2006) de acordo com dados de estudos realizados para diferentes patologias: hipertensão essencial, pacientes tratados com diuréticos, pacientes com insuficiência renal, hipertensão renovascular, insuficiência cardíaca congestiva, infarto agudo do miocárdio, pacientes com complicações renais e retinianas do diabetes mellitus. Como a absorção deste medicamento não é afetada por alimentos, o medicamento pode ser administrado antes, durante ou após as refeições. Deve ser administrado em dose única diária.

1.4.2 Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas

O lisinopril (Figura 2) ou N-[N-[(S)-1-carboxi-3-fenipropil]-L-lisil]-L-prolina, possui fórmula e peso molecular de $C_{21}H_{31}N_3O_5$ e 405,5 g/mol, respectivamente. Apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco, solúvel em água, ligeiramente solúvel em metanol, praticamente insolúvel em acetona. Possui poder rotatório específico compreendido entre -43 e -47 (BRITISH, 2009; EUROPEAN, 2008; THE MERCK INDEX, 2006).

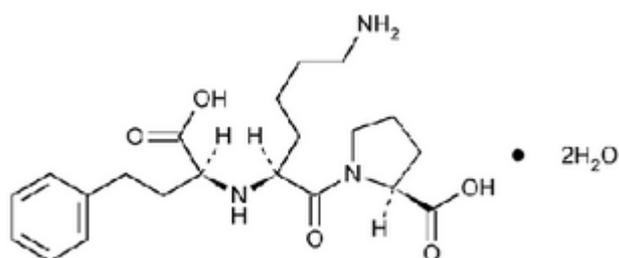


Figura 2. Estrutura química do lisinopril
(Adaptação: UNITED, 2008).

De acordo com a literatura (BRASIL, 2009b; KOROLKOVAS, 2007), após administração oral de lisinopril, o pico de concentração plasmática ocorre em cerca de 7 horas, apesar de haver tendência a um pequeno retardo em pacientes com infarto agudo do miocárdio. A biodisponibilidade absoluta é reduzida em 16 horas em pacientes com insuficiência cardíaca. A absorção de lisinopril não é afetada pela presença de alimentos. O fármaco não se liga às proteínas séricas, sendo inteiramente excretado inalterado na urina, não sendo metabolizado. Em doses múltiplas, o lisinopril possui uma meia-vida efetiva de acúmulo de 12,6 horas. A sua depuração plasmática em pacientes saudáveis é de aproximadamente 50 mL/min.

1.5 ANÁLISE QUANTITATIVA E CONTROLE DE QUALIDADE

Considerando o ativo hidroclorotiazida, as farmacopéias Americana, Brasileira, Britânica e Européia (BRITISH, 2009; EUROPEAN, 2008, FARMACOPÉIA BRAS. IV, 1996; UNITED, 2008) descrevem monografias analíticas para o controle de qualidade do ativo em matéria-prima e em comprimidos de liberação imediata contendo o fármaco. Os dois primeiros códigos oficiais sugerem para a forma farmacêutica comprimido o método cromatográfico para a quantificação do ativo (%) e determinação de impurezas e o método cromatográfico para determinação da quantidade dissolvida (Q) no teste de dissolução. Já os dois últimos códigos oficiais, não apresentam metodologias analíticas para hidroclorotiazida em produto acabado.

A Farmacopéia Americana (UNITED, 2008) apresenta as monografias analíticas para controle de qualidade de lisinopril em matéria-prima e comprimidos, sugerindo a cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação do ativo (%), determinação de impurezas e quantidade liberada (Q) do fármaco da forma farmacêutica. As Farmacopéias Britânica (BRITISH, 2009) e Européia (EUROPEAN, 2008) apresentam somente monografia para análise da matéria-prima.

A literatura registra estudos envolvendo algumas metodologias analíticas para a determinação simultânea de hidroclorotiazida e lisinopril em produtos farmacêuticos. Entretanto, até o momento não existem métodos para determinação simultânea destes ativos em cápsulas magistrais descritas na literatura (IVANOVIC et al, 2007; KUMAR; MALIK; SINGH, 2008; KUMAR; SHAH; SINGH, 2008; VRANIC; UZUNOVIC, 2007; WANG; CHUANG; LIN, 2002; WYSZOMIRSKA; CZERWINSKA; MAZUREK, 2010).

1.6 DISSOLUÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA

Em sistemas biológicos, a dissolução de medicamentos pode ser definida como o fenômeno em que um fármaco no estado sólido se libera da forma farmacêutica de administração e se solubiliza. Portanto, a dissolução é uma importante condição para absorção sistêmica do fármaco, podendo afetar a biodisponibilidade do mesmo. O ensaio de dissolução

in vitro mede a velocidade e a extensão de liberação do ativo no meio avaliado (ABDOU, 1995; STORPIRTIS; CONSIGLIERI, 1995).

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende de sua liberação, da dissolução ou solubilização do mesmo em condições fisiológicas e de sua permeabilidade por meio das membranas do TGI (trato gastrintestinal). Devido à natureza crítica dos dois primeiros, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo* (FERRAZ; CONSIGLIERI; STORPIRTIS, 1998; ROLIM, 2001).

A Figura 3 ilustra os processos relacionados à liberação do fármaco de formas farmacêuticas sólidas, onde K_{dd} representa a taxa de desintegração da formulação e K_{di} , a taxa de dissolução intrínseca do fármaco. Pode-se constatar que quando K_{dd} é maior que K_{di} , a dissolução é controlada pela dissolução intrínseca dos ativos, sendo suas propriedades físico-químicas consideradas importantes. Já quando K_{dd} é menor que K_{di} , a dissolução é controlada pela desintegração, sendo esta influenciada pelas propriedades coesivas da formulação (BROWN, 2004).

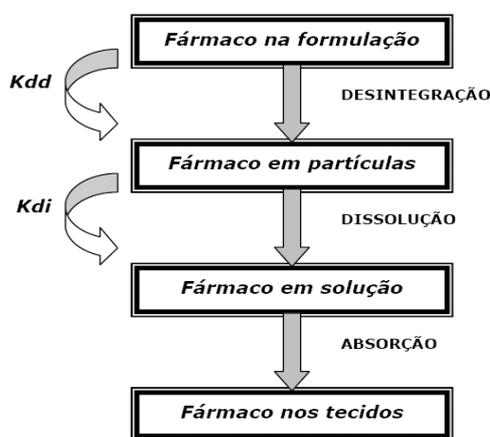


Figura 3. Processos relacionados à liberação do fármaco da forma farmacêutica sólida (adaptado de BROWN, 2004).

A taxa de dissolução em que os fármacos com baixa solubilidade em água se dissolvem a partir da forma farmacêutica, intacta ou desintegrada, no trato gastrintestinal, geralmente é limitante para a absorção sistêmica dos mesmos. Portanto, a dissolução de ativos fracamente solúveis a partir de formas farmacêuticas de liberação imediata possui muitos

desafios. Estes incluem o desenvolvimento e a validação da metodologia de teste, assegurando que o teste é apropriadamente discriminatório e que possui potencial correlação *in vivo-in vitro* (BROWN, 2004).

Pode-se estabelecer uma relação direta entre a dissolução e a eficácia clínica do produto farmacêutico, uma vez que, para difundir-se em líquidos do TGI e atravessar as membranas biológicas, o fármaco deve apresentar-se dissolvido (ABDOU, 1995; BANAKAR, 1992).

Os compostos para serem administrados oralmente devem ter adequada solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal, de forma a atingir sua concentração terapêutica na circulação sistêmica (ÇELIK, 1996).

Atualmente o ensaio de dissolução é um requisito considerado fundamental na indústria farmacêutica para assegurar a qualidade das formas farmacêuticas sólidas de uso oral. É utilizado para garantir a qualidade lote-a-lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento mesmo após determinadas modificações. Além disso, o ensaio permite a otimização das formulações na fase de desenvolvimento, estudos de estabilidade, monitoramento dos processos de fabricação, bem como o estabelecimento de correlações *in vivo in vitro*. Testes de dissolução também podem ser utilizados para avaliar mudanças após o registro do produto e podem auxiliar na decisão para a realização de estudos de bioequivalência (BANAKAR, 1992; DRESSMAN et al., 1998; MARQUES; BROWN, 2002; SKOUG et al., 1997).

Episódios de intoxicação, além da inefetividade de medicamentos levaram aos estudos de biodisponibilidade de produtos farmacêuticos mostrando que variações na formulação ou na técnica de fabricação podem gerar diferenças substanciais na absorção, teor de umidade e propriedades físico-químicas do próprio fármaco e, conseqüentemente, na resposta terapêutica dos fármacos (SKOUG et al., 1997; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Estas variações podem ser monitoradas *in vitro* pelo perfil de dissolução, por meio da quantificação da fração de fármaco dissolvido e *in vivo* pela sua concentração plasmática, ambas em função do tempo. Os dados *in vivo* permitem determinar a biodisponibilidade do fármaco (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

1.6.1 Características do ensaio de dissolução

O teste de dissolução *in vitro* se propõe a quantificar e a avaliar a taxa e a extensão da dissolução, sendo seu resultado expresso em percentagem do fármaco declarada dissolvida, num certo período de tempo. Quando existe uma correlação com a biodisponibilidade *in vivo*, esta poderia ser acessada através do ensaio de dissolução *in vitro* avaliado (ABDOU, 1995; STORPIRTIS; CONSIGLIERI, 1995).

Com intuito de obter esta correlação, o desenvolvimento de uma metodologia de dissolução envolve a seleção de parâmetros como a característica e volume do meio de dissolução, efeito do pH, velocidade de agitação e utilização de equipamento específico, além de um ensaio adequado e validado e equipamento sensível para a quantificação.

O volume do meio de dissolução empregado deveria ser capaz de manter a condição *sink*, que preconiza a utilização de um volume não inferior a 3 vezes o necessário para formar uma solução saturada do fármaco. Isto se faz necessário, visto que, um excesso de meio permite que o fármaco se dissolva continuamente (ABDOU, 1995; STORPIRTIS, 1999).

1.6.2 Sistema de classificação biofarmacêutica (SCB)

Amidon e colaboradores (1995) categorizaram as substâncias farmacêuticas em quatro grupos de acordo com suas propriedades de solubilidade e permeabilidade. A classificação biofarmacêutica pretende correlacionar a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo*. O conhecimento da solubilidade e permeabilidade gastrointestinal dos fármacos se torna de grande valia, uma vez que estes parâmetros controlam a taxa e a extensão da absorção. Esta classificação assume que nenhum outro componente da formulação altere a permeabilidade de membrana ou o trânsito intestinal (AMIDON et al., 1995).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) divide os fármacos em quatro classes, no qual são contempladas as características de solubilidade e permeabilidade de cada fármaco. Embora o SCB esteja limitado a dois dos quatro fatores condicionantes da biodisponibilidade do fármaco, providencia, no entanto, um ponto de partida muito útil no

reconhecimento de quando e como os ensaios de dissolução podem ser úteis no desenvolvimento e avaliação de formas farmacêuticas orais (AMIDON et al., 1995).

De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, a solubilidade de determinado fármaco é considerada alta quando a maior dose empregada é solúvel em até 250 mL de um meio aquoso numa faixa de pH fisiologicamente relevante (de 1 a 7,5). Portanto, pode haver divergência entre a classificação físico-química de solubilidade de determinado material considerado não solúvel, mas que em relação à categorização de solubilidade da classificação biofarmacêutica, onde a dose administrada é considerada, o mesmo seja classificado como de alta solubilidade (BRASIL 2003b; YU et al., 2004).

Os compostos pertencentes à Classe I, ou seja, compostos com alta solubilidade e alta permeabilidade, devem ser rapidamente solubilizados quando incluídos em formas farmacêuticas de liberação imediata e, também, ser rapidamente transportados através da parede do trato gastrointestinal. Portanto, espera-se que estes fármacos sejam bem absorvidos a menos que sejam instáveis, formem complexos insolúveis, sejam segregados diretamente a partir da parede do trato gastrointestinal, ou sofram metabolismo de primeira passagem. Portanto, os ensaios de dissolução para as formulações de liberação imediata de fármacos pertencentes à Classe I necessitam apenas da verificação de que o fármaco é de fato rapidamente liberado da sua forma farmacêutica num meio aquoso (DRESSMAN et al., 1998).

Estão agrupados na Classe II os fármacos de alta permeabilidade, mas baixa solubilidade. Esta é a classe na qual o perfil de dissolução deve estar muito bem definido e ser altamente reprodutível. A dissolução dos fármacos da Classe II é o passo limitante para absorção, desta forma, as condições nas quais o ensaio de dissolução será realizado devem estar muito bem definidas. A adequada comparação das formulações contendo fármacos desta classe requer ensaios de dissolução com múltiplas amostragens de modo a caracterizar o perfil de liberação. Devem ainda ser considerados meios que reflitam a situação *in vivo*, como a adição de surfactantes. Para se obter boas correlações *in vitro/ in vivo*, são particularmente importantes o estudo do meio de dissolução e o emprego de metodologias que reflitam o controle do processo *in vivo* (AMIDON et al., 1995). O estabelecimento de correlação *in vitro/ in vivo* e o resultado da habilidade em discriminar formulações com diferentes biodisponibilidades irá depender de quão bem os ensaios *in vitro* foram estabelecidos (DRESSMAN et al., 1998; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION FDA/CDER, 1995).

A Classe III abrange os fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade. Neste caso a permeabilidade é o passo que controla a velocidade de absorção do fármaco.

Tanto a extensão quanto a velocidade de absorção podem ser altamente variáveis para esta classe de fármacos, mas se a dissolução é rápida, por exemplo, 85% dissolvido em menos de 15 minutos, esta consideração estará mais susceptível às variações do trato gastrintestinal do que aos fatores da forma farmacêutica (AMIDON et al., 1995).

Fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade estão agrupados na Classe IV, e são os que potencialmente podem apresentar problemas de absorção quando administradas por via oral. O estabelecimento de correlações para esta classe de fármacos é muito restrito (AMIDON et al., 1995). Estes fármacos têm uma fraca absorção em geral, mas considera-se que, tal como no caso dos fármacos de Classe II, uma pobre ou má formulação pode ter uma influência adicional negativa tanto na taxa como na extensão da absorção do fármaco (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Portanto para as quatro categorias, considera-se que ensaios de dissolução bem concebidos poderão ser chave para o prognóstico na determinação da absorção oral e da bioequivalência dos fármacos a partir da sua forma farmacêutica (DRESSMAN et al., 1998).

1.6.3 Fatores que interferem na dissolução relacionados ao fármaco e à formulação

1.6.3.1 Solubilidade, tamanho de partícula e higroscopicidade

A solubilidade é um parâmetro termodinâmico que representa a concentração da solução de um fármaco em equilíbrio com o soluto. É o fator que mais afeta a velocidade de dissolução (ABDOU, 1995; STORPIRTIS, 1999). Pode ser determinada por meio da adição de um excesso de fármaco ao meio, seguido de agitação, filtração e quantificação do fármaco dissolvido (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Um fármaco dissolverá mais rápido quanto maior for a sua área de superfície, ou seja, quanto menor for o tamanho de suas partículas. Por essa razão, muitos fármacos se encontram micronizados, de forma a facilitar a sua dissolução e, conseqüentemente, sua absorção. Entretanto, existem alguns casos em que a diminuição do tamanho das partículas não apresenta vantagens para a absorção. Nos casos em que há degradação do fármaco nos

líquidos gástricos, a redução do tamanho das partículas é contra-indicada (LEVY, 1963). Outros fatores que também exercem influência na área de superfície são a forma da partícula e sua densidade (ABDOU, 1995).

As formas anidras dos fármacos apresentam atividade termodinâmica maior em relação aos seus hidratos correspondentes e, conseqüentemente, maior solubilidade e velocidade de dissolução em relação às formas hidratadas (ABDOU, 1995).

1.6.3.2 Natureza química e comportamento estereoquímico de moléculas

O estado amorfo, cristalino e a existência de polimorfos (cristais com arranjos espaciais diferenciados que apresentam diferentes propriedades físicas) são alguns dos fatores a se considerar. Geralmente, substâncias amorfas são mais solúveis que as cristalinas, assim como substâncias anidras são mais solúveis que as hidratadas do mesmo fármaco (GIBALDI, 1991; YATES, 1992). Tal fato decorre das condições empregadas na síntese e purificação da substância, dependendo, por exemplo, do tipo de solvente utilizado e da temperatura da reação. A existência de polimorfismo pode influenciar a biodisponibilidade, a estabilidade química e física do fármaco e ter implicações no desenvolvimento e estabilidade da forma farmacêutica, levando-se em consideração as alterações ocorridas nas características dos cristais (PEZOA; CONCHA; GAETE; 1990). Portanto, podem ser esperadas diferenças na ação do fármaco, em termos farmacológicos e terapêuticos devido à presença de polimorfos em formas farmacêuticas sólidas, assim como em suspensões líquidas (ANSARI; KAZEMIPOUR; TALEBNIA, 2004).

Outro fator importante é que o polimorfo menos estável tende a se transformar no polimorfo mais estável (transição polimórfica), o que pode ocorrer em função do tempo e da temperatura de armazenamento, do tipo de processo de compressão utilizado e da redução do tamanho de partículaS (GIBALDI, 1991; YATES, 1992). Caso no momento da formulação não seja verificado qual será o polimorfo utilizado, pode-se obter um produto ineficaz devido ao comprometimento da dissolução do fármaco e, conseqüentemente, de sua biodisponibilidade.

Grande parte das moléculas biológicas é quiral sendo isolada normalmente como um único estereoisômero (PEZOA; CONCHA; GAETE; 1990). Estas moléculas são de composição química idêntica, mas que não são sobreponíveis com sua imagem no espelho. A maior parte das rotas de síntese empregadas atualmente dá origem a racematos, ou seja, uma mistura de estereoisômeros, pelo fato de serem rotas menos complexas em termos tecnológicos. Aparentemente, essa diferença é irrelevante. Entretanto, tais compostos podem apresentar atividades biológicas distintas ou diferenças significativas em relação à intensidade da ação farmacológica (LIMA et al., 2006).

1.6.3.3 Forma farmacêutica, excipientes e tecnologia de fabricação

Cápsulas de gelatina, de modo geral, rompem-se rapidamente expondo o conteúdo aos líquidos do TGI, mas a tecnologia de fabricação e os diluentes presentes na formulação podem fazer com que a dissolução não ocorra tão rapidamente quanto o esperado. A dissolução de comprimidos depende, primariamente, da desintegração dos comprimidos e dos grânulos (para aqueles comprimidos que desintegram). Comprimidos revestidos, sejam eles de revestimento entérico ou não, devem ter o revestimento rompido antes que possam sofrer desintegração e posterior dissolução (GIBALDI, 1991).

Os excipientes presentes em uma formulação farmacêutica podem afetar a dissolução do fármaco e, conseqüentemente, a velocidade e quantidade pelas quais o mesmo estará disponível para ser absorvido (GIBALDI, 1991).

Lubrificantes insolúveis, por exemplo, retardam o processo de dissolução, assim como a utilização de goma na granulação úmida (conforme aumenta a concentração utilizada, diminui a dissolução). Já o aumento da concentração de amido que atua como diluente e desintegrante, tende a facilitar a dissolução (ABDOU, 1995; WOOD, 1966). Os diluentes, na realidade, podem aumentar ou diminuir a taxa de absorção conforme suas características físico-químicas. A utilização de polímeros hidrossolúveis e gelatina como ligantes tem mostrado um aumento nas taxas de dissolução de fármacos pouco solúveis (BANAKAR, 1992; GIBALDI, 1991;). Um outro fator a ser considerado é a adsorção do fármaco a componentes da formulação (BANAKAR, 1992).

O tipo de granulação utilizada, via seca ou via úmida tem impacto significativo na dissolução. Há relatos, por exemplo, em que foi possível aumentar a solubilidade de compostos pouco solúveis utilizando a técnica de spray-drying para aplicar uma solução diluída de solvente ao fármaco contendo desintegrantes adequados (TAKEUCHI; HANDA; KAWASHIMA, 1987). De modo geral, a granulação úmida favorece a dissolução de fármacos pouco solúveis por conferir a eles características mais hidrofílicas (ABDOU, 1995). A força de compressão é uma variável complexa que pode afetar a dissolução de diferentes formas. Uma das possíveis respostas para essa questão foi apresentada por Smith e colaboradores (1971), que afirma que quando as partículas tendem a se ligar durante o processo de compressão, a dissolução pode diminuir. Por outro lado, quando as partículas não se ligam, a taxa de dissolução pode aumentar. Em outras palavras, significa que a taxa de dissolução depende das mudanças no tamanho de partícula ou de área de superfície durante o processo de compressão (SMITH; BAKER; WOOD, 1971).

1.6.4 Fatores que interferem na dissolução relacionados ao equipamento

1.6.4.1 Aparato utilizado, geometria e vibração do sistema

É reconhecido que os aparatos oferecem condições de trabalho diferente dependendo do seu mecanismo. Conseqüentemente, parâmetros como velocidade de agitação e meio de dissolução diferem significativamente de aparato para aparato (BANAKAR, 1992).

O eixo do elemento de rotação (cesta ou pá) deve coincidir em todos os pontos com o eixo central da cuba, sendo permitido no máximo um desvio de +/- 2 mm, desde que isso não afete a velocidade de agitação (PEZOA; CONCHA; GAETE, 1990). O ideal é que as hastes rodem sem excentricidade (sem se desviar desse eixo) perceptível (ou significativa). De modo geral, desvios superiores aos citados causam um aumento na taxa de dissolução (BANAKAR, 1992).

O ideal é que não haja nenhum tipo de vibração no sistema, uma vez que ela pode alterar o fluxo laminar e introduzir energia dinâmica indesejável, o que, eventualmente, pode causar mudanças significativas na cinética de dissolução de alguns produtos. Por isso, os aparelhos devem ser posicionados em bancadas niveladas e livres de vibração oriunda de outros equipamentos (PEZOA; CONCHA; GAETE, 1990).

1.6.4.2 Velocidade de agitação e posição da haste

A taxa de dissolução é diretamente afetada pela velocidade de agitação, uma vez que a espessura da camada de difusão é inversamente proporcional à velocidade de agitação (BANAKAR, 1992). Velocidades de agitação baixa e alta podem ser utilizadas para notar diferenças dependendo da formulação a ser testada (WOOD, 1966), já que vários fatores e as características de cada formulação podem influenciar a extensão em que a velocidade de agitação afeta a dissolução (ABDOU, 1995). Uma variação de 4-5% nas velocidades é permitida pelas farmacopéias americana e britânica.

Devem ser observadas as especificações farmacopéicas para posicionamento da haste dentro da cuba, obedecendo-se os limites estabelecidos, já que o mau alinhamento pode causar distúrbios tão significativos no fluxo, que a taxa de dissolução pode variar $\pm 25\%$ de teste para teste (BANAKAR, 1992, UNITED, 2008).

1.6.4.3 Posição e método de amostragem

A posição de amostragem pode interferir em maior ou menor grau nos resultados da dissolução dependendo do tamanho das partículas de desintegração do produto e da diferença de densidade entre as partículas e o meio de dissolução. As farmacopéias trazem a indicação de qual é o local mais apropriado para retirar alíquotas do meio de dissolução (PEZOA; CONCHA; GAETE, 1990). A introdução de coletores de amostra também pode causar modificações na hidrodinâmica do sistema (BANAKAR, 1992; UNITED, 2008).

1.6.4.4 Dispositivo para formas farmacêuticas que flutuam

É permitido o uso de um dispositivo para auxiliar que formas farmacêuticas que tendem a flutuar (principalmente cápsulas) permaneçam no fundo da cuba de dissolução. Normalmente essas peças são de aço inoxidável. Embora a hélice seja a forma mais utilizada, existem outras que podem ser aplicadas sem que haja nenhum prejuízo ao processo de dissolução (SOLTERO et al., 1989).

1.6.5 Fatores que interferem na dissolução relacionados ao meio de dissolução

1.6.5.1 Volume, presença de ar/gases e bolhas de ar

O volume apropriado do meio de dissolução depende principalmente da solubilidade do fármaco. De forma a minimizar os efeitos do gradiente de concentração e manter as condições *sink*, a concentração do fármaco não deve exceder 10-15% da sua solubilidade máxima no meio selecionado. Para a maioria dos fármacos, com exceção daqueles pouco solúveis, cerca de 1 litro de meio é suficiente (ABDOU, 1995).

A presença de gases dissolvidos no meio de dissolução pode gerar vários problemas. Eles podem afetar o pH e impedir o fluxo adequado do meio de dissolução, provocar mudanças no movimento das partículas e diminuir o contato entre o líquido e o sólido formando pequenas bolhas na superfície da forma farmacêutica, uma vez que os gases podem formar bolhas durante mudanças de temperatura (PEZOA; CONCHA; GAETE, 1990). A solubilidade de gases no meio de dissolução também depende da temperatura. O meio pode ser devidamente desaerado/desgasificado por aquecimento a 45°C seguido por filtração a vácuo, por sonicação a 37 °C, por ebulição seguida de esfriamento da água, ou por borbulhamento de gás hélio no meio (PEZOA; CONCHA; GAETE, 1990; QURESHI; MCGILVERAY, 1995).

As bolhas de ar não têm relação com a presença de gases no meio de dissolução e podem aparecer em duas situações quando se utiliza o aparato cesta, ao descer a cesta no meio pode-se formar uma bolha no fundo da mesma ou ao redor da forma farmacêutica prejudicando a dissolução.

1.6.5.2 Efeito do pH, temperatura, evaporação e viscosidade do meio

O pH no trato gastrintestinal (TGI) varia entre 1,0 e 7,8. Dessa forma, a escolha do pH do meio deve considerar, principalmente, o tipo de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica (imediate ou não) e o sítio de absorção do mesmo. Nem sempre o pH que favorece a absorção é aquele em que o fármaco melhor se dissolve (STORPIRTIS et al., 1999). Permite-se uma variação de 0,05 unidades em relação ao especificado no teste de dissolução de cada monografia. Apesar de combatida por alguns, a utilização de água como meio de dissolução se justifica principalmente porque ela não exerce nenhuma ação corrosiva no equipamento e apresenta freqüentemente resultados comparáveis àqueles obtidos quando se utiliza um meio ácido (ABDOU, 1995).

Normalmente temperaturas elevadas favorecem a dissolução e solubilidade do fármaco, dessa forma, recomenda-se que a temperatura do teste seja monitorada para não permitir grandes variações, no máximo meio grau, da temperatura considerada adequada (geralmente 37 °C) (MARCOLONGO, 2003).

A evaporação do meio pode ser minimizada aquecendo-se o meio a 37 °C antes de introduzi-lo na cuba de dissolução (MARCOLONGO, 2003).

De modo geral, quanto maior for a viscosidade do meio, mais lenta será a dissolução, uma vez que as moléculas dissolvidas têm seu trânsito dificultado pela viscosidade, principalmente nos processos controlados por difusão (BANAKAR, 1992).

1.6.5.3 Força iônica/pressão osmótica e uso de tensoativos

A força iônica e a pressão osmótica estão intimamente relacionadas. Geralmente um aumento nesses valores favorecem a dissolução (ABUZARUR-ALOUL et al., 1997).

Os tensoativos orgânicos (sais biliares) normalmente são aniônicos ou não iônicos, com valores de EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico) entre 16 e 20 (ABUZARUR-ALOUL et al., 1997). Dessa forma, a opção pelo uso de tensoativos pode levar esses fatores em consideração, quando se deseja aproximar o teste *in vitro* da situação *in vivo*. Os tensoativos diminuem a tensão superficial entre o sólido e o meio de dissolução favorecendo a dissolução, e podem ser utilizados mesmo abaixo da concentração micelar crítica (ABDOU, 1995).

1.6.6 Fatores que interferem na dissolução relacionados ao meio ambiente

Durante a estocagem, o produto pode passar por mudanças nas suas características físico-químicas que, de alguma forma, venha afetar o seu desempenho *in vitro* e *in vivo* (RODRIGUES, 1999). Por isso é importante que o produto seja mantido nas condições indicadas pelo fabricante. Outro aspecto muito importante em relação à estocagem é a embalagem, que deve proteger o produto da melhor forma possível (MURTHY; GHEBRE-SELLASSIE, 1993). O grau em que os produtos podem ser afetados pela estocagem depende dos componentes da formulação. Um dos principais fatores que afetam a dissolução de produtos estocados consiste na umidade presente antes da compactação e a sensibilidade dos excipientes a ela (ABDOU, 1995).

1.6.7 Fatores que interferem na dissolução, relacionados ao método analítico

Quanto à filtração, os filtros utilizados não devem absorver o fármaco, nem liberar partículas de material para a solução (PEZOA; CONCHA; GAETE, 1990).

O método analítico deve estar validado para o procedimento. A grande maioria das monografias especifica que pode ser utilizado o método espectrofotométrico, embora tenha aumentado o número de métodos cromatográficos, principalmente CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) (MARCOLONGO, 2003).

1.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI, 2004).

O objetivo da validação do método é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados (BRASIL, 2003a).

Antes de prosseguir com a validação do método de dissolução deve-se ter certeza de que o equipamento a ser utilizado está calibrado. Os instrumentos são considerados adequados caso a porcentagem de fármaco dissolvido em 30 minutos esteja dentro de uma faixa pré-estabelecida determinada em estudos colaborativos organizados pela USP (QURESHI; MCGILVERAY, 1995).

A filtração do meio de dissolução antes da quantificação mostra-se necessária para a remoção tanto de partículas não dissolvidas da substância quanto de excipientes insolúveis que podem mascarar o resultado ou obstruir a coluna, no caso de serem utilizados métodos cromatográficos. Normalmente são empregados filtros descartáveis com porosidade entre 0,2

e 10 µm, compatíveis com o meio de dissolução e que não causam alterações significativas na concentração do fármaco em solução (SKOUG et al., 1997).

A Resolução RE nº 899 da ANVISA (BRASIL, 2003b) assim como as diretrizes do International Conference on Harmonization (ICH, 1996) determinam que, para quantificação de ativos em formas farmacêuticas e para o ensaio de dissolução, a validação do método deverá garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão adequados à análise.

Especificidade/Seletividade: é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes, tais como: impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Linearidade: é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Intervalo: é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis:

- repetitividade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetitividade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou um mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

- precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes;
- reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

Limite de Detecção: é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

Exatidão: é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade e da especificidade. É expressa pela relação entre a concentração média determinada e a concentração teórica correspondente.

Robustez: é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

A validação inclui também uma análise estatística dos resultados obtidos. Os métodos estatísticos utilizados devem ser determinados antes do início da validação (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION FDA/CDER, 1995).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo o estudo analítico da associação de lisinopril e hidroclorotiazida, na forma farmacêutica cápsula, manipuladas por diferentes farmácias (A, B e C), considerando os diferentes processos e excipientes utilizados, assim como a dosagem, usualmente empregada na manipulação, de forma a validar o ensaio de dissolução e a metodologia analítica para quantificação dos fármacos viabilizando a aplicação em laboratórios de controle de qualidade e a elaboração de uma proposta de monografia farmacopéica devido à ausência de uma metodologia oficial envolvendo ambos os fármacos.

3 RESULTADOS

Como descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma revisão e discussão ampla da literatura, seguida de artigos científicos referentes aos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa. Para tanto foram redigidos dois artigos que se encontram em fase de submissão.

3.1 ARTIGO I

O artigo I consiste no desenvolvimento de metodologia analítica por RP-HPLC para a determinação simultânea de hidroclorotiazida e lisinopril em cápsulas magistrais. O artigo foi submetido à Revista Chromatographia e encontra-se em fase de avaliação pelos revisores.

Development of a method by RP-HPLC for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and lisinopril in capsules.

LP Araújo ^{a*}, R Bonfilio ^b, MB Araújo ^a

^a Center for Pharmaceutical Equivalence of the Center for Quality Control, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva 700, 37130-000. Alfenas-MG, Brazil.

^b Department of Pharmacognosy and Drug Administration, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP - Univ Estadual Paulista, Rodovia Araraquara-Jau, km 1, CEP 14801-902. Araraquara-SP, Brazil.

*Corresponding author. Tel/Fax+55 35 3299 1350

E-mail address: *lindsaypaiva@yahoo.com.br*

Development of a method by RP-HPLC for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and lisinopril in capsules.

ABSTRACT

Lisinopril (LIS) and hydrochlorothiazide (HCTZ) are commonly used in dual drug therapy at low doses. The objective of this work was to develop a simple and precise HPLC method for the simultaneous determination of these drugs in pharmaceutical capsules. The chromatographic method utilized 0.1 mol L⁻¹ sodium phosphate buffer at pH 5.0: acetonitrile: methanol (99.2/0.5/0.3, v/v/v) as the mobile phase, flow rate of 0.5 mL min⁻¹ and UV detection at 210 nm. A NST[®] C-18 column (150 mm x 4.6 mm, 5.0 μm) at 50°C was used as the stationary phase. The method was successfully validated in accordance to ICH guidelines. A linear response was observed over the concentration range of 11–21 μg mL⁻¹ for HCTZ and of 18–33 μg mL⁻¹ for LIS, respectively. In selectivity study, no excipients interference was observed. The relative standard deviation values for precision were < 2% and the percentage recoveries were in accordance with fixed limits of 98.0 up to 102.0 for both drugs. The robustness was assessed by altering oven temperature to 45 and 55 °C and mobile phase flow rate to 0.4 and 0.6 mL min⁻¹. The method was applied to the simultaneous determination of both analytes in capsules and it provided to be simple, cheap and fast.

Keywords: hydrochlorothiazide, lisinopril, capsules, reversed-phase chromatography, analytical validation.

Introduction

Due to the observed additive effect on blood pressure reduction, the combination of LIS and HCTZ is available for oral administration. Currently, the association has been manipulated in combined dosage forms by compounding pharmacies.

Hydrochlorothiazide (HCTZ) is chemically described as 6-Chloro-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide 1,1-dioxide (Fig. 1). The drug has a molecular weight of 297.74 g mol⁻¹ and its molecular formula is C₇H₈ClN₃O₄S₂. It is a white to yellow crystalline powder and its melting point is between 273 and 275 °C. HCTZ is practically insoluble in water and soluble in acetone, in ethanol, and in diluted alkaline solutions. It is a weak acid, with a pK_a of 7.9 and a partition coefficient (octanol/water) of 0.07 [1-3]. HCTZ is a thiazide diuretic widely used in treatment of fluid retention (edema), congestive heart failure and in hepatic or renal disease. Frequently, the drug is co-administered with other antihypertensive agents resulting in effective reduction in arterial pressure due to a decrease in the total peripheral vascular resistance. Thiazide diuretics act on distal convoluted tubule and inhibit Na⁺-Cl⁻ causing increased excretion of sodium and water as well as potassium and hydrogen ions [4].

Lisinopril (LIS) is chemically described as (S)-1-[N²-(1-carboxy-3-phenylpropyl)-L-lysyl]-L-proline dehydrate (Fig. 2). Its molecular formula is C₂₁H₃₁N₃O₅ and its molecular weight is 441.3 g mol⁻¹. LIS is a white crystalline powder, soluble in water and sparingly soluble in methanol and practically insoluble in acetone and in ethanol. Its specific optical rotation is -43 to -47 [1-3]. LIS is indicated for the treatment of essential and renovascular hypertension. It may be used alone as initial therapy or concomitantly with other classes of antihypertensive agents. It is indicated as adjunctive therapy in the management of heart failure in patients who are not responding adequately to diuretics and digitalis. High doses reduce the risk of mortality and hospitalization [4-5].

Literature studies show some analytical methods reported for the simultaneous estimation of HCTZ and LIS in pharmaceutical formulations [6-10]. However, at the present moment no method for simultaneous determination of these drugs in pharmaceutical capsules is described in the literature. The present work propose the development and validation of a rapid, economical, precise and accurate RP-HPLC method for simultaneous estimation of LIS and HCTZ in pharmaceutical capsules.

Experimental

Chemical and reagents

Pharmaceutical capsules described as containing 12.5 mg HCTZ and 20 mg LIS were supplied by three local magistral pharmacies, coded as A, B and C products. The suppliers have established an expiration date of six months (09/11/2010, 12/05/2010 and 01/01/2011 for products A, B and C, respectively). The compounding capsules were described as containing the following excipients: magnesium stearate, sodium dodecyl sulphate, cobalamin (vitamin B₂), talc, aerosil, starch and magnesium carbonate. HCTZ reference substance of 100.40% purity was purchased from Galena[®] laboratories (Campinas, Brazil). LIS reference substance of 99.40% purity was obtained from a Magistrais[®] (Brazil).

All reagents used in the experimental work were of analytical grade. Disodium hydrogen phosphate was acquired from Cinética[®] (São Paulo, Brazil), sodium hydroxide was supplied by Dinâmica[®] (São Paulo, Brazil), hydrochloride acid was acquired from Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brazil), HPLC grade acetonitrile and HPLC grade methanol were purchased from Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brazil). HPLC grade water used to prepare the mobile phase was prepared by Milli-Q reverse osmosis (Millipore[®], Bedford, USA) and meets United States Pharmacopoeia requirements [11].

Apparatus and chromatographic conditions

The following equipments were used: Shimadzu UV-1601PC (Kyoto, Japan) double beam UV–visible spectrophotometer connected to a computer loaded with Shimadzu UVPC version 3.9 software; 1 cm quartz cuvettes; ultrasonic bath model USC2800A (Unique[®], São Paulo, Brazil); analytical balance model 410 (Kern[®], Kern, Germany); digital pH meter PA 200 (Marconi[®] S.A., Piracicaba, Brazil); vacuum filtration system (Nova Técnica[®], Piracicaba, Brazil) and direct Q purification system (Millipore[®], Bedford, USA). The HPLC equipment used was a Shimadzu[®] series LC-10 A (Kyoto, Japan), consisting of LC AVP pump, CLASS-VP 5.02 integration system, DGU-14 A degasser, 7725i manual injector with a 20 µL loop, SPD-10 AVP integrated UV detector, FCV-10 ALVP valve, CTO-10 AVP column oven and SCL-10 AVP.

Isocratic mobile phase consisted of sodium phosphate buffer at pH 5.0: acetonitrile: methanol (99.2/0.5/0.3, v/v/v). The mobile phase was prepared daily, filtered through a 0.45 µm membrane filter Millipore[®] (Bedford, USA) and degassed using the degasser of the

chromatographic system prior to use. The stationary phase was a NST[®] C-18 150 mm x 4,6 mm x 5 μm analytical column (São Carlos, Brazil). The flow rate was 0.5 mL min⁻¹ and the detector was set at 210 nm. The volume of the sample solution injected was 20 μL . The column oven was set at 50°C. Quantitative VETEC[®] (Rio de Janeiro, Brazil) paper filters and subsequently PTFE-membrane filters (Millipore[®], Bedford, USA) were used to filter solutions before injection into HPLC system.

Preparation of solutions

Stock and working standard solutions of HCTZ and LIS

Stock standard solution containing 140 mg L⁻¹ of HCTZ and 220 mg L⁻¹ of LIS was prepared by accurately weighing 14.0 mg of HCTZ reference substance and 22.0 mg of LIS, then transferring it to a 100 mL volumetric flask and adding 50 mL of 0.1 mol L⁻¹ hydrochloride acid solution. The flask was sonicated for 20 min and the volume was made up with 0.1 mol L⁻¹ HCl. Working standard solutions were prepared immediately before use by suitable dilutions of the corresponding stock solutions to appropriate concentration levels, using 0.1 mol L⁻¹ HCl as the diluent.

Sample capsules solution

Pharmaceutical formulations from three different compounding pharmacies were used and coded as A, B and C. The weight equivalent to one average weighing of each dosage form was transferred into a 100 mL volumetric flask, 50 mL of 0.1 mol L⁻¹ HCl was added and the flask was sonicated for 20 min. The volume of the flask was filled with 0.1 mol L⁻¹ HCl and filtered using quantitative filter. Working sample solutions were prepared immediately before use by suitable dilutions of these solutions to appropriate concentration levels, using 0.1 mol L⁻¹ HCl as the diluent.

Selection of the detection wavelength

The optimum detection wavelength was selected from the UV absorption spectra of individual working solutions of HCTZ at 14 mg L⁻¹ and LIS at 22 mg L⁻¹ in 0.1 mol L⁻¹ HCl. Spectrophotometric measurements were recorded using a Shimadzu spectrophotometer. Spectra were obtained in the UV range of 500-200 nm with a fixed slit width of 2 nm, scan speed of about 3200 nm min⁻¹ and 0.2 nm data interval. A 0.1 mol L⁻¹ HCl solution was used as blank solution.

Method development

In the method development for the simultaneous analysis of HCTZ and LIS, a working standard solution containing HCTZ $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ and LIS at $22 \mu\text{g mL}^{-1}$ was used. A variety of mobile phase composition and pH, column oven, flow rate, as well as different chromatographic columns (C-8 and C-18) were investigated.

Method validation

The optimized chromatographic conditions were validated by evaluating selectivity, linearity, precision, accuracy, and robustness parameters in accordance with the ICH guideline Q2 (R1) [12-13].

Selectivity

Selectivity of the method was evaluated by observing the chromatograms of a work standard solution containing HCTZ at $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ and LIS at $22 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the chromatograms of excipient solutions used by compounding pharmacies (A, B and C).

Linearity

Standard stock solutions of the drugs were diluted to prepare linearity standard solutions in the concentration range of $11\text{--}21 \mu\text{g mL}^{-1}$ of HCTZ and $18\text{--}33 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LIS. Three sets of such solutions at six concentration points were prepared. The mean value of each set was analyzed to plot a calibration curve. Linear equation and coefficient of correlation (r) of the calibration curves were calculated to ascertain linearity of the method.

Precision

Precision was evaluated with respect to both repeatability and intermediate precision. Repeatability was evaluated by analyzing work standard solutions containing 11 , 14 and $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ of HCTZ and 18 , 22 and $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LIS. Three replicates of each solution in 0.1 mol L^{-1} were prepared and assayed. Intermediate precision was studied by repetition of the assays on two different days by two analysts. The percentages of relative standard deviation (R.S.D.) of the analytical responses were calculated.

Accuracy

Recovery of the method was determined by spiking the placebo solutions (A, B and C) with 80%, 100% and 120% standard solutions. These mixtures were analyzed by the proposed

method. The experiment was performed in triplicate. Recoveries (%) and relative standard deviations of spiked drugs were calculated.

Robustness

The robustness was studied by evaluating the effect of small and deliberate variations in the chromatographic conditions. Sample solutions of products A, B and C containing HCTZ at 14 mg L⁻¹ and LIS at 22 mg L⁻¹ were used in these experiments. The conditions studied were flow rate (altered by $\pm 10\%$) and oven temperature (altered by $\pm 10\%$).

Analysis of the marketed products

Determination of average weight

This test was carried out according to the Brazilian Pharmacopoeia, 4th ed. [14-15]. Pharmaceutical products A, B and C were used in these experiments. In each case, 20 capsules were individually weighed and the content of the capsules was removed. The emptied shells were weighed, and the average weight of the contents was obtained by subtracting the weight of the shell from the weight of the full 20 capsules. According to Brazilian Pharmacopoeia, capsules with average mass less than 300 mg comply with the test if not more than 2 of the individual masses deviate from the average mass by more than $\pm 10.0\%$ and none deviates by more than twice this percentage.

Assay of capsules

The validated method was applied to the determination of HCTZ and LIS in capsule dosage forms. Five samples from each local drug store (A, B and C) were analyzed. The results were obtained by comparison of the sample measurements with those obtained from working standard solutions at the same concentration levels. According to Brazilian Pharmacopoeia, the acceptance criterion for finished products is between 90.0% and 100.0% of the amount declared.

Content uniformity test

This test consists of 10 units analyzed individually, as indicated in the monograph assay, unless otherwise specified in content uniformity test. For hard capsules, preparation complies with the test if (unless otherwise specified in monograph) 9 or 10 individual contents are within the limits of 85 % to 115 % of declared amount and none is outside the

limits of 75 % to 125 %. Moreover, the percent relative standard deviation (RSD) between individual contents should be less than 6.0 %. If two or three individual contents are outside the limits of 85 % to 115 % but within the limits of 75 % to 125 % or the RSD between individual contents is higher than 6.0% (or both conditions are met), the individual contents of another 20 dosage units should be determined. The preparation complies with the test if not more than three of the individual contents of the 30 units are outside 85 % to 115 % and none is outside the limits of 75 % to 125 % of the declared amount. Moreover, the RSD between 30 individual contents should be less than 7.8%.

This test was performed as follows: 10 units of each sample (A, B and C) were individually transferred to 100 mL volumetric flasks. Then, 50 mL of 0.1 mol L⁻¹ HCl was added and the flasks were sonicated for 20 min. The volumes of the flasks were filled with the same solvent and the solutions were filtered using quantitative VETEC filter. Aliquots of 5 mL were then transferred to 50 mL volumetric flasks and the volumes of the flasks were filled with 0.1 mol L⁻¹ HCl. Solutions were filtered through 0.45- μ m millex-LCR and injected into the HPLC system. The results were obtained by comparison of each sample peak areas with those obtained from standard solutions at the same concentration levels.

Results and discussion

HPLC method development

The maximum absorption wavelength of both drug solutions was found to be 210 nm. This was observed from the UV absorption spectra (results not shown) and was selected as detection wavelength for HPLC analysis. The reversed-phase HPLC method was developed to provide a specific procedure for the rapid quality control analysis of capsules containing combination of HCTZ and LIS. To find the appropriate HPLC conditions, C 18 and C 8 analytical columns were tried. The chromatographic conditions were optimized by changing the mobile phase composition and pH, mobile phase flow rate and column oven. The mobile phase was checked at different ratios of buffer at pH 2.55, 3.0 and 5.0 with acetonitrile and methanol. Flow rates were tried at 1.0 mL min⁻¹, 0.8 mL min⁻¹; 0.5 mL min⁻¹ and 0.4 mL min⁻¹ and the column oven was studied at 25 °C, 40 °C and 50 °C. Successfully attempts were performed using a reversed phase NST[®] C-18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) column at 50 °C. The mobile phases used was sodium phosphate buffer at pH 5.0: acetonitrile:

methanol (99.2:0.5:0.3 v:v:v), at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The detector was set at 210 nm and the volume of the solution injected was 20 µL. Under the described HPLC parameters, the respective compounds were clearly separated and their corresponding peaks were sharply developed at short retention times (Fig. 3). Having optimised the efficiency of chromatographic separation, the quality of the chromatography was monitored by applying the following system suitability tests: capacity factor, theoretical plates and asymmetry. The observed capacity factor was 1.80 for HCTZ and 2.55 for LIS; theoretical plates were higher than 2 200 and higher than 2 400 for HCTZ and LIS, respectively and asymmetries were 1.09 for HCTZ and 1.14 for LIS. Moreover, relative standard deviations between six injections of a work standard solution containing HCTZ at 14 µg mL⁻¹ and LIS at 22 µg mL⁻¹ was 0.7 % for HCTZ peak and 0.5 % for LIS peak.

Method validation

Selectivity

Selectivity of the method was evaluated by observing the chromatograms of A, B and C excipient solutions and the chromatogram of a work standard solution containing HCTZ at 14 µg mL⁻¹ and LIS at 22 µg mL⁻¹. The chromatograms depicted in Fig. 4 shows that the excipients have negligible contribution of HCTZ and LIS peaks.

Linearity

The calibration plot for the method was linear over the concentration range of 11–21 µg mL⁻¹ for HCTZ and 18–33 µg mL⁻¹ for LIS. The correlation coefficients (r) were 0.9979 and 0.9990 for HCTZ and LIS, respectively. The calibration equations obtained were $y = 52041x - 12122$ for HCTZ and $y = 41038x + 36044$ for LIS. The relative standard deviation were smaller than 2%. The results indicated a linear correlation between concentrations and the area values in the concentration range examined for both drugs.

Precision

The values of the precision studies are shown in Table 1. The % RSD results of precision and intermediate precision for both drugs were within 2.0%, confirming satisfactory precision of the developed analytical method.

Accuracy

The mean recoveries, expressed in terms of percent recovery of the pharmaceutical dosage forms by the assay and the respective relative standard deviations (RSD), were determined. As shown in Table 1, the mean percentage recoveries of products A, B and C for both analytes were in accordance with fixed limits of 98.0 up to 102.0, indicating the suitability of the developed method in quantifying both HCTZ and LIS in pharmaceutical tablets.

Robustness

The robustness test examines the method experimental conditions and the potentially responsible factors such as experimental conditions, which should be taken into account during the method development because changes in the optimal conditions can result in significant errors. The low % RSD values between analyte peak areas when deliberate variations in the chromatographic conditions were carried out demonstrated the robustness of the HPLC assay (Table 1).

Analysis of the marketed products

The pharmaceutical capsule products A, B and C average weights were 139.94 mg, 124.51 mg and 130.76 mg, respectively. All products showed acceptable weight values as stipulated by the Brazilian Pharmacopoeia, which establishes that capsules of ≤ 300 mg should be within $\pm 10.0\%$ w/w from the average weight [14].

According to the Brazilian Pharmacopoeia [14], capsules should contain not less than 90.0 percent and not more than 110.0 percent of the labeled amount of the active principle. The results, expressed as percentage drugs (HCTZ and LIS) related to label claim and their respective R.S.D. are shown in Table 2. The results show that the products A and B were within the specified limit of 90.0 % to 110.0 % of the labeled amount of HCTZ and LIS. However, content of HCTZ in product C was outside the tolerance limit. These values could be attributed to an error in the manipulation process of these capsules.

According to the Brazilian Pharmacopoeia, the uniformity of dosage units can be demonstrated by either of two methods, content uniformity or weight variation. For capsule dosage forms with doses less than 50 mg, the test of content uniformity should be applied. Therefore, in this study, the uniformity of dosage units was determined using the content uniformity method.

The results of the content uniformity studies for capsules described as containing 12.5 mg of HCTZ and 20 mg of LIS are shown in Table 3. The results show that the content of HCTZ in all units of products A and B were within the specified tolerance limit of 85.0 to 115.0%. Moreover, for all products, the percent relative standard deviation (RSD) was less than the tolerance limit of 6.0%. However, individual contents of HCTZ in all units of product C were outside the tolerance limit, which can occur due to an error in weighing this active principle. It was observed that there was no relationship between contents of these capsules and the content of active principle, since all products have been approved in average weight test. Therefore, in addition to weighing error, segregation between drug and excipients can be occurred during the mixing process. The results ruled out the possibility of retest.

Regarding LIS content, all units of products A, B and C were within the specified tolerance limit of 85.0 to 115.0% and percent RSD were less than the tolerance limit of 6.0% in all cases. Passing this test indicates that the process involved in capsules manufacture were conducted properly for LIS content.

Regarding homogenization, one can say that an adequate operation provides a content uniformity at any point of the powder. When two solid materials are mixed and one is in small quantity there is a trend to occur lack of uniformity in some parts of the mixture [16].

The situation described above seems quite close to be observed in this work, since the average weight of capsule contents of all analyzed products is considerably higher than individual contents of HCTZ and LIS, which makes the homogenization process of the mixture a critical step. Finally, the content uniformity test is required for low-dose formulations and could be adopted as a standard practice to establish optimal conditions in capsules manufacture, including the choice of adequate qualitative and quantitative ingredients composition as well as ideal time and process of pharmaceutical ingredients mixing.

Conclusion

The proposed RP-HPLC method for simultaneous determination of HCTZ and LIS in capsules under described conditions is quick, efficient and economical, and met the required parameters for analytical validation. The proposed method can thus be used for routine analysis, quality control of capsules containing these drugs.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Center of Pharmaceutical Equivalence of the Federal University of Alfenas, to the financial support provided by UNIFAL-MG and to the magistral pharmacies that supplied the capsules products A, B and C.

References

- [1] (2009) British Pharmacopoeia, Hydrochlorothiazide official monograph, Lisinopril official monograph, London
- [2] (2008) European Pharmacopoeia, 6th ed., Hydrochlorothiazide official monograph, Lisinopril official monograph, Council of Europe, Strasbourg.
- [3](2006) The Merck Index, 14th, Hydrochlorothiazide; Lisinopril, New Jersey.
- [4]Poldermans D, Glazes R, Kargiannis S, Wernsing M, Kaczor J, Chiang YT, Yen J, Gamboa R, Fomina I (2007) *Clinical Therapeutics* 29:279-289
- [5]Shun-Li W, Chi-Hsiang C, Shan-Yang L (2002) *Chem. Pharm. Bull* 50: 78-82
- [6] Kumar V, Shah RP, Singh S (2008) *J. Pharm. Biomed. Anal* 47:508-515
- [7]Vranić E, Uzunović A (2007) *Bosnian Journal Of Basic Medical Sciences* 7:328-334
- [8]Kumar V, Malik S, Singh S (2008) *J. Pharm. Biomed. Anal* 48:619-628
- [9]Wyszomirska E, Czerwińska K, Mazurek AP (2010) *Acta Poloniae Pharmaceutica* 67:137-143
- [10]Ivanović D, Medenica M, Jančić B, Knežević N, Malenović A, Milić J (2007) *Acta Chromatogr* 18:143-156
- [11] (2008) The United States Pharmacopoeia National Formulary, 31th ed. Hydrochlorothiazide tablets official monograph, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD
- [12] (1996) ICH Q2B, International Conference on Harmonization. Guidance for Industry - Q2b Validation of analytical procedures: methodology. Rockville
- [13] Marques MRC, Brown W (2002) *Rev. Analytica* 1:48-51.
- [14] (1988) *Farmacopéia Brasileira* 4. ed., v.1, v.2, p. v.1.1, v.2.14, v.1.6, São Paulo
- [15] (1996) *Farmacopéia Brasileira* 4. ed., Hidroclorotiazida comprimidos monografia oficial, São Paulo.

Figure Captions

Fig. 1. Chemical structure of HCTZ

Fig. 2. Chemical structure of LIS

Fig. 3. Chromatogram of work standard solution containing HCTZ at $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ and LIS at $22 \mu\text{g mL}^{-1}$. Chromatographic conditions: NST[®] C-18 analytical column as stationary phase, sodium phosphate buffer at pH 5.0: acetonitrile: methanol (99.2/0.5/0.3, v/v/v) as mobile phase, flow rate of 0.5 mL min^{-1} , column oven at 50°C , and UV detection at 210 nm

Fig. 4. Chromatograms of work standard solution containing HCTZ at $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ and LIS at $22 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a), product A excipient solution (b), product B excipient solution (c) and product C excipient solution (d)

Figures

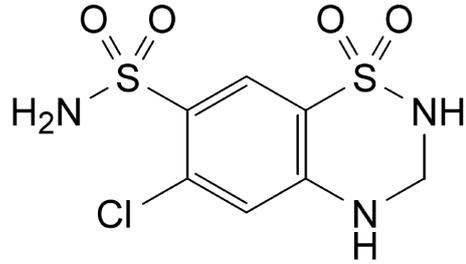


Fig. 1

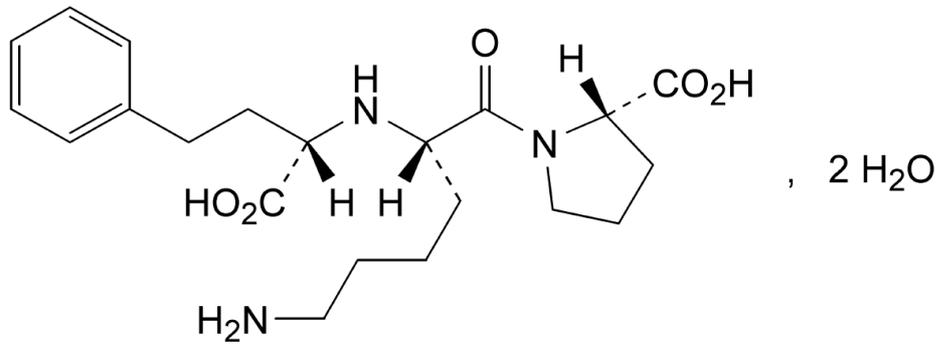


Fig. 2

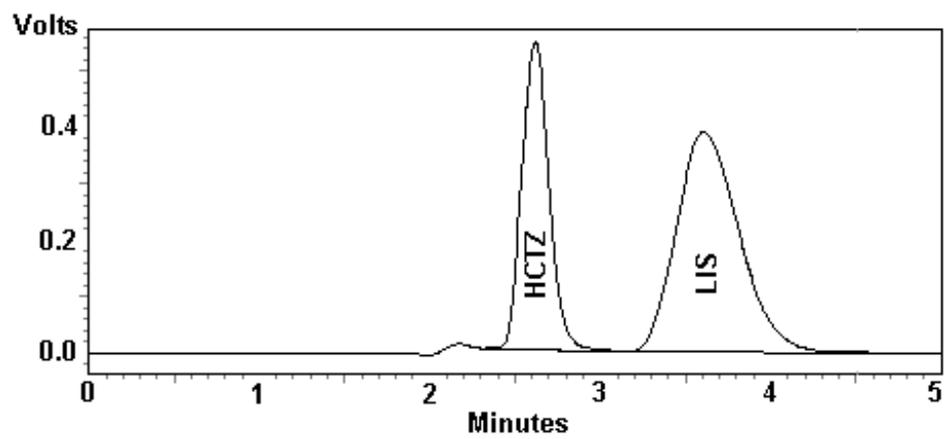


Fig. 3

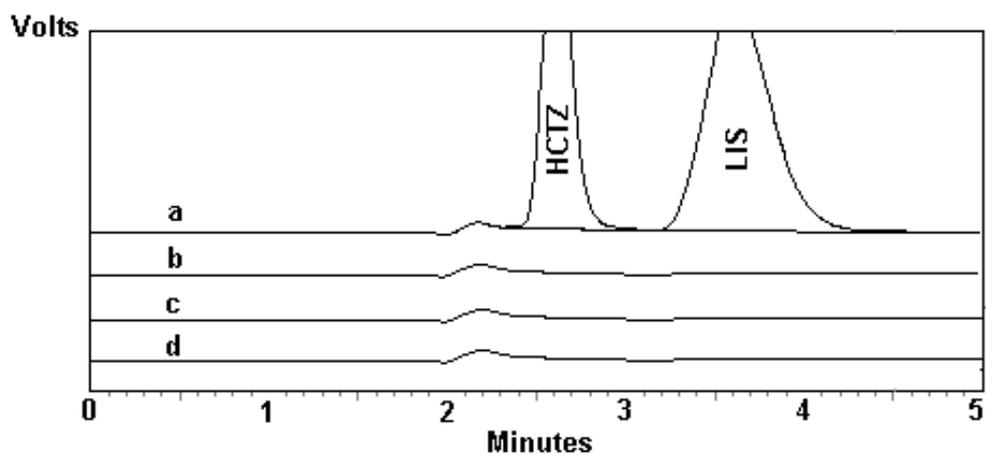


Fig. 4

Table 1. Summary of validation parameters.

Parameter	Condition	Concentration level (mg L ⁻¹)		R. S. D. (%)		Mean recovery (%)	
		HCTZ	LIS	HCTZ	LIS	HCTZ	LIS
Precision							
Repeatability		11	18	1.1	1.0	-	-
		14	22	1.0	0.3	-	-
		21	33	0.8	0.5	-	-
Intermediate precision		11	18	1.0	1.1	-	-
		14	22	1.0	0.4	-	-
		21	33	1.4	0.4	-	-
Accuracy							
Product A		11	18	0.43	0.69	100.94	98.25
		14	22	1.74	1.08	98.90	98.10
		21	33	1.50	1.46	99.07	99.00
Product B		11	18	0.91	0.59	100.59	99.46
		14	22	0.33	0.44	101.80	98.01
		21	33	1.88	0.31	101.58	98.50
Product C		11	18	0.7	0.8	101.47	98.77
		14	22	1.4	0.8	101.72	99.35
		21	33	1.7	1.3	99.63	98.36
Robustness							
	0.4 mL – 45°C	14	22	1.1	0.2	-	-
	0.4 mL – 50°C	14	22	1.3	2.1	-	-
	0.4 mL – 55°C	14	22	2.9	0.3	-	-
	0.5 mL – 45°C	14	22	0.6	0.2	-	-
	0.5 mL – 50°C	14	22	0.4	0.4	-	-
	0.5 mL – 55°C	14	22	0.5	0.2	-	-
	0.6 mL – 45°C	14	22	1.1	0.3	-	-
	0.6 mL – 50°C	14	22	0.4	0.2	-	-
	0.6 mL – 55°C	14	22	0.4	0.1	-	-

Table 2. Assay of HCTZ and LIS in pharmaceutical capsule samples A, B and C

Products	HCTZ			LIS		
	A	B	C	A	B	C
Amount (%)	107.21	94.24	75.98	106.07	99.22	108.19
% of R.S.D. (n = 3)	1.6	1.8	1.8	0.4	1.0	1.4

Table 3. Results of content uniformity studies for capsules described as containing 12.5 mg of HCTZ and 20 mg of LIS

Products	HCTZ			LIS		
	A	B	C	A	B	C
Amount (%)	108.93	87.98	62.81	108.48	108.95	108.10
	108.53	90.55	59.89	105.31	99.59	103.60
	100.64	87.53	54.73	105.57	98.95	109.80
	100.85	83.99	58.18	102.09	108.22	103.89
	99.56	91.96	61.28	109.50	107.57	100.98
	103.91	83.45	62.61	104.51	102.55	98.66
	108.00	84.95	55.13	98.20	96.94	102.76
	106.86	84.73	60.23	109.06	96.10	107.87
	106.60	87.83	59.34	107.62	104.51	99.08
	95.84	87.36	63.65	99.45	107.83	105.28
R.S.D. %	4.3	3.2	5.1	3.8	4.8	3.7

3.2 ARTIGO II

O artigo II consiste no estabelecimento de condições para o ensaio de dissolução de cápsulas contendo a associação de 12,5 mg de hidroclorotiazida e 20 mg de lisinopril. Posteriormente a metodologia foi validada e aplicada para avaliação da liberação de três produtos disponíveis no comércio local. O método de detecção utilizado foi a cromatografia líquida de alta eficiência. O artigo foi submetido à Revista Química Nova e encontra-se em fase de avaliação pelos revisores.

Desenvolvimento e validação de ensaio de dissolução para hidroclorotiazida e lisinopril em cápsulas magistrais

Lindsay Paiva de Araújo ^{a*}, Rudy Bonfilio ^b, Gislaine Ribeiro Pereira ^a, Magali Benjamim de Araújo ^a.

^a Centro de Equivalência Farmacêutica do Núcleo Controle de Qualidade, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000. Alfenas-MG, Brazil.

^b Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, CEP 14801-902. Araraquara-SP, Brazil.

E-mail address: *lindsaypaiva@yahoo.com.br*

Development and validation of dissolution method for hydrochlorothiazide and lisinopril in capsules

ABSTRACT

This work describes the development and validation of dissolution test for hydrochlorothiazide and lisinopril in capsules. The best dissolution *in vitro* profile was achieved using 900 mL of hydrochloride acid as the dissolution medium and basket as the apparatus at 100 rpm. Dissolution study was validated performing using a HPLC method and all parameters were found to be satisfactory (selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness). Thus, it was possible to establish conditions and specifications for dissolution test of hydrochlorothiazide and lisinopril as a tool in quality control.

Keywords: hydrochlorothiazide, lisinopril, capsules, dissolution, validation.

INTRODUÇÃO

A absorção de fármacos após administração oral, a partir de formas farmacêuticas sólidas, depende da sua liberação da forma farmacêutica, da sua dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e de sua permeabilidade através do trato gastrointestinal.¹ Fatores relacionados ao fármaco e formulação, como solubilidade e natureza química do fármaco, polimorfismo, coeficiente de partição, quiralidade, tamanho de partículas, entre outros, tornam o processo de absorção complexo e variável. Qualquer fator que afete a desagregação ou a dissolução pode afetar a biodisponibilidade do fármaco.²

Os estudos de dissolução *in vitro* constituem-se em instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacêuticas das formas farmacêuticas sólidas de uso oral, fornecendo informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento quanto para a produção e controle de qualidade.³ Durante a fase de produção e controle de qualidade permite detectar desvios de fabricação, uniformidade do produto e reprodutibilidade lote a lote.⁴

A hidroclorotiazida ou 6- cloro - 3, 4 - 2H - 1, 2, 4 – benzotiadiazina – 7 – sulfonamida - 1,1 – dióxido (Figura 1) possui fórmula e peso molecular de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ e 297,74 g/mol, respectivamente. Apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco a amarelado, com ponto de fusão entre 273-275°C. É praticamente insolúvel em água, solúvel em acetona, etanol e soluções alcalinas diluídas. É um ácido fraco, com $pK_a = 7,9$ e coeficiente de partição $\log P = -0,07$.⁵⁻⁷ É um diurético tiazídico amplamente utilizado no tratamento de edemas, doença cardíaca congestiva e diversas formas de disfunção renal e hepática. Geralmente é administrada conjuntamente a anti-hipertensivos, com redução efetiva da pressão por mecanismos associados, como a diminuição da resistência periférica.⁸

O lisinopril (Figura 2) ou N-[N-[(S)-1-carboxi-3-fenipropil]-L-lisil]-L-prolina, possui fórmula e peso molecular de $C_{21}H_{31}N_3O_5$ e 405,5 g/mol, respectivamente. Apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco, solúvel em água, ligeiramente solúvel em metanol, praticamente insolúvel em acetona. Possui poder rotatório específico compreendido entre -43 e -47.⁵⁻⁷ É indicado para o tratamento da hipertensão essencial e renovascular. Pode ser usado como monoterapia ou associado a outras classes de agentes anti-hipertensivos. Também é indicado para o controle da insuficiência cardíaca congestiva, como tratamento adjuvante com diuréticos não poupadores de potássio e onde apropriado, digitálicos.⁹

Dentre as associações anti-hipertensivas consideradas eficazes e aplicação na clínica médica tem-se o lisinopril associado à hidroclorotizida em baixas dosagens, indicado para

hipertensão moderada a grave, controlando a pressão sem produzir efeitos colaterais pronunciadas.

As metodologias analíticas apresentadas em códigos oficiais para medicamentos contendo estes fármacos isoladamente consideram a forma farmacêutica de comprimido e recomenda a cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação dos ativos, determinação de impurezas e substâncias relacionadas.¹⁰⁻¹¹ Várias pesquisas vêm sendo realizadas com os ativos isolados para avaliar sua liberação *in vitro*, porém nenhuma delas considera a associação dos fármacos na forma farmacêutica cápsula.¹²⁻¹⁵

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar o ensaio de dissolução para hidroclorotiazida e lisinopril cápsulas magistrais com determinação simultânea por cromatografia líquida de alta eficiência.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Produtos farmacêuticos, substância química de referência e solventes

As cápsulas contendo a associação de hidroclorotiazida 12,5 mg e lisinopril 20 mg foram cedidas por farmácias magistrais de Alfenas e região e foram codificadas em A, B e C, respectivamente, com prazo de validade estabelecido de 6 meses pelos fabricantes (09/11/2010; 05/12/2010 e 01/01/2011, respectivamente).

Foram utilizadas como substância química de referência, hidroclorotiazida padrão de trabalho (Fornecedor Galena, lote HY01091F13, Fab.: 01/09, Val.: 01/13 e teor declarado de 100,4 %) e lisinopril padrão de trabalho (Fornecedor Magistrais, lote L5/0608/002/516, Fab.: 08/06, Val.: 07/11 e teor declarado de 99,4 %).

Os excipientes utilizados pelas farmácias magistrais no processo de manipulação das cápsulas foram estearato de magnésio; lauril sulfato de sódio; vitamina B₂; talco farmacêutico; aerosil, amido e carbonato de magnésio.

Os reagentes utilizados foram ácido clorídrico P.A. (Vetec[®], Brasil), fosfato de sódio monobásico P.A. (Cinética[®], Brasil), hidróxido de sódio pellets P.A. (Dinâmica[®], Brasil), acetonitrila (Vetec[®], Brasil) e metanol (Vetec[®], Brasil) grau HPLC e água Milli-Q.

Foram utilizados filtros de PTFG 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Milipore[®], Brasil) e filtros de papel quantitativo isento de cinzas (Vetec[®], Brasil).

Equipamentos

Foram utilizados balança eletrônica modelo 410 (Kern[®], Alemanha); desintegrador modelo 301-1, série 8906 (Nova Ética[®], Brasil); medidor de pH modelo PA 200 (Marconi[®], Brasil); sistema de filtração a vácuo, constituído de bomba de vácuo (Nova Técnica[®], Brasil); sistema de purificação de água Direct-Q (Millipore[®], Brasil); dissolutor modelo TDT-08L (Electrolab[®], Índia); cromatógrafo à líquido de alta eficiência série LC-10 A (Shimadzu[®], Japão) composto por sistema de Integração CLASS-VP 5.02, bomba modelo LC-10AVP, degaseificador modelo DGU-14A, injetor manual 7725i, com alça de amostragem de 20 µL, detector UV modelo SPD-10AVP, forno modelo CTO-10AVP, controlador modelo SCL-10AVP, válvula FCV-10ALPV e coluna cromatográfica NST[®] C-18 150 mm x 4,6 mm x 5 µm (NST[®], Brasil).

Metodologia

Soluções

Foi utilizado como meio de dissolução ácido clorídrico 0,1 M (HCl), preparado através da adição de 8,5 mL de ácido clorídrico P.A. em 1,0 L de água purificada, sendo posteriormente degaseificado a 41 °C em banho de ultrassom por 30 minutos antes do uso.

A solução estoque de hidroclorotiazida e lisinopril foi preparada em balão volumétrico de 100 mL dissolvendo-se 22 mg de lisinopril e 14 mg de hidroclorotiazida (ambos padrão de trabalho pesados analiticamente) em ácido clorídrico 0,1 M em banho de ultrassom por 20 minutos. Esta solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo. A solução de trabalho foi preparada antes do uso por diluições da solução estoque.

As soluções de placebo foram preparadas dissolvendo-se quantidade exatamente pesada dos excipientes das Farmácias A, B e C, respectivamente, em ácido clorídrico 0,1 M.

Soluções de amostra foram preparadas através da dissolução de uma cápsula em 900 mL de meio de dissolução ácido clorídrico 0,1 M na temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. As amostras foram coletadas ao final de 60 minutos e filtradas em papel de filtro quantitativo, sendo

diretamente injetadas no cromatógrafo à líquido. O volume de injeção foi de 20 µL. Todas as soluções foram previamente filtradas em filtros PTFG de porosidade 0,45 µm e 13 mm de diâmetro antes de serem injetadas.

Condições cromatográficas

A fase móvel utilizada foi constituída de tampão fosfato de sódio monobásico pH 5,0 0,1M: acetonitrila: metanol (99,2:0,5:0,3; V/V/V), com vazão de 0,5 mL/min. A fase móvel foi filtrada à vácuo através de filtros PTFE de 0,45 µm e degaseificada em ultrassom por 30 minutos antes do uso. A temperatura da coluna foi mantida a 50 °C. Os picos foram detectados em 210 nm.

Desintegração

Os medicamentos A, B e C, respectivamente, foram submetidos ao teste de desintegração¹⁶ em aparelhagem específica segundo aos critérios estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira IV.¹⁷ Foram utilizadas seis unidades (cápsulas) de cada farmácia, nas seguintes condições: meio aquoso, temperatura de 37°C ± 1°C e tempo de 30 minutos.

Otimização do ensaio de dissolução

Foram estudadas as seguintes condições para o ensaio de dissolução: ácido clorídrico 0,1 M como meio de dissolução (900 mL a 37 ± 0,5 °C), aparatos pá e cesta em velocidades de 50 e 100 rpm e tempo de coleta das amostras em 30 e 60 minutos. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2x2 (3 farmácias, 2 velocidades de agitação, 2 aparatos e 2 tempos de coleta de amostra) com 6 repetições e comparando-se as médias pelo teste de Scott Knott ao nível de significância de 5 %. Foram comparados os seguintes parâmetros: velocidade de rotação: 50 rpm X 100 rpm; aparato: pá X cesta; tempos de dissolução: 30 min X 60 min.

Após definição dos parâmetros para o ensaio de dissolução, foram realizados os perfis de dissolução das amostras de cada farmácia, retirando-se alíquotas de 5 mL nos tempos de 10, 20, 30, 60 e 120 minutos com reposição do mesmo volume de meio de dissolução HCl 0,1 M a 37°C ± 0,5 °C.¹⁸ As amostras coletadas foram filtradas em papel de filtro quantitativo e, em seguida em dispositivo de PTFE (politetrafluoretileno) de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade e quantificadas por CLAE.

Os perfis de dissolução das amostras das Farmácias A, B e C, respectivamente, foram construídos plotando-se a percentagem de fármaco dissolvido em função do tempo em minutos.

Validação do ensaio de dissolução

O ensaio de dissolução foi validado ¹⁹⁻²² considerando parâmetros de desempenho analítico para a liberação dos ativos: estabilidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

Estabilidade do ensaio de dissolução

Padrão e amostras A, B e C, respectivamente, nas concentrações de 12,5 mg para hidroclorotiazida e 20 mg para lisinopril foram transferidas para cubas separadas (n=6) contendo 900 mL de ácido clorídrico 0,1 M a $37 \pm 0,5$ °C e agitadas por 2 horas a 100 rpm utilizando cesta como aparato. Alíquotas foram coletadas e analisadas em CLAE.

Seletividade

Para determinar a seletividade, amostras de excipientes e de cápsulas vazias (A, B e C) foram transferidas para cubas separadas (n=6) contendo 900 mL de ácido clorídrico 0,1 M a $37 \pm 0,5$ °C e agitadas por 60 minutos a 150 rpm utilizando cesta como aparato. Alíquotas foram coletadas e analisadas em CLAE.

Linearidade

Foram realizados 3 ensaios de linearidade para hidroclorotiazida padrão de trabalho nas concentrações de 3, 7, 10, 15, 16 e 17 µg/mL e lisinopril padrão de trabalho nas concentrações de 4, 11, 15, 22, 24 e 26 µg/mL, em triplicata (n=18). A quarta curva analítica foi construída plotando-se os valores médios das áreas obtidas nos ensaios, em triplicata, em função das concentrações. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram calculados utilizando-se o método dos mínimos quadrados.

Repetibilidade intra-ensaio e precisão intermediária (inter-ensaio)

O ensaio de repetibilidade ²⁰ para a dissolução foi conduzido através da análise de 6 amostras de cada produto (A, B e C) nas condições já padronizadas para o método de dissolução. Alíquotas foram coletadas e analisadas em CLAE. A precisão intermediária foi

avaliada de forma similar, porém por um segundo analista em um dia diferente (n = 12). A estimativa do DPR % dos ensaios foi determinada.

Exatidão

A exatidão do ensaio de dissolução²⁰ foi determinada pela adição de 6,25 mg; 8,75 mg e 15 mg de hidroclorotiazida padrão de trabalho e de 10 mg; 14 mg e 24 mg de lisinopril padrão de trabalho (valores equivalentes a 50 %, 70 % e 120 % da concentração rotulada); respectivamente, em cubas contendo 900 mL de ácido clorídrico 0,1 M a $37 \pm 0,5$ °C e quantidade correspondente de excipientes de cada produto A, B e C, respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicata (n = 9) para cada produto. Alíquotas foram coletadas, quantificadas por CLAE e determinados os percentuais de recuperação.

Robustez

A robustez foi avaliada, submetendo-se os produtos A, B e C, respectivamente, a diferentes condições de ensaio de dissolução, com alteração do tempo de coleta e rotação. Os resultados foram interpretados pela estimativa de desvio padrão relativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desintegração

O teste de desintegração permite verificar se comprimidos e cápsulas se desintegram dentro do limite de tempo especificado, quando seis unidades do lote são submetidas à ação de aparelhagem específica sob condições experimentais descritas. A desintegração é definida, para os fins desse teste, como estado no qual nenhum resíduo das unidades testadas (cápsulas ou comprimidos) permanece na tela metálica do aparelho de desintegração, salvo fragmentos insolúveis de revestimento de comprimidos ou invólucros de cápsulas, de acordo com especificações da Farmacopéia Brasileira.¹⁷ O tempo de desintegração foi de 2 minutos para as farmácias A e B, respectivamente e de 3 minutos para a farmácia C, atendendo a especificação farmacêutica.

Otimização do ensaio de dissolução

Os compêndios oficiais ^{6,10,11} registram as monografias individuais para ambos os fármacos, preconizando como meio de dissolução o ácido clorídrico 0,1 M, permitindo a sua utilização como meio de dissolução na determinação simultânea dos fármacos, simulando à condição gástrica.

Delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2x2 (aparato pá e cesta, velocidades de agitação de 50 e 100 rpm e tempos de coleta 30 e 60 minutos) foi utilizado e, para a análise estatística dos resultados, o teste de Scott Knott ao nível de 5%.

Comparando-se os resultados, verificou-se que houve diferença significativa ($P < 0,05$) ao se modificar aparato, rotação, tempo de dissolução e quanto à interação dupla entre aparato e rotação.

Para a variável hidroclorotiazida, as melhores condições estudadas foram aparato cesta, rotação de 100 rpm e tempo de coleta em 60 minutos, sendo atingida uma maior percentagem de cedência do fármaco. Ao se estudar a variável lisinopril, observou-se que as melhores condições foram aparato cesta, rotação de 50 rpm e o tempo não apresentou diferença significativa entre a percentagem de fármaco liberada em 30 ou 60 minutos. A interação dupla (aparato x rotação) não foi significativa para este ativo, assim, por se tratar de uma associação, optou-se pelas condições padronizadas para a hidroclorotiazida na tentativa de avaliar o comportamento de liberação do lisinopril, otimizando as condições do ensaio de dissolução para a associação.

Realizou-se o perfil de dissolução retirando-se alíquotas nos tempos de 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 minutos para avaliação do comportamento de cedência de ambos os fármacos. A Figura 3 ilustra o perfil de dissolução de fármacos com determinação simultânea. Na avaliação dos perfis de dissolução, verificou-se que os valores de percentagem de cedência do fármaco para a hidroclorotiazida foram superiores a 85 % em 30 minutos de teste, liberando lentamente ainda ao final de 60 minutos. Observando-se o comportamento do lisinopril, após 10 minutos houve liberação de aproximadamente 80 % do valor rotulado do fármaco. O DPR % entre as cubas de um mesmo tempo de coleta foram menor que 20 % no primeiro ponto de coleta e menor que 10 % nos pontos seguintes.¹⁸ Estabelecidas as condições para o ensaio de dissolução, procedeu-se à realização dos perfis de dissolução das amostras A, B e C; respectivamente. Os tempos de coleta foram 10, 20, 30, 60 e 120 minutos, atendo às especificações da RE nº 901 da ANVISA ²¹ para no mínimo 5 pontos de coleta e o último ponto sendo o dobro do anterior.

As Tabelas de 1 a 3 demonstram as percentagens de cedência de cada fármaco dos produtos A, B e C, respectivamente. As figuras 4 e 5 ilustram os perfis de dissolução de ambos os fármacos das diferentes farmácias.

As farmácias A e C utilizam estearato de magnésio e talco farmacêutico como excipiente, sendo o estearato de magnésio utilizado como lubrificante de cápsulas em concentrações de 0,25 a 1 %. Por ser hidrofóbico, a quantidade de estearato de magnésio empregada pode retardar a dissolução de cápsulas. Uma alta concentração de estearato de magnésio e um tempo longo de mistura, pode resultar na formação de um leito hidrofóbico na mistura do pó que não se dispersa após a dissolução do invólucro da cápsula, podendo retardar a penetração dos fluidos gastrintestinais e reduzir a dissolução e absorção do fármaco,²³ o que foi observado durante a dissolução da amostra C, demonstrado através das baixas percentagens de cedência dos fármacos no ensaio de dissolução (Tabela 3). Um agente tensoativo, como o lauril sulfato de sódio é recomendado neste caso para superar este problema através do favorecimento da molhagem da mistura de pós pelos fluidos gastrintestinais, aumentando a dissolução e a biodisponibilidade de fármacos veiculados em formas farmacêuticas sólidas, porém esse excipiente foi utilizado apenas nas amostras A. O talco é usado como agente diluente (5 – 30 %) para cápsulas e comprimidos, devido ao efeito secante (absorvente) e lubrificante, é hidrofóbico e um retardante da dissolução, podendo reduzir a dissolução de fármacos pouco solúveis.²³

As farmácias A e C, respectivamente, fazem uso do talco farmacêutico como excipiente, porém a farmácia A tem como recurso o uso de lauril sulfato de sódio para aumentar a dissolução, não sendo esta afetada pela ação dos excipientes acima mencionados, o que pode ser visto através da liberação gradual dos fármacos (Tabela 1). Já a farmácia C, faz ainda uso de carbonato de magnésio e aerosil como excipientes, como o carbonato de magnésio também tem propriedades absorventes, ela poderia substituir em sua formulação o estearato de magnésio - que retarda a dissolução, por lauril sulfato de sódio a fim de melhorar a biofarmacêutica dos fármacos (Tabela 3).

A farmácia B faz uso apenas de amido e aerosil como excipientes. O amido é usado como diluente para cápsulas e o aerosil como adsorvente, dessecante, deslizante, agente suspensor, agente de viscosidade e agente anti-caking; não possuindo ações significativas na dissolução de cápsulas.²³ Porém, ao se observar as percentagens de cedência (Tabela 2) verifica-se que há liberação muito rápida dos ativos, pois em 20 minutos houve a liberação de mais de 85 % dos ativos; uma sugestão seria a utilização da menor concentração usada de

estearato de magnésio (0,25 %) ou talco farmacêutico (1 - 10 %) para retardar um pouco mais a dissolução.

Validação da metodologia

Estabilidade do ensaio de dissolução

As soluções de hidroclorotiazida 14 µg/mL e lisinopril 22 µg/mL, padrão de trabalho, e as soluções das amostras A, B e C, respectivamente, permaneceram estáveis após o teste de dissolução de 2 horas.

Seletividade

A Figura 6 representa o cromatograma dos excipientes, das cápsulas vazias das amostras A, B e C, respectivamente e do padrão de hidroclorotiazida e lisinopril nas concentrações de 14 e 22 µg/mL, onde se verifica que não houve a interferência dos excipientes no tempo de retenção dos ativos. O mesmo ocorreu com a análise dos invólucros, demonstrando que o ensaio e o método de análise é seletivo para a dissolução das cápsulas das farmácias em estudo.

A seletividade foi confirmada para os excipientes estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio, vitamina B₂, talco farmacêutico, aerosil, amido e carbonato de magnésio. Como há grande heterogeneidade nos excipientes envolvendo os processos de manipulação, a seletividade deve ser confirmada caso o processo de manipulação envolva excipientes diferentes dos citados acima, o que poderá representar limitação e desvantagem para a aplicação do método proposto.

Linearidade

Os resultados de linearidade foram avaliados por meio da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Foi obtido um coeficiente de correlação linear (r) de 0,9980 para hidroclorotiazida padrão de trabalho nas concentrações de 3, 7, 10, 14, 15 e 17 µg/mL e de 0,9985 para lisinopril padrão de trabalho nas concentrações de 4, 11, 15, 22, 24 e 26 µg/mL. A equação da reta obtida foi $y = 15772x + 75544$ e $y = 17316x + 11037$ para hidroclorotiazida e lisinopril, respectivamente. A estimativa do desvio padrão relativo entre as replicatas de cada concentração foi inferior a 2%. Os resultados obtidos indicam a existência

de correlação linear entre as concentrações e os valores de área obtidos na faixa de concentração analisada para os dois ativos.

Repetibilidade (intra-ensaio) e precisão intermediária (inter-ensaio)

Os valores médios das estimativas de desvio padrão relativo de 1,3 %, 4,8 % e 4,1 % para amostras de hidroclorotiazida das farmácias A, B e C; respectivamente, indicam boa precisão ao se analisar amostras do ativo no mesmo dia, também sendo observado para as amostras lisinopril das farmácias A, B e C, gerando respostas de 2,3 %, 2,0 % e 4,8 % respectivamente. A precisão também é satisfatória quando analisado em dias diferentes por analistas diferentes, com respostas de 4,5 % 4,5 % e 3,4 % para amostras de hidroclorotiazida A, B e C e 3,8 % 2,8 % e 5,0 % para amostras A, B e C de lisinopril, respectivamente. São aceitáveis valores de desvio padrão relativo igual ou abaixo de 5 % (Brasil, 2003a).

Exatidão

A exatidão do ensaio foi avaliada pelo teste de recuperação. Foram encontrados valores médios de recuperação para hidroclorotiazida de 103,57 % para as amostras da Farmácia A; 101,99 % para as amostras da Farmácia B e 103,20 % para as amostras da Farmácia C, indicando exatidão adequada. Para lisinopril, foram encontrados valores médios de recuperação de 97,86 % para a Farmácia A; 98,77 % para a Farmácia B e 98,52 % para a Farmácia C. Na tabela 4 estão demonstrados os valores das estimativas do DPR % obtido para cada concentração assim como as percentagens de recuperação. A estimativa do desvio padrão relativo entre as replicatas de cada concentração foi inferior a 2 %. A recuperação deve estar entre 95 a 105 %, indicando boa recuperação para o ensaio dos ativos. ⁴

Robustez

A robustez foi verificada pelos valores das estimativas de desvio padrão relativo entre as percentagens de cedência de hidroclorotiazida e lisinopril, amostras A, B e C, respectivamente, submetidas a diferentes condições do ensaio de dissolução comparadas à condição padronizada. Os valores das estimativas de DPR % foram abaixo de 2 %, indicando robustez para o ensaio (Tabela 5).

CONCLUSÃO

O desenvolvimento do ensaio de dissolução para hidroclorotiazida e lisinopril associados, em cápsulas de liberação imediata de 12,5 mg e 20 mg respectivamente, padronizou a utilização de ácido clorídrico 0,1 M (900 mL, a 37 °C ± 0,5 °C) como meio de dissolução, aparato cesta, velocidade de agitação de 100 rpm e tempo de coleta de 60 minutos fornecendo resultados satisfatórios com boa capacidade de liberação dos fármacos.

O ensaio de dissolução e o método de quantificação por CLAE foram validados demonstrando estabilidade, seletividade, precisão, exatidão e linearidade nas faixas de trabalho consideradas.

Este estudo demonstra a importância de um método oficial para o ensaio de dissolução envolvendo associações de fármacos, prática comum na manipulação magistral, constituindo subsídio para a elaboração de monografia farmacopéica para ser aplicada na rotina de controle de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro do Centro de Equivalência Farmacêutica do Núcleo de Controle de Qualidade (CEFAR NCQ/UNIFAL – MG), a UNIFAL – MG pelo suporte financeiro e as farmácias de manipulação A, B e C que cederam as amostras de hidroclorotiazida 12,5 mg e lisinopril 20 mg na forma farmacêutica cápsula.

REFERÊNCIAS

1. Ansari, M., M. Kazemipour, Talebnia, J. *Diss. Technol.* **2004**, 8, 16.
2. Storpirtis, S.; Oliveir,a P.G; Rodrigues, D., Maranhão, D. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **1990**, 35, 16.
3. Manadas, R.; Pina, M.E.; Veiga, F. *Rev. Bras. Cien. Farm.* **2002**, 38, 375.
4. Marques, M. R. C; Brown, W. *Rev. Analytica*, **2002**, 1, 48.

5. *British Pharmacopoeia*, The Stationery Office: London, 2009.
6. *European Pharmacopoeia*, 6th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2008.
7. *The Merck Index*: 14th. New Jersey: Merck & Co., 2006.
8. Polderman, S, D. *Clinical Therapeutics*, **2007**, 29, 279.
9. Shun-Li W.; Chi-Hsiang C.; Shan-Yang L. *Chem. Pharm. Bull*, **2002**, 50, 78.
10. *Farmacopéia Brasileira*, 4. ed., Atheneu: São Paulo 1996.
11. *The United States Pharmacopoeia National Formulary*, 31th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, INC, 2008.
12. Harris, D. et al. *Int. J. Pharm.*, **1989**, 56, 97.
13. Lamolha, M. A.; Serra, C. H. R.. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, **2007**, 43, 435.
14. Lima, A. C. et al. *Acta Farm. Bonaerense*, **2005**, 25, 104.
15. Mahle, F. et al. *Rev. Ciênc. Farm. Básica. Apl.*, **2008**, 28, 265
16. Storpirtis, S.; Consiglieri, V.O. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, **1995**, 31, 63.
17. *Farmacopéia Brasileira*, 4a ed., Atheneu: Rio de Janeiro, 1988.
18. International Conference on Harmonization. Dissolution Test General Chapter Q4B Annex 7. 2008.
19. International Conference on Harmonization. Guidance for Industry - Q2b Validation of analytical procedures: methodology. 1996.
20. Azevedo, R. C. P., Pereira, G. R., Araújo, M. B. *Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas*, Universidade Federal Alfenas, Brasil, 2007.
21. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - RE nº 901 de 29 de maio de 2003. DOU, 2003.
22. Bonfilio, R., Mendonça, T. F., Pereira, G. R., Araújo, M. B., Tarley, C. R. T. *Química Nova*, **2010**, 33, 2, 377.
23. Ferreira, A. O. *Guia prático da farmácia magistral*. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2010, cap. 3.

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química da hidroclorotiazida.

Figura 2. Estrutura química do lisinopril.

Figura 3. Perfil de dissolução de hidroclorotiazida e lisinopril associados utilizando HCl 0,1 M como meio de dissolução, aparato cesta, velocidade de rotação de 100 rpm e tempo de 60 minutos.

Figura 4. Perfil de dissolução de hidroclorotiazida utilizando HCl 0,1 M como meio de dissolução, aparato cesta, velocidade de rotação de 100 rpm e tempo de 120 minutos.

Figura 5. Perfil de dissolução de lisinopril utilizando HCl 0,1 M como meio de dissolução, aparato cesta, velocidade de rotação de 100 rpm e tempo de 120 minutos.

Figura 6. Cromatogramas das soluções de hidroclorotiazida (14 µg/mL) e lisinopril (22 µg/mL), excipientes das amostras A, B e C e seus respectivos invólucros na avaliação da seletividade.

Figuras

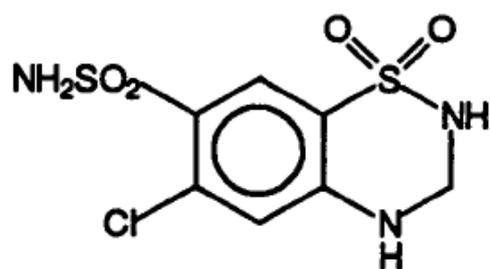


Figura 1

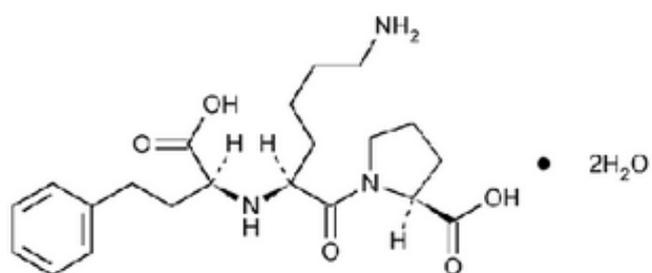


Figura 2

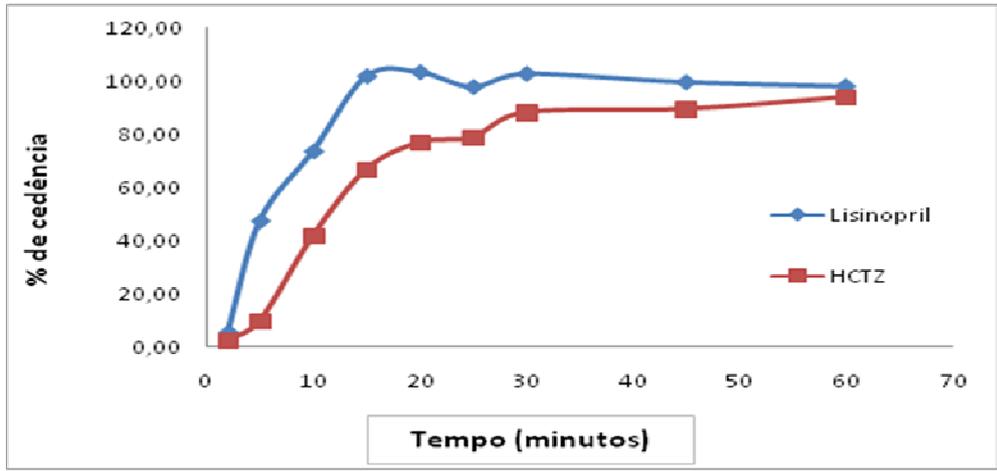


Figura 3

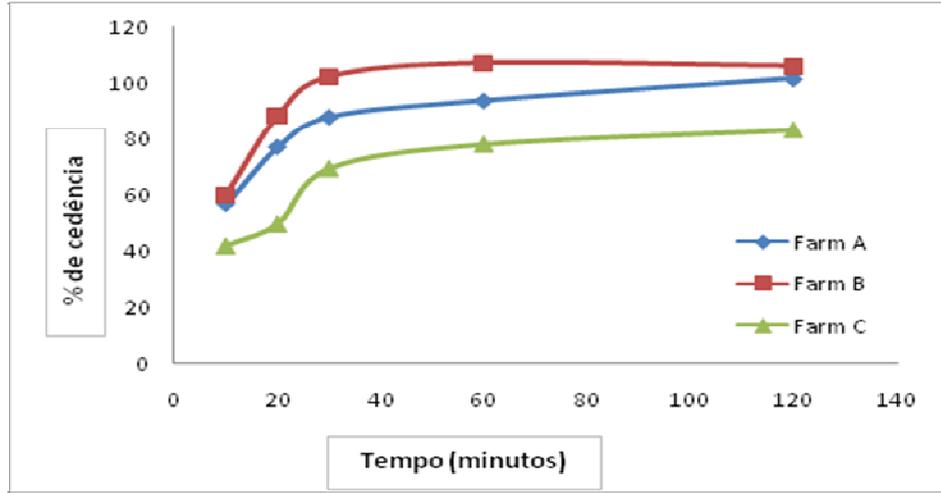


Figura 4

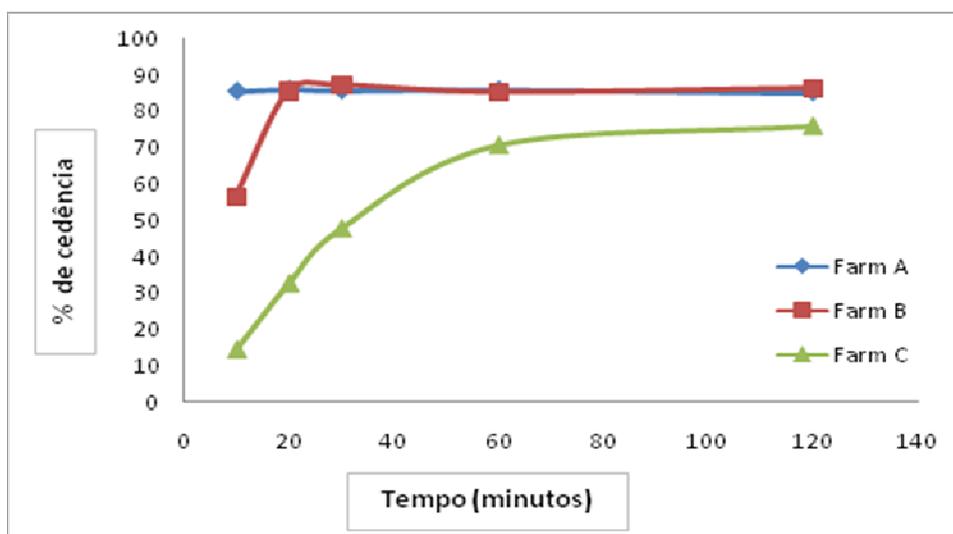


Figura 5

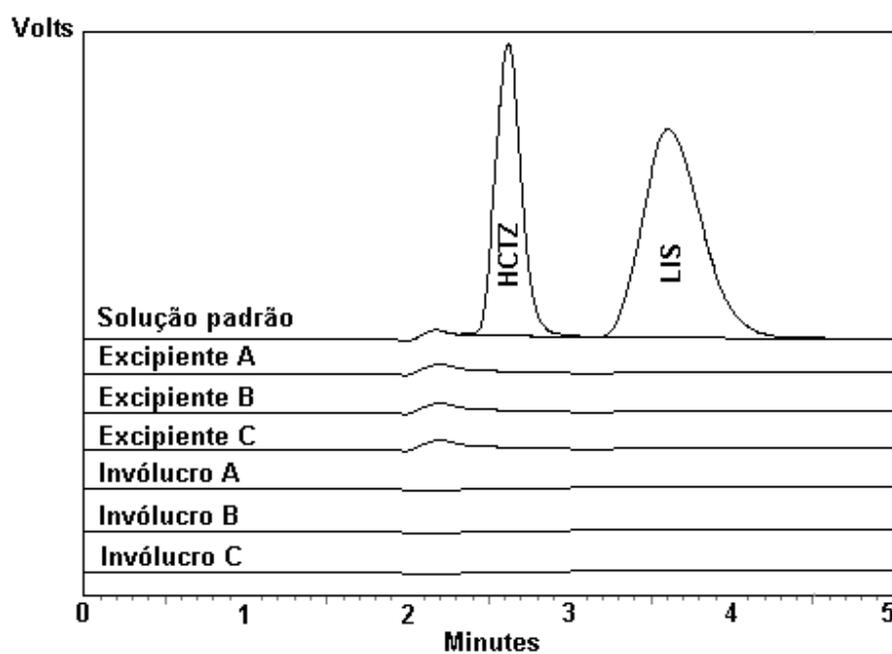


Figura 6

Tabela 1. Valores médios de percentagem de cedência para o perfil de dissolução de hidroclorotiazida e lisinopril associados, Farmácia A - utilizando HCl 0,1 M como meio de dissolução, aparato cesta, velocidade de agitação de 100 rpm.

Hidroclorotiazida					
Tempos coleta	10'	20'	30'	60'	120'
DPR %	10,3	5,8	2,0	5,0	4,1
% liberada (média)	56,58	77,01	87,98	93,89	101,88
Lisinopril					
Tempos coleta	10'	20'	30'	60'	120'
DPR %	5,7	4,1	2,6	4,2	2,9
% liberada (média)	56,62	85,66	87,31	85,41	86,47

Tabela 2. Valores médios de percentagem de cedência para o perfil de dissolução de hidroclorotiazida e lisinopril associados, Farmácia B - utilizando HCl 0,1 M como meio de dissolução, aparato cesta, velocidade de rotação de 100 rpm.

Hidroclorotiazida					
Tempos coleta	10'	20'	30'	60'	120'
DPR %	12,8	9,6	5,6	5,0	3,7
% liberada (média)	60,08	88,32	102,29	107,14	106,05
Lisinopril					
Tempos coleta	10'	20'	30'	60'	120'
DPR %	8,7	3,8	2,8	2,7	3,1
% liberada (média)	85,51	85,98	85,70	85,87	85,21

Tabela 3. Valores médios de percentagem de cedência para o perfil de dissolução de hidroclorotiazida e lisinopril associados, Farmácia C - utilizando HCl 0,1 M como meio de dissolução, aparato cesta, velocidade de rotação de 100 rpm.

Hidroclorotiazida					
Tempos coleta	10'	20'	30'	60'	120'
DPR %	19,0	10,0	6,9	10,0	9,5
% liberada					
(média)	41,98	49,82	69,34	77,89	83,08
Lisinopril					
Tempos coleta	10'	20'	30'	60'	120'
DPR %	16,7	7,7	7,0	5,8	5,2
% liberada					
(média)	14,32	32,54	47,64	70,65	75,91

Tabela 4. Valores correspondentes à exatidão do ensaio de dissolução para hidroclorotiazida e lisinopril associados, utilizando HCl 0,1 M como meio de dissolução, aparato cesta, velocidade de agitação de 100 rpm e tempo de coleta em 60 minutos.

Ativo	Produto	Adicionado (mg)	Encontrado (mg)	DPR %	Recuperação
Hidroclorotiazida	A	6,9	7,16	0,8	103,82
	A	9,3	9,69	1,3	104,16
	A	15,8	16,23	1,4	102,74
	B	6,5	6,29	1,7	96,72
	B	9,0	9,40	1,4	104,47
	B	15,0	15,72	0,6	104,79
	C	6,5	6,80	1,1	104,70
	C	9,1	9,42	1,5	100,46
	C	15,2	15,26	0,6	100,43
Lisinopril	A	9,9	9,52	1,7	96,15
	A	15,2	15,01	1,6	98,78
	A	16,2	15,98	1,2	98,66
	B	10,0	9,56	1,7	95,63
	B	14,3	15,01	1,3	104,94
	B	24,0	22,97	0,9	95,73
	C	11,0	10,89	1,0	99,01
	C	14,0	13,65	0,4	97,48
	C	24,0	23,78	0,7	99,07

Tabela 5. Valores correspondente à robustez do ensaio de dissolução de hidroclorotiazida e lisinopril associados, utilizando HCl 0,1 M como meio de dissolução, aparato cesta, velocidade de rotação de 50 e 100 rpm e tempos de coleta em 60 e 120 minutos.

Produto	Rotação (rpm)	Tempo (min)	% cedência (média) HCTZ	% cedência (média) LIS	DPR % HCTZ	DPR % LIS
A	50	60	99,13	83,71	0,5	1,4
A	50	120	101,88	84,52	1,4	0,7
A	100	120	97,92	86,47	1,4	0,9
A	100	60	99,89	85,41	Condição otimizada	
B	50	60	105,17	84,13	1,3	1,4
B	50	120	104,21	84,10	2,0	1,5
B	100	120	106,05	85,21	0,7	0,5
B	100	60	107,14	85,87	Condição otimizada	
C	50	60	76,90	69,15	0,9	1,5
C	50	120	80,13	71,12	2,0	0,5
C	100	120	80,08	71,98	2,0	1,32
C	100	60	77,89	70,65	Condição otimizada	

4 CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo propôs o desenvolvimento e validação de um método por cromatografia líquida de fase reversa, demonstrando ser rápido, econômico, preciso e exato para a análise simultânea de hidroclorotiazida e lisinopril cápsulas magistrais, fornecendo subsídios para a elaboração de uma proposta de monografia farmacopéica (Apêndice A) para os ensaios de doseamento e dissolução dos fármacos associados para seu uso em laboratório de controle de qualidade, visto que não há metodologia oficial descrita para a associação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. **Dissolution**. In: Remington: the science and practice of pharmacy. 19. ed. Easton: Mack Publishing, 1995. v. 1, p. 593-604.

ABUZARUR-ALOUL, R. et al. Critical dissolution of oral systems based on statistically designed experiments. I. Screening of critical fluids and *in vitro/in vivo* modeling of extended release coated spheres. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, v. 23, n. 8, p. 749-760, 1997.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharm. Res.**, Ann Arbor, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANSARI, M.; KAZEMIPOUR, M.; TALEBNIA, J. The development and validation of a dissolution method for clomipramine solid dosage forms **Diss. Technol**, Hong Kong, v. 8, p.16-24, 2004.

ARAÚJO, L. M. B.; BRITTO, M. M. S.; CRUZ, T. R. C. Tratamento do Diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 44, n. 6, p. 509-518, 2000.

AZEVEDO, R. C. P.; PEREIRA, G. R.; ARAÚJO, M. B. **Estudo da liberação *in vitro* de captopril cápsulas magistrais por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2007. 180f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal Alfenas, Alfenas, 2007.

BANAKAR, U.V. **Pharmaceutical dissolution testing**. New York: Marcel Dekker, 1992, 437 p.

BONFILIO, R. et al. Losartan potassium dissolution test for drug release evaluation in pharmaceutical capsules using HPLC and UV spectrophotometry **Quim. Nova**. v. 33, n. 2, p. 377-383, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 fev. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Cadernos de atenção básica: Hipertensão arterial sistêmica e Diabetes mellitus - protocolo**. Caderno 7, Brasília, DF: Ministério da saúde, 96 p., 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 901 de 29 de maio de 2003. Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (*FFSOLI*). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003b.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Nefrologia, Sociedade Brasileira de Cardiologia e Sociedade Brasileira de Hipertensão. **V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial**, São Paulo, SP. 2006. 55 p. Disponível em: <<http://groups.google.com.br/group/adhiro-diabeticos/web/dicas-saudveis>>. Acesso em 23 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Bulário Eletrônico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Clorana®: Hidroclorotiazida**. Sanofi-Aventis, São Paulo, SP Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[26377-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[26377-1-0].PDF)>. Acesso em: 15 abr. 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Bulário Eletrônico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Zestril®: Lisinopril**. Astrazeneca: Cotia, SP. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25448-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25448-1-0].PDF)>. Acesso em: 15 abr. 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Bulário Eletrônico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Prinzide®: Lisinopril/Hidroclorotiazida**. Merck Sharp & Dohme: Campinas, SP. Disponível em: < [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25932-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25932-1-0].PDF) >. Acesso em: 15 abr. 2009c.

BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationery Office, 2009. vol. 2, p.1011, 1227.

BROWN, C. K. et al. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharm. Technol.**, v. 25, p. 56-62, 2004.

COUTO, A. A.; BOTTEOU, P. R. A. Tratamento da hipertensão arterial sistêmica. **Rev. Bras. Med.**, v. 48, n. 9, p. 588-592, 1991.

CURTIS, M. J.; PUGSLEY, M. K. As drogas e o sistema cardiovascular. In: PAGE, C. et al. **Farmacologia integrada**. 2. ed. Barueri-SP: Manole, 2004. cap. 18, p. 405-406.

ÇELIK, M. The past, present, and future of tableting technology. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 1996.

DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas 2007/08 (DEF). Versão 2.4. Disponível em: <<http://magistralfarma.blogspot.com/2009/03/def-200708-dicionario-de-especialidades.html>>. Acesso em: 09 mar. 2009.

DRESSMAN, J.B. et al. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharm. Res.**, v. 15, n. 1, 1998.

ESQUINAZI, M. A. Treinta años de terapêutica Antihipertensiva. **Rev. Med. Tucumán**, v. 2, n. 4, p. 191-211, 1996.

EUROPEAN Pharmacopoeia, 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2008, p. 2086, 2277.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte 1. p. V.1.1, V.1.4, V.1.5, V.2.17.4.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. Fascículo 1. Parte 2. cap. 33, 33.1, p. 101-104.

FERRAZ, H. G.; CONSIGLIERI, V. O.; STORPIRTIS, S. Avaliação da cinética de dissolução de ampicilina em comprimidos comercializados no Brasil. **Rev. Farm.Bioquim.** São Paulo, v. 34, n. 2, p. 93-99, 1998.

FERREIRA, A. **Guia prático da farmácia magistral.** 4. ed. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2010. v. 1, cap. 5. p. 109-120.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – Center for drug evaluation and research – FDA/CDER. Guidance for industry - Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, *In Vitro* Dissolution Testing, and *In Vivo* Bioequivalence Documentation. 1995. 26 p.

GIBALDI, M. **Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics.** 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, 406 p.

GRAHAME-SMITH, D. G.; ARONSON, J. K. **Tratado de farmacologia clínica e farmacoterapia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 210, 469p.

HARRIS, D. et al. Oral availability of a poorly absorbed drug, hydrochlorothiazide, from a bioadhesive formulation in the rat. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 56, p. 97-102, 1989.

HOFFMAN, B. B. et al. **Farmacologia integrada.** 2. ed. São Paulo: Manole, 2004, p. 396-399.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). Guidance for Industry: validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Versão 4, 27 oct. 1994. 17 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). Evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts for use in the ich regions on Dissolution test general chapter Q4B Annex 7 (R1). Versão 4, 27 sept. 2010. 7p.

IVANOVIĆ, D. et al . Validation of an analytical procedure for simultaneous determination of hydrochlorothiazide, lisinopril, and their impurities. **Acta Chromatographica**, n. 18, p. 143-156, 2007.

JACKSON, E. K. Renina e angiotensina. In BRUNTON, L. L. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2006, p. 715-716.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica & clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.135, 148, 151, 153, 161-163.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. ed. 2007/2008. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap. 13, p. 8.20, 8.23-8.26, 8.30.

KUMAR, V.; SHAH, R.P.; SINGH, S. LC and LC-MS methods for the investigation of polypills for the treatment of cardiovascular diseases.: Part 1. Separation of active components and classification of their interaction/degradation products. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 47, n. 3, p. 508-515, 2008.

KUMAR, V.; MALIK, S.; SINGH, S. Polypill for the treatment of cardiovascular diseases: Part 2. LC-MS/TOF characterization of interaction/degradation products of atenolol/lisinopril and aspirin, and mechanisms of formation thereof. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 619-628, 2008.

LABBADIA, E. M.; CURY JUNIOR, A. J. Hipertensão arterial e atendimento multiprofissional: uma nova forma de abordagem e tratamento do paciente hipertenso. **Rev. Bras. Med. Psicos.**, v. 4, p. 188-193, 1997.

LAMOLHA, M. A.; SERRA, C. H. R. Avaliação das propriedades de fluxo dos granulados e dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida 50 mg obtidos por granulação úmida. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 435-446, jul./set. 2007.

LIMA, A. C. et al. Força de compressão e umidade no perfil de dissolução da hidroclorotiazida. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 104-107, 2006.

LEVY, G. Effect of particle size on dissolution and gastrointestinal absorption rates of pharmaceuticals. **Am. J. Pharm.**, Philadelphia, v. 135, n. 3, p. 78-92, 1963.

MAHLE, F. et al. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida comercializados no Brasil. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 3, p. 265-271, 2008.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 375-400, 2002.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. São Paulo, 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Faculdade de Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M. R. C; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Rev. Analytica**, n. 1, p. 48-51, 2002.

MENEGHINI, L. Z.; ADAMS, A. I. H. Avaliação físico-química de cápsulas de diazepam manipuladas em farmácias magistrais de Passo Fundo/RS. **Rev. Bras. Farm.**, v. 2, n. 88, p. 67-70, 2007.

MINAS GERAIS. Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais. Atenção à Saúde do Adulto – Hipertensão e Diabetes: Saúde em Casa. 1. ed. Belo Horizonte, 2006. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br/publicacoes/linha-guia/linhas-guia/linhas-guia/LinhaGuiaHipertdia.pdf>> Acesso em 27 mai. 2008.

MURTHY, K. S.; GHEBRE-SELLASSIE, I. Current perspectives on the dissolution stability of solid oral dosage forms. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.82, n.2, p.113-126, 1993.

MYCEK, M. J.; HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C. **Farmacologia Ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Art Med, 1998, p. 177, 179, 187-188.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/hpr/NPH/docs/gs_chronic_disease.pdf> Acesso em 16 abr. 2009.

PEIXOTO, M. M. et al. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em Feira de Santana-BA. **Rev. Pharm. Bras.**, Brasília, ano IX, n. 47. p. 69-73, mar/abr/maio 2005.

PEZOA, R.; CONCHA, A. M.; GAETE, G. Disolución de formas farmacêuticas sólidas. **Rev. Col. Quim. Farm.** Santiago, v. 46, n. 2, p. 43-51, 1990.

POLDERMANS, D. et al. Tolerability and blood pressure-lowering efficacy of the combination of amlodipine plus valsartan compared with lisinopril plus hydrochlorothiazide in adult patients with stage 2 hypertension. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n. 2, p. 279-289, fev. 2007.

QURESHI, S.A.; MCGILVERAY, I. J. A critical assessment of the USP dissolution apparatus suitability test criteria. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, New York, v. 21. n. 8, p. 905-924, 1995.

RANG, H. P.; DALE, M. M. e RITTER, J. M. **Farmacologia**, 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p. 331-342; 440-448.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, D. **Estudo comparativo de cápsulas de omeprazol do mercado nacional: avaliação biofarmacotécnica**. São Paulo, 1999. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

ROLIM, C. M. B. **Bioequivalência de comprimidos de nimesulida do mercado nacional**. 2001. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SKOUG, J. W. et al. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharm. Technol.**, New York, v. 1, p. 34-43, 1997.

SMITH, H. L.; BAKER, C. A.; WOOD, J. H. Interpretation of dissolution rate máxima: dependence upon tablet compression force. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 23, p. 536-38, 1971.

SOLTERO, R.A. et al. Effects of sinker shapes on dissolution profiles. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 78, n. 1, p. 35-39, 1989.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol. 43, n. 4, São Paulo, Out./Dez. 2007.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V. O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, São Paulo, v. 31, p. 63-70, 1995.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos**. São Paulo: [s.n.], 1999. 78p.

STORPIRTIS, S. et al. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 35, p.1-16, 1999.

TAKEUCHI, H.; HANDA, T.; KAWASHIMA, Y. Enhancement of the dissolution rate of a poorly water-soluble drug (tolbutamide) by a spray-drying solvent deposition method and disintegrants. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 39, p. 769-73, 1987.

THE MERCK INDEX: 14. ed. New Jersey: Merck & Co., 2006. p. 4785, 5513.

UNITED States Pharmacopoeia National Formulary, 31 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, INC, 2008. p. 2334, 2538.

VRANIĆ, E., UZUNOVIĆ, A. Influence of tablet splitting on content uniformity of lisinopril/hydrochlorthiazide tablets. **Bosnian Journal Of Basic Medical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 328-334, 2007.

WANG, S.; CHUANG, C.; LIN, S. pH-Dependent Coordination of Metal–Lisinopril Complex Investigated by Attenuated Total Reflection/Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Chem. Pharm. Bull**, v. 50, n. 1, p. 78-82, 2002.

WOOD, J.H. *In vitro* evaluation of physiological availability of compressed tablets. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v. 42, n. 3, p. 120-51, 1966.

WYSZOMIRSKA, E., CZERWIŃSKA, K., MAZUREK, A.P. Identification and determination of antihypertensives from the group of angiotensin: Convertase inhibitors by densitometric method in comparison with HPLC method. **Acta Poloniae Pharmaceutica: Drug Research**, v. 67, n. 2, p. -137-143, 2010.

YATES, T. Consideraciones generales sobre solubilidad y disolución de medicamentos. In: ARANCIBIA, A.; PEZOA, R., (Eds.) **Biodisponibilidad de Medicamentos: Simpósio Internacional I**. Santiago: Editorial Universitaria, 1992, p. 165-170.

YU, L. X. et al. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **Intern. J. Pharm.**, v. 270, p. 221-7, 2004.

APÊNDICE A – Proposta de monografia

CÁPSULAS DE HIDROCLOROTIAZIDA E LISINOPRIL

Contém, no mínimo, 90,0 % e no máximo 110,0% da quantidade declarada de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ (hidroclorotiazida) e $C_{21}H_{31}N_3O_5$ (lisinopril).

IDENTIFICAÇÃO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia líquida de alta eficiência* (V.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector de ultravioleta a 210 nm, coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (C18) com partículas de 5 μ m mantida à temperatura de 50 °C e com vazão de fase móvel de 0,5 mL/min.

Solução (1): Pesar 20 cápsulas, remover o conteúdo e pesá-las novamente. A partir do peso médio, pesar a quantidade equivalente a 14 mg de hidroclorotiazida e 22 mg de lisinopril, e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 50 mL de ácido clorídrico 0,1 M e levar ao ultrassom por 20 minutos. Diluir o filtrado para a concentração final de 14 μ g/mL para hidroclorotiazida e 22 μ g/mL para lisinopril utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente.

Solução (2): Pesar quantidade equivalente a 14 mg de hidroclorotiazida e 22 mg de lisinopril, e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 50 mL de ácido clorídrico 0,1 M e levar ao ultrassom por 20 minutos. Diluir o filtrado para a concentração final de 14 μ g/mL para hidroclorotiazida e 22 μ g/mL para lisinopril utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente.

Fase móvel: mistura de tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M pH 5,0; acetonitrila e metanol (99,2:0,5:0,3 v/v/v).

Procedimento: Injetar, separadamente, 20 μ L das soluções (1) e (2). O cromatograma obtido com a *solução (1)* deve ser semelhante ao obtido com a *solução (2)*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de peso (V.1.1). Cumpre o teste.

Desintegração (V.1.4.1). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (V.1.6). Cumpre o teste.

TESTE DE DISSOLUÇÃO (V.1.5)

Meio de dissolução: ácido clorídrico 0,1 M (900 mL)

Aparelhagem: cesta, 100 rpm

Tempo: 60 minutos

Imediatamente após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução e filtrar. Preparar solução padrão na mesma concentração do ensaio de doseamento, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente.

Proceder conforme descrito em *Cromatografia líquida de alta eficiência* (V.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector de ultravioleta a 210 nm, coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (C18) com partículas de 5 µm mantida à temperatura de 50 °C e com vazão de fase móvel de 0,5 mL/min.

Fase móvel: mistura de tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M pH 5,0; acetonitrila e metanol (99,2:0,5:0,3 v/v/v).

Procedimento: Injetar, separadamente, 20 µL das soluções padrão e amostra. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de C₇H₈ClN₃O₄S₂

(hidroclorotiazida) e $C_{21}H_{31}N_3O_5$ (lisinopril). dissolvida no meio a partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

Tolerância: não menos que 85% da quantidade declarada de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ (hidroclorotiazida) e $C_{21}H_{31}N_3O_5$ (lisinopril) se dissolvem em 60 minutos.

ENSAIOS DE PUREZA

Substâncias relacionadas. Proceder conforme descrito no Doseamento. Injetar 20 μ L da *solução amostra*. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de cada impureza a partir da fórmula:

$$100 \times (A_i/A_s)$$

em que: A_i é a área de cada impureza e A_s é a soma das áreas de todos os picos. O limite é 0,2 % para cada impureza e 0,5% para o total de impurezas.

DOSEAMENTO

Por *Cromatografia líquida de alta eficiência* (V.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector de ultravioleta a 210 nm, coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (C18) com partículas de 5 μ m mantida à temperatura de 50 °C e com vazão de fase móvel de 0,5 mL/min.

Fase móvel: mistura de tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M pH 5,0; acetonitrila e metanol (99,2:0,5:0,3 v/v/v).

Solução amostra: Pesar 20 cápsulas, remover o conteúdo e pesá-las novamente. A partir do peso médio, pesar a quantidade equivalente a 14 mg de hidroclorotiazida e 22 mg de lisinopril, e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 50 mL de ácido clorídrico 0,1 M e levar ao ultrassom por 20 minutos. Diluir o filtrado para a concentração final de 14 µg/mL para hidroclorotiazida e 22 µg/mL para lisinopril utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente.

Solução padrão: Pesar quantidade equivalente a 14 mg de hidroclorotiazida e 22 mg de lisinopril, e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 50 mL de ácido clorídrico 0,1 M e levar ao ultrassom por 20 minutos. Diluir o filtrado para a concentração final de 14 µg/mL para hidroclorotiazida e 22 µg/mL para lisinopril utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente.

Procedimento: Injetar, separadamente, 20 µL das soluções padrão e amostra. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ (hidroclorotiazida) e $C_{21}H_{31}N_3O_5$ (lisinopril) a partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.