

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

RUDY BONFILIO

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS
PARA DETERMINAÇÃO DE LOSARTANO POTÁSSICO
EM CÁPSULAS

Alfenas/MG

2009

RUDY BONFILIO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS
PARA DETERMINAÇÃO DE LOSARTANO POTÁSSICO
EM CÁPSULAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a 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

2009

Bonfilio, Rudy.

Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de losartano potássico em cápsulas / Rudy Bonfilio.-Alfenas, 2009.

135 f. : il.-

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Alfenas.

Bibliografia.

1. Losartan. 2. Planejamento experimental. 3. Controle Analítico de Qualidade. 4. Dissolução. I. Título.

CDD: 615.1

RUDY BONFILIO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS
PARA DETERMINAÇÃO DE LOSARTANO POTÁSSICO
EM CÁPSULAS**

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

Aprovada em:

Prof^a:

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof^a:

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof^a: Magali Benjamim de Araújo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** _____

Dedico essa dissertação a Deus, aos meus familiares e amigos pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar a oportunidade de mais uma conquista.

Aos meus familiares, principalmente minha mãe pelo apoio, compreensão e palavras de incentivo.

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

Aos professores César Ricardo Teixeira Tarley e Gislaine Ribeiro Pereira, pela colaboração e importantes sugestões.

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

Ao Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade Federal de Alfenas pelas análises cromatográficas com o detector de arranjo de diodos.

Aos colegas do Mestrado em Ciências Farmacêuticas: Adélia, Daniela, Emiliane, Fernanda, Heleneide, Livia, Mariana e Marina.

Aos amigos Ana Paula, Ivan e Valdomiro pela amizade e incentivo.

À mestranda Taciane Ferreira Mendonça pelo auxílio nas análises, paciência e amizade.

Às farmácias Erva Magia, Santa Terezinha do Menino Jesus e Therapêutica pelas amostras de cápsulas de losartano potássico cedidas.

Ao Curso de Pós-graduação da Universidade Federal de Alfenas pela política de incentivo à produção acadêmica.

À UNIFAL-MG pela bolsa institucional.

Aos bibliotecários pelo suporte durante a elaboração desta dissertação.

E a todos que contribuíram indiretamente.

O único homem que não comete erros é aquele que nunca faz coisa alguma. Não tenha medo de errar, pois você aprenderá a não cometer duas vezes o mesmo erro.

Franklin D. Roosevelt

RESUMO

O losartano potássico é um agente anti-hipertensivo não peptídico, que exerce sua ação por bloqueio específico dos receptores da angiotensina II. Até o presente momento, não há um método oficial descrito para a quantificação do fármaco em formulações farmacêuticas. O objetivo deste estudo foi desenvolver metodologias analíticas para quantificação de losartano potássico em cápsulas e estabelecer condições para realização do teste de dissolução de cápsulas de losartano potássico 50 mg. Para a determinação do teor, dois métodos espectrofotométricos foram propostos: a espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem, utilizando leituras a 205 e 234 nm, respectivamente. O solvente empregado foi água destilada. Além da espectrofotometria foi desenvolvido um método por CLAE, onde os parâmetros cromatográficos foram otimizados de forma multivariada, através do emprego do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} e da matriz de Doehlert. As condições obtidas foram as seguintes: fase móvel composta de uma mistura de tampão fosfato 58 mmol L⁻¹ pH 6,2 e acetonitrila 65:35 v/v, coluna C8, 100 mm × 4,6 mm com partículas de 5 µm, temperatura da coluna de 35°C, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção no UV a 254 nm. Para estabelecer as condições para o teste de dissolução, empregou-se medicamentos manipulados obtidos de três farmácias locais, sendo estes codificados como A, B e C. As condições ótimas foram obtidas de forma multivariada através do planejamento fatorial completo 2^4 . O uso de tampão fosfato 72 mmol L⁻¹, pH = 6,8 (900 mL a 37°C ± 0,5°C) como meio de dissolução, aparato 1 (cesta), velocidade de agitação de 50 rpm e tempo de coleta em 30 minutos foram considerados satisfatórios. As amostras do ensaio de dissolução foram quantificadas por espectrofotometria no UV a 205 nm e por cromatografia líquida de alta eficiência. Os métodos analíticos e ensaios de dissolução descritos foram validados e demonstraram ser seletivos, lineares, precisos, exatos, robustos e com limites de detecção e quantificação desejáveis. Finalmente, todos os métodos foram empregados para ensaios de qualidade das amostras A, B e C e estas mostraram-se dentro dos parâmetros exigidos pelos órgãos regulatórios.

Palavras-chave: losartano potássico, planejamento experimental, controle analítico de qualidade, dissolução.

ABSTRACT

Losartan potassium is a non-peptide angiotensin II receptor (type AT1) antagonist for the treatment of hypertension. At the present moment, there is not an official method described for the quantification of the drug in pharmaceutical formulations. The aim of this study was to develop analytical methods for losartan potassium quantification in capsules and to establish conditions for accomplishment of the dissolution test for losartan potassium capsules 50 mg. Two spectrophotometric methods were proposed for quantification: direct and first order derivative spectrophotometry, with signals at 205 nm of the zero-order spectrum and 234 nm at the first-derivative spectrum. The employed solvent was distilled water. In addition to these methods, an HPLC method was developed, which the chromatographic parameters were optimized from multivariate approach through the employment of a 2^{5-1} fractional factorial design and the Doehlert matrix. Under optimized conditions, the mobile phase was a potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v), pumped at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The column was 100 mm × 4.6 mm C8 packed with 5 μm particles and the temperature was fixed in 35 °C. UV detection was performed at 254 nm. To establish the conditions for accomplishment of the dissolution test for losartan potassium in pharmaceutical capsules products tests A, B and C, purchased from three local drugstores were used. Optimal dissolution conditions were obtained from multivariate design through a 2^4 full factorial design. The use of 72 mmol L⁻¹ potassium phosphate buffer pH 6.8 as dissolution medium, baskets as apparatus at the stirring speed of 50 rpm and time of 30 min were considered satisfactory. The dissolution sample solutions were quantified by UV spectrophotometric method at 205 nm and by HPLC. The described analytical methods and dissolution procedures were validated presenting selectivity, linearity, precision, accuracy, robustness and desirable limits of detection and limits of quantitation. Finally, all the methods were used for quality control assays of the products tests A, B and C, which demonstrated to be in accordance to regulatory demands.

Key words: losartan potassium; experimental design; analytical quality control; dissolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sítio de ação de bloqueadores de receptores da angiotensina II.....	14
Figura 2 - Estrutura do losartano e seus metabólitos E 3179 e E 3174.....	16
Figura 3 - Estrutura química do Losartano potássico – $C_{22}H_{22}ClKN_6O$	17
Figura 4 - Estrutura química dos produtos de degradação do losartano potássico.....	19

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1.1	Agentes anti-hipertensivos.....	11
1.2	Antagonistas do receptor da angiotensina II.....	13
1.3	Losartano potássico.....	15
1.3.1	Características físico-químicas e químicas.....	17
1.3.2	Produtos de degradação.....	18
1.3.3	Propriedades farmacocinéticas.....	20
1.3.4	Posologia.....	22
1.3.5	Superdosagem.....	23
1.3.6	Interações medicamentosas.....	23
1.3.7	Indicações.....	23
1.3.8	Advertências e contra indicações.....	24
1.3.9	Farmacodinâmica.....	25
1.3.10	Reações adversas.....	26
1.4	Métodos analíticos.....	26
1.5	Validação.....	28
1.6	Teste de dissolução.....	32
1.6.1	Fatores que interferem na dissolução.....	34
1.6.1.1	Fatores que interferem na dissolução relacionados ao fármaco e formulação.....	35
1.6.1.2	Fatores que interferem na dissolução relacionados com o equipamento.....	36
1.6.1.3	Fatores que interferem na dissolução relacionados com o meio de dissolução.....	36
1.6.1.4	Fatores que interferem na dissolução relacionados com o meio ambiente.....	37
1.6.1.5	Fatores que interferem na dissolução relacionados com o método analítico.....	37
2	RESULTADOS.....	39
2.1	ARTIGO I.....	40
2.2	ARTIGO II.....	62
2.3	ARTIGO III.....	86
3	CONCLUSÕES.....	119
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
	APÊNDICE A.....	131

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Agentes anti-hipertensivos

A hipertensão arterial sistêmica é a mais comum das doenças cardiovasculares e está associada à elevada morbidade e mortalidade, com custos crescentes (DUNN; SMALL, 2001; CHOBANIAN et al, 2003). É considerada um agravo de grande magnitude em termos econômicos, sociais e de qualidade de vida (WENDHAUSEN; REBELLO, 2004).

No Brasil, aproximadamente 65% dos idosos são portadores de hipertensão arterial sistêmica, sendo que entre as mulheres com mais de 65 anos, a prevalência pode chegar a 80% (JÚNIOR et al, 2006a). Kearney et al estimaram que a prevalência da hipertensão em 2005 era de 26% da população mundial adulta e que em 2025 a prevalência irá aumentar em cerca de 24% em países desenvolvidos e 80% em países em desenvolvimento (KEARNEY et al, 2005; TU; CHEN; LIPSCOMBE, 2008).

Hipertensão é definida como pressão arterial sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mmHg e diastólica (PAD) maior ou igual a 90 mmHg em pelo menos duas tomadas em momentos distintos, seguindo-se as recomendações do *7^o Joint National Committee* (CHOBANIAN et al, 2003; SILVA, 2006).

A hipertensão arterial sistêmica é um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares. Dentre essas, podemos citar o acidente vascular encefálico (SILVA, 2006); a coronariopatia e suas conseqüentes complicações como o infarto do miocárdio e a morte súbita cardíaca; a insuficiência cardíaca e renal e o aneurisma dissecante da aorta (HOFFMAN, 2006). Possui origem multicausal e multifatorial, sendo que o meio ambiente exerce influência na sua gênese e hábitos de vida inadequados são fortes determinantes de valores elevados da pressão arterial (JARDIM; SOUSA; MONEGO, 1996).

A manutenção dos níveis pressóricos normais em um hipertenso é prejudicada por vários fatores, dentre os quais podemos citar: ausência de sintomas na grande maioria dos casos; ausência de “cura”; necessidade de tratamento por toda a vida e necessidade imperiosa de

mudança de estilo de vida, o que envolve educação da condição de pessoas ativas (não pacientes) e equipe multidisciplinar, tarefa pouco estabelecida na prática médica diária (SILVA, 2006).

O tratamento envolve medidas não farmacológicas (por exemplo, aumento do exercício físico, redução do sal e da gordura saturada da dieta com aumento do consumo de frutas e fibras, redução do peso corporal e do consumo de álcool), seguida de introdução gradativa de fármacos, começando por aqueles que possuem comprovado benefício e menor probabilidade de produzir efeitos colaterais (AMODEO; LIMA, 1996; RANG et al, 2004).

O tratamento medicamentoso da hipertensão arterial teve grande avanço no decorrer das últimas décadas e o desenvolvimento de agentes anti-hipertensivos, que restauram a expectativa de vida do indivíduo, representou um grande sucesso terapêutico (RANG et al, 2004). Atualmente, conta-se com medicamentos bastante eficazes e com poucos efeitos colaterais, apesar da falta de adesão ao tratamento (JARDIM; SOUSA; MONEGO, 1996).

O tratamento farmacológico de pacientes com hipertensão associada a pressões diastólicas elevadas diminui a morbidade e a mortalidade decorrentes de doença cardiovascular. A terapia anti-hipertensiva efetiva reduz acentuadamente o risco de acidentes vasculares cerebrais, de insuficiência cardíaca e renal devido à hipertensão. Entretanto, a redução de risco do infarto do miocárdio pode ser menos notável (HOFFMAN, 2006).

Os principais locais de ação dos agentes anti-hipertensivos incluem o sistema nervoso simpático, o sistema renina-angiotensina-aldosterona e os autacóides derivados do endotélio tonicamente ativos (RANG et al., 2004).

Os fármacos utilizados no controle da hipertensão arterial são utilizados como única ferramenta terapêutica ou em associações, sendo que a escolha da terapia é determinada inicialmente pela condição do paciente (idade, etnia, complexidade da hipertensão e contra-indicações) A terapia medicamentosa inicial é a administração de um único princípio ativo e, em caso de insucesso, fármacos de outras classes são adicionados. (SMALL, 2006).

Os fármacos para o tratamento da hipertensão arterial podem ser divididos em 7 distintos grupos ou famílias, a saber: diuréticos, simpaticolíticos de ação central, beta bloqueadores, alfa bloqueadores, antagonistas de canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina e antagonistas do receptor da angiotensina II (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2007). Além dessas

classes existem outros fármacos, dentre os quais podemos citar o nitroprussiato de sódio e a hidralazina (SMALL, 2006).

A classe que compreende os antagonistas dos receptores da angiotensina II são particularmente úteis para pacientes que não toleram os inibidores da enzima conversora de angiotensina em virtude da ocorrência de tosse (RANG et al., 2004). Oferecem várias vantagens sobre os outros agentes anti-hipertensivos, incluindo: alta seletividade, eficácia clínica, tolerabilidade e a conveniência da administração uma vez ao dia (CONLIN, 2001).

1.2 Antagonistas do receptor da angiotensina II

A angiotensina II é um octapeptídeo vasoconstritor extremamente potente, formado a partir da angiotensina I pela enzima conversora de angiotensina (BARREIRO; FRAGA, 2006). Essa substância exerce seu papel na superfície celular, mediante dois tipos de receptores específicos conhecidos como AT₁ e AT₂.

O receptor AT₂ é primariamente embrionário, não sendo encontrado em grande número no indivíduo adulto, e parece não se relacionar com a proteína G. Os seus locais de ligação encontram-se na medula adrenal, pâncreas, ovários, sistema nervoso central e tecidos fetais. O seu papel ainda não está totalmente esclarecido e relaciona-se com a diferenciação de crescimento celular (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007).

Os receptores AT₁ são subdivididos em dois subtipos: AT_{1a} e AT_{1b}. Estes estão relacionados com a proteína G e distribuídos amplamente no organismo, principalmente na camada média muscular e no endotélio dos vasos e ainda rins, fígado, sistema nervoso central, trato gastrintestinal, sistema urinário, córtex adrenal e pulmões. São responsáveis pela maioria dos efeitos conhecidos da angiotensina II por meio da ativação do sistema fosfatidil-inositol/cálcio citosólico, incluindo: vasoconstrição, estímulo da síntese e liberação de aldosterona, estímulo da reabsorção tubular de sódio, aumento da atividade simpática e indução do crescimento muscular liso (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007).

O bloqueio seletivo de receptores AT₁ é um meio efetivo e altamente específico de inibir os efeitos fisiológicos da angiotensina II o que impede os efeitos cardiovasculares deletérios da

angiotensina II (CONLIN, 2001) e ainda evita a interferência com outros sintomas biológicos, o que poderia ocasionar alguns efeitos colaterais (tosse) como ocorre com os inibidores da enzima conversora de angiotensina. A Figura 1, a seguir, esquematiza o mecanismo de ação dos bloqueados de receptores para angiotensina II.

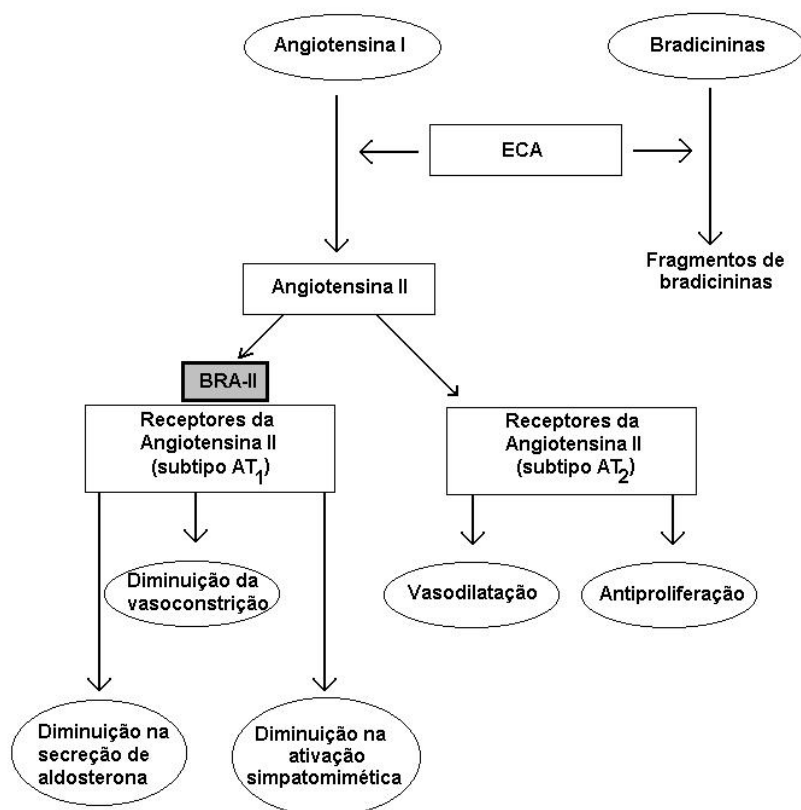


Figura 1 – Sítio de ação de bloqueadores de receptores da angiotensina II. BRA-II = bloqueadores de receptores da angiotensina II.

Fonte: adaptado de CONLIN, 2001.

Quando administrados em doses adequadas, os antagonistas dos receptores AT_1 , parecem ser tão eficazes quanto os inibidores da ECA no tratamento da hipertensão. À semelhança desse último, eles podem ser menos eficazes em pacientes afro-americanos e naqueles com baixos níveis de renina (HOFFMAN, 2006).

O efeito completo dos antagonistas dos receptores AT_1 sobre a pressão arterial tipicamente só é observado cerca de 4 semanas após o início da terapia. Se a pressão arterial não for controlada

apenas com um antagonista dos receptores AT₁, pode-se adicionar uma pequena dose de hidroclorotiazida ou outro diurético (HOFFMAN, 2006).

O consumo dos bloqueadores do receptor AT₁ da angiotensina II (BRA) aumentou nos últimos anos e esta classe de medicamentos ocupa lugar de destaque, pois além de ser eficaz no controle da hipertensão arterial, tem capacidade de proteção dos órgãos-alvo e apresenta baixa incidência de eventos adversos (JÚNIOR et al, 2006b).

1.3 Losartano potássico

Segundo o dicionário terapêutico Guanabara (KOROKOLVAS, 2007), os fármacos com terminação an no idioma em inglês, ao serem traduzidos para o português adquirem a terminação ana. Existem, porém, algumas exceções, como os fármacos terminados em orfan, oxan, sulfan e sartan. Portanto, a tradução genérica correta do losartan para o português é losartano.

O losartano potássico representou uma importante inovação terapêutica. Foi lançado em 1995, na Suécia, pelos laboratórios Du Pont Merck, com o nome fantasia Cozaar[®] (BARREIRO, 2001). Foi o primeiro antagonista do receptor da angiotensina II, não peptídico e a maioria das estruturas químicas dos fármacos pertencentes a essa classe foram baseadas em alterações na estrutura do losartano (CONLIN, 2001).

Trata-se de um antagonista total, competitivo e específico dos receptores da angiotensina II, metabolizado em ácido carboxílico E-3174, que é similar e tão seletivo quanto o losartano potássico e mais potente que esse (cerca de 10 a 40 vezes) (GAVRAS; SALERNO, 1996). Nas doses terapêuticas (12,5 a 100 mg), existe uma relação linear entre a dose de losartano potássico e a de E-3174. Ambos se ligam altamente às proteínas plasmáticas (99%), com concentrações livres para os órgãos-alvo nos locais de seus receptores (SILVA, 2006). O aldeído intermediário entre o losartano potássico e seu metabólito é chamado E 3179 (SICA; GERH; GHOSH, 2006). As estruturas químicas do losartano e de seus metabólitos estão demonstradas na Figura 2.

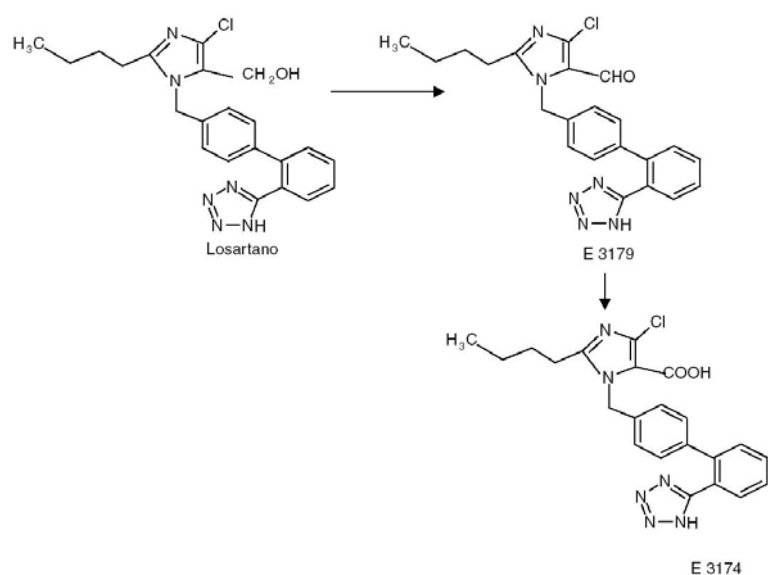


Figura 2 – Estrutura química do losartano e seus metabólitos E 3179 e E 3174.

Fonte: SICA; GERH; GHOSH, 2006.

O medicamento é disponível na forma farmacêutica comprimidos, para administração oral contendo 12,5; 25 mg; 50 mg ou 100 mg de losartano potássico e os seguintes excipientes: celulose microcristalina, lactose hidrogenada, amido pré-gelatinizado, estearato de magnésio, hidroxipropilcelulose, hipromelose, dióxido de titânio corante alumínio amarelo D&C n. 10 e corante alumínio azul FD&C n. 2 (FDA – CDER, 2008) É comercializado também por farmácias magistrais na forma farmacêutica cápsulas e existem relatos na literatura da forma farmacêutica suspensão (SEBURG, 2006).

No Brasil, o losartano potássico é disponibilizado nas formas de cápsulas e comprimidos, nas dosagens de 12,5; 25; 50 e 100 mg. Os principais produtos comercializados pelas indústrias são: COZAAR[®] (medicamento referência, Merck Sharp & Dome), ARADOIS[®] (Biolab-Sanus), CORUS[®] (Biosintética), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Biosintética), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Brainfarma), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Cinfa), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Cristália), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Eurofarma), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Farmasa), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Medley), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Merck), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Novartis), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Ranbaxy), LOSARTANA POTÁSSICA[®] (Ratiopharm), LOSARTEC[®] (Marjan), LOSATAL[®] (Hebron), REDUPRESS[®] (Aché), TORLÓS[®] (Torrent), VALTRIAN[®] (Medley),

ZAARPRESS[®] (Sigma Pharma). O produto é também comercializado associado ao besilato de anlodipino: LOTAR[®] (Biosintética) e associado a hidroclorotiazida: ARADOIS-H[®] (Biolab-Sanus), CORUS-H[®] (biosintética), HIPRESS[®] (Aché), HYZAAR[®] (Merck, Sharp & Dome), LOSARTANA POTÁSSICA HIDROCLOROTIAZIDA[®] (EMS), LOSARTANA POTÁSSICA HIDROCLOROTIAZIDA[®] (Eurog./Legrand), LOSARTANA POTÁSSICA HIDROCLOROTIAZIDA[®] (Germed), TORLÓS-H[®] (Torrent) (KOROKOLVAS, 2007; BRASIL, 2009).

1.3.1 Características físico-químicas e químicas

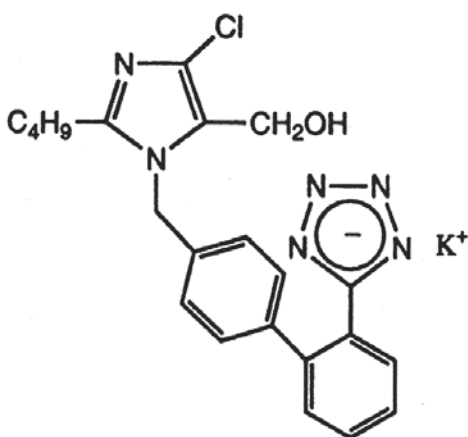


Figura 3- Estrutura química do Losartano potássico – C₂₂H₂₂ClKN₆O.

Fonte: MCCARTHY et al, 1998.

O losartano potássico é um derivado imidazólico funcionalizado, 2-n-butil-4-cloro-5-hidroxi metil-1((2'-(1H-tetrazol-5-il)(bifenil-4-il) metil imidazol, sal potásico (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2007). Foi o primeiro fármaco com o anel tetrazólico em sua estrutura, mimetizando uma função ácido carboxílico (BARREIRO, 2001).

É um sólido levemente amarelado, de peso molecular 461, ponto de fusão de 183,5 a 184,5 °C, com solubilidade em água de 3,3 mg/mL em pH 7,8 apresentando pKa de 4,9 (WILLIAMS et al, 1996; LASTRA et al, 2003).

É facilmente solúvel em água, solúvel em álcoois e levemente solúvel em solventes orgânicos comuns, como acetonitrila e metil etil cetona (FDA – CDER, 2008).

Em casos mais extremos, um dos enantiômeros é quase inativo, como no caso do S-losartano, praticamente desprovido de efeito inibidor da enzima conversora de angiotensina (NOËL et al, 2004).

Existem duas formas polimórficas descritas para o losartano potássico na literatura: forma I, que apresenta baixa estabilidade frente à temperatura e a forma II, que apresenta alta estabilidade frente à temperatura (RAGHAVAN et al, 2003).

1.3.2 Produtos de degradação

Tem sido documentado que fármacos podem sofrer degradação físico-química durante o processo de fabricação e estocagem. O teste de estabilidade de fármacos sob várias condições de temperatura e umidade é parte essencial do desenvolvimento de fármacos. Segundo Zhao et al., comprimidos de losartano potássico mantidos a 40° C e 75% de umidade relativa, por três anos apresentaram produtos de degradação. Os autores utilizaram as técnicas de cromatografia líquida acoplada a massas (LC-MS) e a cromatografia líquida acoplada a massas/massas (LC-MS/MS) para acompanhamento da estabilidade. Foram obtidos três picos extras, quando as amostras foram submetidas ao estresse, que foram caracterizados como produto de degradação I, produto de degradação II e produto de degradação III, cujas estruturas estão relacionadas a seguir (ZHAO et al, 1999).

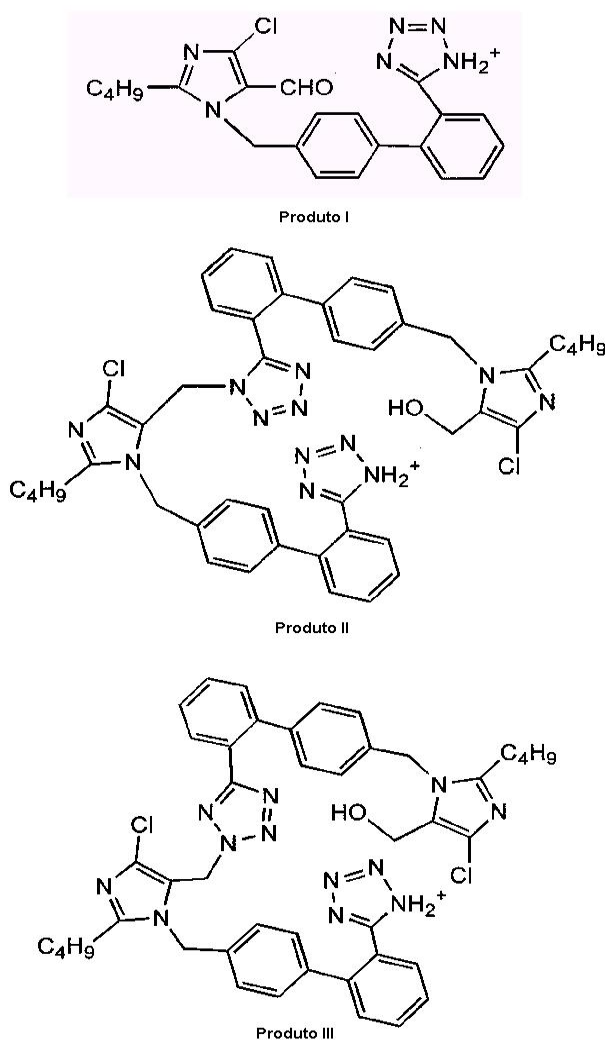


Figura 4 – Estruturas químicas dos produtos de degradação I, II e III do losartano potássico.

Fonte: ZHAO et al, 1999.

O produto I corresponde a um aldeído degradado do losartano potássico, pela oxidação do grupo alcólico na porção imidazólica do losartano potássico. Os produtos II e III correspondem, à condensação de dois monômeros, seguida por eliminação de uma molécula de água (ZHAO et al, 1999) e são formados sob condições ácidas e aquecimento (HERTZOG et al, 2002).

Durante o desenvolvimento de uma formulação de suspensão extemporânea para losartano potássico, produtos de degradação desconhecidos foram identificados quando da utilização de xarope de cereja como veículo, que aumentaram rapidamente quando as soluções analíticas,

preparadas a partir das suspensões, foram expostas à luz. As estruturas dos produtos de degradação foram determinadas usando uma combinação de HPLC, LC/MS, ^{13}C and $^1\text{HNMR}$ (SEBURG, 2006).

Um estudo de estabilidade de losartano potássico associado a hidroclorotiazida para estabelecer o tempo de uso do produto e condições de estocagem revelou como a qualidade do produto foi alterada com o tempo sob a influência de fatos ambientais. Em condições de $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, com $80\% \pm 5\%$ de UR houve formação de duas impurezas: *o*-tolylbenzotetrazole e *iso*-losartano. O estudo também concluiu que blisters é a alternativa apropriada para o acondicionamento desse produto (LUSINA et al, 2005).

1.3.3 Propriedades farmacocinéticas

Após a administração oral, o losartano potássico é bem absorvido e sofre metabolismo de primeira passagem, pelas frações 2C9 e 3A4 do sistema citocromo P₄₅₀. As concentrações máximas médias de losartano potássico e de seu metabólito ativo são atingidas em 1 hora e em 3 a 4 horas, respectivamente. Não houve efeito clinicamente significativo no perfil da concentração plasmática de losartano potássico quando o fármaco foi administrado com uma refeição-padrão (SIMPSON; MCCLELLAN, 2000; FDA – CDER, 2008; BRASIL, 2008a).

Apresenta biodisponibilidade baixa e variável (cerca de 33%) (LO et al, 1995; SOLDNER et al, 2000; KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007).

O metabólito principal, ácido carboxílico, é 10 a 40 vezes mais potente que o fármaco inalterado, sendo ele o responsável pela maior parte da atividade farmacológica; formando-se também outros metabólitos, muitos menos ativos que o losartano potássico (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007).

Tanto o losartano potássico como seu metabólito ativo apresentam taxa de ligação a proteínas plasmáticas: 98,7%, no caso do losartano e 99,8% no caso do metabólito principal, ligando-se principalmente à albumina. (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007; FDA – CDER, 2008).

A farmacocinética de losartano e de seu metabólito ativo foi determinada após doses intravenosas de cada componente separadamente em voluntários saudáveis. O volume de distribuição do losartano e seu metabólito ativo é cerca de 34 litros e 12 litros, respectivamente. A depuração plasmática total de losartano e seu metabólito ativo é cerca de 600 mL min^{-1} e 50 mL min^{-1} , respectivamente, com depuração renal de cerca de 75 mL min^{-1} e 25 mL min^{-1} , respectivamente (LO et al, 1995).

Estudos em ratos indicam que o losartano potássico praticamente não atravessa a barreira hematoencefálica (BRASIL, 2008a).

Aproximadamente 14% da dose de losartano potássico administrado por via intravenosa ou oral são convertidos ao seu metabólito ativo. Após a administração intravenosa ou oral de losartano potássico marcado com ^{14}C , a radioatividade plasmática circulante principal é atribuída a losartano e ao seu metabólito ativo. Observou-se conversão mínima de losartano ao seu metabólito ativo em aproximadamente 1% dos indivíduos estudados (BRASIL, 2008a; FDA – CDER, 2008).

Além do metabólito ativo, são formados metabólitos inativos, incluindo dois principais formados por hidroxilação da cadeia lateral butílica e um secundário, um glucuronídeo N-2 tetrazol (BRASIL, 2008a).

Quando o losartano é administrado por via oral, aproximadamente 4% da dose é excretada inalterada na urina e 6%, na forma de metabólito ativo. Tanto o losartano quanto seu metabólito ativo apresentam cinética linear em doses menores ou iguais a 200 mg, por via oral (BRASIL, 2008a; FDA – CDER, 2008). Manifesta-se o efeito máximo em cerca de 6 horas (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007).

Após a administração oral, as concentrações plasmáticas de losartano e de seu metabólito ativo diminuem poliexponencialmente, com meia-vida final de aproximadamente 2 horas e de 6 a 9 horas, respectivamente. A longa meia-vida do seu metabólito é responsável pela duração de sua ação (cerca de 24 horas), na dose de 50 a 100 mg, permitindo a sua administração uma vez ao dia. Durante a administração da dose única diária de 100 mg, o fármaco e seu metabólito ativo não se acumulam significativamente no plasma (BRASIL, 2008a).

Tanto a excreção biliar como a urinária contribuem para a eliminação de losartano e seus metabólitos. Após dose oral do fármaco marcado com ^{14}C em humanos, aproximadamente 35% da radioatividade é recuperada na urina e 58%, nas fezes. Após dose intravenosa marcada com ^{14}C em humanos, aproximadamente 43% da radioatividade é recuperada na urina e 50%, nas fezes (BRASIL, 2008a; FDA – CDER, 2008).

1.3.4 Posologia

A dose usual inicial e de manutenção é de 50 mg uma vez ao dia para a maioria dos pacientes. O efeito anti-hipertensivo máximo é alcançado 3 a 6 semanas após o início do tratamento. Alguns pacientes podem obter benefício adicional se a dose for aumentada para 100 mg uma vez ao dia (BRASIL, 2008a).

Para redução do risco de morbidade e mortalidade cardiovascular, em pacientes hipertensos com hipertrofia ventricular esquerda, a dose usual inicial de losartano potássico é de 50 mg uma vez ao dia. Uma dose baixa de hidroclorotiazida deve ser adicionada e/ou a dose de losartano potássico deve ser elevada para 100 mg uma vez ao dia, com base na resposta da pressão arterial (BRASIL, 2008a).

A dose inicial do fármaco para pacientes com insuficiência cardíaca é de 12,5 mg uma vez ao dia. Geralmente, a dose deve ser titulada a intervalos semanais (isto é, 12,5 mg/dia, 25 mg/dia, 50 mg/dia) até a dose usual de manutenção de 50 mg uma vez ao dia, de acordo com a tolerabilidade do paciente (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007; BRASIL, 2008a).

Para proteção renal em pacientes com diabetes tipo 2 com proteinúria, a dose usual inicial é de 50 mg uma vez ao dia. Essa dose pode ser aumentada para 100 mg uma vez ao dia, com base na resposta da pressão arterial. Pode ser administrado com outros agentes anti-hipertensivos (por exemplo, diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio, alfa ou betabloqueadores e agentes de ação central) e também com insulina e outros agentes hipoglicemiantes comumente utilizados (por exemplo: sulfoniluréias, glitazonas e inibidores da glucosidase) (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007; BRASIL, 2008a).

1.3.5 Superdosagem

Os dados disponíveis sobre superdosagem em humanos são limitados e as manifestações mais prováveis seriam hipotensão e taquicardia; bradicardia poderia ocorrer por estimulação parassimpática (vagal). Se ocorrer hipotensão sintomática, deve-se instituir tratamento de suporte (BRASIL, 2008a). O losartano e o seu metabólito ativo não podem ser removidos da circulação por hemodiálise (BRASIL, 2008a).

1.3.6 Interações medicamentosas

A exemplo do que ocorre com outros fármacos que bloqueiam a angiotensina II ou os seus efeitos, o uso concomitante de diuréticos poupadores de potássio (espironolactona, triantereno, amilorida), suplementos de potássio ou substitutos do sal que contêm potássio pode resultar em aumento do potássio sérico (BRASIL, 2008a). Outros medicamentos hipotensores podem produzir efeitos hipotensivos aditivos (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007).

O efeito do losartano potássico, a exemplo do que ocorre com outros anti-hipertensivos, pode ser atenuado pelo antiinflamatório não esteróide indometacina (BRASIL, 2008a). Diuréticos podem acarretar hipotensão sintomática e simpatomiméticos podem reduzir seus efeitos (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007).

1.3.7 Indicações

O losartano potássico é indicado para o tratamento da hipertensão. Ele pode ser utilizado isolado ou em combinação com outros agentes anti-hipertensivos, incluindo diuréticos (FDA – CDER, 2008). É indicado para o tratamento da insuficiência cardíaca, quando o tratamento com inibidor da ECA não é mais considerado adequado. Não é recomendada a troca do tratamento em pacientes com insuficiência cardíaca que estejam estabilizados com inibidores da ECA (BRASIL, 2008a).

É também indicado para reduzir o risco de morbidade e mortalidade cardiovascular avaliado pela incidência combinada de morte cardiovascular, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio em pacientes hipertensos com hipertrofia ventricular esquerda (BRASIL, 2008a).

É indicado para retardar a progressão da doença renal avaliada pela redução da incidência combinada de duplicação da creatinina sérica, insuficiência renal terminal (necessidade de diálise ou transplante renal) e para reduzir a proteinúria (BRASIL, 2008a; FDA – CDER, 2008).

1.3.8 Advertências e contra indicações

Em pacientes que apresentam depleção de volume intravascular (p. ex., aqueles tratados com altas doses de diuréticos), pode ocorrer hipotensão sintomática (BRASIL, 2008a).

Desequilíbrios eletrolíticos são comuns em pacientes com comprometimento renal, com ou sem diabetes, e devem ser corrigidos (BRASIL, 2008a).

Com base nos dados de farmacocinética que demonstram aumentos significativos das concentrações plasmáticas de losartano em pacientes com cirrose, deve-se considerar doses mais baixas para pacientes com histórico de insuficiência hepática (BRASIL, 2008a).

Como consequência da inibição do sistema renina-angiotensina, foram relatadas, em indivíduos susceptíveis, alterações na função renal, inclusive insuficiência renal; essas alterações podem ser reversíveis com a descontinuação do tratamento (BRASIL, 2008a).

Outros fármacos que afetam o sistema renina-angiotensina podem aumentar as taxas de uréia sanguínea e de creatinina sérica em pacientes com estenose da artéria renal bilateral ou estenose da artéria de rim único (BRASIL, 2008a).

Quando utilizados durante o segundo e o terceiro trimestres da gravidez, os fármacos que atuam diretamente no sistema renina-angiotensina podem causar danos e até morte do feto em desenvolvimento. Quando houver confirmação de gravidez, o tratamento deve ser suspenso o mais rapidamente possível (BRASIL, 2008a).

Estudos realizados com losartano potássico em animais demonstraram danos e morte do feto e do recém-nascido; acredita-se que isto ocorra por um mecanismo farmacologicamente mediado

pelos efeitos no sistema renina-angiotensina. Não se sabe se o losartano é excretado no leite materno (BRASIL, 2008a).

O medicamento é contra indicado em pacientes com hipersensibilidade a qualquer componente do produto e em casos de gravidez, lactação, crianças menores que 6 anos ou com depuração renal menor que $30 \text{ mL/min/1,73m}^2$ (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007; BRASIL, 2008a).

1.3.9 Farmacodinâmica

A angiotensina II, um potente vasoconstritor, é o principal hormônio ativo do sistema renina-angiotensina e o maior determinante da fisiopatologia da hipertensão. A angiotensina II liga-se ao receptor AT_1 e desencadeia várias ações biológicas importantes, incluindo vasoconstrição e liberação de aldosterona (CONLIN, 2001; BRASIL, 2008a).

O losartano potássico é um composto sintético potente, ativo por via oral e liga-se seletivamente ao receptor AT_1 . *In vitro e in vivo*, tanto o losartano quanto seu metabólito ácido carboxílico farmacologicamente ativo (E-3174) bloqueiam todas as ações fisiologicamente relevantes da angiotensina II, independentemente da fonte ou via de síntese (BRASIL, 2008a).

Estudos *in vitro* indicam que losartano é um inibidor reversível e competitivo de receptores AT_1 . O metabólito ativo é 10 a 40 vezes mais potente por peso que o losartano e parece ser um inibidor reversível e não competitivo de receptores AT_1 (FDA – CDER, 2008).

Losartano e seu principal metabólito ativo não exibem qualquer atividade parcial agonista nos receptores AT_1 e tem afinidade maior (cerca de 1000 vezes) para receptores AT_1 do que receptores AT_2 (FDA – CDER, 2008).

Não apresenta também efeitos de abstinência após a suspensão da terapia em pacientes hipertensos (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007).

O losartano liga-se seletivamente ao receptor AT_1 e não se liga ou bloqueia outros receptores de hormônios ou canais iônicos importantes na regulação cardiovascular. Além disso, o fármaco não inibe a ECA (cininase II), a enzima que degrada a bradicinina. Conseqüentemente, os efeitos

não relacionados diretamente ao bloqueio do receptor AT₁, como a potencialização dos efeitos mediados pela bradicinina ou o desenvolvimento de edema (losartano: 1,7%; placebo: 1,9%), não estão associados ao losartano (BRASIL, 2008a).

1.3.10 Reações adversas

Os efeitos adversos relatados compreendem cefaléia, infecção do trato respiratório superior, tontura, astenia, fadiga, efeitos ortostáticos, erupção cutânea, hiperpotassemia, diarreia, cólicas ou dores musculares, tosse seca, insônia, congestão nasal (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2007).

Em estudos clínicos controlados de hipertensão essencial, tontura foi o único efeito adverso relatado como relacionado à medicação com incidência superior à do placebo (BRASIL, 2008a).

O losartano potássico foi geralmente bem tolerado em estudos clínicos controlados sobre insuficiência cardíaca. Os efeitos adversos mais comuns relacionados à medicação foram tontura e hipotensão (BRASIL, 2008a).

1.4 Métodos analíticos

No desenvolvimento de uma nova metodologia analítica devem ser considerados diversos fatores tais como: objetivo a que a metodologia se propõe, tempo de análise, custo, viabilidade e facilidade de execução do método. Além disso, uma metodologia deve ser confiável, ou seja, garantir que os resultados estejam exatos, reprodutíveis e que possa ser aplicada em qualquer laboratório, desde que este esteja apto e possua a instrumentação adequada.

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma forma farmacêutica.

Milhões de medições analíticas são efetuadas a cada dia em milhares de laboratórios ao redor do mundo. Uma forte infra-estrutura internacional de medições está sendo implementada e, verifica-se a necessidade progressiva de dados analíticos comparáveis e consistentes, para a

eliminação de barreiras técnicas entre os países. Para atingir esse processo de conhecimento mútuo internacional, em que uma vez efetuada a medição esta é aceita em qualquer país, requisitos legais, de certificação e credenciamento devem ser observados (BARROS, 2002).

As análises são desenvolvidas para fornecer informações confiáveis quanto à natureza e composição dos materiais a elas submetidas. A sua variabilidade aumenta quando as medidas são feitas por diferentes analistas no mesmo laboratório, e mais ainda quando os analistas estão em laboratórios diferentes (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000).

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).

Todo trabalho analítico deve ser adequadamente planejado. Um plano destes pode ser, em sua forma mais básica, simplesmente uma entrada em um caderno de anotações. Planos mais detalhados deverão ser apropriados para tarefas maiores e mais complicadas. Para trabalho realizado segundo as boas práticas de laboratórios, há um requisito específico de que o trabalho seja realizado segundo planos de estudo documentados (BRASIL, 2008b).

Na literatura oficial, para o ensaio de doseamento, podem ocorrer grandes variações nas suas determinações, desde resultados exatos, até subjetivos. Considerando essa variedade de doseamentos, diferentes métodos necessitam de diferentes programas de validação (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2004).

Em termos simples, uma medição pode ser convenientemente descrita em termos de uma etapa de isolamento e um estágio de medição. Raramente um analito pode ser medido sem primeiro separá-lo da matriz da amostra. Assim, a finalidade da etapa de isolamento é simplificar a matriz na qual o analito é finalmente medido. No caso de formas farmacêuticas sólidas como cápsulas e comprimidos, observa-se que a etapa de isolamento é relativamente simples, pois os excipientes farmacêuticos presentes na formulação muitas vezes não interferem no método analítico, principalmente no caso da cromatografia líquida de alta eficiência que possui a vantagem de separar os componentes de uma formulação farmacêutica (BRASIL, 2008b).

Métodos de análise têm certos atributos como exatidão, precisão, especificidade, sensibilidade, e todos devem ser considerados ao selecionar um que seja apropriado para uma situação específica. Nem sempre é possível ou mesmo desejável otimizar todos estes atributos simultaneamente. De forma resumida, o analista deve avaliar toda a informação disponível e decidir considerando o nível de incerteza aceitável (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000).

A literatura descreve várias técnicas para determinação de losartano potássico em fluidos biológicos, utilizando métodos cromatográficos com detecção no UV ou com espectrometria de massas (FURTEK; LO, 1992; LEE; SHIM; LEE, 1996; SOLDNER; SPAHN-LANGGUTH; MUTSCHLER, 2000; YEUNG et al, 2000; KRISTOFFERSEN et al, 2007). Para determinação de losartano potássico em produtos farmacêuticos existem métodos descritos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (WILLIAMS et al, 1996; ZHAO et al, 1999; CARLUCCI et al, 2000; ERK, 2001; HERTZOG et al, 2002; ANSARI et al, 2004; LUSINA et al, 2005; MAIO; DIAS; BERGOLD, 2005; SEBURG et al, 2006; SREEKANTH et al, 2007; OBANDO; ESTELA; CERDÀ, 2008), cromatografia líquida de alta eficiência em camada delgada (MCCARTHY et al, 1998; SATHE; BARI, 2007), eletroforese capilar (WILLIAMS et al, 1996; QUAGLIA et al, 2002; HILLAERT; BOSSCHE, 2003), eletrocromatografia capilar (QUAGLIA et al, 2002), cromatografia de fluido supercrítico (WILLIAMS et al, 1996) e espectrofotometria (PRABHAKAR; GIRIDHAR, 2002; LASTRA et al, 2003; ANSARI et al, 2004; MAGGIO; CASTELLANO; KAUFMAN, 2008;). Recentemente, a literatura apresenta estudos que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência para estudos de bioequivalência de comprimidos contendo losartano potássico (CHOI et al, 2008; NEVES et al, 2008). Para o ensaio de dissolução foi descrito um método para avaliação de losartano potássico associado a hidroclorotiazida em comprimidos, utilizando HCl 0,1 mol L⁻¹ como meio de dissolução e pá a 100 rpm como aparato (SUHAGIA; SHAH; PATEL, 2005).

1.5 Validação

Validação de método analítico é o processo de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica e tem recebido considerável atenção na literatura. A determinação das características de desempenho do método é somente

uma parte do processo e os critérios de aceitação são baseados no uso intencional do método. É recomendado que o planejamento e execução da validação de método siga um plano mestre de validação (BARROS, 2002).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos regulatórios do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às exigências regulatórias evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003a; RIBANI, 2004).

Todas técnicas analíticas usadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e para a determinação de suas características relacionadas com a qualidade devem ser validadas. No caso de utilização de métodos descritos em farmacopéias, não é necessário proceder à validação desde que as análises sejam conduzidas com estrita observação do texto. Na maioria dos casos, especialmente quando há modificações na composição do fármaco, na rota sintética ou no procedimento analítico, é necessário revalidar a técnica analítica (ÉPSHTEIN, 2004).

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostra sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços (RIBANI, 2004).

Órgãos como ICH, ISO, ANVISA, INMETRO e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para a qualidade assegurada e demonstração de competência técnica. O que se pode observar é que não há um procedimento normalizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação. Como esses organismos são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios é importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes (ICH, 1996; INTERNATIONAL, 1999; BRASIL, 2003a; INMETRO, 2003; RIBANI, 2004).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, como a Resolução RE nº 899, de 29/05/2003 da ANVISA e o documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO, de março/2003 (BRASIL, 2003a; INMETRO, 2003; RIBANI, 2004).

A Resolução RE nº 899, de 29/05/2003 (BRASIL, 2003a) determina que a validação deve 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.

Esses parâmetros são definidos, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003a), da seguinte forma:

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

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: O intervalo especificado 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 adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

Precisão: A 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 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: 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.

Limite de Quantificação: É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, percentagem p/p ou p/v, partes por milhão) na amostra.

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

Robustez: A robustez de um método analítico 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.

1.6 Teste de dissolução

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação, da dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal. Devido à natureza crítica dos dois primeiros, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo* (BRASIL, 2003b). Com base nessas considerações, os testes de dissolução *in vitro* para sólidos orais de liberação imediata, tais como comprimidos e cápsulas são utilizados para avaliar a qualidade lote a lote de um produto, guiar o desenvolvimento de novas formulações, assegurar a contínua qualidade do produto e sua eficiência após certas mudanças, como na formulação, no processo de produção, no local e na escala do processo produtivo (FDA, 1997).

Estes testes emergiram nos últimos 35 anos após problemas encontrados com equivalentes genéricos de digoxina comprimidos. Vários estudos colaborativos foram então empreendidos pelo governo norte-americano e laboratórios industriais. Foi demonstrado que o tempo de dissolução médio poderia estar relacionado com parâmetros farmacocinéticos como a taxa e a extensão de absorção do fármaco, estabelecendo assim uma correlação entre a performance *in vivo* e *in vitro*. Isso levou à incorporação de testes de dissolução e especificações nos capítulos gerais e monografias da farmacopéia americana (USP). Nos anos subseqüentes, os equipamentos foram então melhorados e padronizados, com instituição de testes de calibração. Essa adição de testes de dissolução às monografias rendeu então um excelente meio de assegurar a uniformidade de produtos de liberação imediata (JORGENSEN; BHAGWAT, 1998).

Nos dias atuais, os testes de dissolução *in vitro* constituem um dos instrumentos essenciais para a avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações. Fornecem, também informações úteis tanto para a pesquisa de desenvolvimento, como para a produção e controle de qualidade. No desenvolvimento farmacotécnico permite a avaliação de novas formulações, verificação da estabilidade e possibilitam estudos de correlação *in vitro* – *in vivo* (MALESUIK et al., 2006).

A taxa de dissolução de um fármaco a partir do estado sólido é definida como a quantidade do fármaco que passa para solução, por unidade de tempo, sob interface líquido/sólido,

temperatura e composição do solvente padronizados. Em biofarmacotécnica, taxa de dissolução normalmente se refere à taxa pelo qual um fármaco se dissolve a partir de uma forma farmacêutica intacta ou seus fragmentos e partículas formadas durante o teste. Os termos solubilização ou taxa de dissolução podem ser usados com o mesmo significado, embora a maioria dos autores prefira o último (BANAKAR, 1992).

Com os avanços da tecnologia e das pesquisas envolvendo liberação de fármacos, modernização dos testes e mais ênfase na previsibilidade de efeitos terapêuticos por meio de testes *in vitro*, os testes de dissolução têm ganhado cada vez mais popularidade. Atualmente os testes de dissolução fazem parte das monografias de quase todas as formas farmacêuticas sólidas (KHAN, 1996).

Entretanto, existem fármacos que não possuem monografia oficial e, para estes fármacos, existe a necessidade de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos. A avaliação do perfil de dissolução do fármaco (percentagem de fármaco dissolvido versus tempo) em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos testes de dissolução (MALESUIK et al, 2006).

No Brasil os ensaios de dissolução passaram a ser exigidos para o registro de medicamentos a partir de 1999, com a introdução dos medicamentos genéricos. (MARCOLONGO, 2003).

Os testes de dissolução envolvem três estágios e os critérios de aceitação são definidos para cada estágio como uma quantidade Q , expressa como porcentagem do valor rotulado, que é estabelecida para cada produto em suas monografias. Os critérios de aceitação são estabelecidos da seguinte forma: no estágio um (S1), o número de unidades testadas é 6 e cada unidade não deve apresentar valor de liberação menor que $Q + 5\%$. Em caso de reprovação deve-se proceder ao estágio dois (S2), onde são testadas mais 6 unidades e a média das 12 unidades (S1 + S2) deve ser maior ou igual a Q e nenhuma unidade deve ser menor que $Q - 15\%$. No estágio S3 devem ser testadas mais 12 unidades e a média das 24 unidades (S1 + S2 + S3) deve ser maior ou igual a Q e não mais que duas unidades deve ser menor que $Q - 15\%$ e nenhuma unidade menor que $Q - 25\%$ (SACCONI et al, 2004).

1.6.1 Fatores que interferem na dissolução

Gordon Amidon e colaboradores propuseram um sistema de classificação biofarmacêutica, que assume que tanto a solubilidade quanto a permeabilidade são parâmetros chaves que controlam a absorção dos fármacos. Os fármacos são então subdivididos em quatro categorias (AMIDON et al, 1995):

- Classe I: fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade
- Classe II: fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade
- Classe III: fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade
- Classe IV: fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade

Essa classificação pode ser usada para se estabelecer especificações de dissolução e pode também prover uma base para prever a probabilidade de se alcançar uma bem sucedida correlação *in vitro* – *in vivo*. A solubilidade do fármaco é determinada dissolvendo-se a maior dose desse fármaco em 250 mL de tampão ajustando-se o pH entre 1 e 8. A substância é considerada altamente solúvel quando a relação entre a dose e a solubilidade for menor ou igual a 250 mL. Fármacos de alta permeabilidade são aqueles com biodisponibilidade maior que 90%, na ausência de instabilidade documentada no trato gastrointestinal (FDA, 1997). Utilizando essa classificação pode-se identificar formulações cuja biodisponibilidade não sofra variações mesmo quando existirem mudanças na formulação (MARCOLONGO, 2003).

Inúmeras são as variáveis que podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução. Todas devem ser consideradas, mas algumas devem ser rigorosamente monitoradas para obtenção de resultados confiáveis. Vários fatores mencionados a seguir são interdependentes, o que faz com que sua análise seja bastante complexa (MARCOLONGO, 2003).

1.6.1.1 Fatores que interferem na dissolução relacionados ao fármaco e formulação

Informações sobre a solubilidade do fármaco em diferentes valores de pH é crucial e está relacionado com seu estado iônico. O conhecimento do seu pKa é, portanto, relevante (JORGENSEN; BHAGWAT, 1998).

A solubilidade é importante para que se possa estabelecer condições “sink”. Esse termo condição “sink” denota um estado em que a concentração do fármaco em um meio solubilizante é muito baixa quando comparada com uma solução saturada do fármaco no mesmo meio (COLOMBO et al, 1996). A solubilidade é o fator que mais afeta a velocidade de dissolução (MARCOLONGO, 2003).

O tamanho de partícula também deve ser considerado, pois um fármaco dissolverá mais rápido quanto maior for a sua área de superfície (MARCOLONGO, 2003).

O estado amorfo, cristalino e a existência de polimorfos (cristais com arranjos espaciais diferenciados que apresentam diferentes propriedades físicas) determinam diferentes propriedades físicas e conseqüentes solubilidades. Geralmente, substâncias amorfas são mais solúveis que as cristalinas, assim como substâncias anidras são mais solúveis que as hidratadas do mesmo fármaco (GIBALDI, 1991).

Outros fatores que exercem influência significativa na dissolução relacionados ao fármaco e formulação são:

- Forma farmacêutica: cápsulas de gelatina, de modo geral, rompem-se rapidamente expondo seus conteúdos aos líquidos do trato gastrointestinal. Já dissolução do comprimidos depende, primariamente, da desintegração do comprimido e dos grânulos. (GIBALDI, 1991).
- Excipientes: praticamente todos os excipientes envolvidos na formulação exercem alguma influência na dissolução, seja ela negativa ou positiva. 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). A utilização de polímeros hidrossolúveis e gelatina como ligantes tem mostrado um

aumento nas taxas de dissolução de fármacos pouco solúveis (GIBALDI, 1991). Um outro fator a ser considerado é a adsorção do fármaco a componentes da formulação (BANAKAR, 1992).

- Tecnologia de fabricação: o tipo de granulação utilizada, via seca ou via úmida tem impacto significativo na dissolução. De modo geral, a granulação úmida favorece a dissolução de fármacos pouco solúveis por conferir a ele características mais hidrofílicas (ABDOU, 1989). A força de compressão é uma variável complexa que pode afetar a dissolução de diferentes formas. 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 tende a aumentar. (MARCOLONGO, 2003).

1.6.1.2 Fatores que interferem na dissolução relacionados com o equipamento

É reconhecido que os aparatos oferecem condições de trabalho diferentes dependendo do seu mecanismo, sendo que o aparato cesta é recomendado para cápsulas e o aparato pá para comprimidos (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2007).

Também interferem significativamente no sistema: geometria do sistema (o eixo do elemento de rotação deve coincidir em todos os pontos com o eixo central da cuba) (PEZOA, 1990); vibração do sistema (o ideal é que não haja nenhuma vibração, uma vez que ela pode alterar o fluxo laminar e introduzir energia dinâmica indesejável) (PEZOA, 1990); velocidade de agitação: (a taxa de dissolução é diretamente afetada pela velocidade de agitação) (BANAKAR, 1992); posição da haste; posição e método de amostragem e dispositivos para formas farmacêuticas que flutuam (MARCOLONGO, 2003).

1.6.1.3 Fatores que interferem na dissolução relacionados com o meio de dissolução

O volume apropriado do meio de dissolução depende principalmente da solubilidade do fármaco. De forma a minimizar os efeitos de gradiente de concentração e manter as condições

“sink”, a concentração do fármaco não deve exceder 10-15% da sua solubilidade máxima no meio selecionado (ABDOU, 1989).

A presença ar ou gases pode 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 por esse motivo o meio pode ser devidamente desaerado/desgasificado (MARCOLONGO, 2003).

A escolha do pH do meio deve considerar, principalmente o tipo de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica e o sítio de absorção do meio (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).

Outros fatores que interferem na dissolução e que devem ser considerados são a temperatura (normalmente temperaturas elevadas favorecem a dissolução); a viscosidade (de modo geral, quanto maior for a viscosidade do meio, mais lenta será a dissolução) (BANAKAR, 1992); o uso de tensoativos (diminuem a tensão superficial entre o sólido e o meio de dissolução favorecendo a dissolução) (ABDOU, 1989).

1.6.1.4 Fatores que interferem na dissolução relacionados com o meio ambiente

Durante a estocagem o produto pode passar por mudanças nas suas características físico-químicas que podem, de alguma forma, afetar o seu desempenho *in vitro* e *in vivo* (RODRIGUES, 1999).

1.6.1.5 Fatores que interferem na dissolução relacionados com o método analítico

Os filtros utilizados não devem absorver o fármaco, nem liberar partículas de material para a solução (PEZOA, 1990).

O método analítico deve estar validado para o procedimento e a grande maioria das monografias especifica que pode ser utilizado o método espectrofotométrico, embora tenha

aumentado o número de métodos cromatográficos, principalmente cromatografia líquida de alta eficiência (MARCOLONGO, 2003).

2 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 3 artigos que se encontram em fase de submissão.

2.1 ARTIGO I

O artigo I consiste na aplicação e validação de metodologias analíticas por espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem no UV para determinação quantitativa de losartano potássico na forma farmacêutica cápsula. Foi submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas e se encontra em fase de avaliação pelos revisores.

Estudo comparativo de metodologias analíticas por espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem no UV para determinação de losartano potássico em cápsulas

A comparative study of analytical methodologies by zero-order and first-derivative UV spectrophotometry for evaluation of losartan potassium in capsules

Rudy Bonfilio¹, Livia Botacini Favoretto², Gislaïne Ribeiro Pereira³, Roberta de Cássia Pimentel Azevedo³, Magali Benjamin de Araújo^{3*}.

¹Pós-graduando do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG, ²Estagiária do Centro de Equivalência Farmacêutica do Núcleo Controle de Qualidade da UNIFAL-MG, ³Departamento de Farmácia – UNIFAL-MG, Alfenas/MG.

RESUMO

O losartano potássico é um agente anti-hipertensivo não peptídico, que exerce sua ação por bloqueio específico dos receptores da angiotensina II. Este trabalho consistiu na validação e comparação entre métodos espectrofotométricos direto e por derivada de primeira ordem, usando água destilada como solvente. Baseado nas características espectrofotométricas de losartano potássico, um sinal a 205 nm do espectro de ordem zero e um sinal a 234 nm do espectro de primeira derivada foram adequados para a quantificação. Os resultados foram usados para comparar essas duas técnicas instrumentais. O coeficiente de correlação entre as respostas e as concentrações de losartano potássico na faixa de 3,0-7,0 mg L⁻¹ e 6,0-14,0 mg L⁻¹ para espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem em solução aquosa, respectivamente, foi de 0,9999 para ambos os casos. Os métodos foram aplicados para quantificação de losartano potássico em cápsulas obtidas de farmácias de manipulação e demonstraram ser eficientes, fáceis de aplicar e de baixo custo. Além disso, não necessitam de reagentes poluentes e requerem equipamentos economicamente viáveis.

Unitermos: losartano potássico; espectrofotometria direta; espectrofotometria derivada de primeira ordem, cápsulas.

ABSTRACT

Losartan potassium is an antihypertensive non-peptide agent, and exerts its action by specific blockade of angiotensin II receptors. The present work consists of the application of an analytical methodology for evaluation of losartan potassium in capsules using as solvent distilled water. Based on the spectrophotometric characteristics of losartan potassium, a signal at 205 nm of the zero-order spectrum and a signal in 234 nm of the first-derivative spectrum were found adequate for quantification. The results were used to compare these instrumental techniques. The linearity between the signals and concentrations of losartan potassium in the ranges of 3.0-7.0 mg L⁻¹ and 6.0-14.0 mg L⁻¹ for zero-order and first-derivative spectrophotometry in aqueous solutions, respectively, presented a correlation coefficient (r) of 0.9999 for both cases. The methods were applied for losartan potassium in capsules dosage obtained from compounded pharmacies and showed to be efficient, easy to apply and low cost. They don't use polluting reagents and they require relatively inexpensive instruments.

Uniterms: losartan potassium; zero-order UV spectrophotometry; first-order derivative UV spectrophotometry, capsules.

INTRODUÇÃO

O losartano potássico (Figura 1) é um derivado imidazólico funcionalizado, correspondendo ao sal potássico 2-n-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1((2'-(1H-tetrazol-5-il)(bifenil-4-il) metilimidazol. Foi desenvolvido pelos laboratórios Du Pont Merck como potente antagonista de receptores da angiotensina II, não peptídico, para o tratamento da hipertensão arterial (Barreiro, Fraga, 2001; Korolkovas, 2006). É administrado na sua forma ativa e seu metabólito, também apresenta atividade anti-hipertensiva, o que confere um efeito prolongado na ação farmacológica. A eficácia terapêutica e seus efeitos sobre o coração e rim parecem ser

semelhantes aos dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA). Contudo, seus efeitos adversos são diferentes, principalmente com relação à tosse, cuja incidência é significativamente menor comparado aos inibidores da ECA (Oigman, 1996). Apresenta-se como sólido levemente amarelado, de peso molecular 461, ponto de fusão de 183,5 a 184,5 °C, com solubilidade aquosa de 3,3 mg mL⁻¹ em pH 7,8, apresentando pKa de 4,9 (Lastra *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1996).

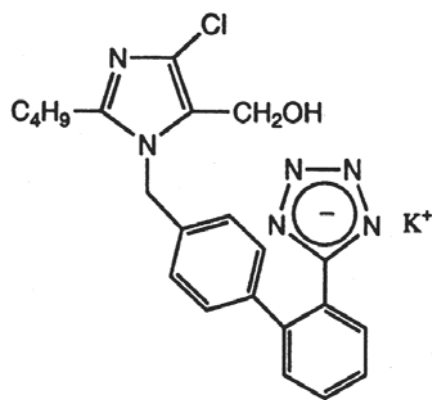


Figura 1. Estrutura química do losartano potássico

A literatura registra inúmeros trabalhos para determinação de losartano potássico, isolado ou associado a hidroclorotiazida em comprimidos, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, cromatografia de fluido supercrítico, cromatografia em camada delgada de alta eficiência e espectrofotometria no ultravioleta por derivadas (Ansari *et al.*, 2004; Erk, 2001; Lastra *et al.*, 2003 McCarthy *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1996). Para a forma farmacêutica cápsula, foi descrito na literatura uma metodologia analítica utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (Maio, Dias, Bergold, 2005).

Até o momento, não se tem registrado na literatura metodologias analíticas empregando a espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem para determinação quantitativa de losartano potássico na forma farmacêutica cápsula, com manipulação freqüente em farmácias magistrais, e nenhum compêndio oficial descreve a monografia para o produto acabado.

O presente trabalho propôs a validação e aplicação de metodologias analíticas orientadas ao controle de qualidade de losartano potássico 50 mg na forma farmacêutica cápsulas, utilizando a espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem na região do UV.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Produtos farmacêuticos, substância química de referência e solventes

As formas farmacêuticas cápsulas, contendo losartano potássico 50 mg, foram cedidas por farmácias magistrais de Alfenas e região e foram codificadas em A, B e C, respectivamente, com prazo de validade estabelecido, por 04 meses, pelos fabricantes (26/01/08, 06/12/2007 e 24/11/2007, respectivamente).

Foi utilizado losartano potássico padrão de trabalho (IPCA Laboratories Limited, Índia), número de lote 5069LB2RI, com teor declarado de 98,90% e validade em 12/2009.

Os excipientes utilizados no processo de manipulação das cápsulas foram estearato de magnésio (All-Chemistry e YOD, Brasil), aerosil (All-Chemistry e Ely Martins, Brasil), lauril sulfato de sódio (All-Chemistry e Gerbrás, Brasil), talco (DEG, Labsynth e Pharma Nostra, Brasil) amido (DEG, Brasil), microcel MC-102 L (DEG, Brasil).

O solvente utilizado foi água destilada.

Equipamentos

Foi utilizado espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu, Japão), duplo-feixe, modelo 1601PC, equipado com modo de derivação interna, com software UVPC 3.1 (Shimadzu, Japão) e cubetas de quartzo de 1 cm; aparelho de ultrassom modelo USC2800A (Unique, Brasil); balança analítica modelo 410 (Kern, Alemanha); medidor de pH modelo PA 200 (Marconi, Brasil); destilador modelo NT 425 (Nova Técnica, Brasil); papel de filtro quantitativo isento de cinzas (Vetec, Brasil).

Metodologia

Preparação da solução estoque de losartano potássico padrão de trabalho

Foram pesados, exatamente, cerca de 25,0 mg de losartano potássico padrão de trabalho que foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Levou-se ao ultra-som por 10 minutos e completou-se o volume do balão com água destilada. Em seguida, a solução foi filtrada utilizando-se papel de filtro quantitativo.

Preparação das soluções estoques das amostras de cápsulas

A partir do peso médio obtido com 20 cápsulas de cada amostras A, B e C, respectivamente, pesou-se o correspondente a 25,0 mg de losartano potássico que foram cuidadosamente transferidos para balões volumétricos de 50 mL, codificados em A, B e C, respectivamente. Levou-se os balões ao ultra-som por 10 minutos e completou-se os volumes dos balões com água destilada. Em seguida, as soluções das amostras A, B e C, respectivamente, foram filtradas utilizando-se papel de filtro quantitativo.

Determinação do comprimento de onda de máxima absorvância

A solução estoque de losartano potássico padrão de trabalho foi diluída para concentração final de 5 mg L^{-1} , em água destilada, procedendo-se à varredura espectral entre 300 e 200 nm, após zerar o aparelho com água destilada. Posteriormente, foram obtidos os espectros de absorção de ordem zero e de derivada de primeira ordem.

Medidas espectrofotométricas

Os espectros de ordem zero e sua derivada de primeira ordem foram obtidos na região do ultravioleta na faixa de 300 a 200 nm, empregando-se espectrofotômetro Shimadzu mod. UV 1601-PC, com banda espectral de 2 nm, velocidade de varredura de 3200 nm/min e intervalo de agrupamento de dados de 0,2 nm. O software UVPC 3.1 permitiu a diferenciação para obtenção

do espectro de primeira derivada, utilizando um delta lambida ($\Delta\lambda$) de 8 nm. Os valores de amplitude foram obtidos a partir do espectro de primeira derivada em unidades de distância do pico negativo em 234 nm em relação à linha de base.

Validação de metodologia analítica

A validação de metodologia analítica foi feita de acordo com as seguintes referências: Barros, Hirata, 2002; Brasil, 2003; Farmacopéia, 1988; ICH, 1995; INMETRO, 2000; Ribani, 2004; United, 2007.

Seletividade

A seletividade foi avaliada pela obtenção dos espectros de absorção de ordem zero a 5,0 mg L⁻¹ e de derivada de primeira ordem a 10 mg L⁻¹ entre 300 e 200 nm envolvendo soluções de losartano potássico padrão de trabalho e das amostras A, B e C, utilizando-se água destilada como solvente. Os procedimentos foram realizados, também, com a mistura dos excipientes presente nas amostras A, B e C, considerando as proporções utilizadas na manipulação dos medicamentos pelos diferentes fabricantes.

Linearidade

Para o estudo da linearidade a solução estoque de losartano potássico padrão de trabalho foi diluída em água destilada nas concentrações finais de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mg L⁻¹, em quintuplicata. Construiu-se a curva analítica com os valores médios das absorbâncias a 205 nm em função das concentrações. Uma segunda curva foi construída nas concentrações de 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 mg L⁻¹, em quintuplicata, plotando-se os valores médios das leituras da primeira derivada a 234 nm em função das concentrações.

Precisão

A precisão foi avaliada nos níveis de repetitividade e precisão intermediária. Na repetitividade foram preparadas soluções de losartano potássico padrão de trabalho, em sextuplicata, utilizando-se água destilada como solvente. Efetuaram-se as leituras das soluções em espectrofotômetro utilizando-se os modelos ordem zero a 205 nm na concentração de 5 mg L⁻¹

¹ e de derivada de primeira ordem a 234 nm, na concentração de 10 mg L⁻¹. O procedimento foi repetido no mesmo dia pelo mesmo analista. Efetuaram-se os cálculos das estimativas dos desvios padrão relativo das determinações.

Para a precisão intermediária, efetuou-se o mesmo procedimento anterior, com exceção da repetição, que foi executada em um segundo dia por um diferente analista. Efetuaram-se os cálculos das estimativas dos desvios padrão relativo das determinações.

Exatidão

A exatidão das metodologias foi avaliada pelo teste de recuperação, onde quantidades conhecidas de losartano potássico padrão de trabalho foram adicionadas às amostras A, B e C, respectivamente. Para a espectrofotometria direta foram preparadas soluções das amostras A, B e C, respectivamente, em triplicata, nas concentrações finais de 2,5 mg L⁻¹ de losartano potássico. Volumes apropriados da solução do padrão de trabalho foram utilizados para obtenção de três níveis de concentração nas amostras, a saber, 4,0; 5,0 e 6,0 mg L⁻¹. No modelo espectrofotométrico de derivada de primeira ordem foram preparadas soluções das amostras A, B e C, respectivamente, em triplicata, nas concentrações finais de 5,0 mg L⁻¹ de losartano potássico, com posteriores adições de volumes apropriados da solução do padrão de trabalho para obtenção dos níveis de concentração 8,0; 10,0 e 12,0 mg L⁻¹. As soluções, preparadas para cada nível de concentração, de cada amostra, foram analisadas utilizando-se os métodos propostos e calculando-se as percentagens de recuperação (% R).

Robustez

Para medir a capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos envolvendo os métodos propostos, foram efetuadas leituras das soluções de losartano potássico padrão de trabalho nas concentrações finais de 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ empregando-se a espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem, respectivamente. O procedimento foi realizado, comparando-se os valores das respostas obtidas com as leituras realizadas em diferentes cubetas e após alteração das condições ambientais da sala, desligando-se o ar condicionado.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) das amostras (A, B e C), sob as condições experimentais estabelecidas, foram determinados efetuando-se 20 leituras correspondentes ao branco (água destilada). O LD e LQ foram determinados com base nas equações: $LD = 3 \times Dpa/IC$; $LQ = 10 \times Dpa/IC$ em que: DPa é o desvio padrão de 20 determinações do branco e IC é a inclinação da curva de calibração.

Estabilidade da solução aquosa

A partir da solução estoque de losartano potássico padrão de trabalho foram preparadas soluções nas concentrações finais de 5,0 e 10 mg L⁻¹, utilizando-se água destilada como solvente. Procedeu-se às varreduras espectrais das soluções nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 e 24 horas do preparo, aplicando-se os modelos de espectrofotometria direta para a solução a 5 mg L⁻¹ e derivada de primeira ordem para a solução a 10 mg L⁻¹.

Análise das amostras de cápsulas

Determinação de peso médio

Para determinação do peso médio das cápsulas das amostras das farmácias A, B e C, respectivamente, seguiu-se metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia, 1988) pesando-se individualmente 20 cápsulas, removendo-se o conteúdo de cada uma e pesando-as novamente. O peso médio de cada amostra foi calculado pela diferença dos valores individuais obtidos entre a cápsula cheia e vazia e determinando as estimativas dos desvios padrões relativos individuais em relação ao peso médio de cada amostra.

Doseamento das amostras

As metodologias analíticas validadas foram aplicadas na determinação do teor de losartano potássico presente nas amostras de cápsulas das farmácias A, B e C, respectivamente. A quantificação do fármaco foi realizada aplicando-se a espectrofotometria direta e espectrofotometria derivada de primeira ordem nas concentrações de 5,0 e 10 mg L⁻¹, respectivamente, comparando-se os valores das respostas das amostras com as de losartano potássico padrão de trabalho preparadas nas mesmas concentrações.

Uniformidade de conteúdo

O conteúdo de 10 cápsulas de cada amostra (farmácias A, B e C) foi transferido individualmente para balões volumétricos de 100 mL, que foram levados ao ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume de cada balão com água destilada. Alíquotas de cada amostra, previamente filtradas em papel de filtro quantitativo, foram diluídas para as concentrações finais de 5 e 10 mg L⁻¹ e analisadas pela espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem, respectivamente, comparando-se os valores das respostas das amostras com as de losartano potássico padrão de trabalho preparadas nas mesmas concentrações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A literatura relata estudo do comportamento de solução aquosa de losartano potássico em vários valores de pH e conclui que em valores entre 5 e 9, as suas características espectrais se mantêm constantes (Lastra *et al.*, 2003). A destilação é um dos sistemas mais utilizados em farmácias magistrais para obtenção da água purificada a ser empregada nos processos de manipulação e controle de qualidade. Os valores de pH recomendados para água destilada encontram-se entre 5,0 e 7,0 (United, 2007). A sua maior vantagem e facilidade, em relação às questões ambientais em laboratórios de análises químicas estão no descarte e menor custo frente aos outros solventes, principalmente os orgânicos. A solubilidade aquosa do losartano potássico (3,3 mg mL⁻¹ em pH 7,8) é, também, fator relevante a ser considerado pois permite a validação das metodologias espectrofotométricas (Lastra *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1996).

A análise do espectro de absorção de ordem zero para o losartano potássico em água destilada (Figura 2) demonstra que a solução na concentração de 5,0 mg L⁻¹, apresenta um máximo no comprimento de onda de 205 nm com valores de absorvância de aproximadamente 0,50, neste ponto, justificando o uso dessa concentração como ponto médio para construção da curva de calibração no modelo espectrofotométrico direto.

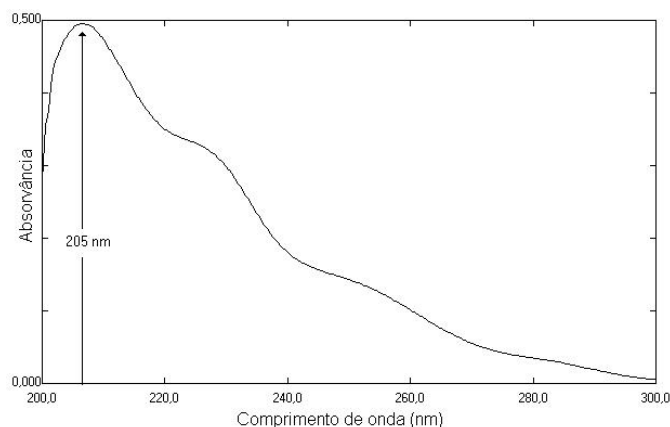


Figura 2. Espectro de absorção de ordem zero de losartano potássico na concentração de 5 mg.L^{-1} , utilizando água destilada como solvente.

Trabalhos publicados justificam a utilização da espectrofotometria derivada de primeira ordem para a forma farmacêutica comprimido, devido ao máximo de absorção do fármaco no espectro de ordem zero ser em 205 nm e nenhum pico resolvido é registrado em outro comprimento de onda (Lastra *et al.*, 2003), além da possível absorção de excipientes presentes na formulação de comprimidos, no comprimento de onda próximo a 200 nm, o que limita a aplicação da espectrofotometria direta para determinação deste tipo de forma farmacêutica (Ansari *et al.*, 2004).

Na espectrofotometria de derivadas a diferenciação do espectro de absorção por ordem zero não aumenta as informações do espectro de absorção original, mas ocorre supressão das bandas largas, realce das bandas estreitas apresentando maior resolução e obedecendo, ainda, a lei de Beer-Lambert (Paschoal *et al.*, 2003). Ao se derivar o espectro de absorção original, através do software do equipamento que disponibiliza esse recurso, observa-se um nítido pico invertido em 234 nm (Figura 3). Neste comprimento de onda, uma solução a 5 mg L^{-1} apresenta valores de absorvância, no espectro de ordem zero, de aproximadamente 0,25. Para análises subsequentes, foi utilizada a concentração de 10 mg. L^{-1} , para que o ponto médio da curva de calibração correspondesse a um sinal próximo de 0,5 no espectro de ordem zero.

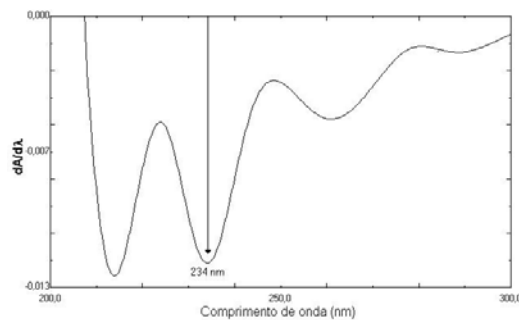


Figura 3. Espectro de absorção de primeira derivada de losartano potássico na concentração de 5 mg.L⁻¹, utilizando água destilada como solvente.

No experimento realizado, os excipientes presentes nas cápsulas manipuladas pelas diferentes farmácias magistrais, não apresentaram absorção no comprimento de onda de 205 nm, demonstrando a seletividade do método espectrofotométrico direto para esta forma farmacêutica (Figura 4). Isso reflete em vantagem para laboratórios que não possuem o equipamento com o recurso de derivar as curvas espectrais. A seletividade do método foi confirmada para os seguintes excipientes: estearato de magnésio, aerosil, lauril sulfato de sódio, talco, amido, microcel MC 102- L de diferentes fornecedores. Como há grande heterogeneidade nos excipientes envolvendo os processos de manipulação, a seletividade do método utilizando a espectrofotometria direta deve ser confirmada caso o processo de manipulação envolva excipientes diferentes dos citados acima, o que poderá representar limitação e desvantagem para aplicação do modelo de espectrofotometria direta.

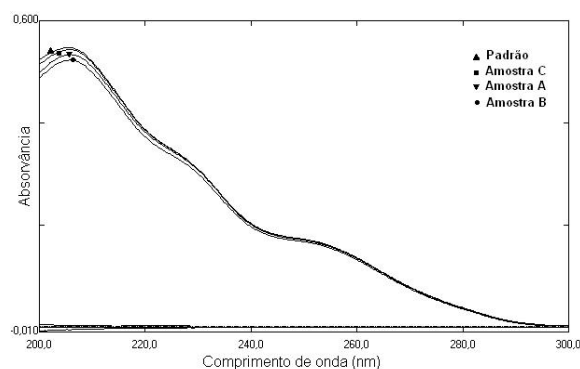


Figura 4. Sobreposição dos espectros de ordem zero de solução aquosa de padrão de losartano potássico (5 mg L⁻¹), amostras de cápsulas A, B e C (5 mg L⁻¹) e seus respectivos excipientes.

A análise dos resultados demonstrou não haver interferência dos excipientes presentes nas amostras de cápsulas A, B e C, no método de espectrofotometria derivada de primeira ordem (Figura 5).

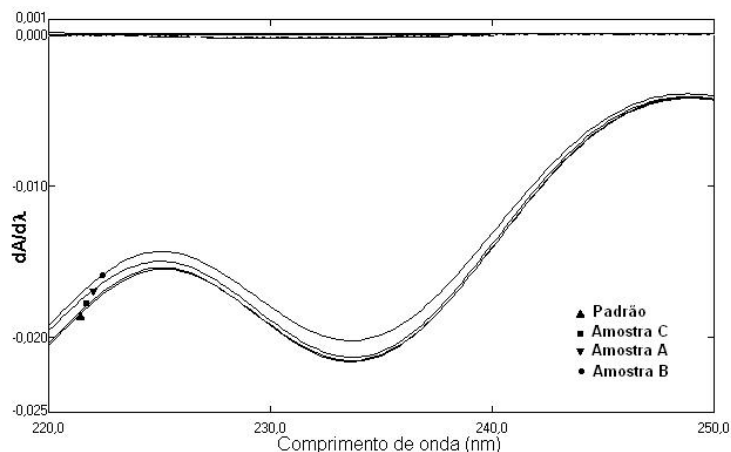


Figura 5. Sobreposição dos espectros de primeira derivada de solução aquosa de padrão de losartano potássico (10 mg L^{-1}), amostras de cápsulas A, B e C (10 mg L^{-1}) e seus respectivos excipientes.

Embora através da técnica espectrofotométrica, em relação à seletividade, não seja possível identificar e quantificar produtos de degradação é importante ressaltar e recomendar que a matéria-prima a ser utilizada na manipulação das cápsulas de losartano potássico deve ser analisada e acompanhada de certificado de análise que garanta valores dentro dos critérios de aceitação quanto aos produtos de degradação especificados na monografia oficial da matéria-prima, que estabelece um limite de 0,2 % para qualquer impureza individual e de 0,5 % para o total de impurezas encontradas (United, 2007).

Os resultados de linearidade foram avaliados por meio da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Foi obtido um coeficiente de correlação (r) de 0,9999 para as soluções de losartano potássico nas concentrações de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mg L^{-1} pela espectrofotometria direta. A equação da reta obtida foi $A = 0,095C - 0,0048$. A estimativa do desvio padrão relativo entre as 5 determinações de cada concentração foi inferior a 2 %. Na espectrofotometria derivada de primeira ordem o coeficiente de correlação também foi de 0,9999 para as soluções de losartano potássico nas concentrações de 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 mg L^{-1} . A equação da reta obtida foi: $dA/d\lambda = -0,0022C - 0,0004$. A estimativa do desvio padrão relativo entre as 5

determinações de cada concentração foi inferior a 2 %. Esses resultados demonstraram haver correlação linear entre as concentrações de losartano potássico e as respostas apresentadas pelas duas metodologias.

Os valores médios das estimativas de desvio padrão de 0,95 % e 0,75 % e de 0,89 % e 0,76 % demonstraram que o método possui precisão satisfatória quando analisado no mesmo dia e em dias diferentes por aplicação da espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem, respectivamente. São aceitáveis valores de desvio padrão relativo igual ou abaixo de 5 % (Brasil, 2003).

Os métodos espectrofotométricos desenvolvidos demonstraram exatidão, que foi constatada pelo teste de recuperação. Valores médios de 99,00 %, 101,74 % e 98,91 % e de 101,19 %, 99,86 % e 101,56 % para as amostras A, B e C, respectivamente, para a espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem indicam exatidão adequada. Valores entre 98 a 102% são considerados satisfatórios (Tabelas 1 e 2).

Tabela I. Valores obtidos na determinação dos parâmetros de validação analítica para losartano potássico através da espectrofotometria direta, utilizando água destilada como solvente a 205 nm.

Parâmetros	Condições	Níveis de concentração (mg L ⁻¹)	Médias das absorvâncias	DPR (%)	Média de recuperação (%)
Precisão					
repetitividade	1ª Série	5	0,482	0,79 (n=6)	
	2ª Série	5	0,482	1,11 (n=6)	
intermediária	1º dia	5	0,490	0,70 (n=6)	
		5	0,487	0,79 (n=6)	
	Amostra A	4,0	0,377	0,55 (n=3)	
		5,0	0,477	0,36 (n=3)	99,00
		6,0	0,570	0,62 (n=3)	
		4,0	0,372	0,82 (n=3)	
Amostra B	5,0	0,466	0,33 (n=3)	101,74	
	6,0	0,563	0,00 (n=3)		
	4,0	0,396	0,39 (n=3)		
Amostra C	5,0	0,498	0,83 (n=3)	98,91	
	6,0	0,596	0,86 (n=3)		
	Cubeta 1	5,0	0,599		
Robustez	Cubeta 2	5,0	0,599	0,12 (n=3)	
	Ar desligado	5,0	0,600		

Tabela II. Valores obtidos na determinação dos parâmetros de validação analítica para losartano potássico através da espectrofotometria derivada de primeira ordem, utilizando água destilada como solvente a 234 nm.

Parâmetros	Condições	Níveis de concentração (mg L ⁻¹)	Médias das respostas (dA/dλ)	DPR (%)	Média de recuperação (%)
Precisão					
repetitividade	1ª Série	10,0	-0,0204	0,92 (n=6)	
	2ª Série	10,0	-0,0208	0,86 (n=6)	
intermediária	1º dia	10,0	-0,0219	0,53 (n=6)	
		10,0	-0,0203	0,99 (n=6)	
	Amostra A	8,0	-0,0148	0,39 (n=3)	
		10,0	-0,0188	0,31 (n=3)	101,19
		12,0	-0,0225	0,26 (n=3)	
		8,0	-0,0159	0,00 (n=3)	
Exatidão	Amostra B	10,0	-0,0200	0,50 (n=3)	99,86
		12,0	-0,0237	0,24 (n=3)	
		8,0	-0,0163	0,71 (n=3)	
	Amostra C	10,0	-0,0202	0,00 (n=3)	101,56
		12,0	-0,0241	0,24 (n=3)	
Robustez	Cubeta 1	10,0	-0,0221		
	Cubeta 2	10,0	-0,0222	0,21 (n=3)	
	Ar desligado	10,0	-0,0221		

A robustez determina as condições próprias em que deve ser desenvolvido a calibração e os fatores que devem ser levados em consideração durante a construção do modelo, onde a principal observação está nas alterações das condições experimentais e ambientais que podem refletir nos resultados gerando erros significativos na determinação. Nas metodologias propostas a robustez

foi verificada pelos baixos valores das estimativas de desvio padrão relativo entre as leituras das soluções de losartano potássico padrão de trabalho, realizadas em diferentes cubetas e com alteração das condições ambientais desligando-se o ar condicionado da sala (Tabelas 1 e 2).

Os limites de detecção e de quantificação foram respectivamente 0,01 e 0,04 mg L⁻¹ para a espectrofotometria direta e 0,07 e 0,23 mg. L⁻¹ para a derivada de primeira ordem, demonstrando sensibilidade adequada para a aplicação proposta, pois em ambos os modelos, os limites se encontram abaixo da concentração referente ao primeiro ponto da curva de calibração.

A estabilidade do fármaco em solução aquosa foi avaliada em função do tempo registrando-se os espectros de absorção em até 24 horas de armazenamento e não houve alterações significativas nos perfis espectrais (Figuras 6 e 7).

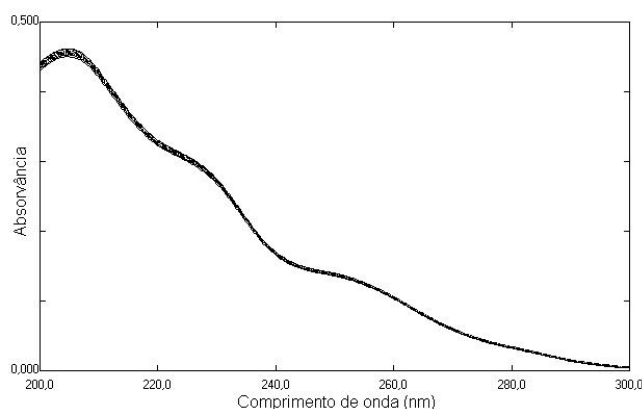


Figura 6. Sobreposição de espectros de ordem zero para avaliação de estabilidade da solução aquosa de losartano potássico 5 mg L⁻¹.

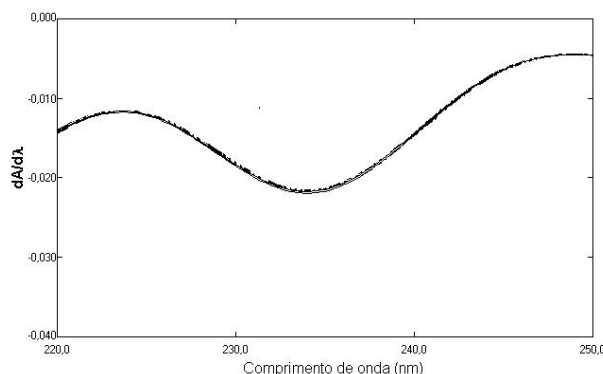


Figura 7. Sobreposição de espectros de primeira derivada para avaliação de estabilidade da solução aquosa de losartano potássico 10 mg L⁻¹.

Em relação à análise do produto acabado, a uniformidade de peso das unidades do mesmo lote das amostras A, B e C, respectivamente, apresentaram valores de 132,33 mg, 155,12 mg e

158,02 mg, respectivamente. Os valores de peso médio das amostras atenderam aos limites estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (1988), onde cápsulas com peso nominal em até 300 mg podem variar em $\pm 10\%$.

As metodologias analíticas envolvendo a espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem foram aplicadas à forma farmacêutica cápsula das amostras das farmácias A, B e C, respectivamente. Os valores de teores e estimativas de desvio padrão relativo estão apresentados na Tabela 3, demonstrando que a quantidade do princípio ativo em cada amostra atende ao preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988) para produto acabado, de 90 a 110 %.

O teste de uniformidade de conteúdo das cápsulas de cada amostra mostrou que as amostras A e C apresentam estimativas de desvio padrão relativo com valores aceitáveis. Por outro lado, a amostra B embora tenha apresentado quantidade do fármaco dentro das especificações apresentou estimativa de desvio padrão relativo superior a 6% (Tabela 3). A uniformidade de conteúdo de produto acabado deve estar entre 85,0% e 115,0% e a estimativa de desvio padrão relativo deve ser inferior a 6,0% (Farmacopéia, 1988).

Tabela III. Valores obtidos no doseamento e uniformidade de conteúdo para losartano potássico nas amostras de cápsulas das farmácias A, B e C, respectivamente.

Amostras	A		B		C	
	Direta	Derivada primeira	Direta	Derivada primeira	Direta	Derivada primeira
Teor (%)	98,06	99,18	96,08	94,54	99,25	99,61
DPR (%)	1,10 (n=5)	0,78 (n=5)	1,93 (n=5)	1,16 (n=5)	1,00 (n=5)	0,61 (n=5)
Encontrado (mg)	49,03	49,59	48,04	47,27	49,63	49,81
Uniformidade(%)	98,85	100,13	96,04	99,70	100,51	101,02
DPR (%)	3,40 (n=10)	3,00 (n=10)	6,08 (n=10)	6,95 (n=10)	3,37 (n=10)	4,47 (n=10)
Encontrado (mg)	49,40	50,10	48,00	49,90	50,30	50,50

As duas metodologias analíticas foram comparadas estatisticamente, utilizando-se dos resultados de teor obtidos no ensaio de uniformidade de conteúdo. Para análise estatística dos dados, primeiramente, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2 com 10 repetições e comparação de métodos pelo teste Tukey ao nível de significância de 5 %. Foram comparados os seguintes parâmetros: amostras (farmácias A, B e C) e modelos (espectrofotometria de ordem zero e de derivada de primeira).

Comparando-se as amostras de losartano potássico cápsulas das farmácias analisadas, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre elas. As cápsulas das farmácias A, B e C apresentaram estatisticamente a mesma média percentual total de teor. Comparando-se os modelos utilizados (espectrofotometria direta e derivada de primeira ordem) verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre eles.

CONCLUSÕES

As metodologias analíticas propostas envolvendo a espectrofotometria na região do UV, sob as condições descritas, para determinação quantitativa de losartano potássico 50 mg na forma farmacêutica cápsula, utilizando-se água destilada como solvente, mostraram-se rápidas, confiáveis, economicamente viáveis e atenderam aos parâmetros exigidos para validação de método analítico, de acordo com os fins adotados. Além disso, apresentam a vantagem de utilizar água destilada, que não agride o meio ambiente.

A espectrofotometria derivada de primeira ordem é uma alternativa para o doseamento de losartano potássico na forma farmacêutica cápsula, principalmente se os excipientes utilizados no processo de manipulação forem diferentes dos estudados nesse trabalho, e que porventura absorvam no comprimento de onda de 205 nm.

AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro do Centro de Equivalência Farmacêutica do Núcleo Controle de Qualidade (NCQ/UNIFAL-MG), a UNIFAL-MG pela bolsa de mestrado e as farmácias de manipulação que cederam as amostras de losartano potássico 50 mg na forma farmacêutica cápsula.

REFERÊNCIAS

ANSARI, M.; KAZEMIPOUR, M.; KHOSRAVI, F.; BADARAN, M. A Comparative Study of First-derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography applied to the determination of losartan potassium in tablets. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 52, n. 10, p. 1166-1170, 2004.

BARROS, C. B.; HIRATA, Y. S. Validação de métodos analíticos. *Biológico*, v.64, n.2, p. 175-177, 2002.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. São Paulo/Porto Alegre: Artmed, 2001. cap.3, p.97.

BRASIL. Resolução RE nº899 de 29 de maio de 2003. A agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF 02 de jun 2003, Seção 1. p. 47.

ERK, N.; J. Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 24, n. 4, p. 603-611, 2001.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. v.1,v.2, p. v.1.1, v.2.14, v.1.6.

ICH. International Conference on Harmonization. *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B (CPMP/ICH281/95), 1995. Disponível em:<<http://www.fda.gov/cder>>. Acesso em: 15 jan.2008.

INMETRO. Guia para laboratórios químicos: um auxílio à organização e ao credenciamento, Rio de Janeiro, Interciência, 2000. p.41.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico guanabara*, Ed. 2006/2007. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 8.33.

LASTRA, O. C.; LEMUS, I. G.; SÁNCHEZ H. J.; PÉREZ, F. Development and validation of an UV derivative spectrophotometric determination of losartan potassium in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.33, n. 2, p.175-180, 2003.

MAIO, V. M DOS P.; DIAS, C. L.; BERGOLD, A. M. Validation of an isocratic HPLC assay of losartan potassium in pharmaceutical formulations and stress test for stability evaluation of drug substance. *Acta Farm. Bonaerense*, v.24, n.2, p.250-255, 2005.

MCCARTHY, K. E.; WANG, Q.; TSAI, E. W.; DOMINIC, P. I.; BROOKS, M. A. J. Determination of losartan and its degradates in COZAAR® tablets by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.17, n. 4-5, p.671-677, 1998.

OIGMAN, W. Tratamento farmacológico da hipertensão arterial essencial. *Medicina, Ribeirão Preto*, v.29, n. 2-3, p.244-249, 1996.

PASCHOAL, L. R.; FERREIRA, W. A.; PRADO, M. R. D.; VILELA, A. P. O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 39, n.1, p. 105-113, 2003.

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

UNITED States Pharmacopoeia. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2007. p. 2499, 3050.

WILLIAMS, R. C.; ALASANDRO, M. S.; FASONE, V. L.; BOUCHER, R. J.; EDWARDS, J. F.; J. Comparison of liquid chromatography, capillary electrophoresis and super-critical fluid chromatography in the determination of Losartan Potassium drug substance in Cozaar® tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 14, n.11, p.1539-1546, 1996.

2.2 ARTIGO II

O artigo II consiste na otimização e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação quantitativa de losartano potássico na forma farmacêutica cápsula e aplicação desse método para avaliação de produtos de degradação e de produtos comercializados no mercado nacional. Foi submetido à revista Journal of AOAC International e encontra-se em fase de avaliação pelos revisores.

Optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for determination of losartan potassium in the presence of its degradation products in pharmaceutical capsules

Rudy Bonfilio ^a, César R. T. Tarley ^b, Gislaine R. Pereira ^c, Magali B. de Araújo ^{c*}.

^a *Master's Degree Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000. Alfenas-MG, Brazil.*

^b *Department of Exact Sciences, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000. Alfenas-MG, Brazil.*

^c *Department of Pharmacy, Center of Pharmaceutical Equivalence of the Nucleus Control of Quality, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000. Alfenas-MG, Brazil.*

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

E-mail address: magali@unifal-mg.edu.br (M. B. Araújo)

ABSTRACT

This paper describes the optimization and validation of an analytical methodology for determination of losartan potassium capsules in the presence of its degradation products by HPLC using a 2^{5-1} fractional factorial design and a Doehlert design for establishment of the chromatographic conditions. The HPLC method utilized potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v) as mobile phase, pumped at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The column was 125 mm × 4.6 mm C8 packed with 5 μm particles and the temperature was fixed at 35 °C. UV detection was performed at 254 nm. All parameters of validation were found in accordance showing accuracy, precision, selectivity, robustness and linearity over the concentration range of 30-70 mg L⁻¹ of losartan potassium. The limits of detection and quantification were 0.114 and 0.420 mg L⁻¹, respectively. The method showed to be useful for determination of losartan potassium in pharmaceutical capsules.

Keywords: Doehlert design; fractional factorial design; losartan potassium; reversed-phase chromatography; validation;

1. Introduction

The scientific and technological progress demands a growing need of effective analytical methodologies. In the pharmaceutical market there is a concern regarding analysis for routine tests of formulations that should be fast, to assure the quality and to attend the regulatory demands. In this sense, it is important to stress on that during development of a new analytical method, in which it must comprise those satisfactory features, including, selectivity, sensibility and high linear range, the time and consumption of sample/reagent involved in the optimization process must be reduced. Such optimization condition can be achieved by using multivariate experimental design (1). Among their advantages, multivariate experimental design provides a reduction in the number of required experiments, resulting in lower reagent consumption and considerably less laboratory work (1). According to these advantageous, the present work propose the use of multivariate design to develop a HPLC method for determination losartan potassium drug substance when it is as a single active principle in pharmaceutical capsules. Losartan potassium (Fig. 1), chemically described as 2-butyl-4-chloro-1-[*p*-(*o*-1*H*-tetrazol-5-ylphenyl)benzyl] imidazole-5-methanol monopotassium salt (2) is an angiotensin II receptor (type AT1) antagonist for the treatment of hypertension. Losartan has been demonstrated to be superior to previous peptide receptor antagonists and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors because of its enhanced specificity, selectivity and tolerability (3,4) Losartan potassium has a molecular weight of 461, a pKa of 4.9 and an aqueous solubility of 3.3 mg mL⁻¹ at pH 7.8 (5). Several analytical techniques have been applied to the analysis of losartan potassium in biological fluids using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods (6-9). For applications in pharmaceutical products there are methods that make use of HPLC (10-18), High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) (19,20), Capillary Electrophoresis (CE), Capillary Electrochromatography (CEC) (21) and spectrophotometry (22,23). Recently, the literature presents reports of the employment of the HPLC for bioequivalence studies of tablets containing losartan potassium (24,25). However, few analytical reports for the analysis of losartan potassium in capsules are described (26). Moreover, the United States Pharmacopeia (2) has not yet incorporated in an analytical monograph a method for quantification of losartan potassium in capsules.

Thus, the focus of the work describes herein was to develop of a HPLC method for determination of losartan potassium in pharmaceutical capsules aiming at to obtain a satisfactory efficiency using the available resources, to validate the method and to apply the method for determination of active principle in the presence of its degradation products.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

All reagents were of analytical grade. Potassium dihydrogenphosphate anhydrous (KH_2PO_4), phosphoric acid PA, sodium hydroxide PA, HPLC grade acetonitrile and hydrochloride acid PA were purchase from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil); reverse osmosis water purified was obtained using a reverse osmosis water purification system (GEHAKA, OS 10 LTH, Brazil). 98.90% purity losartan potassium salt was supplied by IPCA laboratories limited, (Athal, Indian). 50 mg losartan potassium salt in capsules were supplied by three local drug stores from three different Brazilian manufactures, coded as A, B and C. The placebo mixture used in accuracy and selectivity studies containing pharmaceutical grade excipients (magnesium stearate, aerosil, sodium dodecyl sulfate, talc, starch and microcel MC-102 1) were obtained from same local drug stores (A, B and C).

2.2. Apparatus

Chromatographic separations were carried out using a Shimadzu HPLC system (Tokyo, Japan) series LC-10A consisting of a LC AVP pump, a CLASS-VP 5.02 integration system, a DGU-14 A degasser, a 7725i manual injector with a 20 μL loop, (Rheodyne, EUA), a SPD-10AVP integrated UV detector, a FCV-10ALVP valve, a CTO-10AVP column oven and a SCL-10 AVP controller. The peak purity was determined on a SPD-M 10A VP photodiode-array detector (PDA). Chromatographic columns were Licrospher RP-18 (Merck, Germany) packed column, (100 \times 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) combined with a guard column (10 X 4.6 mm i.d.) and Macherey Nagel Nucleosil C8 analytical column (5 μm particle size, 125 \times 4.6 mm i.d.) proceeded by a guard column (20 \times 4.6 mm i.d.). Digital pH meter (PA 200, Marconi S.A,

Brazil); ultrasonic Bath model USC2800A (Unique, Brazil); analytical balance model 410 (Kern, Germany); reverse osmosis water purifier (GEHAKA, OS 10 LTH, Brazil); vacuum filtration system (Millipore, Brazil) and PTFE membrane filters pore size of 0.45 μm and diameter of 13.0 mm (Millipore, Brazil).

2.3. Sample preparation

2.3.1. Losartan potassium stock and working standard solutions

The stock solution of losartan potassium was prepared in a 50 mL volumetric flask by dissolving an accurately weighted amount (25 mg) of losartan potassium standard (98.90% purity) in mobile phase; the final volume was made up with mobile phase.

Working solutions were prepared immediately before use, by appropriate dilutions of the corresponding stock solutions of losartan potassium with mobile phase. The solutions were then filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter.

2.3.2. Sample capsules solution

Pharmaceutical formulations of three different local drug stores were used. In each case, the average weight was obtained through the difference of a weight between full and empty 20 capsules. The quantity equivalent to 25 mg losartan potassium was transferred into a 50 mL volumetric flask and the volume completed with mobile phase. This solution was diluted immediately before use, by appropriate dilutions with mobile phase and coded as A, B and C. The solutions were filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter.

2.3.3. Losartan potassium excipient solutions

An excipients mixture containing the same amount of the capsules commercially available was transferred to a 50 mL volumetric flask and treated as described in section 2.3.2.

2.4. Optimization strategy of chromatographic conditions

In order to make a screening study of factors that influence the chromatographic conditions a 2^{5-1} fractional factorial design was carried out in duplicate for the following factors: pH of buffer used in the mobile phase (2.5 and 7.0), proportion of the components in the mobile phase (phosphate buffer-acetonitrile, (60:40 and 40:60, v/v)), column temperature (25°C and 35°C), mobile phase flow rate (0.8 and 1.2 mL min⁻¹) and column type (silica C8 and RP-18) (Table 1). A losartan potassium work standard solution at 50 mg L⁻¹ concentration was utilized in these experiments (section 2.3.1). The generator employed for this design was $I = abcde$. The run time varied from 5 to 25 minutes, in agreement with the levels used in the design. The UV detection was made at 254 nm wavelength and 20 µL of injection volume was used. Considering that both, theoretical plates and retention time play an important role in the establishment of a new chromatographic method, the analytical response used in the experimental design was based on theoretical plates/retention time ratio. After establishing those significant factors from the fractional factorial design, the final optimization was further carried out using a Doehlert design, whose design comprises 7 conditions, with central point carried out in triplicate. From this design, it was possible to apply the response surface method (RSM) to optimize the factors levels. All data were processed using the STATISTICAL package software (version 6.0).

2.5. Method validation

Method validation was performed following ICH specifications (27) for selectivity, range of linearity, accuracy, precision, robustness, LOD and LOQ.

2.6. Accelerated degradation studies

The literature reports the presence of the degradation products in tablets and pharmaceutical capsules which are observed under acid and temperature stress (13,18,26). Therefore, accelerated degradation studies were performed to provide an indication of the drug stability and method selectivity. For degradation study 25 mg of losartan potassium standard was accurately weighted and diluted in 1.0 mol L⁻¹ HCl to concentration of 50 mg L⁻¹. This solution was heated under

refluxing at 105°C for 2 h, and then neutralized by adjusting the pH to 7.0. The solution was filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter before injection. Additional PDA detector data were collected for the purposes of the peak purity evaluation.

3. Results and discussion

3.1. Method development and optimization

As commented, the analytical response based on theoretical plates/retention time ratio was chosen taking into account the great paramount importance of theoretical plates that must be observed in a low run time. Theoretical plates should be higher than 2000 in accordance to USP (2). However, it was observed experimentally that the number of theoretical plates increased with the increase of retention time (data not shown). Hence, the response based on theoretical plates/retention time ratio was successfully employed as a compromise between required theoretical plates and low run time, indeed, an appropriate condition to be applied for routine laboratories analysis. The experimental results from 2^{5-1} fractional factorial design for the five factors that influences in the analytical response are shown in Table 1. The effect of each studied factor as well as the interaction among them was established according to the estimate of the contrast since a fractional factorial design was used (Table 2). In order to determinate the statistical significance of the factors and their interactions, the standard variance (S_p^2) of the estimate of the factors was calculated via Eq.1.

$$S_p^2 = \frac{(n_A - 1)s_A^2 + (n_B - 1)s_B^2}{(n_A - 1) + (n_B - 1)} \quad (1)$$

Where n is the number of times that the assay was repeated and s^2 is the variance obtained in each assay. The standard variance of the experimental design listed in Table 1 obtained from Eq. 1, was 944.30. Yet, the variance of the contrast was obtained from Eq. 2:

$$V(\text{estimate}) = V[\bar{R}(+)] + V[\bar{R}(-)] = \frac{S_p^2}{n} + \frac{S_p^2}{n} \quad (2)$$

Where n is the number of assays with low and high levels. Thus, the variance of the estimate of the contrast was found to be 118.04. The error (10.86) of the estimate of the contrast was obtained by extracting the root of the variance. By multiplying the error by the critical t_{n-1} (2.120) (28). for a confidence interval of 95%, the estimated error becomes 23.03. When the value of the estimated error is smaller than the estimated contrast, the factor becomes statistically significant (28).

Comparing the results of the estimate of the contrast with the estimated error it is concluded that all factors are significant. When the estimate of the contrast is positive, it indicates the increase of its level provides a significant increase in the result (theoretical plates/retention time ratio). Hence, it was verified that the best response was obtained with the following conditions: higher acetonitrile proportions in the mobile phase, high column temperature, mobile phase buffer at high pH, higher mobile phase flow rates and C8 analytical column. As column type is a qualitative factor, it was decided to adopt C8 column for the subsequent studies. Column temperature values above 35°C were not tested because the use of mobile phase at high pH associated to high temperatures can lead to damage to the silica of the stationary phase. Thus, column temperature was set at 35°C. The increase of the analytical response observed with the increase of the mobile phase flow rate is attributed to the decrease of retention time and, of course, accompanied by the decrease of the theoretical plates. A very high increase of the mobile phase flow rate is not beneficial, because it can harm the process of diffusion of the losartan potassium among stationary and mobile phase. Therefore, the mobile phase flow rate was fixed at 1 mL min⁻¹.

Concerning the significant interaction between proportions of the components in the mobile phase and pH of buffer used in the mobile phase, a final optimization of these factors was accomplished by Doehlert design. The levels employed in this design for pH of buffer used in the mobile phase varied from 2.0 up to 7.0, while the proportion of phosphate buffer in the mobile phase varied from 60% up to 70%. The central point (65% of phosphate buffer pH 4.5) was carried out in triplicate. As verified from response surface (Fig. 2) there is a significant improvement in analytical response when working at higher pH values and smaller proportions of phosphate in the mobile phase. Despite high pH values providing the best results, it was decided to adopt phosphate buffer at pH 6.2 in order to preserve the lifetime of the column. The proportion of phosphate buffer at pH 6.2 was fixed at 65%. Smaller ratios of buffer mobile phase content were

not used, since this condition can cause a very low retention time, which was experimentally verified.

Therefore, the method was developed for the determination of losartan potassium capsules with the following chromatographic parameters: mobile phase constituted by potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v), in isocratic elution system, flow rate at 1.0 mL min⁻¹ with column temperature of 35°C, C8 analytical column, run time of 5 minutes (except for analysis of degradation products), UV detection wavelength at 254 nm and 20 µL of injection volume.

3.2. Method validation

3.2.1 System suitability

This test was carried out by injecting six replicates of a work standard solution of losartan potassium (Section 2.3.1) containing 50 mg L⁻¹ (100% level). A representative chromatogram is showed in the Fig. 3. The retention time was 3.19 min; theoretical plates higher than 4900; capacity factor higher than 2.19 and asymmetry of 1.06. The relative standard deviation was 1.17%. All parameters are in accordance to United States Pharmacopeia (2).

3.2.2 Linearity

Linearity was evaluated according to the ICH guidelines (27) by the analysis of working standard solutions of losartan potassium (Section 2.3.1). The standard solutions were obtained in five replicates in the final concentrations of 30, 40, 50, 60 and 70 mg. L⁻¹ of losartan potassium (ranging from 60 to 140% of a 50 mg nominal dose in capsules). The calibration equations and determination coefficient obtained were $A = 20321[\text{losartan potassium}] + 2917.2$ and 0.9998, respectively. The relative standard deviations of each point (n=5) were smaller than 2%. The results show excellent correlations between peak area and tested concentrations.

3.2.3 Precision

Precision was evaluated at the intra-day and inter-day precision levels. Intra-day was studied by the determination of system precision for six replicate injections of work standard solutions of

losartan potassium (Section 2.3.1) in a concentration of 50 mg L⁻¹ (100% level). This procedure was repeated in a short time. The overall relative standard deviation observed was 0.94% (Table 3).

Inter-day precision also was evaluated by injection of six independent of work standard solutions of losartan potassium (Section 2.3.1) in a concentration at the 100% level. This procedure was repeated in a different day. The overall relative standard deviation observed was 1.15% (Table 3). The assay method precision acceptance criteria set in the validation was smaller than 2.0%.

3.2.4 Accuracy

The accuracy of the losartan potassium capsules method was determined by the measuring the drug recovery in triplicate at three levels from 80 to 120% of the method concentration (50 mg. L⁻¹). Aliquots of losartan potassium stock standard solution (Section 2.3.1) were added to sample capsules solution designed A, B e C (Section 2.3.2) for obtaining of these levels. The mean recovery, expressed in terms of percent recovery of the pharmaceutical dosage forms by the assay, for each component at each level and the respective relative standard deviation were calculated and are listed in Table 3. These indicate that the method enables the accurate determination of the losartan potassium.

3.2.5 Selectivity

The selectivity of the losartan capsules method was demonstrated by the injection of a work standard solution of losartan potassium (Section 2.3.1) in a concentration of 50 mg. L⁻¹ and by the injection of losartan potassium excipient solutions (Section 2.3.3). The chromatogram depicted in Fig. 4 shows that the excipient has negligible contribution with the main peak. The selectivity was also confirmed by comparison of the spectra between the peaks of losartan potassium obtained from reference substance (Section 2.3.1) and losartan potassium reference substance after refluxing at 105°C for 2 h in 1.0 mol L⁻¹ HCl (Section 2.6) using PDA detector. The similarity index between the spectra was 0.9973 indicated that no excipients or impurities interfered with losartan potassium peak.

3.2.6 Robustness

The Robustness of the proposed method was examined by its capacity in resisting small and deliberate variations of the analytical parameters. The pH was changed for the range of 6.0-6.4; the composition of mobile phase (phosphate buffer – acetonitrile (65:35, v/v) was changed from 60:40 up to 70:30, v/v and the temperature rate was evaluated ranging from 33°C up to 37°C. The results, shown in Table 4, confirmed the Robustness of the test, because the obtained values were within the acceptance limits of 95.0–105.0% (29).

3.2.7 Limits of detection and quantification

LOD/LOQ parameters were established to demonstrate that the analyses are being performed in a region above the limit of quantification value. To determine the LOD from this approach, a comparison was made between measurements of the signals of samples with low concentrations of losartan potassium. The signal-to-noise ratio was 3:1 for LOD and 10:1 for LOQ, proportions usually acceptable for these limits. For the present work, the noise was measured from chromatograms of blank (by injection of the mobile phase) in the same regions as the peaks of the analytes. The LOD and LOQ values were 0.114 and 0.420 mg. L⁻¹. The literature presents the values of 0.023 and 0.420 mg L⁻¹ for the LOD and LOQ, respectively (6).

3.3 Accelerated degradation studies

Degradation products were observed in losartan potassium reference substance after refluxing at 105°C for 2 h in 1.0 mol L⁻¹ hydrochloric acid (Fig. 5). To make sure if these degradation products obtained are the same ones identified by Zhao and coworkers (18) spectroscopic analysis will be necessary. Other conditions that usually cause degradation were not performed because in previous studies no degradation products were observed (13,18,26).

3.4 Application of the validated method to pharmaceutical products

The proposed method was applied for determination of losartan potassium in capsules dosage forms. Five samples of capsules solution (Section 2.3.2) of each local drug store (A, B and C) in a concentration of 50 mg. L⁻¹ were analyzed. The results, expressed as percentage drug related to label claim, are informed in Table 5. The amounts of each sample are within the Brazilian Pharmacopoeia and United States Pharmacopeia requirements that establish the limits between 90.0 and 110.0% (2,30).

3.5 Determination of content uniformity of pharmaceutical capsules

Each one content of the ten pharmaceutical forms (unitary doses of 50 mg) of each local drug store (A, B and C) was analyzed. Results are shown in Table 6. The capsules of three local drug stores (A, B and C) contained between 85.13 and 101.45 percent and relative standard deviation was (2.31, 3.03 and 2.59, respectively), in good agreement with the requirements of the Brazilian Pharmacopoeia and United States Pharmacopeia that establish the limits between 85.0 and 115.0% and the R.S.D smaller than 6.0% (2,30).

4. Conclusion

In this study, the application of multivariate approach using factorial design and Doehlert design was a useful tool for simultaneous study of the five factors that play important role in the chromatographic analysis and allow us to establish reasonable chromatographic conditions. The proposed and validated method by HPLC showed to be useful, simple and efficient for determination of losartan potassium in pharmaceutical capsules and could effectively separate the drug from its degradation products. Therefore, the method demonstrated to be in compliance with the requirements of the quality control.

Acknowledgements

The authors are grateful to Center of Pharmaceutical Equivalence of the Nucleus Control of Quality of the Federal University of Alfenas, to the UNIFAL-MG for the financial support and the Laboratory of Toxicological Analysis of the Federal University of Alfenas for the accomplishments of the analyses using PDA detector.

References

- (1) Ferreira, S. L. C., Santos, W. N. L., Quintella, C. M., Neto, B. B., & Bosque-Sendra, J. M. (2004). *Talanta*, **63**, 1061-1067
- (2) The United States Pharmacopoeia (2007) (30. ed.) United States Pharmacopoeia Convention: Rockville
- (3) Barreiro, E. J., & Fraga, C. A. M. (2001) *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*, Artmed, São Paulo/Porto Alegre.
- (4) Schoenberger, J. A. (1995) *J. Hypertens.* **13**, S43–S47
- (5) Williams, R. C., Alasandro, M. S., Fasone, V. L., Boucher, R. J., & Edwards, J. F. (1996) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 1539-1546
- (6) Furtek, C.I., & Lo, M.W. (1992) *J. Chromatogr. A* **573**, 295–301
- (7) Kristoffersen, L., Øiestad, E. L., Opdal, M. S., Krogh, M., Lundanes, E., & Christophersen, A. S. (2007) *J. Chromatogr. B* **850**, 147-160
- (8) Lee, H., Shim, H. O., & Lee, H. S. (1996) *Chromatogr.* **42**, 39–42
- (9) Yeung, P. K., Jamieson, A., Smith, G. J., Fice, D., & Pollak, P. T. (2000) *Int. J. Pharm.* **204**, 17-22
- (10) Ansari, M., Kazemipour, M., Khosravi, F., & Baradaran, M. (2004) *Chem. Pharm. Bull.* **52** (4), 1166 –1170
- (11) Carlucci, G., Palumbo, G., Mazzeo, P., & Quaglia, M. G. (2000) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23**, 185–189
- (12) Erk, N. (2001) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 603-611

- (13) Hertzog, D. L., McCafferty, J. F., Fang, X., Tyrrell, R. J., & Reed, R. A. (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**, 747–760
- (14) Lusina, M Cindri'c, T., Tomai'c, J., Peko, M., Pozai'c, L., & Musulin, N. (2005) *Int. J. of Pharmac.* **291**, 127–137
- (15) Obando, M. A., Estela, J. M., & Cerda, V. (2008) *Anal. Bioanal Chem.* **391**, 2349-2356
- (16) Seburg, R., Ballard, J. M., Hwang, T., & Sullivan, C. M. (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42**, 411–422
- (17) Sreekanth, N., Shivshanker, K., Shanmuga Pandian, P., Roosewelt, C., Srinivasa Rao, G., & Gunasekaran, V. (2007) *Asian J. Chem.* **19**, 2850-2856
- (18) Zhao, Z., Wang, Q., Tsai, E., Qin, X., & Ip, D. (1999) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **20** 129–136
- (19) McCarthy, K. E., Wang, Q., Tsai, E. W., Gilbert, R. E., Ip, D. P., & Brooks, M. A. (1998) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 671–677
- (20) Sathe, S. R., & Bari, S. B. (2007) *Acta Chromatogr.* **19**, 270-278
- (21) Quaglia, M. G., Donati, E., Carlucci, G., Mazzeo, P., & Fanali, S. (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**, 981–987
- (22) Lastra, O. C., Lemus, I. G., Sánchez, H. J., & Pérez, R. F. (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33**, 175-180
- (23) Maggio, R. M., Castellano, P. M., & Kaufman, T. S. (2008) *Anal Bioanal Chem* **391**, 2949-2955
- (24) Choi, Y. (2008) *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* **31** (17), 2643 – 2656
- (25) Neves, R. (2008) *Arzneim. Forsch.* **58**, (8), 369-375
- (26) Maio, V. M. P., Dias, C. L., & Bergold, A. M. (2005) *Acta Farm. Bonaerense* **24** (2), 250–255
- (27) International Conference on Harmonization (1996) “Test and methodology” Validation of Analytical Procedures, ICH-Q2 (R1), Geneva
- (28) Montgomery, D.C. (2000) in *Design and Analysis of Experiments*, D. C. Montgomery (ed.) fifth ed., Wiley, New York, NY pp.177-185
- (29) Tzanavaras, P. D., Themelis, D. G., Zotou, A., Stratis, J., & Karlberg, B. (2008) *J. Pharm. Biomed. Anal* **46**, 670–675

(30) Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. (1988). Atheneu, São Paulo.

Figure Captions

Fig. 1. Chemical structure of losartan potassium.

Fig. 2. Response surface of the theoretical plates divided by retention time (TP/RT). The selected working conditions were 65 percent of 58 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.2).

Fig. 3. Representative chromatogram of system suitability of losartan potassium capsules method. Conditions: C8 analytical column; 1.0 mL min⁻¹ flow rate; column temperature of 35°C; 20-μL injection volume; isocratic method of potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v); UV detection at 254 nm.

Fig. 4. Chromatogram of losartan potassium capsules (a) and placebo (b). Conditions: C8 analytical column; 1.0 mL min⁻¹ flow rate; column temperature of 35°C; 20-μL injection volume; isocratic method of potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v); UV detection at 254 nm.

Fig. 5. Chromatogram of losartan potassium reference substance after refluxing at 120°C for 2 h in 1.0 hydrochloric acid (a) and under normal conditions (b). Conditions: C8 analytical column; 1.0 mL min⁻¹ flow rate; column temperature of 35°C; 20-μL injection volume; isocratic method of potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v); UV detection at 254 nm

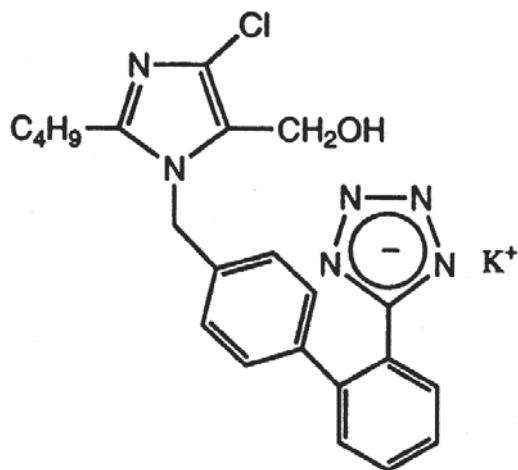


Fig. 1. Bonfilio et al.

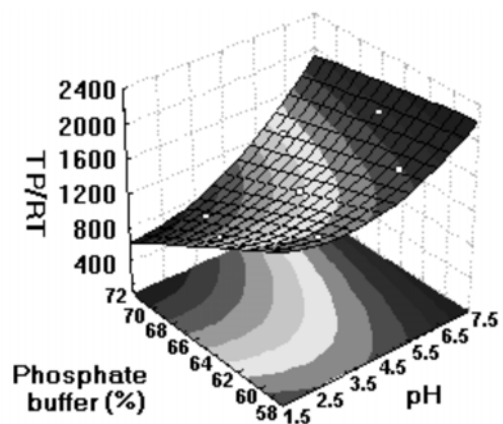


Fig. 2. Bonfilio et al.

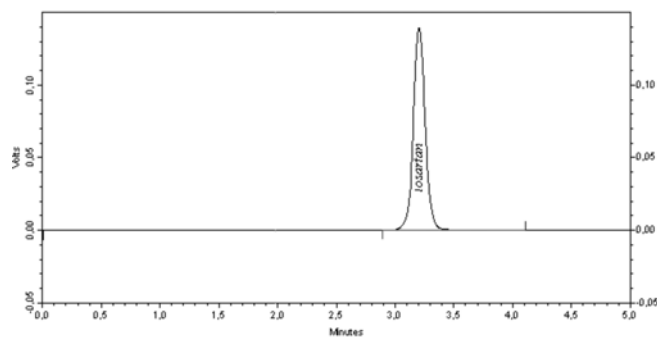


Fig. 3. Bonfilio et al.

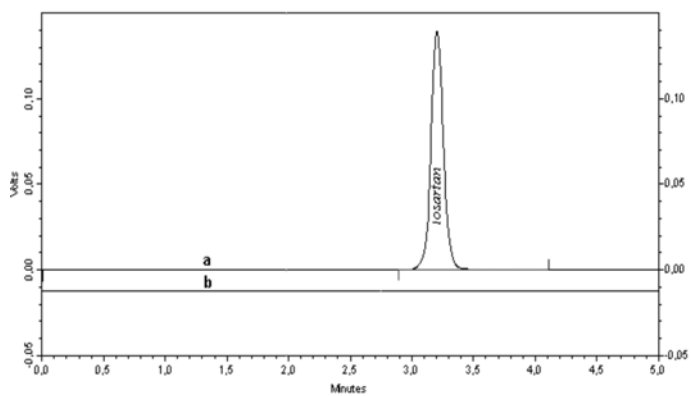


Fig. 4. Bonfilio et al.

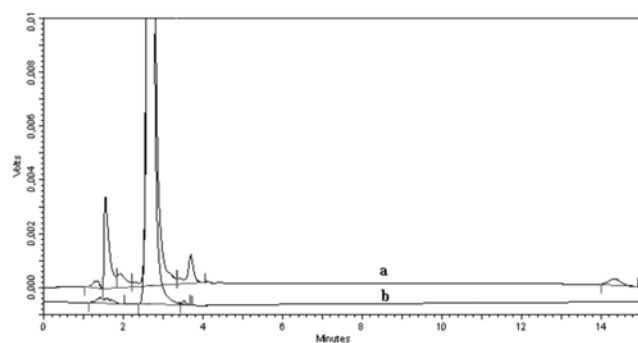


Fig. 5. Bonfilio et al.

Table 1. The 2^{5-1} fractional factorial design and the results obtained for the HPLC method for determination of losartan potassium.

Runs	Buffer Proportion (a)	Column temperature (b)	pH of the buffer (c)	Flow (mL min ⁻¹) (d)	Column type (e)	Response (theoretical plates /retention time)	Mean values	Variance
	- (60%)	- (25°C)	- (2.5)	- (0.8)	- (C8)			
	+ (70%)	+ (35°C)	+(7.0)	+ (1.2)	+(C18)			
1	-	-	-	-	+	1030.41/1041.13	1035.77	57.46
2	+	-	-	-	-	370.05/367.04	368.54	4.53
3	-	+	-	-	-	1062.10/1062.48	1062.29	0.07
4	+	+	-	-	+	491.99/506.51	499.24	105.42
5	-	-	+	-	-	1383.48/1440.35	1412.02	1617.10
6	+	-	+	-	+	544.96/546.49	545.72	1.17
7	-	+	+	-	+	1189.10/1144.31	1166.73	1003.07
8	+	+	+	-	-	1209.44/1201.76	1205.62	29.49
9	-	-	-	+	-	1227.04/1233.30	1230.17	19.59
10	+	-	-	+	+	560.19/555.09	557.64	13.01
11	-	+	-	+	+	1359.02/1386.12	1372.55	367.20
12	+	+	-	+	-	565.95/571.43	568.69	15.02
13	-	-	+	+	+	1295.58/1270.80	1283.38	307.02
14	+	-	+	+	-	1169.95/1321.93	1255.67	11548.96
15	-	+	+	+	-	1802.13/1802.05	1802.09	0.003
16	+	+	+	+	+	792.31/786.04	789.18	19.66

Table 2. Estimated contrast of the factors and estimated error.

Factors and interactions	Estimated contrast
Proportion of the phosphate buffer	-573.02
Column temperature	98.43
pH of the buffer	344.43
Mobile phase flow	194.21
Column type	-205.65
Proportion of the phosphate buffer X Column temperature	-12.22
Proportion of the phosphate buffer X pH of the buffer	103.65
Proportion of the phosphate buffer X Mobile phase flow	-58.63
Proportion of the phosphate buffer X Column type	-43.59
Column temperature X pH of the buffer	20.77
Column temperature X Mobile phase flow	-44.54
Column temperature X Column type	2.91
pH of the buffer X Mobile phase flow	3.40
pH of the buffer X Column type	116.47
Mobile phase flow X Column type	-5.43
Estimated error	23.03

Table 3. Results of precision and accuracy of the losartan potassium capsules method. Conditions: C8 analytical column; 1.0 mL min⁻¹ flow rate; column temperature of 35°C; 20-μL injection volume; isocratic method of potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v); UV detection at 254 nm.

Parameters	Conditions	Concentration levels (μg/mL)	Mean	(%) R.S.D	Mean recovery (%)
<i>Precision</i>					
Intra-day	Series 1	50	986422.33	1.31 (n =6)	
	Series 2	50	981826.50	0.56 (n =6)	
Inter-day	Day 1	50	1043889.67	0.74 (n =6)	
	Day 2	50	1030716.67	1.55 (n =6)	
<i>Accuracy</i>					
	Sample A	40	776774.7	1.32 (n =3)	
		50	966812	1.08 (n =3)	98.2
		60	1169952	0.26 (n =3)	
	Sample B	40	773670	1.95 (n =3)	
		50	1027599	1.14 (n =3)	102.0
		60	1177576	0.92 (n =3)	
Sample C	40	815278.7	0.10 (n =3)		
	50	1012311	0.95 (n =3)	99.7	
	60	1145946	1.86 (n =3)		

Table 4. Robustness study of the HPLC assay.

Chromatographic parameters	Percent recovery*
Optimal conditions	99.0
Variation of the pH	
pH = 6.0	97.6
pH = 6.4	99.3
Variation of the ACN:buffer phosphate ratio	
30:70 (v/v)	98.8
40:60 (v/v)	100.3
Variation of column temperature	
T= 33°C	98.9
T= 37°C	98.2

* Percent recovery according to the calibration curve obtained under optimal conditions (mean of three injections).

Table 5. Assay of losartan potassium in pharmaceutical capsules of samples A, B e C. Conditions: C8 analytical column; 1.0 mL min⁻¹ flow rate; temperature of 35°C; 20-μL injection volume; isocratic method of potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v); UV detection at 254 nm.

	Standard	Sample A	Sample B	Sample C
Mean	948455.3	913982.8	928446.4	944336.8
R.S.D. (%)	0.39 (n=5)	0.34 (n=5)	0.53 (n=5)	0.48 (n=5)
Losartan (%)	98.90	95.31	96.81	98.47
Losartan (mg)	---	48.19	48.94	49.78

Table 6. Content uniformity of losartan potassium in pharmaceutical capsules of samples A, B e C. Conditions: C8 analytical column; 1.0 mL min⁻¹ flow rate; column temperature of 35°C; 20-μL injection volume; isocratic method of potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v); UV detection at 254 nm.

Capsule	Sample A (%)	Sample B (%)	Sample C (%)
1	94.02	91.24	94.10
2	90.40	89.73	93.84
3	93.15	88.86	94.67
4	94.47	88.19	96.99
5	93.42	87.25	98.79
6	96.68	92.36	101.45
7	90.70	88.38	95.59
8	98.70	85.13	93.84
9	94.15	86.03	97.76
10	93.51	93.57	95.50

2.3 ARTIGO III

O artigo III consiste na otimização e validação de um ensaio de dissolução de cápsulas contendo 50 mg de losartano potássico utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrofotometria no UV como métodos de detecção.

Losartan potassium dissolution test for drug release evaluation in pharmaceutical capsules using HPLC and UV spectrophotometry

Rudy Bonfilio ^{a*}, Taciane Ferreira Mendonça ^a, Gislaine Ribeiro Pereira. ^a, César Ricardo Teixeira Tarley ^b, Magali Benjamim de Araújo ^a.

^a *Department of Pharmacy, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000. Alfenas-MG, Brazil.*

^b *Department of Exact Sciences, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000. Alfenas-MG, Brazil.*

*Corresponding author. Rudy Bonfilio. Department of Pharmacy, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000. Alfenas-MG, Brazil. Tel/Fax +55 35 3299 1350
E-mail address: rudybonfilio@yahoo.com.br

Keywords: Losartan potassium; full factorial design; dissolution; drug release;

ABSTRACT

The present work describes the development and validation of a dissolution test for capsules containing 50 mg of losartan potassium using HPLC and UV spectrophotometric quantitation methods. After testing “sink” conditions, a 2⁴ full factorial design was carried out to evaluate the following factors: dissolution medium (water and potassium phosphate buffer, pH 6.8); apparatus (basket and paddle); collect time (30 and 60 min) and stirring speed (50 and 100 rpm). After analysis of the results, the best dissolution conditions were achieved by using potassium phosphate buffer, pH 6.8 as dissolution medium, basket as apparatus at the stirring speed of 50 rpm and time of 30 min. Both dissolution procedure and analytical methods were validated including selectivity, linearity, precision and accuracy. Validation acceptance criteria were met in all cases. The dissolution test was successfully employed in three different drug products and a statistical analysis of the results showed that there are no significant differences between HPLC and spectrophotometric analytical methods. Since there is no official monograph for this product, the dissolution test developed could be applied for assessment of drug release of losartan potassium salt from capsules for quality control routine.

1. Introduction

The quality assurance of pharmaceutical products is a wide-ranging concept covering all matters that individually or collectively influence the quality of a product. In this sense, the importance of *in vitro* dissolution tests for immediate release solid oral dosage forms, such as tablets and capsules must be highlighted, since they are essential to evaluate the lot-to-lot quality of a drug product, to guide development of new formulations and to ensure continuing product quality and performance after certain changes, such as changes in the formulation, the manufacturing process, the site of manufacture, and the scale-up of the manufacturing process [1]. Although immediate release solid dosage forms are routinely subjected to tests such as content uniformity, weight, hardness, friability and disintegration, the test that is most often associated with the assessment of *in vivo* performance is the dissolution test [2].

Therefore, undoubtedly, there is a real need to develop dissolution tests for pharmaceutical products to assure the quality and to attend the regulatory demands.

Losartan potassium (Fig.1), 2-butyl-4-chloro-1-[*p*-(*o*-1*H*-tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl]imidazole-5-methanol monopotassium salt [3], was the first of a new class of orally active, non-peptide angiotensin II receptor (type AT1) antagonist for the treatment of hypertension. Losartan has been demonstrated to be superior to previous peptide receptor antagonists and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors because of its enhanced specificity, selectivity and tolerability [4,5]. Losartan potassium has a molecular weight of 461; a pKa value of 4.9; an aqueous solubility of 3.3 mg mL⁻¹ at pH 7.8 [6] and exhibits highly variable and low oral bioavailability (approximately 33%) [7,8]. Losartan is, therefore, considered class 3 in the biopharmaceutics classification system, because it has high solubility and low permeability.

Several analytical techniques have been applied to the analysis of losartan potassium in biological fluids using high performance liquid chromatography methods (HPLC) [9-13]. For applications in pharmaceutical products there are methods that make use of HPLC [14-22], high performance thin layer chromatography (HPTLC) [23,24], capillary electrophoresis (CE), capillary electrochromatography (CEC) [25] and spectrophotometry [26-28]. Recently, the literature presents the employment of the HPLC for bioequivalence studies of tablets containing losartan potassium [29,30].

At the best of our knowledge, there are no dissolution tests described in literature for losartan potassium in pharmaceutical capsules and not any pharmacopoeia described an official method. The aim of this work is to establish conditions for a dissolution test for losartan potassium capsules using a multivariate approach, to validate the test and quantitation methods, to evaluate three different commercial products and to compare HPLC and spectrophotometric methods .

The multivariate experimental design provides a reduction in the number of required experiments, is faster to implement and more cost-effective than traditional univariate approaches. Therefore, a full factorial design was found to be suitable for the purpose of this work.

2. Materials and Methods

2.1. Chemical and reagents

All reagents were of analytical grade. Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4), phosphoric acid PA, sodium hydroxide PA, HPLC grade acetonitrile and hydrochloride acid PA were

purchased from Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brazil). 98.90% purity losartan potassium salt was supplied by IPCA laboratories limited[®] (Athal, Indian). 50 mg losartan potassium salt in capsules were supplied by three local drugstores from three different Brazilian manufactures, codified as A, B and C. The placebo mixture used in accuracy and selectivity studies containing pharmaceutical grade excipients (magnesium stearate, aerosil, sodium dodecyl sulfate, talc, starch and microcel MC-102 1) were obtained from the same local drugstores (A, B and C).

2.2. Instrumentation

Dissolution tests were performed in an Electrolab[®] TDT-08 L multi bath (n=8) dissolution test system (Mumbai, India), in accordance with The United States Pharmacopoeia (USP) general method [3].

UV visible spectrophotometer used was a Shimadzu[®] model 1601 (Kyoto, Japan), connected to a computer loaded with Shimadzu UVPC version 3.9 software.

The HPLC equipment used was a Shimadzu[®] series LC-10A (Kyoto, Japan), consisting of a LC AVP pump, a CLASS-VP 5.02 integration system, a DGU-14 A degasser, a 7725i manual injector with a 20 μ L loop, (Rheodyne[®], California, United States), a SPD-10AVP integrated UV detector, a FCV-10ALVP valve, a CTO-10AVP column oven and a SCL-10 AVP controller. A Nucleosil RP8 analytical column, 5 μ m particle size, 125 \times 4.6 mm i.d. (Macherey Nagel[®], Düren, Germany) with a guard column (20 \times 4.6 mm i.d.) was used in this study.

The following equipments were also used: digital pHmeter PA 200 (Marconi[®] S.A., Piracicaba, Brazil); ultrasonic Bath model USC2800A (Unique[®], São Paulo, Brazil); analytical balance model 410 (Kern[®], Kern, Germany); reverse osmosis water purifier OS 10 LTH

(Gehaka[®], São Paulo, Brazil); vacuum filtration system (Millipore[®], Bedford, United States) and disintegrator model 299-6 (Nova Ética[®], São Paulo, Brazil).

2.3. Solutions

All dissolution media used in this study (water and phosphate buffer, pH 6.8) were degassed at 41°C in ultrasonic bath for 30 min prior to use.

A buffer potassium phosphate at pH 6.8 was prepared by adding 13.6 g of potassium dihydrogenphosphate and 224 mL of 0.2 mol L⁻¹ sodium hydroxide in 2.0 L of water. The pH value was checked with the pHmeter.

The stock solutions of losartan potassium were prepared in a 50 mL volumetric flask by dissolving an accurately weighed amount (27.8 mg) of losartan potassium standard (98.90% purity) in potassium phosphate buffer or purified water depending on the dissolution medium used. This solution was filtered in a quantitative VETEC filter paper. Working standard solutions were prepared immediately before use, by appropriate dilutions of the corresponding stock solutions of losartan potassium with potassium phosphate buffer or purified water.

Placebo solutions were prepared by dissolving an amount accurately weighed of placebo mixture (containing the same amount of the products A, B and C) in potassium phosphate buffer.

Sample solutions were prepared by putting one capsule in each vessel containing the dissolution medium (900 mL) at the temperature of 37±0.5°C. Samples were collected at the end of the specified time and filtered in a quantitative VETEC filter paper. For the HPLC analysis, samples were directly injected into the HPLC system. In the spectrophotometric analysis, 2.5 mL

of the samples were transferred into a 25 mL volumetric flask, later completed with dissolution medium.

To avoid interference from the capsule shell in the spectrophotometric quantitation, blank solutions were prepared by dissolving capsule shells of each brand (A, B and C) into the same medium and performed the dissolution test in the same manner as the samples. Any absorbance obtained from the blank solutions was subtracted from the absorbance of the sample solutions.

2.4. Spectrophotometric measurements

Spectra of losartan potassium standard were built in the range from 400 to 200 nm using 1 cm quartz cuvettes in the fast scan speed, 2.0 nm data interval and 2 nm bandwidth. The percentage of drug release (DR%) was assayed at the wavelength of 205 nm.

2.5. HPLC analytical procedure

The volume of injection was twenty microliters. All solutions were filtered through a 0.45 μm millex-LCR filter before the injection in the column. The flow rate was set at 1.00 mL min⁻¹ with a mobile phase of potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v). The mobile phase was filtered under vacuum through 0.45 μm modified hydrophilic PTFE membrane and degassed ultrasonically for 30 min prior to use. The column temperature was maintained at 35°C. Peak areas were taken as analytical signal, with detection at 254 nm.

2.6. Sink conditions

In order to establish *sink* conditions, the solubility of the drug was tested using 100 mg of losartan potassium in 300 mL of 0.1 mol L⁻¹ HCl, 0.01 mol L⁻¹ HCl, phosphate buffer, pH 6.8 and water.

2.7. Dissolution experiments based on factorial design of each factor

In order to evaluate the significance of each factor in the dissolution conditions, a 2⁴ full factorial design was performed in duplicate in a total of 16 experiments for each sample (A, B and C). The following parameters were investigated: dissolution medium (water and potassium phosphate buffer, pH 6.8); apparatus (basket and paddle); stirring time (30 and 60 min) and stirring speed (50 and 100 rpm). These factors and their levels are listed in Table 1.

The main effects of each studied factor and the variance of each experiment were calculated according to literature [31] and the standard variance (S_p^2) of the factors was calculated via Eq. (1):

$$S_p^2 = \frac{(n_A - 1)s_A^2 + (n_B - 1)s_B^2}{(n_A - 1) + (n_B - 1)} \quad (1)$$

Where n is the number of times that the assay was repeated and s^2 is the variance obtained in each assay. After that, the variance of the effects was obtained from Eq. (2):

$$V(\text{estimate}) = V[\bar{R}(+)] + V[\bar{R}(-)] = \frac{s_p^2}{n} + \frac{s_p^2}{n} \quad (2)$$

Where n is the number of assays with low (8) and high (8) levels. The error of the effects was obtained by extracting the root of the variance. By multiplying the error by the critical t_{n-1} with 16 degree of freedom (2.120) [31] for a confidence interval of 95%, it was obtained the estimated error for each product.

2.8. Method validation

2.8.1. Selectivity

For determination of selectivity, the placebo samples and empty capsules of each product (A, B and C, respectively) were transferred to separate vessels ($n = 6$) containing 900 mL of dissolution medium at 37 ± 0.5 °C and stirred for 60 min at 150rpm using basket as apparatus. Aliquots were collected and the interference of empty capsules and placebo mixture of each formulation was evaluated by HPLC and spectrophotometry [32].

2.8.2. Linearity

Linearity was evaluated according to the ICH guidelines [33], by the analysis of standard solutions in the final concentrations of 30.0, 40.0, 50.0, 60.0 and 70.0 mg L⁻¹ of losartan potassium in phosphate buffer pH=6.8 using HPLC detection. The calibration curve using spectrophotometry was obtained in the final concentrations of 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0 mg L⁻¹ of

losartan potassium in phosphate buffer pH=6.8. The calculation of regression line was employed by the method of least squares.

2.8.3. Repeatability (intra-assay) and intermediate precision (inter-assay) of the analytical methods

The repeatability of analytical methods was validated by analysis of six standard solutions of losartan potassium dissolved in phosphate buffer pH=6.8 at the concentrations of 55.6 and 5.56 mg L⁻¹ using HPLC and spectrophotometry, respectively (100% levels). The intermediate precisions of methods were determined similarly but a second analyst repeated the procedure in a different day. The R.S.D values for determinations were calculated [33].

2.8.4. Repeatability (intra-assay) and intermediate precision (inter-assay) of the dissolution procedure

The repeatability of dissolution procedure was accomplished submitting six samples of each product (A, B and C) to the optimized dissolution test. Aliquots were collected and evaluated by HPLC and spectrophotometry at 205 nm. The intermediate precisions were determined similarly but a second analyst repeated the procedure in a different day. The R.S.D values for determinations were calculated [34].

2.8.5.1. Accuracy of the analytical methods

Accuracy of the analytical methods was carried out by the addition of losartan potassium stock standard solution to placebo mixtures A, B and C (section 2.1) in 25 ml volumetric flasks, to obtain three final concentration levels, corresponding to 80, 100 and 120% of target

concentration of each quantitation method (HPLC and spectrophotometry). Each solution was prepared in triplicate. The percent recoveries were calculated [33].

2.8.5.2. Accuracy of the dissolution procedure

Accuracy of dissolution tests was determined by the addition of 40, 50 and 60 mg of losartan potassium to placebo mixtures A, B and C (section 2.1) in vessels containing 900 mL of dissolution medium (phosphate buffer, pH = 6.8). The samples were submitted to optimized dissolution test. Aliquots were collected and analyzed by HPLC and spectrophotometry at 205 nm. These studies were performed in triplicate. The percent recoveries were calculated [34].

2.8.6. LOD and LOQ

The detection (LD) and quantitation (LQ) limits of the HPLC method were determined based on the S/N criteria. The signal-to-noise ratio was 3:1 for LOD and 10:1 for LOQ. The noise was measured from chromatograms of blank (phosphate buffer, pH = 6.8) [33].

The detection (LD) and quantitation (LQ) limits of the UV spectrophotometric method were obtained from the Eq. (3) and Eq. (4):

$$\text{LOD} = 3(\text{S.D}/a) \quad (3)$$

$$\text{LOQ} = 10(\text{S.D}/a) \quad (4)$$

where S.D. is standard deviation of the 20 spectrophotometric readings of blank (phosphate buffer, pH = 6.8). and a is slope of calibration curves obtained in the linearity study [33].

2.9 Disintegration

All capsules formulations were subject to a disintegration test according general chapters to United States Pharmacopoeia [3]. All tests were conducted using water at $37 \pm ^\circ\text{C}$. Six capsules per formulation were tested.

2.10. Dissolution profiles

The dissolution profiles were obtained after determining the best dissolution condition tests as well as the validation. Potassium phosphate buffer, pH 6.8 was used as dissolution medium, basket as apparatus at the stirring speed of 50 rpm and vessel volume of 900 mL. Aliquots of 5 mL were withdrawn from each vessel and the same volume of the dissolution medium was replaced to maintain a constant total volume. The times selected were 2; 5; 10; 20; 30 and 60 minutes. Six samples were assayed for each product using both HPLC and spectrophotometry.

2.11 Comparison of methods

A factorial design $6 \times 3 \times 2$ (six time points, three products and two methods) with six repetitions was used together with a statistical method based on the analysis of variance (ANOVA) in order to compare the analytical methods (UV spectrophotometry x HPLC) at 0.05 significance level.

3. Results and discussion

3.1 Spectrophotometric conditions

The ultraviolet spectrum for losartan potassium, in water and potassium phosphate buffer showed maximum drug absorption wavelength at 205 nm. Therefore, this wavelength was used for the losartan potassium spectrophotometric quantitation throughout the study.

3.2 Optimization of HPLC conditions

In the HPLC analysis, the chromatographic conditions were based on the previous work, in which a methodology by HPLC for the quantitation of losartan potassium in pharmaceutical capsules was developed and validated. In order to confirm if the chromatographic parameters are in accordance to literature, a system suitability test was carried out by injecting six replicates of a work standard solution of losartan potassium containing 55.5 mg L^{-1} . The retention time was 2.92 min; theoretical plates higher than 4100; capacity factor of 2.19 and asymmetry of 1.30. The relative standard deviation of peak area was 0.96 %. Thus, all parameters are in agreement to the United States Pharmacopeia recommendations [3].

3.3. Optimization strategy of dissolution experiments

The experiments were performed in duplicate for the products A, B and C using a 2^4 full factorial design in a total of 16 experiments (Table 2). Taking into account the analytical

responses as drug release percent (DR%), the effects of the four factors and their respective errors were calculated and shown in Table 3. When the effects of factorial design exceed the estimated error for each product in a level of 95% of confidence interval, this effect becomes statistically significant [31]. Furthermore, variables with positive effects indicate that an increase of their level provides a significant increase in the DR % and negative effects mean that higher percentage of drug release is obtained with decrease in the levels of the variables.

Considering HPLC method, only F4 (stirring speed) was statistically significant with a negative effect (-2.78) for product A. For product B, only F4 is significant too, however the effect was positive (2.77). One possible explanation for this paradoxical effect is the difference of the excipients contained in each product A and B. In the case of product A, the increase of the agitation speed could have favored the interaction of its excipients with the active principle [35], resulting in a smaller analytical responses, which was not observed with product B. However, when the experiments were carried out with stirring speed of 50 rpm the drug release percent (DR%) was higher than 80% in all products (Table 2). This effect was observed due to the high aqueous solubility of losartan potassium [6]. Therefore, this factor was fixed at 50 rpm because this stirring speed is enough to assure an effective drug release of products. Moreover, a maximum discriminatory power should be obtained with lower stirring rate [35].

Regarding spectrophotometric detection, F2 (apparatus) was statistically significant. The negative effect for both products B (-3.03) and C (-3.77) indicates that the basket is an adequate stirring apparatus. This result is in accordance with USP 30 that recommends basket apparatus for dissolution test of capsules [3].

The factor F1 (dissolution mediums) is not significant for all products, considering both detection methods. Therefore, both mediums (phosphate buffer pH 6.8 and water) could be used

in the subsequent analysis. However, the use of water as a dissolution medium is discouraged because test conditions such as pH and surface tension can vary depending on the water source and may change during the dissolution test itself [1]. For this reason, the phosphate buffer pH 6.8 was chosen as dissolution medium. The 0.1 and 0.01 mol L⁻¹ HCl was not used for establishment of dissolution medium because the drug was not dissolved in both solutions, and a precipitate was observed during the establishment of “sink” conditions.

The time of 30 minutes is not statistically different from 60 minutes. Consequently, the time of 30 minutes was chosen considering the importance of analytical frequency in pharmaceutical quality control laboratories.

The established conditions after 2⁴ full factorial design were: 900 mL of phosphate buffer, pH 6.8 at 37° C as dissolution medium, basket as apparatus at the stirring speed of 50 rpm and collection in 30 minutes.

3.4. Method validation

3.4.1. Selectivity

Placebo formulations for products A, B and C did not present absorbance at 205 nm. However, A, B and C capsule shells presented UV absorbance at 205 nm (Fig. 2). For this reason, in this method one capsule shell of each product was analyzed in a separate vessel under the same optimized conditions and the absorbance value was subtracted from the sample solution absorbance to eliminate this interference.

In the HPLC method no additional chromatographic peaks from the placebo formulations and empty capsules were observed with the same retention time for losartan potassium, which demonstrates the selectivity of this method (Fig. 3).

3.4.2 Linearity

The calibration equations obtained from HPLC and spectrophotometry were: peak area = $18994 [\text{losartan potassium}(\text{mg L}^{-1})] + 19753$ and $\text{abs} = 0.0891[\text{losartan potassium}(\text{mg L}^{-1})] - 0.0011$, respectively. The least square regression showed excellent correlation coefficients: $r = 1.0000$ and 0.9999 for HPLC and spectrophotometric methods, respectively. The relative standard deviation of each point ($n=5$) was smaller than 2%. The results meeting the acceptance criteria [33].

3.4.3.1 Repeatability (intra-assay) and intermediate precision (inter-assay) of the analytical methods

The results of the repeatability (intra-assay) and intermediate precision (inter-assay) of the methods are shown in Table 4. The relative standard deviations did not exceed 2.0% for both methods, demonstrating suitable precision [36].

3.4.3.2 Repeatability (intra-assay) and intermediate precision (inter-assay) of the dissolution procedure

The results of the repeatability (intra-assay) and intermediate precision (inter-assay) of the dissolution procedure using HPLC and spectrophotometry are shown in Table 5. The relative

standard deviations did not exceed 5.0%, demonstrating suitable precision for the dissolution test [36].

3.4.4.1 Accuracy of the analytical methods

The values of analytical methods accuracy for losartan potassium in all drug products are summarized in Table 6. The average values are between 98.0-102.0% for both methods, showing good recovery [36].

3.4.4.2 Accuracy of the dissolution procedure

The values of dissolution procedure accuracy for losartan potassium in all drug products shown in Table 7 are between 95.0-105.0%, showing good recovery according to literature [36].

3.4.5. LD and LQ

The detection limits of the HPLC and spectrophotometric methods were found to be 0.013 and 0.08 mg L⁻¹, respectively. The quantitation limits of the HPLC and spectrophotometry were found to be 0.22 mg L⁻¹ and 0.26 mg L⁻¹, respectively. The Precision experiments at the LQ level yielded R.S.D. of 2.0% and 1.9% ($n = 3$) for HPLC and spectrophotometric methods, respectively.

3.5. *Disintegration*

All formulations met the compendial requirements for capsules [3] (disintegration time < 20 minutes). Disintegration times were 5 minutes and 11 seconds; 4 minutes and 52 seconds and 5 minutes and 35 seconds for products A, B and C, respectively.

3.6. *Dissolution profiles*

The validated methods were used in the analysis of three losartan potassium capsules supplied from three different manufacturers. Dissolution profiles of each product using HPLC and spectrophotometric detection are presented in Fig. 4 and Fig.5, respectively. The results are expressed as losartan potassium concentration dissolved versus time (minutes). All three products tested showed >95% dissolution in 30 min. These results are in accordance to FDA [1], which recommended that for highly soluble and rapidly dissolving drug products (BCS classes 1 and 3), a single-point dissolution test specification of 85% in 60 minutes or less is sufficient as a routine quality control test for batch-to-batch uniformity. Therefore, 30 minutes can be considered satisfactory to evaluate the release-time of losartan potassium in capsules, in agreement with the results of factorial design. So, the acceptance criterion of 85% in 30 minutes was used.

3.7 *Comparison of methods*

Table 8 presents the data obtained by ANOVA, where the analytical methods were statistically compared. The results obtained show that there are no significant differences

between HPLC and spectrophotometric analytical methods as well as interactions between methods and products.

4. Conclusion

In this work, it was developed and validated a dissolution test for losartan potassium in capsules. The use of 900 mL of phosphate buffer, pH 6.8 at 37 °C, basket at the stirring speed of 50 rpm as apparatus and 30 minutes of test provided satisfactory results for all products. The application of multivariate approach was a useful tool in the establishment of the factors influence in the dissolution test using a reduced number of experiments. Both HPLC and spectrophotometric can be successfully employed to the quantitation of losartan potassium in capsules from the dissolution tests. This study illustrates the importance of an official method for dissolution test, since there is no official monograph for losartan potassium in capsules.

Acknowledgements

The authors are grateful to Center of Pharmaceutical Equivalence of the Nucleus Control of Quality and the UNIFAL-MG for the financial support. The author César Ricardo Teixeira Tarley is grateful to the CNPq for fellowships.

References

[1] FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Guidance for Industry. FDA, USA, 1997.

- [2] J. B. Dressman, G. L. Amidon, C. Reppas, V. P. Shah, Dissolution Testing as a Prognostic Tool for Oral Drug Absorption: Immediate Release Dosage Forms, *Pharm. Res.* 15 (1998), 11--22.
- [3] The United States Pharmacopoeia, 30th.ed. United States Pharmacopoeia Convention: Rockville, 2007, pp. 1280--1281.
- [4] J. A. Schoenberger, Losartan with hydrochlorothiazide in the treatment of hypertension, *J. Hypertens.* 13 (1995), S43--S47.
- [5] D. L. Hertzog, J. F. McCafferty, X. Fang, R. J. Tyrrell, R. A. Reed, Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002), 747--760.
- [6] R. C. Williams, M. S. Alasandro, V. L. Fasone, R. J. Boucher, J. F. Edwards, Comparison of liquid chromatography, capillary electrophoresis and super-critical fluid chromatography in the determination of losartan potassium drug substance in Cozaar tablets *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996), 1539--1546.
- [7] A. Soldner, L. Benet, Z. E. Mutschler, U. Christians, Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and Caco-2 cell monolayers, *Br. J. Pharm.* 129 (2000), 1235--1243.
- [8] M. W. Lo, M. R. Goldberg, J. B. Mccrea, H. Lu, C. I. Furtek, T. D. Bjornsson, Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3 174 in humans, *Clin. Pharmacol. Ther.* 58 (1995), 641--649.
- [9] C.I. Furtek, M.W. Lo, Simultaneous determination of a novel angiotensin II receptor blocking agent, losartan, and its metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 573 (1992), 295--301.
- [10] H. Lee, H. O. Shim, H. S. Lee, Simultaneous determination of losartan and active metabolite EXP3174 in rat plasma by HPLC with column switching, *Chromatogr.* 42 (1996), 39--42.
- [11] P. K. Yeung, A. Jamieson, G. J. Smith, D. Fice, P. T. Pollak, Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection, *Int. J. Pharm.* 204 (2000), 17--22.
- [12] L. Kristoffersen, E. L., Øiestad, M. S. Opdal, M. Krogh, E. Lundanes, A. S. Christophersen, Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design *J. Chromatogr. B* 850 (2007), 147--160.

- [13] A. Soldner, H. Spahn-Langguth, E. Mutschler, Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and Caco-2 cell monolayers, *Brit. J. Pharmacol.* 129 (2000), 1235--1243.
- [14] N. Erk, Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001), 603--611.
- [15] M. Ansari, M. Kazemipour, F. Khosravi, M. Baradaran, A comparative study of first-derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography applied to determination of losartan potassium in tablets, *Chem. Pharm. Bull.* 52 (2004), 1166--1170.
- [16] Z. Zhao, Q. Wang, E. Tsai, X. Qin, D. Ip, Identification of losartan degradates in stressed tablets by LC-MS and LC-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999), 129--136.
- [17] G. Carlucci, G. Palumbo, P. Mazzeo, M. G. Quaglia, Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000), 185--189.
- [18] V. M. P. Maio, C. L. Dias, A. M. Bergold, Validation of an Isocratic HPLC Assay of Losartan Potassium in Pharmaceutical Formulations and Stress Test for Stability Evaluation of Drug Substance, *Acta Farm. Bonaerense* 24 (2005), 250--255.
- [19] M. Lusina, T. Cindrić, J. Tomaić, M. Peko, L. Pozaić, N. Musulin, Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets *Int. J. of Pharmac.* 291 (2005), 127--137.
- [20] M. A. Obando, J. M. Estela, V. Cerda, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in tablets by high-performance low-pressure chromatography using a multi-syringe burette coupled to a monolithic column, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008), 2349--2356.
- [21] R. Seburg, J. M. Ballard, T. Hwang, C. M. Sullivan, Photosensitized degradation of losartan potassium in an extemporaneous suspension formulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006), 411--422.
- [22] N. Sreekanth, K. Shivshanker, P. S. Pandian, C. Roosewelt, G. S. Rao, V. Gunasekaran, Simultaneous estimation and validation of ramipril, losartan potassium and hydrochlorothiazide by RP-HPLC in pure and pharmaceutical dosage form, *Asian J. Chem.* 19 (2007), 2850--2856.
- [23] K. E. McCarthy, Q. Wang, E. W. Tsai, R. E. Gilbert, D. P. Ip, M. A. Brooks, Determination of losartan and its degradates in COZAAR tablets by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998), 671--677.
- [24] S. R. Sathe, S. B. Bari, Simultaneous analysis of losartan potassium, atenolol, and hydrochlorothiazide in bulk and in tablets by high-performance thin-layer chromatography with UV absorption densitometry, *Acta Chromatogr.* 19 (2007), 270--278.

- [25] M. G. Quaglia, E. Donati, G. Carlucci, P. Mazzeo, S. Fanali, Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002), 981--987.
- [26] O. C. Lastra, I. G. Lemus, H. J. Sánchez, R. F. Pérez, Development and validation of an UV derivative spectrophotometric determination of Losartan potassium in tablets *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003), 175--180.
- [27] R. M. Maggio, P. M. Castellano, T. S. Kaufman, A multivariate approach for the simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in a combined pharmaceutical tablet formulation, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008), 2949--2955.
- [28] A. H. Prabhakar, R. Giridhar, A rapid colorimetric method for the determination of Losartan potassium in bulk and in synthetic mixture for solid dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002), 861--866.
- [29] R. Neves, Bioequivalence study of two different film-coated tablet formulations of losartan-hydrochlorothiazide in healthy volunteers, *Arzneim. Forsch.* 58 (2008), 369--375.
- [30] Y. Choi, Determination of Losartan in Human Plasma by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry (LC-ESI-MS): Application to Bioequivalence Study, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 31 (2008), 2643--2656.
- [31] D.C. Montgomery, Design and Analysis of Experiments, in: D. C. Montgomery (ed.), Wiley, NY, 2000, pp.177--185.
- [32] A. R. Breier, C. S. Paim, M. Steppe, E. E. S. J. Schapoval, Development and Validation of Dissolution Tests for Fexofenadine Hydrochloride Capsules and Coated Tablets, *Pharm. Pharmaceut. Sci.* 8 (2005), 289--298.
- [33] International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedures, ICH-Q2 (R1), Geneva, 1996.
- [34] R. C. P. Azevedo, G. P. Ribeiro, M. B. Araújo, Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para captopril em cápsulas magistrais por CLAE, *Braz. J. Pharm. Sci.* 44 (2008), 261--269.
- [35] V. P. Shah, M. Gurbarg, A. Noory, S. Dighe, J. P. Skelly, Influence of Higher Rates of Agitation on Release Patterns of Immediate-Release Drug Products, *J. Pharm. Sci.* 81 (1991), 500--503.
- [36] M.R.C. Marques, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais, *Rev. Anal.* 1 (2002), 48--51.

Figure captions

Fig. 1. Chemical structure of losartan potassium.

Fig. 2. UV spectrum of losartan potassium (a), empty capsules A, B and C (b) and placebo samples A, B and C (c), after dissolution test using basket at 150 rpm for 60 minutes. The aliquots were diluted 10-fold.

Fig. 3. Chromatogram of placebo sample of product A (a), placebo sample of product B (b), placebo sample of product C (c), empty capsule A (d), empty capsule B (e), empty capsule C (f) and a work standard solution of losartan potassium 55.6 mg. L⁻¹ in phosphate buffer pH 6.8 (g). Conditions: C8 analytical column; 1.0 mL min⁻¹ flow rate; column temperature of 35°C; 20-μL injection volume; isocratic method of potassium phosphate buffer (pH 6.2; 58 mmol L⁻¹) – acetonitrile (65:35, v/v); UV detection at 254 nm.

Fig. 4. Dissolution profile of 50 mg capsules losartan potassium products codified as A, B and C under optimal dissolution conditions using HPLC method.

Fig. 5. Dissolution profile of 50 mg capsules losartan potassium products codified as A, B and C under optimal dissolution conditions using spectrophotometric method.

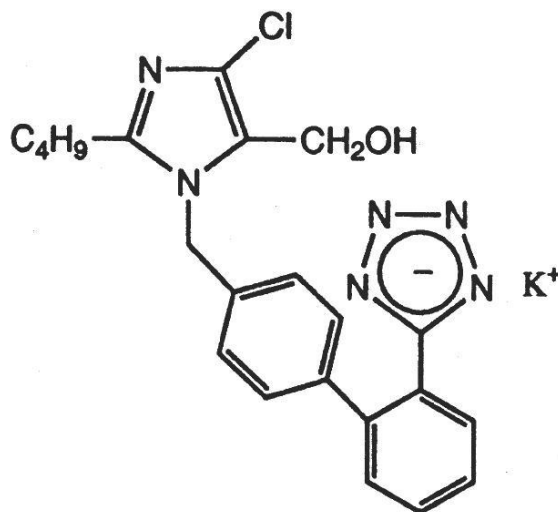


Fig. 1. Bonfilio et al

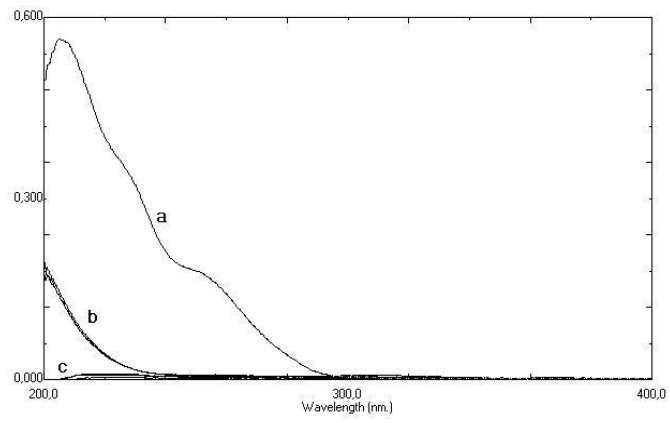


Fig. 2. Bonfilio et al

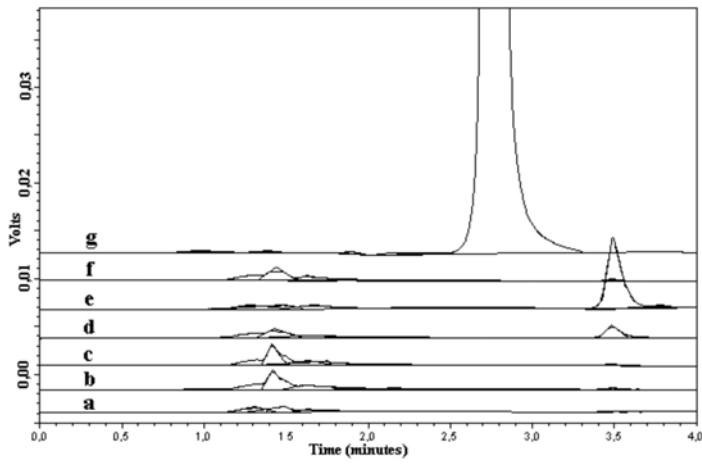


Fig. 3. Bonfilio et al

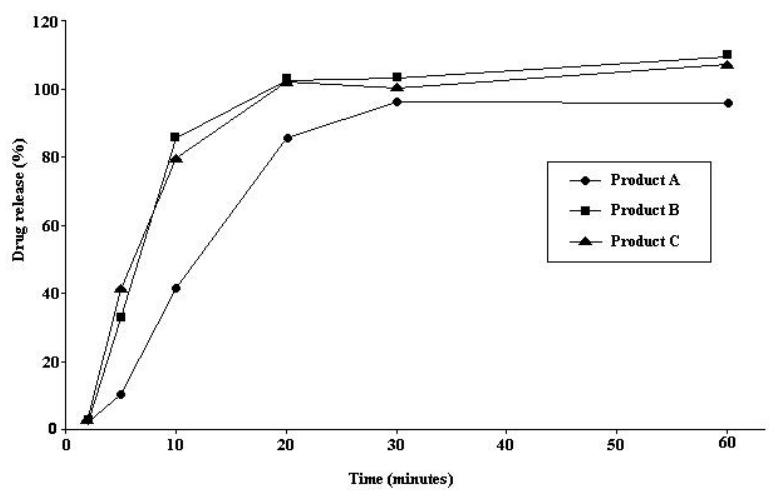


Fig.4. Bonfilio et al

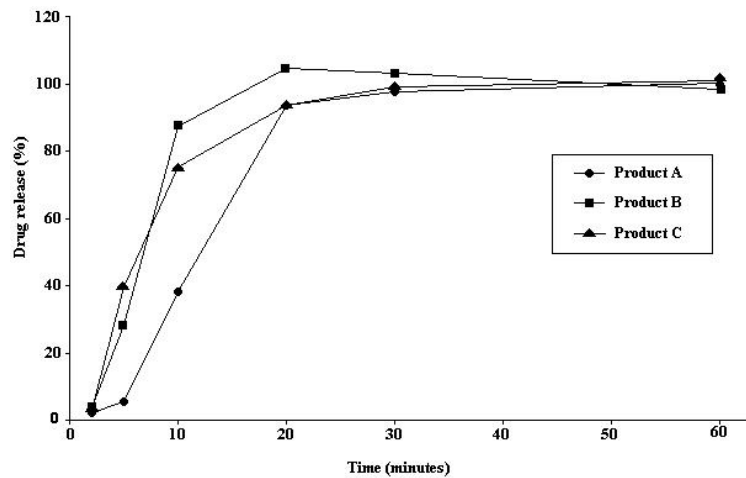


Fig. 5. Bonfilio et al

Table 1. Factors and levels employed in the building of the 2^4 full factorial design

Factors	Levels	
	(-) Low	(+) High
F1-Dissolution medium	Water	Phosphate buffer, pH 6.8
F2-Apparatus	Basket	Paddle
F3-Time	30 min	60 min
F4-Stirring speed	50 rpm	100 rpm

Table 2. Design matrix and experimental results obtained from the 2⁴ full factorial design

Tests	F1	F2	F3	F4	HPLC			Spectrophotometry		
					Product A (%)	Product B (%)	Product C (%)	Product A (%)	Product B (%)	Product C (%)
1	-	-	-	-	89.7/95.6	90.30/87.77	106.4/104.0	87.8/98.8	90.2/92.4	104.0/95.1
2	+	-	-	-	95.3/95.4	96.2/96.0	108.4/106.2	93.3/95.2	97.0/93.3	102.2/98.1
3	-	+	-	-	94.8/103.2	97.5/94.0	98.9/103.8	97.4/107.7	99.6/93.0	100.9/101.9
4	+	+	-	-	92.7/96.1	93.6/90.6	101.4/104.3	90.2/96.6	98.3/93.6	96.2/99.2
5	-	-	+	-	96.8/99.3	88.7/93.0	94.4/102.3	93.5/99.3	83.9/90.3	93.2/91.9
6	+	-	+	-	91.6/99.9	97.0/95.6	96.2/106.3	89.4/97.9	87.4/91.5	89.1/96.7
7	-	+	+	-	96.7/97.3	94.2/92.4	98.3/102.8	91.3/84.6	89.9/88.0	92.5/92.7
8	+	+	+	-	95.3/89.6	90.5/94.0	101.7/113.4	91.4/91.3	90.20/90.57	92.4/98.7
9	-	-	-	+	93.5/94.5	92.0/89.7	113.5/100.5	95.5/94.9	91.1/86.9	107.3/97.6
10	+	-	-	+	94.1/95.1	97.8/97.1	103.0/101.9	98.0/97.7	93.8/89.2	94.7/91.4
11	-	+	-	+	97.4/104.4	99.1/90.5	100.3/99.6	95.4/106.7	98.5/89.4	100.3/99.6
12	+	+	-	+	95.6/99.1	92.9/90.5	91.2/105.0	93.5/92.3	92.1/88.6	93.3/95.7
13	-	-	+	+	101.9/96.8	86.1/92.4	93.4/100.9	100.1/96.4	81.1/87.5	97.1/97.9
14	+	-	+	+	89.3/93.2	101.3/100.3	110.2/106.3	86.8/92.1	97.9/96.4	93.2/100.3
15	-	+	+	+	97.0/94.1	95.8/93.7	97.2/115.6	96.2/94.2	92.9/91.8	90.5/98.3
16	+	+	+	+	92.1/95.2	92.0/96.0	104.1/103.0	94.1/90.9	88.90/90.38	94.1/98.5

Table 3. Effects of the factors and estimated errors on the drug release percent (DR%) for products A, B and C.

Method	Factor	Product A		Product B		Product C	
		Effects	Estimated error	Effects	Estimated error	Effects	Estimated error
HPLC	F1	1.11		-0.24		-0.82	
	F2	-0.71		0.47		-0.15	
	F3	-0.30		1.02		-0.19	
	F4	-2.78*	2.48	2.77*	1.93	1.90	2.90
Spectrophotometry	F1	-0.18		1.63		-0.32	
	F2	-3.24		-3.03*		-3.77*	
	F3	1.18		-0.81		0.30	
	F4	-3.08	3.27	2.04	2.39	0.30	2.80

F1: Meio de dissolução, F2: Aparato, F3: Tempo de ensaio, F4: Velocidade de agitação

* Statically significant values

Table 4. Results of precision of the HPLC and spectrophotometric analytical methods for losartan potassium in capsules.

Method	Level	Concentration (mg. L ⁻¹)	R.S.D. (%)
HPLC	Repeatability	55.6	0.57 (n= 6)
	Intermediate precision	55.6	0.53 (n=12)
Spectrophotometry	Repeatability	5.56	0.56 (n=6)
	Intermediate precision	5.56	1.07 (n=12)

Table 5. Results of the dissolution procedure precision using HPLC and spectrophotometry for losartan potassium in capsules.

Method	Level	Product	Concentration (mg. L ⁻¹)	R.S.D. (%)
HPLC	Repeatability	A	55.6	3.43 (n= 6)
		B	55.6	4.08 (n= 6)
		C	55.6	3.45 (n= 6)
	Intermediate precision	A	55.6	3.93 (n=12)
		B	55.6	3.42 (n=12)
		C	55.6	2.97 (n=12)
Spectrophotometry	Repeatability	A	5.56	3.27 (n= 6)
		B	5.56	3.43 (n= 6)
		C	5.56	2.86 (n= 6)
	Intermediate precision	A	5.56	3.31 (n=12)
		B	5.56	2.71 (n=12)
		C	5.56	2.79 (n=12)

Table 6. Results of accuracy of the HPLC and spectrophotometric analytical methods for losartan potassium in capsules.

Method	Product	Final concentration (mg l ⁻¹)		R.S.D. (%) n=3	Mean recovery (%)
		Added	Found		
HPLC	A	44.48	44.50	0.40	99.50
	B	55.60	56.19	0.97	
	C	66.72	65.00	1.17	
	A	44.48	44.50	1.46	98.20
	B	55.60	55.10	0.51	
	C	66.72	63.77	2.49	
	A	44.48	45.38	1.48	101.40
	B	55.60	56.75	1.56	
	C	66.72	66.81	0.98	
Spectrophotometry	A	4.45	4.36	0.75	99.3
	B	5.56	5.55	0.51	
	C	6.67	6.66	1.33	
	A	4.45	4.31	0.24	98.5
	B	5.56	5.57	0.87	
	C	6.67	6.58	0.09	
	A	4.45	4.46	1.00	100.1
	B	5.56	5.57	0.11	
	C	6.67	6.66	0.25	

Table 7. Results of the dissolution procedure accuracy using HPLC and spectrophotometry for losartan potassium in capsules.

Method	Product	Final concentration (mg l ⁻¹)		R.S.D. (%) n=3	Mean recovery (%)
		Added	Found		
HPLC	A	44.44	43.09	0.40	
	B	55.56	55.54	0.97	97.40
	C	66.67	63.53	1.17	
	A	44.44	45.71	1.46	
	B	55.56	54.12	0.51	99.10
	C	66.67	64.67	2.49	
	A	44.44	42.18	1.48	
	B	55.56	52.09	1.56	95.30
	C	66.67	64.75	0.98	
Spectrophotometry	A	4.44	4.47	0.98	
	B	5.56	5.58	0.68	100.9
	C	6.67	6.78	0.54	
	A	4.44	4.71	1.84	
	B	5.56	5.67	1.48	103.8
	C	6.67	6.90	0.27	
	A	4.44	4.40	4.49	
	B	5.56	5.64	1.65	99.6
	C	6.67	6.55	1.24	

Table 8. ANOVA data for comparative analysis of HPLC and spectrophotometric quantitation methods

Factors	D. F.	S. S.	M. S.	F	P
Method	1	110.811037	110.811037	0.064	0.8003
Product	2	10470.681078	5235.340539	3.030	0.0504
M X P	2	212.578078	106.289039	0.062	0.9404
Error	210	362818.692003	1727.708057		
Total	215	373612.762196			

3 CONCLUSÕES

A metodologia analítica para quantificação de losartano potássico cápsulas de 50 mg empregando a espectrofotometria direta na região do ultravioleta, utilizando água destilada como solvente, apresentou seletividade, precisão, exatidão, robustez e linearidade na faixa de trabalho considerada (3,0-7,0 mg L⁻¹). Essa metodologia apresentou limites de detecção e de quantificação de 0,01 e 0,04 mg L⁻¹, respectivamente, sendo estes considerados adequados para a finalidade a que se destinam.

A metodologia analítica para quantificação de losartano potássico cápsulas de 50 mg empregando a espectrofotometria derivada de primeira ordem na região do ultravioleta, utilizando água destilada como solvente, apresentou seletividade, precisão, exatidão, robustez e linearidade na faixa de trabalho considerada (6,0-14,0 mg L⁻¹). Essa metodologia apresentou limites de detecção e de quantificação de 0,07 e 0,23 mg L⁻¹, respectivamente sendo estes considerados adequados para a finalidade a que se destinam.

Os métodos espectrofotométricos descritos acima foram aplicados para quantificação de losartano potássico em cápsulas obtidas de farmácias de manipulação locais e demonstraram ser eficientes, fáceis de aplicar e de baixo custo. Além disso, não necessitam de reagentes poluentes e requerem equipamentos economicamente viáveis.

O método de quantificação de losartano potássico por cromatografia líquida de alta eficiência foi otimizado de forma multivariada, através de um planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹, seguido por uma matriz de Doehlert. Esta otimização mostrou-se uma ferramenta útil para definir as condições cromatográficas. O método foi validado e apresentou seletividade, precisão, exatidão, robustez e linearidade na faixa de trabalho considerada (30,0-70,0 mg L⁻¹). Essa metodologia apresentou limites de detecção e de quantificação de 0,114 e 0,420 mg. L⁻¹, respectivamente.

A cromatografia líquida de alta eficiência apresentou vantagem em relação aos métodos espectrofotométricos por ser seletiva em relação aos produtos de degradação. Entretanto, os métodos espectrofotométricos apresentaram-se rápidos e economicamente viáveis, sendo também satisfatórios para rotina de laboratórios de controle de qualidade, uma vez que os produtos de

degradação podem ser monitorados na matéria-prima empregada para a manipulação das cápsulas.

As condições para realização do teste de dissolução de losartano potássico cápsulas 50 mg foram determinadas de forma multivariada com o emprego de um planejamento fatorial completo 2^4 , com a vantagem da utilização de um número reduzido de experimentos. A quantificação foi feita empregando-se a espectrofotometria direta na região do ultravioleta e a cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados mostraram, em ambos os casos, que as melhores condições para realização do teste de dissolução são: tampão fosfato pH = 6,8 como meio de dissolução, aparato cesta e velocidade de agitação de 50 rpm, com tempo de coleta de 30 minutos e tolerância de, no mínimo, 85% .

Os parâmetros de validação analítica dos ensaios de dissolução mostram-se de acordo e, em ambos os métodos, foram observados seletividade, precisão, exatidão, robustez e linearidade nas faixas de trabalho consideradas (3,0-7,0 mg L⁻¹ para a dissolução com detecção espectrofotométrica e 30,0-70,0 mg L⁻¹ para a dissolução com detecção utilizando a CLAE).

O estabelecimento de ensaios de qualidade para o losartano potássico cápsulas de 50mg apresentado neste trabalho constitui subsídio para a análise do produto comercializado no mercado nacional, uma vez que não há monografia oficial para essa forma farmacêutica e a literatura apresenta poucas metodologias analíticas para a análise de losartano potássico na forma farmacêutica cápsula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. **Dissolución, bioavalailability and bioequivalence**. Easton: Mack Printing, 1989. p. 554.

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.**, v. 12, n. 3, p.413-420, 1995.

AMODEO, C.; LIMA, N. K. C. Tratamento não medicamentoso da hipertensão arterial. **Medicina**, v. 29, p.239-243,1996.

ANSARI, M. et al. A comparative study of first-derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography applied to determination of losartan potassium in tablets. **Chem. Pharm. Bull.** v. 52, p. 1166-1170, 2004.

BANAKAR, U.V. **Pharmaceutical Dissolution Testing**. New York: Marcel Dekker inc, 1992, pag 473.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. São Paulo/Porto Alegre: Artmed Editora, 2001, cap.3, p.97.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

As referências bibliográficas estão de acordo com o manual de normalização para elaboração de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses da UNIFAL-MG.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.** Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da União, Brasília, 02 de jun. 2003a.

BRASIL. **Resolução RE nº 901, de 29 de maio de 2003.** Determina a publicação do "Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI)". Diário Oficial da União, Brasília, de 02 de jun. de 2003b.

BRASIL. Ministério da saúde. **Bulário eletrônico da anvisa.** Disponível em: <<http://bulario.bvs.br>>. Acesso em 17 de novembro de 2008a.

BRASIL. Ministério da saúde. **Guia para a qualidade em química analítica.** Uma assistência para a habilitação Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/laboratorios.pdf>>. Acesso em 17 de novembro de 2008b.

BRASIL. Ministério da saúde. **Lista de Medicamentos Genéricos Registrados por ordem de medicamento de referência.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/lista/display0110.pdf>. Acesso em 20 de janeiro de 2009

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CARLUCCI, G. et al. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 23, p. 185-189, 2000.

CHOBANIAN, A. V. et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. **JAMA**, v. 289, n.19, p. 2560-2571, 2003.

CHOI, Y. et al. Determination of Losartan in Human Plasma by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry (LC-ESI-MS): Application to Bioequivalence Study. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 31, n. 17, p. 2643 – 2656, 2008.

COLOMBO, P. et al. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. **J. Controlled Release**, v. 39, p. 231-237, 1996.

CONLIN, P. R. Efficacy and Safety of Angiotensin Receptor Blockers: A Review of Losartan in Essential Hypertension. **Curr. Ther. Res.**, v. 62, n. 2, p. 79-91, 2001.

DUNN, E. C.; SMALL, R. E. Economics of Antihypertensive Therapy in the Elderly. **Drugs & Aging**, v.18, n. 7, p. 515-525, 2001.

ÉPSHTEIN, N. A. Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis. **Pharm. Chem. J.**, v. 38, n. 4, p. 40-56, 2004.

ERK, N. Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p. 603–611, 2001.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for drug evaluation and research – CDER. **Label information, Cozaar**. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/foi/label/2006/020386s045lbl.pdf>>. Acesso em 17 de novembro de 2008.

FDA, **Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms**, Food and Drug Administration, Rockville, 1997.

FURTEK, C. I.; LO, M.W. Simultaneous determination of a novel angiotensin II receptor blocking agent, losartan, and its metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 573 p. 295–301. 1992.

GAVRAS, H. P.; SALERNO, C. M. The Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Losartan in Clinical Practice: A Review. **Clin. Ther.** , v. 18, n. 6, p. 1058-1067, 1996.

GIBALDI, M. **Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, p. 352 e 406.

HOFFMAN, B. B. Terapia da hipertensão. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, cap. 32, p.757-770.

HERTZOG, D. L. et al. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 30, p. 747-760, 2002.

HILLAERT, S.; BOSSCHE, W. V. D. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 31, p. 329-339, 2003.

ICH Q2B, International Conference on Harmonization, **Validation of analytical procedures: methodology**, 1996. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder>. Acesso em 19 nov. 2008.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação de validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 01 - MARÇO/2003. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>. Acesso em 19 nov. 2008.

INTERNATIONAL Standard Organization; **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**, ISO/IEC 17025, 1999.

JARDIM, P. C. V. B.; SOUSA, A. L. L.; MONEGO, E. T. Atendimento multiprofissional ao paciente hipertenso. **Medicina**, v. 29, p. 232-238, abr./set. 1996.

JORGENSEN, E. D.; BHAGWAT, D. Development of dissolution tests for oral extended-release products. **Pharm. Sci. Technol. Today**. v. 1, n. 3, p. 128-135, 1998.

JÚNIOR, D. P. L. et al. A farmacoterapia no idoso: revisão sobre a abordagem multiprofissional no controle da hipertensão arterial sistêmica. **Rev. Latino-am Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 435-441, 2006a.

JÚNIOR, K. Et al. Estudo “LOTHAR”: avaliação de eficácia e tolerabilidade da combinação fixa de anlodipino e losartana no tratamento da hipertensão arterial primária. **Arq. Bras. Cardiol**. v. 86, n. 1, p. 39-51, 2006b.

KEARNEY, P. M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, p. 217–223, 2005.

KHAN, M.Z.I. Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with *in vivo* data: challenges and opportunities. **Int. J. Pharm.**, v. 140, p.131-43, 1996.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário terapêutico guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2007. p. 8.32 e 8.33.

KRISTOFFERSEN, L. et al. Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design. **J. Chromatogr., B**, v. 850, p.147–160, 2007.

LASTRA, O. C. et al. Development and validation of an UV derivative spectrophotometric determination of Losartan potassium in tablets. **J. Pharmac. Biom. Anal.** v. 33, p. 175-180, 2003.

LEE, H.; SHIM, H. O.; LEE, H. S. Simultaneous determination of losartan and active metabolite EXP3174 in rat plasma by HPLC with column switching. **Chromatographia**, v. 42, p.39–42, 1996.

LO, M. et al. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3 174 in humans. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 58, n. 6, p. 641-649, 1995.

LUSINA, M.; et al. Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. **Int. J. Pharmac.** v. 291, p. 127–137, 2005.

MAGGIO, R. M.; CASTELLANO, P. M.; KAUFMAN, T. S. A multivariate approach for the simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in a combined pharmaceutical tablet formulation. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 391, p.2949-2955, 2008.

MAIO, V. M. P. ; DIAS, C. L. ; BERGOLD, A. M. Validation of an Isocratic HPLC Assay of Losartan Potassium in Pharmaceutical Formulations and Stress Test for Stability Evaluation of Drug Substance. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 250-255, 2005.

MALESUIK, M. D. et al. Determination of amlodipine in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and UV-spectrophotometry. **J AOAC Int**, v.89, n.2, p.359-64, 2006.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 107 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2003.

MCCARTHY, K. E. et al. Determination of losartan and its degradates in COZAAR tablets by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 17, n. 4-5, p. 671–677, 1998.

NEVES, R. et al. Bioequivalence study of two different film-coated tablet formulations of losartan-hydrochlorothiazide in healthy volunteers. **Arzneim. Forsch.**, v. 58, n. 8, p. 369-375, 2008.

NOËL, F. et al. Estudos de bioequivalência para fármacos que apresentam estereoisomerismo. **Infarma**, v.16, n. 11-12, 2004.

OBANDO, M. A.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, v. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in tablets by high-performance low-pressure chromatography using a multi-syringe burette coupled to a monolithic column. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 391, p. 2349-2356, 2008.

PEZOA, R.; CONCHA, A. M.; GAETE, G. Disolución de formas farmacéuticas sólidas. **Rev. Col. Quím. Farmac.**, v. 46, n. 2, p. 43-51, 1990.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, São Paulo, 2000, p. 4, 7, 43, 45, 48.

PRABHAKAR, A. H.; GIRIDHAR, R. A rapid colorimetric method for the determination of Losartan potassium in bulk and in synthetic mixture for solid dosage form. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 27, p. 861-866, 2002.

QUAGLIA, M. G. et al. Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 29, p. 981-987, 2002.

RAGHAVAN, K. et al. A spectroscopic investigation of losartan polymorphs. **Pharm. Res.**, v. 10, n. 6, p. 900-904, 1993.

RANG, H.P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 18, p. 339-343.

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**. 1999. 144f. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SACCONI, C. D. et al. Statistical Properties of the Dissolution Test of USP. **Dissol. Technol.**, v. 11, n. 3, p.25-28, 2004.

SATHE, S. R.; BARI, S. B. Simultaneous analysis of losartan potassium, atenolol, and hydrochlorothiazide in bulk and in tablets by high-performance thin-layer chromatography with UV absorption densitometry. **Acta Chromatogr.**, v. 19, p. 270-278, 2007.

SEBURG, R. A. et al. Photosensitized degradation of losartan potassium in an extemporaneous suspension formulation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 42, p. 411–422, 2006.

SICA, D. A. GEHR, T. W. B. GHOSH, S. Clinical Pharmacokinetics of Losartan. **Clin Pharmacokinet**, v. 44, n.8, p. 797-814, 2005.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, Cap. 68, p.701.

SIMPSON, L. K.; MCCLELLAN, K. J. Losartan: a review of its use, with Special Focus on Elderly Patients. **Drugs and Aging**, v. 15, n. 3, p. 227-250, 2000.

SMALL, R. Antihypertensive drugs. **Anaesthes. Intens. Care Med.**, v. 7, n. 8, p. 298 – 302, 2006.

SOLDNER, A.; SPAHN-LANGGUTH, H.; MUTSCHLER, E. Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and Caco-2 cell monolayers. **Br. J. Pharmacol.**, v. 129, p. 1235-1243, 2000.

SREEKANTH, N. et al. Simultaneous estimation and validation of ramipril, losartan potassium and hydrochlorothiazide by RP-HPLC in pure and pharmaceutical dosage form. *Asian J. Chem.*, v. **19**, n. **4**, p. **2850-2856**, 2007.

SUHAGIA, B. N.; SHAH, R. R.; PATEL, D. M. Development of a RP-HPLC method for evaluating losartan Potassium and hydrochlorothiazide tablets. **Ind. J. Pharm. Sci.**, v. 67, n. 1, p. 37-42, 2005.

TU, K.; CHEN, Z.; LIPSCOMBE, L. L. Prevalence and incidence of hypertension from 1995 to 2005: a population-based study. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 178, n. 11, p.1429-1435, 2008.

UNITED States Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); **Review Guide: Validation of Chromatographic Methods**, Rockville, 1994.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 30 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, INC, 2007.

VALENTINI, S.R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de Captopril - comparação de metodologias para um programa de garantia de qualidade. **Acta Sci. Health Sc.**, v. 26, n. 2, p. 357-364, 2004.

WENDHAUSEN, A. L. P.; REBELLO, B. C. As concepções de saúde-doença de portadores de hipertensão arterial. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 3, n. 3, p. 243-251, set/dez. 2004.

WILLIAMS, R.C. et al. Comparison of liquid chromatography, capillary electrophoresis and super-critical fluid chromatography in the determination of losartan potassium drug substance in Cozaar tablets. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 14, p. 1539-1546, 1996.

YEUNG, P. K. F. et al. Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection. **Int. J. Pharm.**, v. 204, p.17–22, 2000.

ZHAO, Z. Z. et al. Identification of losartan degradates in stressed tablets by LC-MS and LC-MS/MS. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 20, p. 129-136, 1999.

APÊNDICE A – Proposta de monografia

CÁPSULAS DE LOSARTANO POTÁSSICO

Contém, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110% da quantidade declarada de $C_{22}H_{22}ClKN_6O$.

IDENTIFICAÇÃO

Proceder conforme descrito em *espectrofotometria de absorção no ultravioleta* (V.2.14.-3), utilizando como solvente água destilada.

Solução (1): Pesar 20 cápsulas, remover o conteúdo e pesá-las novamente. A partir do peso médio, pesar a quantidade de pó equivalente a 25 mg de losartano potássico e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 30 mL de água destilada, levar ao ultrassom por 10 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de 5 µg/mL utilizando água destilada como solvente.

Solução (2): Pesar 25 mg de losartano potássico padrão e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 30 mL de água destilada, levar ao ultrassom por 10 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de 5 µg/mL utilizando água destilada como solvente.

A. Efetuar a varredura espectral na faixa de 200 a 300 nm. O espectro de absorção obtido com a *solução (1)* deve ser semelhante ao obtido com a *solução (2)*, apresentando máximo de absorvância em 205 nm.

B. Efetuar a varredura espectral na faixa de 200 a 300 nm. O espectro de primeira derivada da *solução (1)* deve ser semelhante ao obtido com a *solução (2)*, apresentando picos negativos em 220 e 234 nm.

CARACTERÍSTICAS

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

Teste de 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: tampão fosfato pH= 6,8.

Aparelhagem: cesta, 50 rpm

Tempo: 30 minutos

Imediatamente após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução e filtrar. Preparar solução padrão na mesma concentração, utilizando tampão fosfato pH=6,8 como solvente. Proceder conforme os seguintes métodos.

A. *Cromatografia líquida de alta eficiência* (V.2.17.4). Imediatamente após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução e filtrar. Preparar solução padrão na mesma concentração, utilizando tampão fosfato pH=6,8 como solvente. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 254 nm, coluna de 125 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno,

empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (C8) com partículas de 5 µm, mantida á temperatura de 35 graus e com vazão de fase móvel de 1 mL/min.

Fase móvel: mistura de tampão fosfato pH=6,2 e acetonitrila (65:35 v/v).

Injetar, separadamente, 20 µL das soluções padrão e amostra. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de C₂₂H₂₂ClKN₆O dissolvida no meio a partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

B. *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta* (V.2.14.-3). Imediatamente após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução e filtrar. Preparar solução padrão na mesma concentração, utilizando tampão fosfato pH=6,8 como solvente e filtrar. Diluir dez vezes amostras e padrão.

Efetuar a leitura das absorvâncias das soluções padrão e amostra a 205 nm. Calcular a quantidade de C₂₂H₂₂ClKN₆O dissolvida no meio a partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

Tolerância: não menos que 85% (Q=80%) da quantidade declarada de C₂₂H₂₂ClKN₆O se dissolvem em 30 minutos.

ENSAIOS DE PUREZA

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

$$100 X (A_i/A_s)$$

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 de 0,2% para cada impureza e de 0,5% para o total de impurezas.

DOSEAMENTO

A. *Por cromatografia líquida de alta eficiência (V.2.17.4).* Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 254 nm, coluna de 125 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (C8) com partículas de 5 μm , mantida á temperatura de 35 graus e com vazão de fase móvel de 1 mL/min.

Fase móvel: mistura de tampão fosfato pH=6,2 e acetonitrila (65:35 v/v)

Solução amostra: pesar 20 cápsulas. Remover o conteúdo e pesá-las novamente. Transferir quantidade de pó equivalente a 25 mg de losartano potássico para balão volumétrico de 50 mL. Completar o volume com fase móvel, homogeneizar e filtrar. Diluir para concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Solução padrão: Transferir 25 mg de losartano potássico padrão para balão volumétrico de 50 mL. Completar o volume com fase móvel, homogeneizar e filtrar. Diluir para concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Procedimento: Injetar, separadamente, 20 μL das soluções padrão e amostra. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ClKN}_6\text{O}$ a partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

B. *Por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (V.2.14.-3)*

Solução amostra: pesar 20 cápsulas, remover o conteúdo e pesá-las novamente. A partir do peso médio, pesar a quantidade de pó equivalente a 25 mg de losartano potássico e transferir para

balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 30 mL de água destilada, levar ao ultrassom por 10 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de 5 µg/mL utilizando água destilada como solvente.

Solução padrão: Pesar 25 mg de losartano potássico padrão e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 30 mL de água destilada, levar ao ultrassom por 10 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de 5 µg/mL utilizando água destilada como solvente.

Procedimento: Efetuar a leitura das absorvâncias das soluções padrão e amostra a 205 nm. Calcular a quantidade de $C_{22}H_{22}ClKN_6O$ a partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.