

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS, ESTUDO
PRELIMINAR DE ESTABILIDADE E ENSAIO DE DISSOLUÇÃO DO
ANTIEPILÉPTICO TRIAZÍNICO LAMOTRIGINA NA FORMA FARMACÊUTICA
COMPRIMIDO**

MAGDA TARGA MARTINS

PORTO ALEGRE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS, ESTUDO
PRELIMINAR DE ESTABILIDADE E ENSAIO DE DISSOLUÇÃO DO
ANTIEPILÉPTICO TRIAZÍNICO LAMOTRIGINA NA FORMA FARMACÊUTICA
COMPRIMIDO**

Dissertação apresentada por **Magda Targa Martins** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17 de agosto de 2007 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez
Centro Universitário Metodista -IPA

Profa. Dra. Letícia Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Nádia Maria Volpato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

M386d Martins, Magda Targa
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos, estudo preliminar de estabilidade e ensaio de dissolução do antiepiléptico triazínico lamotrigina na forma farmacêutica comprimido / Magda Targa Martins – Porto Alegre: UFRGS, 2007. – xxvi, 162 p. : il., tab., graf.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Lamotrigina. 2. Antiepilépticos. 3. Validação: Métodos de análise de fármacos. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Estabilidade. 5. Dissolução *in vitro*. 6. Controle de qualidade de medicamentos. I. Steppe, Martin. II. Título.

Bibliotecárias responsáveis:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB10/480
Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Martin Steppe pela orientação, amizade e eterna boa vontade em ajudar.

À Profa. Dra. Elfrides Scherman Schapoval pelo exemplo profissional e pelo exemplo de vida para todos nós.

Aos colegas do LEPCQ: Ana Rita, Cássia, Lauren, Cristiane, Marcelo, Júlia, Juliana S., Juliana R., Vanessa, Diogo, Andreas, Letícia, Alini, Heloísa, Mariana e Gabriela pela alegria, amizade e carinho.

Ao colega Clésio pela ajuda e, principalmente, amizade desde os tempos de graduação.

Aos funcionários do Laboratório (REBLAS): Lorena, Leila, Daniela, Cacá e Rose pela ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Tércio P. Oppe durante a orientação na iniciação científica.

Ao Dido querido pelo auxílio na obtenção dos medicamentos, artigos, explicações neurológicas e, principalmente p.

À minha mãe querida pela ajuda e sabedoria em todos os momentos importantes.

À minha irmã Flávia amada pela descontração e alegria que ela sempre proporciona.

Ao meu irmão Bernardo pela parceria durante todos os momentos radicais de nossas vidas.

Às minhas pequenas filhas pelo tempo que elas souberam esperar e pela alegria que elas trazem à minha vida.

Ao Zizo pela ajuda, companheirismo e por todos esses anos.

Às minhas grandes amigas de longa data que me acompanharam e me compreenderam: Mariana Lo Pumo, Luisa e Gisela Câmara e Jô.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas.....	xxiii
Resumo.....	xxv
Abstract.....	xxvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS GERAIS.....	07
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1. Epilepsia.....	13
3.2. Anticonvulsiantes.....	14
3.2.1. Lamotrigina.....	15
3.2.1.1. Descrição.....	16
3.2.1.2. Mecanismo de ação.....	17
3.2.1.3. Indicações.....	18
3.2.1.4. Características farmacocinéticas.....	19
3.2.1.5. Reações adversas.....	19
3.2.1.6. Contra-indicações.....	20
3.2.1.7. Interações medicamentosas.....	21
3.2.1.8. Dosagem e administração.....	21
3.2.1.9. Métodos para a determinação da lamotrigina	21
4. ANÁLISE QUALITATIVA DA LAMOTRIGINA.....	25
4.1. Introdução.....	27
4.2. Objetivos específicos.....	27
4.3. Materiais.....	28
4.3.1. Lamotrigina Substância Química de Referência.....	28

4.3.2. Produto farmacêutico.....	28
4.4. Determinação da LTG SQR por Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	28
4.4.1. Materiais.....	28
4.4.2. Método.....	29
4.4.3. Resultados.....	29
4.4.4. Discussão.....	30
4.5. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV).....	30
4.5.1. Materiais.....	31
4.5.2. Métodos.....	31
4.5.3. Resultados.....	31
4.5.4. Discussão.....	33
4.6. Métodos para a identificação da lamotrigina em comprimidos.....	34
4.6.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	34
4.6.1.1. Materiais.....	35
4.6.1.2. Método.....	35
4.6.1.3. Resultados.....	36
4.6.1.4. Discussão.....	37
4.7. Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV).....	39
4.7.1. Materiais.....	39
4.7.2. Método.....	40
4.7.3. Resultados.....	40
4.7.4. Discussão.....	41
4.8. Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
4.8.1. Materiais.....	43
4.8.2. Método.....	43
4.8.3. Resultados.....	45

4.8.4. Discussão.....	45
5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA LAMOTRIGINA.....	49
5.1. Introdução.....	51
5.2. Objetivos específicos.....	52
5.3. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	52
5.3.1. Materiais.....	52
5.3.2. Método.....	53
5.3.2.1. Validação.....	53
5.3.2.1.1. Especificidade.....	53
5.3.2.1.2. Linearidade.....	54
5.3.2.1.3. Precisão.....	55
5.3.2.1.4. Exatidão.....	57
5.3.2.1.5. Robustez.....	58
5.3.2.1.6. Limites de detecção e quantificação.....	59
5.3.2.1.7. Estabilidade das soluções.....	59
5.3.2.1.8. Resultados.....	60
5.3.2.1.8.1. Especificidade.....	60
5.3.2.1.8.2. Linearidade.....	60
5.3.2.1.8.3. Precisão.....	63
5.3.2.1.8.4. Exatidão.....	63
5.3.2.1.8.5. Robustez.....	64
5.3.2.1.8.6. Limites de detecção e quantificação.....	65
5.3.2.1.8.7. Estabilidade das soluções.....	65
5.3.2.1.9. Discussão.....	66
5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	67
5.4.1. Materiais.....	68

5.4.2. Método.....	68
5.4.2.1. Validação.....	68
5.4.2.1.1. Especificidade.....	68
5.4.2.1.1.1. Especificidade frente à amostra simulada dos excipientes.....	69
5.4.2.1.1.2. Especificidade frente à degradação forçada.....	69
5.4.2.1.1.2.1. Fotodegradação.....	69
5.4.2.1.1.2.2. Hidrólise ácida e básica.....	70
5.4.2.1.1.2.3. Temperatura associada à hidrólise.....	71
5.4.2.1.1.2.4. Efeitos da oxidação.....	71
5.4.2.1.1.2.5. Efeitos da temperatura.....	71
5.4.2.1.2. Linearidade.....	72
5.4.2.1.3. Precisão.....	73
5.4.2.1.4. Exatidão.....	75
5.4.2.1.5. Robustez.....	76
5.4.2.1.6. Limites de detecção e quantificação.....	77
5.4.2.1.7. Estabilidade das soluções.....	77
5.4.2.1.8. Adequabilidade do sistema.....	78
5.4.2.1.9. Resultados.....	78
5.4.2.1.9.1. Especificidade.....	78
5.4.2.1.9.2. Linearidade.....	82
5.4.2.1.9.3. Precisão.....	85
5.4.2.1.9.4. Exatidão.....	85
5.4.2.1.9.5. Robustez.....	86
5.4.2.1.9.6. Limites de detecção e quantificação.....	87
5.4.2.1.10. Discussão.....	89
5.5. Análise estatística comparativa dos métodos.....	94
5.5.1. Resultados.....	94

5.5.2. Discussão.....	95
6. ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE.....	97
6.1. Introdução.....	99
6.2. Objetivos específicos.....	99
6.3. Estabilidade térmica.....	99
6.3.1. Materiais.....	99
6.3.2. Método.....	100
6.4. Fotoestabilidade.....	101
6.4.1. Materiais.....	101
6.4.2. Método.....	101
6.5. Hidrólise ácida.....	102
6.5.1. Matérias.....	102
6.5.2. Método.....	102
6.6. Resultados.....	103
6.7. Discussão.....	109
7. MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DOS COMPRIMIDOS DE LAMOTRIGINA.....	113
7.1. Introdução.....	115
7.2. Desenvolvimento e validação de método de dissolução para comprimidos de lamotrigina.....	117
7.2.1. Materiais.....	117
7.2.2. Método.....	118
7.2.2.1. Doseamento dos comprimidos de lamotrigina das especialidades farmacêuticas selecionadas.....	118
7.2.2.1.1. Preparo da solução de Substância Química de Referência de lamotrigina.....	118
7.2.2.1.2. Preparo das soluções das amostras de lamotrigina.....	119
7.2.2.2. Determinação da solubilidade da SQR de lamotrigina.....	119
7.2.2.3. Definição das condições para o ensaio de dissolução.....	120

7.2.2.3.1. Preparo da solução de Substância Química de Referência de lamotrigina.....	121
7.2.2.3.2. Preparo das soluções amostra de lamotrigina.....	121
7.2.2.4. Determinação da estabilidade do fármaco.....	122
7.2.2.4.1. Preparo da solução de Substância Química de Referência.....	122
7.2.2.5. Influência do filtro.....	123
7.2.2.5.1. Preparo da solução de Substância Química de Referência.....	123
7.2.2.5.2. Preparo da solução de amostra de lamotrigina.....	123
7.2.2.6. Validação do método de dissolução.....	124
7.2.2.6.1. Especificidade.....	124
7.2.2.6.2. Linearidade.....	124
7.2.2.6.3. Precisão.....	125
7.2.2.6.3.1. Preparo da solução de Substância Química de Referência de lamotrigina.....	125
7.2.2.6.3.2. Preparo da solução das amostras de lamotrigina.....	125
7.2.2.6.4. Exatidão.....	125
7.2.2.6.5. Robustez.....	126
7.2.2.7. Comparação dos perfis de dissolução do medicamento referência e similar.....	126
7.2.2.7.1. Preparo da solução de Substância Química de Referência de lamotrigina.....	127
7.2.2.7.2. Preparo da solução de amostra de lamotrigina.....	127
7.2.2.8. Ensaio de dissolução dos comprimidos de lamotrigina nas especialidades farmacêuticas.....	127
7.2.2.9. Resultados.....	128
7.2.2.10. Discussão.....	137
8. DISCUSSÃO GERAL.....	143
9. CONCLUSÕES GERAIS.....	149
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura química da lamotrigina.....	16
Figura 3.2. Mecanismo de ação da lamotrigina e outros anticonvulsivantes comumente utilizados na inativação dos canais de sódio.....	17
Figura 4.1. Curva de aquecimento da lamotrigina SQR por calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	29
Figura 4.2. Espectro na região do infravermelho da lamotrigina SQR obtido por dispersão em brometo de potássio	32
Figura 4.3. Cromatograma e R _f obtidos por CCD da solução da SQR da LTG (R), solução amostra dos comprimidos de LTG (A) e da solução de carbamazepina SQR (C), revelado por luz UV 254 nm.....	36
Figura 4.4. Cromatograma e R _f obtidos por CCD na análise da solução de LTG SQR (R), solução amostra dos comprimidos de lamotrigina (A), solução amostra degradada sob luz UV 254 nm (30 dias) (L), solução amostra degradada em NaOH 1 M (10 dias) (D1) e solução amostra degradada em HCL 1 M (10 dias) (D2) revelados por luz UV 254 nm.....	37
Figura 4.5. Sobreposição e comparação dos espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de LTG SQR (A) e de comprimidos de LTG (B) preparadas em HCL 0,01 M, ambas na concentração de 20 µg/ml....	41
Figura 4.6. Sobreposição dos espectros da lamotrigina em diferentes solventes.....	42
Figura 4.7. Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de LTG SQR (A) e solução de LTG comprimidos (B), ambas à concentração de 40 µg/ml.....	45
Figura 4.8. Cromatogramas realizados com a mesma fase móvel contendo H ₂ O:MeOH (60:40) sem 0,3% de TEA (A) e com TEA (B).....	46
Figura 5.1. Espectro de absorção na região do UV referente à solução placebo dos excipientes dos comprimidos em HCL 0,01 M, na faixa de 200 a 400 nm.....	60
Figura 5.2. Espectro de absorção na região do UV da solução de SQR de LTG em HCL 0,01 M, na faixa de 200 a 400 nm.....	60
Figura 5.3. Representação gráfica da curva padrão da LTG SQR obtida por	

espectrofotometria de absorção no UV.....	62
Figura 5.4. Sobreposição dos cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de LTG SQR (A) e da ASE (B).....	78
Figura 5.5. Cromatograma obtido com a solução de comprimidos de LTG após 24 horas em câmara de luz UV a 254 nm.....	79
Figura 5.6. Cromatogramas sobrepostos das soluções de comprimidos de LTG após 2 h (A) e 7 h (B) de contato com HCL 1 M.....	80
Figura 5.7. Cromatogramas sobrepostos das soluções de comprimidos de LTG após 2 h (A) e 7 h (B) de contato com NaOH 1 M.....	80
Figura 5.8. Cromatograma obtido com a solução de SQR (A) de LTG após 2 horas de contato com NaOH 1 M. Produto desconhecido (B).....	81
Figura 5.9. Cromatograma obtido com a solução de SQR (A) de LTG após 2 horas de contato com HCL 1M e aquecimento a 80°C por 1 hora.....	81
Figura 5.10. Cromatograma obtido com a solução de SQR (A) de LTG após 2 horas de contato com NaOH 1M e aquecimento a 80°C por 1 hora.....	82
Figura 5.11. Representação gráfica da curva padrão da LTG obtida por CLAE.....	84
Figura 5.12. Limite de detecção (LD) obtido com a solução de LTG SQR na concentração de 0,05 µg/ml.....	88
Figura 5.13. Limite de quantificação (LQ) obtido com a solução de LTG SQR na concentração 0,15 µg/ml.....	89
Figura 6.1. Cromatogramas obtidos com a solução de LTG comprimidos nos tempos zero (A), após 6 dias (B) e após 11 dias (C) em câmara de luz a 254 nm.....	106
Figura 6.2. Perfil de fotodegradação obtido a partir dos resultados experimentais durante os intervalos de 0,1,2,6,7,8,11 e 15 dias de exposição à luz UV.....	106
Figura 6.3. Cromatograma obtido com a solução de LTG comprimidos submetida à fotodecomposição por luz 254 nm durante 30 dias (A). Espectro no UV referente ao produto de degradação majoritário (DL).....	107
Figura 6.4. Perfil de degradação das amostras de lamotrigina submetidas aos efeitos do ácido (HCL 1 M).....	109
Figura 6.5. Cromatogramas obtidos com as soluções de LTG comprimidos submetidas ao HCL 1 M no tempo zero (A) e após 54 horas (B).....	109

Figura 7.1. Perfis de dissolução do Produto A nos diferentes meios utilizados.....	130
Figura 7.2. Cromatogramas obtidos com a solução de lamotrigina no tempo (0), solução amostra de lamotrigina submetida a 2 horas na temperatura de 37°C (A) e a solução de LTG mantida à temperatura ambiente por 24 horas...	131
Figura 7.3. Espectro de UV referente à solução de excipientes do Produto A.	132
Figura 7.4. Espectro de UV referente à solução de excipientes do Produto B.	132
Figura 7.5. Representação gráfica dos valores experimentais obtidos através da dissolução dos Produtos (A) e (B).....	135
Figura 7.6. Percentual de dissolução alcançado em cada uma das cubas (n=6) para os Produtos (A) e (B).....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Classificação das crises epiléticas.....	14
Tabela 3.2. Tratamento terapêutico para os tipos mais freqüentes de convulsões.....	18
Tabela 3.3. Métodos para a determinação da LTG em fluidos biológicos.....	22
Tabela 4.1. Faixas de fusão obtida por DSC e descrita na literatura.....	30
Tabela 4.2. Principais bandas do espectro de IV da lamotrigina SQR e suas atribuições.....	33
Tabela 4.3. Condições cromatográficas empregadas na análise da LTG por CLAE.....	44
Tabela 5.1. Composição da amostra simulada de excipientes.....	54
Tabela 5.2. Modo de preparo da curva padrão para a avaliação da linearidade do método analítico por espectrofotometria de absorção no UV...	55
Tabela 5.3. Modo de preparo das amostras para a realização do teste de recuperação.....	57
Tabela 5.4. Absorvâncias obtidas pelo método por espectrofotometria de absorção no UV a 267 nm através das curvas padrão em HCL 0,01 M.....	61
Tabela 5.5. ANOVA dos resultados experimentais obtidos através da curva padrão da LTG por espectrofotometria de absorção no UVA 267 nm.....	62
Tabela 5.6. Valores experimentais obtidos a partir da determinação da LTG nos comprimidos obtidos por espectrofotometria de absorção no UV para a determinação do teor e avaliação da precisão.....	63
Tabela 5.7. Resultados obtidos pelo teste de recuperação realizado por espectrofotometria de absorção no UV para a determinação da LTG em comprimidos.....	64
Tabela 5.8. Valores experimentais obtidos por espectrofotometria de absorção no UV para a determinação da LTG submetidas a diferentes processos de extração do fármaco.....	64
Tabela 5.9. ANOVA realizada para os 3 diferentes processos de extração efetuados para o método de espectrofotometria de absorção no UV.....	65
Tabela 5.10. Limites de detecção e quantificação determinados matematicamente através dos valores obtidos pelas curvas padrão.....	65

Tabela 5.11. Valores experimentais obtidos a partir de soluções de LTG SQR (20 µg/ml) num intervalo de 5 dias.....	66
Tabela 5.12. Modo de preparo da curva padrão para avaliação de linearidade do método analítico por CLAE.....	73
Tabela 5.13. Modo de preparo das amostras para a análise da exatidão do método por CLAE para a determinação da LTG.....	75
Tabela 5.14. Pequenas variações realizadas para a determinação da robustez do método.....	77
Tabela 5.15. Valores experimentais encontrados para avaliar a estabilidade da solução.....	79
Tabela 5.16. Áreas obtidas pelo método por CLAE através da curva padrão.	83
Tabela 5.17. ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão de LTG por CLAE.....	84
Tabela 5.18. Valores experimentais obtidos a partir da determinação da LTG nos comprimidos obtidos por CLAE para avaliação da precisão.....	85
Tabela 5.19. Resultados experimentais obtidos pelo teste de recuperação r CLAE para a determinação da LTG em comprimidos.....	86
Tabela 5.20. Valores obtidos experimentalmente para o Limite de detecção e limite de quantificação para o método por CLAE.....	87
Tabela 5.21. Valores experimentais obtidos com as mudanças propositalmente realizadas para a análise da robustez do método.....	88
Tabela 5.22. Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados para CLAE.....	89
Tabela 5.23. Teste-t: comparação UV/CLAE para duas amostras presumindo variâncias equivalentes.....	95
Tabela 6.1. Teores de LTG obtidos experimentalmente nos comprimidos após submeter as amostras à temperatura de 80°C por período de 10 dias.....	104
Tabela 6.2. Teores de LTG obtidos experimentalmente nas soluções após submeter as amostras à incidência direta de luz UV 254 nm por período de 15 dias.....	105
Tabela 6.3. Valores obtidos experimentalmente a partir das amostras de LTG submetidas à hidrólise ácida.....	108

Tabela 7.1. Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	116
Tabela 7.2. Amostras utilizadas para o desenvolvimento do teste de dissolução.....	118
Tabela 7.3. Teores de LTG obtidos através de espectrofotometria de absorção no UV em cada uma das especialidades farmacêuticas.....	128
Tabela 7.4. Solubilidade da SQR de lamotrigina a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	129
Tabela 7.5. Teores de fármaco dissolvido de acordo com o meio selecionado nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos.....	129
Tabela 7.6. Valores experimentais obtidos através do teste de estabilidade para as soluções de LTG SQR em HCL 0,01 M.....	130
Tabela 7.7. Resultados experimentais obtidos para os testes de amostra e SQR de lamotrigina após a verificação da influência do filtro.....	131
Tabela 7.8. Resultados da precisão intermediária do método de dissolução por espectrofotometria de absorção no UV utilizando diferentes analistas em diferentes dias.....	133
Tabela 7.9. Valores das médias e DPR encontrados na determinação das precisões intradia e interdía por espectrofotometria de absorção no UV.....	133
Tabela 7.10. Resultados referentes ao estudo de exatidão por espectrofotometria de absorção no UV, realizado através do método de adição de padrão.....	134
Tabela 7.11. Comparação entre as percentagens de fármaco dissolvido (%) utilizando meio desaerado por 30 minutos em ultra-som e não desaerado para avaliação da robustez do método.....	134
Tabela 7.12. Resultados experimentais obtidos pela dissolução dos Produtos A e B.....	135
Tabela 7.13. Percentual de fármaco dissolvido em 30 minutos através do teste de dissolução.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS

1. ANOVA Análise de variância;
 2. CICV Correlação *in vivo-in vitro*;
 3. DAD Detector de arranjo de fotodiodos;
 4. DSC Calorimetria diferencial exploratória;
 5. epm Erro padrão da média;
 6. GI Graus de liberdade;
 7. LD Limite de detecção;
 8. LQ Limite de quantificação;
 9. LTG Lamotrigina;
 10. r Coeficiente de correlação de Pearson;
 11. Rf Fator de retenção;
 12. SQ Soma dos quadrados;
 13. SQR Substância química de referência;
 14. TEA Trietilamina.
-

RESUMO

Palavras-chave: lamotrigina, cromatografia líquida de alta eficiência, métodos analíticos, validação, estabilidade, dissolução *in vitro*.

A lamotrigina é um fármaco relativamente novo que tem se mostrado útil no tratamento de diferentes crises epiléticas. Este fármaco encontra-se no mercado na forma de comprimidos e, apesar de seu amplo uso na terapêutica, não há descrição de métodos analíticos em códigos oficiais para o controle de qualidade da lamotrigina em sua forma farmacêutica. Estudos de estabilidade não foram encontrados na literatura científica, apenas dados fornecidos pela indústria. No FDA (2006) estão descritas as condições para o teste de dissolução dos comprimidos de lamotrigina, mas não há relatos sobre a forma de quantificação dos mesmos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos o desenvolvimento e validação de métodos analíticos qualitativos e quantitativos, realização de estudo preliminar de estabilidade e o desenvolvimento e validação de método de dissolução para o controle de qualidade da lamotrigina em comprimidos. A caracterização da substância química de referência foi realizada através de calorimetria diferencial exploratória (DSC) e espectrofotometria na região do infravermelho (IV). A cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizadas para identificação da lamotrigina em comprimidos. Para a quantificação dos comprimidos, foram utilizadas a espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O estudo preliminar de estabilidade térmica foi realizado submetendo-se as amostras ao calor seco de 80°C. A fotoestabilidade foi avaliada em soluções de lamotrigina armazenadas em câmara de luz a 254 nm por um período de até quinze dias, demonstrando que o fármaco é sensível à luz. As amostras também foram submetidas à hidrólise ácida por um período de 54 horas, observando-se decaimento no teor do fármaco. Foi desenvolvido e validado um método de dissolução simples e rápido para o controle de qualidade dos comprimidos de lamotrigina.

ABSTRACT

“Development and validation of analytical methods, preliminary study of stability and dissolution test to determination of the triazine antiepileptic lamotrigine in tablets”.

Keywords: lamotrigine, high-performance liquid chromatography, analytical methods, validation, stability, dissolution.

Lamotrigine is a relative new antiepileptic drug that seems useful in the treatment of different seizures. Lamotrigine can be found in the market in tablets. Despite being used in therapeutics, methods for quality control of lamotrigine in tablets are not available in the official codes. Stability studies were just informed by the producer. FDA (2006) described the conditions of dissolution test to lamotrigine in tablets, but there is nothing about the quantification method. In this way, the aim of this work was the development and validation of analytical methods, preliminary study of stability and the development and validation of a dissolution method to quality control of lamotrigine in tablets. The characterization of the reference standard was carried out by differential scanning calorimetry (DSC) and infrared spectroscopy (IR). Thin-layer chromatography (TLC), ultraviolet spectroscopy (UV) and high performance liquid chromatography (HPLC) was performed to lamotrigine qualitative analysis. UV and HPLC were performed to lamotrigine quantitative analysis. The sample solutions were submitted under UV-light at 254 nm during 15 days, showing degradation and decrease in the labeled amount. Thermal degradation was carried by dry heat at 80°C in solid powder. The solution samples was also submitted to acid condition with HCL 1 M during 54 hours. Rapid and simple dissolution method to routine quality control of lamotrigine was developed and validated.

1. INTRODUÇÃO

1.1.Introdução

A crise convulsiva é um dos acontecimentos mais graves no exercício da medicina e na vida cotidiana. Ainda não se conhecem todos os aspectos das convulsões, porém sabe-se que são devidas ao comportamento anormal de grupos de neurônios cerebrais. Algumas pessoas apresentam convulsões que se manifestam de maneira imprevisível e repetida. Essa doença é chamada epilepsia (BERGEN, 2003).

No final do século XVIII, a farmacoterapia da epilepsia era limitada somente ao uso dos brometos. Em 1912, o fenobarbital foi introduzido como o primeiro agente orgânico sintético reconhecido por ter atividade anticonvulsionante. Os fármacos introduzidos até 1965 eram estruturalmente relacionados ao fenobarbital. Os agentes introduzidos após esta data exibem uma diversidade de estruturas químicas. Nesse grupo incluem-se os benzodiazepínicos (clonazepam e clorazepato), iminostilbeno (carbamazepina), ácido carboxílico de cadeia ramificada (ácido valpróico), feniltiazina (lamotrigina), análogo cíclico do GABA (gabapentina), monossacarídeo sulfamato-substituído (topiramato), derivado do ácido nipecótico (tiagabina) e derivado da pirrolidina (levetiracetam) (BALDAUF, 2002; McNAMARA, 2003).

A maioria dos pacientes com epilepsia não obtém cura. Logo, os antiepilépticos são prescritos para prevenir a recorrência de crises, tendo como objetivo a melhor qualidade de vida para o paciente (KLIEMANN e MONTE, 2004).

Um agente anticonvulsionante ideal seria aquele que interrompesse as crises convulsivas e, ao mesmo tempo, não causasse efeitos indesejáveis. Porém, os fármacos existentes nos dias atuais não só falham no controle das crises como também causam efeitos adversos (McNAMARA, 2003).

Para milhares de pacientes epiléticos em todo o mundo, a perspectiva de novos fármacos, mais eficazes e menos tóxicos é a esperança de um futuro melhor (GUERREIRO e GUERREIRO, 2000).

Entre os novos medicamentos recentemente introduzidos na terapêutica para pacientes com epilepsia, a lamotrigina e a gabapentina podem ser usadas como medicação de primeira escolha por apresentarem vantagens em relação à farmacocinética e efeitos colaterais, comparados aos medicamentos mais antigos (BEN-MENACHEM, 2000).

O tratamento medicamentoso da epilepsia tem buscado eficácia juntamente com a diminuição dos efeitos indesejáveis para os pacientes, já que os mesmos precisam destes medicamentos por longos períodos ou até por toda a vida. A qualidade dos fármacos anticonvulsionantes é fundamental para o bem estar dos pacientes e, para tanto, é necessário que esses fármacos estejam sob rígido controle.

O emprego de métodos analíticos sensíveis é imprescindível para que o controle de qualidade possa garantir a eficácia e a segurança do uso de um medicamento. A escolha do método a ser utilizado na análise depende de vários fatores, tais como a natureza do fármaco, pureza e quantidade de amostra. Além disso, deve-se levar em conta as condições do laboratório e os custos envolvidos na análise (AVEDAÑO, 1993).

Foram encontrados na literatura científica, vários trabalhos referentes à determinação da lamotrigina em fluidos biológicos (COCIGLIO *et al*, 1991; SALLUSTIO e MORRIS, 1997; MATAR *et al*, 1998; BOTIGER *et al*, 1999; VIDAL *et al*, 1999; ANGELIS-STOFORDIS, 1999; BARBOSA e MÍDIO, 2000; TORRA *et al*, 2000; CROCI *et al*, 2001; CASTEL-BRANCO *et al*, 2001; PATIL e BODHANKAR, 2005; CHENG *et al*, 2005), bem como a determinação desse fármaco em comprimidos. Porém, os códigos oficiais não descrevem metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa do fármaco e na forma farmacêutica comprimido (EMANI *et al*, 2006; YOUSSEF e TAHA, 2007). Em relação à estabilidade da lamotrigina, não foram encontrados trabalhos científicos referentes a mesma, somente dados obtidos a partir do fabricante sobre a conservação do

produto. As condições do ensaio de dissolução para comprimidos de lamotrigina são descritas pelo FDA (2006) utilizando HCl 0,1 M (900 ml) e pás (50 rpm), porém não existem referências em relação ao método de quantificação.

Devido à relevância terapêutica da lamotrigina, de suas comprovadas vantagens com relação aos fármacos de primeira escolha e de sua ampla comercialização no país, torna-se importante o desenvolvimento do presente trabalho de forma a contribuir para a avaliação da qualidade das especialidades farmacêuticas contendo este fármaco.

2. OBJETIVOS GERAIS

2.1. Objetivos Gerais

- Desenvolver e validar métodos analíticos para análise qualitativa e quantitativa dos comprimidos de lamotrigina;
- Realizar estudo preliminar de estabilidade dos comprimidos de lamotrigina;
- Desenvolver e validar método de dissolução para o controle de qualidade dos comprimidos de lamotrigina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Epilepsia

Epilepsia é um distúrbio cerebral crônico de diversas etiologias, caracterizado por manifestações recorrentes clinicamente diversificadas, entre as quais figuram as convulsões. Estas resultam de atividade elétrica cerebral anormal e são um sinal comum de disfunção cerebral. O histórico familiar, lesão cerebral e doenças neurológicas são fatores de risco para a epilepsia (CARPENTER *et al.*, 2002; KLIEMANN e MONTE, 2004).

A prevalência da epilepsia em alguns países é de 0,5 a 0,6%, incluindo todos os tipos de crises em todas as idades. Nos países desenvolvidos, 2 a 4% de todas as pessoas têm convulsões recorrentes em alguma época de suas vidas. Países em desenvolvimento, bem como zonas urbanas desfavorecidas, mostram taxas mais altas. A incidência é maior em crianças e idosos. Os homens são mais afetados do que as mulheres (1,5:1) (CARPENTER *et al.*, 2002; KLIEMANN e MONTE, 2004). FERNANDES e colaboradores (1992) determinaram uma prevalência de 16,5 e 20,3 em cada 1000 habitantes de Porto Alegre para epilepsia ativa e inativa, respectivamente.

O tratamento medicamentoso deve ser instituído tão logo o diagnóstico de convulsões esteja confirmado. A decisão de iniciar um tratamento para um paciente baseia-se na relação risco-benefício, isto é, no risco de novas crises *versus* o risco dos medicamentos (GUERREIRO e PALMINI, 2000; BERGEN, 2003).

Os riscos que potencialmente são minimizados pelo uso dos medicamentos são: morte, lesão física decorrente da crise, lesão a terceiros, principalmente por direção de veículos, dano cerebral e conseqüências psicossociais (GUERREIRO *et al.*, 2000).

Não há dúvidas de que um dos principais avanços na terapêutica medicamentosa da epilepsia na década de 80 foi a compreensão de que determinados fármacos são mais eficazes no controle de específicos tipos de crises e/ou síndromes epiléticas, inaugurando o tratamento racional da epilepsia (GUERREIRO e PALMINI, 2000).

A correta caracterização clínica da epilepsia permite adequada compreensão da fisiopatogenia em cada paciente e, conseqüentemente, orienta racionalmente o tratamento. A classificação das crises epiléticas pode ser observada na Tabela 3.1 (KLIEMANN e MONTE, 2004).

Tabela 3.1. Classificação das crises epiléticas.

I. Crises Parciais (Locais ou Focais)
A. Crises parciais simples (sem envolvimento da consciência)
B. Crises parciais complexas (psicomotoras ou do lobo temporal; com alteração da consciência)
C. Crises parciais seguidas de crises generalizadas secundárias (tônico-clônica, tônica ou clônica)
II. Crises Generalizadas
A. Ausência (pequeno mal)
B. Crises mioclônicas
C. Crises clônicas
D. Crises tônicas
E. Crises tônico-clônicas (grande-mal)
F. Crises atônicas
III. Crises Epiléticas Não-Classificáveis

* KLIEMANN E MONTE, 2004.

3.2. Anticonvulsiantes

Os antiepiléticos, mais comumente chamados de anticonvulsiantes, são fármacos que deprimem seletivamente o SNC. Sua principal aplicação está na

supressão de crises, acessos ou ataques epiléticos sem causar dano ao SNC nem depressão da respiração.

Fármacos anticonvulsionantes, introduzidos nos últimos anos, têm aumentado as opções para o controle das crises. Estes mostram-se úteis em situações específicas ou constituem alternativas aos fármacos de primeira escolha em casos de não-resposta. A maioria dos pacientes com epilepsia não obtém cura. Logo, os antiepiléticos são prescritos para prevenir a recorrência de crises. O objetivo do tratamento é o melhor controle das crises e o mínimo de efeitos adversos (KLIEMANN e MONTE, 2004).

Recentemente, foram introduzidos diversos antiepiléticos novos para o tratamento das convulsões: a gabapentina, a lamotrigina, o topiramato e a tiagabina. A maioria dos novos antiepiléticos foi aprovada em caráter de medicação complementar, porém, não há motivos para considerá-los menos eficazes quando usados isoladamente, já que muitos especialistas os prescrevem desta forma. Além disso, a oxacarbazepina, a lamotrigina, a gabapentina, o topiramato e a vigabatrina têm demonstrado eficácia e, em muitos casos, melhor tolerabilidade, características farmacocinéticas mais favoráveis e menor potencial para interações medicamentosas em relação aos fármacos tradicionais (BIALER *et al.*, 2001; BERGEN, 2003).

3.2.1. Lamotrigina

A lamotrigina (LTG) (Figura 3.1) foi introduzida na Europa em 1991 e nos Estados Unidos em 1993. É o único representante dessa nova classe de antiepiléticos, os triazínicos. Ela corresponde ao derivado diclorofenílico da triazina-3,5-diamina e não apresenta relação estrutural nem farmacológica com outros anticonvulsionantes (BALDAUF, 2002; McNAMARA, 2003).

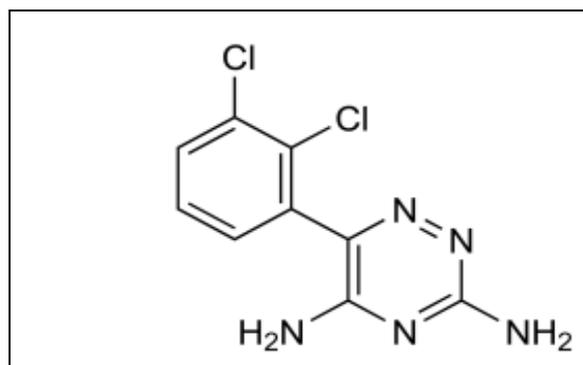


Figura 3.1. Estrutura química da lamotrigina (BUDAVARI, 2001).

A lamotrigina é comercializada no Brasil na forma de comprimidos de 25, 50 e 100 mg , com o nome comercial de Lamictal[®], marca registrada da GlaxoSmithKline; Lamitor[®], marca registrada da Torrent; Neural[®], marca registrada da Cristália e Neurium[®], marca registrada da Sintofarma (KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004). Além disso, atualmente a lamotrigina está presente na lista de medicamentos genéricos da Anvisa produzida pelo laboratório Arrow Farmacêutica LTDA (ANVISA, 2006).

3.2.1.1. Descrição

- A lamotrigina é um pó de coloração branca a creme pálido (MOFFAT *et al.*, 2004);
- Nome químico: [6-(2,3 diclorofenil)-1,2,4-triazina-3,5-diamina] (MOFFAT *et al.*, 2004);
- Composição elementar: C=42,21%; H=2,76%; Cl= 27,69%; N=27,35% (BUDAVARI, 2001);
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): 84057-84-1 (BUDAVARI, 2001);
- Fórmula molecular: C₉H₇Cl₂N₅ (BUDAVARI, 2001);
- Massa molecular: 256,09 (BUDAVARI, 2001);
- Faixa de fusão: 216-218 °C (BUDAVARI, 2001; MOFFAT *et al.*, 2004);

- Solubilidade: Muito pouco solúvel em água (0,17 mg/ml a 25 °C e pouco solúvel em HCl 0,1 M (4,1 mg/ml a 25 °C) (MOFFAT *et al.*, 2004);
- Base lipofílica com $pK_a = 5,7$ (CHENG *et al.*, 2005);
- Denominação comum brasileira (DCB): lamotrigina;
- LogP/hidrofobicidade: 1,497 (DRUGBANK, 2007).

3.2.1.2. Mecanismo de ação

A lamotrigina atua na estabilização da membrana pré-sináptica pelo bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes (prolongamento de sua inativação) (Figura 3.2). Dessa forma, impede a liberação dos neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato) compreendidos no desencadeamento das crises epilépticas. Esse mecanismo de ação é exercido por agentes eficazes em crises parciais e generalizadas tônico-clônicas como a lamotrigina (CORDIOLI *et al.*, 2000; KLIEMANN e MONTE, 2004; KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004).

A lamotrigina é efetiva contra um espectro maior de convulsões do que a fenitoína e a carbamazepina, o que sugere que possua ações adicionais na regulação pela inativação dos canais de sódio (McNAMARA, 2003).

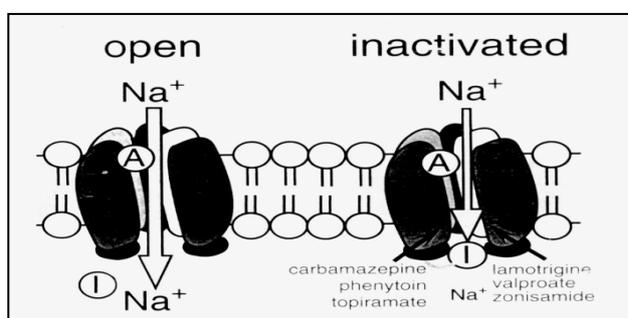


Figura 3.2. Mecanismo de ação da LTG e outros anticonvulsivantes comumente utilizados na inativação dos canais de sódio (McNAMARA, 2003).

3.2.1.3. Indicações

A lamotrigina tem amplo espectro de atividade antiepiléptica, demonstrando benefício em crises parciais como terapia adjunta ou monoterapia em adultos e crianças; crises generalizadas primárias, ausências e crises mioclônicas. A síndrome de Lennox-Gastaut, que é uma forma de epilepsia grave na infância e caracterizada por apresentar múltiplos tipos de crises, tem como escolha para terapia o ácido valpróico, a lamotrigina e o topiramato (BERAN *et al.*, 1998; PELLOCK e APPLETON, 1999; AVOLI *et al.*, 2001; KLIEMANN e MONTE, 2004).

Um ensaio duplo-cego realizado com carbamazepina e lamotrigina como monoterapia indicou uma eficácia semelhante entre as duas, mas a lamotrigina foi melhor tolerada (McNAMARA, 2003).

Para mulheres em idade reprodutiva, a escolha do antiepiléptico recai sobre a lamotrigina, por ser eficaz e provavelmente mais segura em relação à gestação (BERAN *et al.*, 1998; AVOLI *et al.*, 2001; BRODIE, 2001).

Na Tabela 3.2, estão descritos os tipos de crises e os tratamentos mais comumente utilizados.

Tabela 3.2. Tratamento terapêutico para os tipos mais freqüentes de convulsões.

Convulsões parciais (focais) Simplex Complexas	Fenitoína, carbamazepina, ácido valpróico, gabapentina, <u>lamotrigina</u> , topiramato e tiagabina
Convulsões tônico-clônicas	Gabapentina, <u>lamotrigina</u> , topiramato e tiagabina
Crises de ausência	Ácido valpróico, etossuximida e <u>lamotrigina</u>
Convulsões mioclônicas	Ácido valpróico e <u>lamotrigina</u>

*BERGEN, 2003.

Além disso, os agentes anticonvulsionantes têm sido utilizados no tratamento da desordem bipolar, incluindo a lamotrigina, que tem se mostrado efetiva na depressão bipolar. A melhora clínica torna-se evidente na terceira semana de tratamento (CORDIOLI *et al.*, 2000; McNAMARA, 2003).

A lamotrigina também tem se mostrado potencialmente útil no tratamento da dor crônica e na dor do membro fantasma (FERREIRA *et al.*, 2004).

3.2.1.4. Características farmacocinéticas

A lamotrigina é bem absorvida no trato gastrointestinal, apresentando biodisponibilidade oral de 98%, atingindo níveis plasmáticos máximos em 1 a 3 horas. Encontra-se em 55% ligada a proteínas plasmáticas e sofre extenso metabolismo hepático, com posterior excreção renal de metabólitos inativos. A absorção não é afetada pela ingestão de alimentos e não apresenta metabolismo de primeira passagem (CORDIOLI *et al.*, 2000; KLIEMANN e MONTE, 2004).

A LTG sofre biotransformação extensiva. O metabólito principal é o *N*-glicuronídeo, responsável por 65% da dose recuperada na urina. A meia-vida de eliminação é de 29 horas. A lamotrigina não interfere com anticoncepcionais orais (STEPHEN *et al.*, 2001; KLIEMANN e MONTE, 2004; KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004).

3.2.1.5. Reações adversas

Os efeitos adversos que estão associados à neurotoxicidade são, geralmente, dose-dependentes. No caso da lamotrigina esses efeitos são comumente: cefaléia, diplopia, tonturas, ataxia, tremor, distúrbios gastrintestinais, alterações comportamentais, coordenação anormal, rinite, ansiedade, insônia. Estes efeitos melhoram com a redução ou fracionamento das doses diárias. Os efeitos idiossincráticos (reações cutâneas), hepatite medicamentosa e efeitos hematológicos graves, indicam suspensão imediata do medicamento. A lamotrigina

pode causar, raramente, síndrome de Stevens-Johnson (DRUG INFORMATION, 2000; KLIEMANN e MONTE, 2004).

Além dessas reações, a lamotrigina pode ocasionar cansaço, irritabilidade e agressividade. É importante salientar que na bula do medicamento Neural[®] consta que o corante amarelo de tartazina presente na formulação pode causar reações de natureza alérgica, entre as quais asma brônquica.

Há relatos de um estudo em que pacientes com diagnóstico recente de epilepsia receberam lamotrigina ou carbamazepina como monoterapia e uma eficácia semelhante foi demonstrada com os dois fármacos, porém pacientes tratados com lamotrigina tiveram uma taxa inferior de abandono de tratamento. A terapia com a lamotrigina demonstrou um número menor de casos de sonolência com o novo fármaco em relação à carbamazepina. Melhor tolerabilidade em favor da lamotrigina foi confirmada num segundo estudo duplo-cego comparativo com idosos (BRODIE *et al.*, 1999). Em voluntários saudáveis, a lamotrigina não afetou atenção, velocidade psicomotora, linguagem, memória ou humor (MARTIN *et al.*, 1999).

A lamotrigina é considerada um fármaco seguro. Nenhuma alteração hematológica ou renal foi detectada em mais de 60 mil pacientes expostos a esse medicamento em mais de trinta países. Fica cada vez mais evidente que o maior risco com a lamotrigina é o de efeitos idiossincráticos (GUERREIRO e GUERREIRO, 2000).

3.2.1.6. Contra-indicações

A lamotrigina é contra indicada em pacientes que demonstraram hipersensibilidade ao fármaco e deve ser evitada em pacientes com insuficiência hepática. Nenhuma evidência de efeito teratogênico foi observada em animais de experimentação como: camundongos, ratos e coelhos. Entretanto, toxicidade materna e toxicidade fetal secundária acarretam diminuição de peso fetal e/ou retardamento na ossificação (CORDIOLI *et al.*, 2000; PHYSICIAN'S, 2000; DEF, 2004).

3.2.1.7. Interações medicamentosas

A lamotrigina é um antiepiléptico poderoso e deve ser introduzida lentamente e em dosagem menor para o paciente que também estiver usando ácido valpróico (BERGEN, 2003).

O fenobarbital, a fenitoína e a carbamazepina podem diminuir a concentração da lamotrigina; já o ácido valpróico é capaz de aumentar a concentração da lamotrigina por inibir as enzimas hepáticas de metabolização da mesma. A administração da lamotrigina, principalmente em combinação com ácido valpróico, pode causar o desenvolvimento de necrólise epidérmica tóxica (CORDIOLI *et al.*, 2000; KLIEMANN e MONTE, 2004).

Como a lamotrigina não interage com enzimas hepáticas, a mesma não influencia com o metabolismo de outros fármacos lipossolúveis, incluindo a varfarina e os contraceptivos orais (BALDAUF, 2002).

3.2.1.8. Dosagem e administração

As doses iniciais recomendadas para adultos são de 12,5 a 25 mg/dia, aumentadas gradualmente (a cada 2 a 4 semanas), até doses de manutenção de 100 a 400 mg/dia. Pacientes idosos requerem menor dosagem. Para crianças, as doses equivalentes são de 0,15 mg/kg/dia, aumentadas gradualmente até doses de manutenção em torno de 1 a 8 mg/kg/dia. A suspensão da lamotrigina deve ser gradual em um período de duas semanas para evitar crises de rebote (CORDIOLI *et al.*, 2000; KLIEMANN e MONTE, 2004).

3.2.1.9. Métodos para a determinação da lamotrigina

Existem vários trabalhos referentes à determinação da lamotrigina em fluidos biológicos encontrados na literatura científica, a maioria destes por cromatografia líquida de alta eficiência. Na Tabela 3.3 estão demonstrados alguns parâmetros cromatográficos descritos em vários trabalhos já publicados.

Tabela 3.3. Métodos para a determinação da LTG em fluidos biológicos encontrados na literatura científica.

Referência	Coluna	Fase Móvel	λ (nm)
Cociglio <i>et al.</i> , 1991	CN	CH ₃ CN/ Tampão acetato 0,01 M (pH 3,5) –(11/9)	280
Sallustio e Morris, 1997	Si	CH ₃ OH/ H ₂ O / NH ₄ H ₂ PO ₄ (94/5,92/0,08)	280
Matar <i>et al.</i> , 1998	C18	CH ₃ CN/CH ₃ OH/fosfato 0,01M (pH 7,5)–(17/18/65)	220
Botiger <i>et al.</i> , 1999	C18	CH ₃ CN/CH ₃ OH/fosfato 0,01M (pH 7,1)–(10/30/60)	310
Vidal <i>et al.</i> , 1999	Si	CH ₃ OH/H ₂ O/NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 5)]– (94/5,96/0,04)	280
Angelis-Stofordis <i>et al.</i> , 1999	Si	CH ₃ CN/H ₂ O / fosfato 0,5 M (pH 6,5)–(20/79/1)	306
Barbosa e Mídio, 2000	C18	CH ₃ OH/0,1 M KH ₂ PO ₄ /TEA– (43,5/56 /0,01)	306
Torra <i>et al.</i> , 2000	C18	CH ₃ CN/fosfato 0,25 M (pH 3,8) – (45/55)	210
Croci <i>et al.</i> , 2001	ISRP	CH ₃ CN / fosfato de potássio bibásico 0,01M (pH 6)–(18/82)	330
Castel-Branco <i>et al.</i> , 2001	C18	CH ₃ OH/0,1 M KH ₂ PO ₄ /TEA (35/64,7/0,3)	306
Patil e Bodhankar, 2005	C18	Tampão fosfato(10 mM): metanol:acetonitrila:acetona (55:22:12:11)- pH 7,0	210
Cheng <i>et al.</i> , 2005	Si	CH ₃ CN [H ₂ O 0,2% H ₃ PO ₄ +0,3%TEA(pH2,7)]–(84/16)	225

Em trabalho recentemente realizado por EMANI e colaboradores (2006) foi desenvolvido e validado um método por CLAE para a determinação da lamotrigina em comprimidos. No mesmo, foi utilizada uma coluna de fase reversa C18, sendo a fase móvel constituída por acetonitrila e tampão fosfato de potássio monobásico

numa proporção de 35:65, com pH ajustado em 3,5. Esse trabalho foi realizado a uma temperatura de 40°C, sendo o comprimento de onda escolhido de 210 nm.

YOUSSEF e TAHA (2007) descreveram a validação de métodos para a determinação da lamotrigina, sendo estes: método colorimétrico (529 nm) e CLAE, usando uma coluna C18 e fase móvel contendo acetonitrila: metanol: ortofosfato de potássio 0,01 M na proporção de (30:20:50) com pH ajustado em 6,7 e comprimento de onda de 275 nm.

Encontra-se disponibilizado para consulta pública (USP, 2007) um método referente à determinação da LTG matéria prima, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm de diâmetro interno), fase móvel composta por trietilamina (1,4% (v/v):metanol) na proporção de (3:2) com pH ajustado para 2,0 com ácido fosfórico e comprimento de onda de 250 nm. O fluxo utilizado é de 0,8 ml/min e a temperatura é mantida a 40°C.

Em 1999, ASHTON e colaboradores descrevem um método por cromatografia líquida de alta eficiência capaz de detectar a principal impureza de síntese, (*Z*)-2-(2,3-diclorofenil)-2-(guanidinilimino) acetonitrila, presente em pequenas concentrações na lamotrigina. Para tanto, uma amostra deve ser pré-concentrada por CLAE em coluna de fase normal e fase móvel constituída por dicloroetano:metanol (90:10). Posteriormente, a amostra é analisada por CLAE em coluna de fase reversa (C18), fase móvel constituída por metanol:água (55:45) e detecção por espectrometria de massas.

Além dos métodos descritos por CLAE, encontra-se na literatura diferentes métodos para a determinação da lamotrigina em fluidos biológicos utilizando a eletroforese capilar, descrito por SHIHABI e OLES (1996) e THEURILLAT e colaboradores em (2002). Em um outro trabalho está descrita a validação de um método para a determinação da lamotrigina por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (KULDEEP e SUBHASH, 2005). A cromatografia gasosa na determinação da LTG em fluidos biológicos foi relatada por WATELLE e colaboradores (1997) e DASGUPTA e HART (1997).

4. ANÁLISE QUALITATIVA DA LAMOTRIGINA

4.1. Introdução

A pureza das substâncias utilizadas como referência é de extrema importância para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos. Para tanto, materiais de referência bem caracterizados e com pureza documentada devem ser utilizados para o estudo de validação (ICH, 2005).

Existem duas categorias de padrões de referência: os compendiais e os não compendiais. Os compendiais são obtidos de fontes como a USP e não necessitam de caracterização posterior. Os não compendiais são aqueles com elevado teor de pureza e devem ser cuidadosamente caracterizados para garantir a sua identidade (SWARTZ e KRULL, 1998).

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a substância química de referência através da determinação da faixa de fusão e análise por espectrofotometria na região do infravermelho (IV);
- Desenvolver método por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação da lamotrigina em comprimidos;
- Desenvolver método por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para identificação de lamotrigina em comprimidos.

4.3. Materiais

4.3.1. Lamotrigina Substância Química de Referência (SQR)

Foi utilizada como substância química de referência a lamotrigina com teor declarado de 99,4%, gentilmente cedida pelo Laboratório Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, identificada pelo número de lote 10113-2004, conforme especificado pelo certificado de análise.

4.3.2. Produto farmacêutico

Comprimidos de lamotrigina obtidos no mercado, com teor rotulado de 100 mg, cuja mistura de excipientes é composta por: manitol, corante amarelo de tartazina nº 5, amido de milho, amido pré-gelatinizado (Explosol[®]), fosfato de cálcio dibásico diidratado, glicolato sódico de amido, dióxido de silício e estearato de magnésio. É comercializado pelo nome Neural[®], identificado pelo número de lote 05010111, prazo de validade até janeiro de 2008, produzido pelo Laboratório Cristália- Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.

4.4. Determinação do ponto de fusão por calorimetria diferencial exploratória (DSC)

Os eventos termodinâmicos podem indicar a pureza e identidade de fármacos. As transições ocorrem em temperaturas características e os padrões contribuem para a identificação de substâncias e o controle da pureza das amostras, já que a presença das impurezas faz com que ocorra diminuição no ponto de fusão (USP 30, 2007).

4.4.1. Materiais

Foi utilizada para a determinação do ponto de fusão a lamotrigina SQR descrita no item 4.3.1.

As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N_2) FC-60-A, integrador TA-60WS e software de controle e análise TA-60 versão 2.0. A calibração do equipamento foi conduzida com Zinco e Índio.

4.4.2. Métodos

Para determinação da faixa de fusão, aproximadamente 1,0 mg de lamotrigina SQR foi introduzido em porta-amostra de alumínio com capacidade de 4 μ l, o qual foi selado e inserido no equipamento de DSC. Esta técnica térmica compara diferenças no fluxo de calor entre a amostra em branco (porta-amostra selado vazio) e a substância em análise enquanto ambas são submetidas a um programa de temperatura controlada. A velocidade de aquecimento foi de 10°C/minuto. O tempo de análise foi de 23 minutos. A temperatura máxima estabelecida foi de 250°C. O ensaio foi realizado sob atmosfera inerte de nitrogênio e fluxo de 50 ml/minuto.

4.4.3. Resultados

Na figura 4.1 encontra-se a curva de aquecimento obtida na análise do ponto de fusão da lamotrigina SQR.

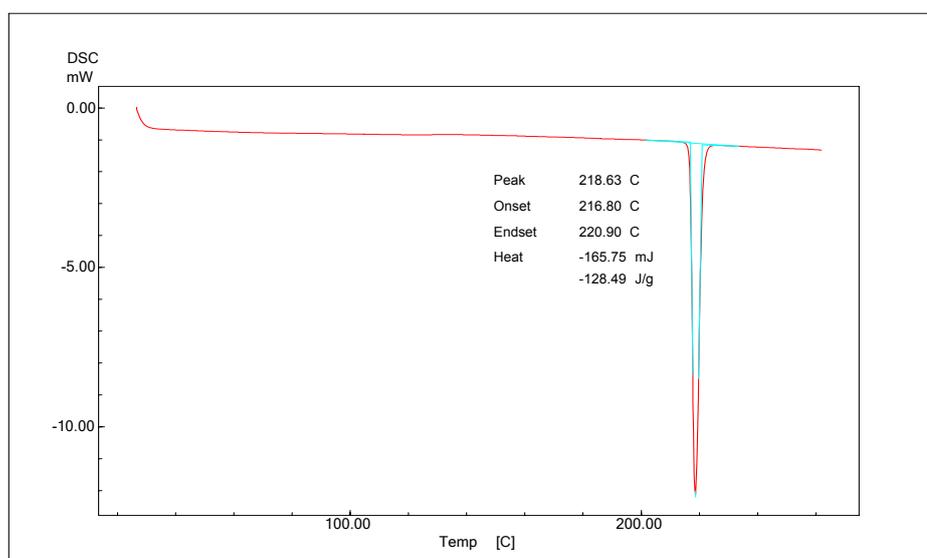


Figura 4.1. Curva de aquecimento da lamotrigina SQR realizada por calorimetria diferencial exploratória (DSC).

Na Tabela 4.1, encontra-se a faixa de fusão obtida na análise, bem como a descrita na literatura (BUDAVARI, 2001; MOFFAT *et al*, 2004).

Tabela 4.1. Faixa de fusão obtida por DSC e faixas de fusão encontradas na literatura.

	Faixa de fusão
DSC-60	216,80 °C a 220,90 °C
Dados da literatura ^{a,b}	216 °C a 218 °C

4.4.4. Discussão

O perfil do pico de uma substância pura apresenta-se extremamente afilado em um espectro de DSC, porém, se existirem impurezas, nota-se a diminuição na temperatura da faixa de fusão e o pico torna-se mais alargado. Desta forma, um DSC pode ser uma evidência clara de que o composto não apresenta pureza elevada (FORD e TINMINS, 1989).

O método por DSC possibilita informações quantitativas a respeito das características exotérmicas e endotérmicas em função da temperatura e do tempo (CLAS *et al.*, 1999). O pico obtido através da análise por DSC para LTG SQR, demonstrado na Figura 4.1, apresenta transição endotérmica, ou seja, a amostra absorve calor (128,49 J/g) para fundir.

O pico extremamente afilado juntamente com os valores de faixa de fusão encontrados experimentalmente comparados aos valores de faixa de fusão encontrados na literatura são praticamente equivalentes. Desta forma, é possível inferir que a amostra analisada apresenta pureza adequada para sua utilização como substância química de referência.

4.5. Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A espectrofotometria na região do infravermelho fornece uma impressão digital, única para cada composto. Por essa razão, é um dos métodos mais

empregados para identificação de fármacos, pois é capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais, com exceção dos isômeros ópticos. A partir dos espectros pode-se identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes na amostra (PAVIA *et al.*, 2001; WATSON, 2005).

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

4.5.1. Materiais

O espectro na região do infravermelho da lamotrigina SQR, foi obtido utilizando-se espectrofotômetro FTIR, marca Shimadzu, modelo 8300. As pastilhas destinadas à análise foram preparadas em dispersão de brometo de potássio (KBr).

4.5.2. Métodos

Para a realização do ensaio foram misturados, em gral de ágata, 1,76 mg de lamotrigina substância química de referência com aproximadamente 150 mg de brometo de potássio, previamente dessecado a 105°C por duas horas. Essa mistura foi prensada, obtendo-se uma pastilha transparente para a realização do ensaio.

4.5.3. Resultados

O espectro do IV da lamotrigina SQR dispersa em brometo de potássio encontra-se apresentado na Figura 4.2.

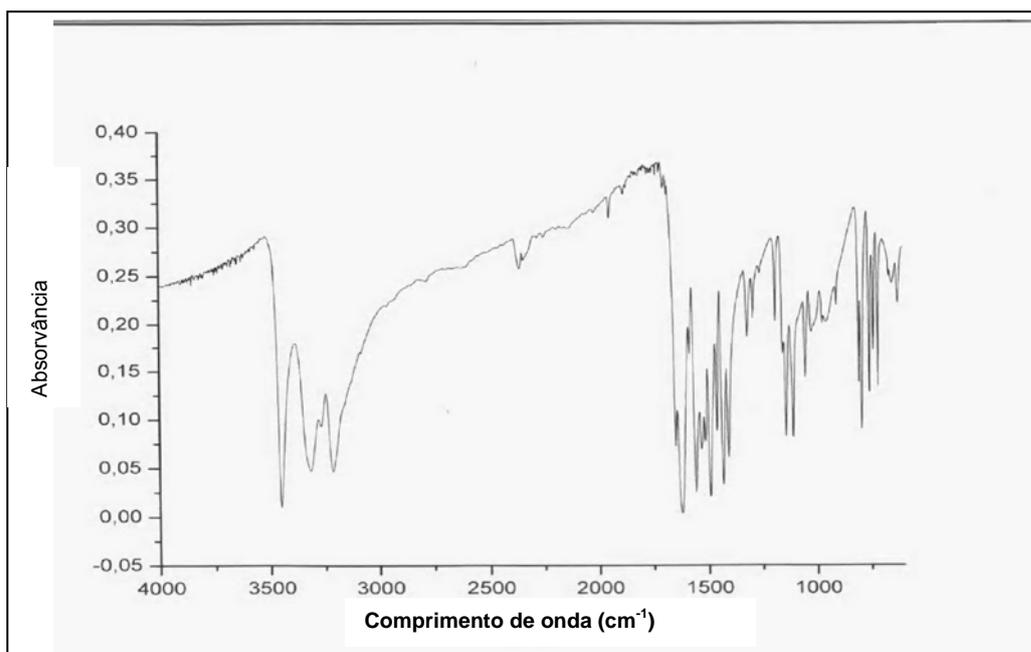


Figura 4.2. Espectro na região do IV da lamotrigina SQR obtido por dispersão em brometo de potássio (KBr).

O espectro de infravermelho (IV) foi observado e comparado com os dados encontrados na literatura. As principais bandas referentes aos grupos funcionais característicos da lamotrigina foram analisadas.

Na Tabela 4.2 estão descritas as atribuições realizadas para as principais bandas encontradas para a lamotrigina SQR dispersa em pastilha de brometo de potássio (KBr).

Tabela 4.2. Atribuição das principais bandas do espectro de IV da lamotrigina SQR.

Frequência de absorção (cm^{-1})	Atribuição
690	Deformação angular de C-H ^d
800	Deformação angular de C-H ^d
1350	Deformação axial de C-N de aminas Aromáticas ^d
1450 e 1480	Estiramento da ligação C=C de fenila ^c
< 1500	Região da impressão digital ^b
1588	Vibração de deformação angular de N-H ^d
1625	Ligação guanidínica ^a
2000 a 1680	Bandas fracas harmônicas (<i>overtone</i>)-modo de substituição do anel ^{c,d}
3180 , 3260 e 3333	Ressonância de Fermi ^c (ombro) com o estiramento simétrico de N-H em 3300 cm^{-1}
3480	Estiramento simétrico e assimétrico de NH_2 ^a

^a (Nakanishi, 1977), ^b (Watson,2004), ^c (Pavia *et al.*, 2001), ^d (Silverstein e Webster, 2000).

4.5.4. Discussão

De acordo com a literatura consultada, as principais bandas referentes à lamotrigina ocorrem em 1614, 1488, 1429 e 1404 cm^{-1} (MOFFAT *et al.*, 2004). Pôde-se observar que nessa região ocorre um número intenso de bandas. É importante descrever que as bandas acima de 3000 cm^{-1} são importantes para identificação de aminas primárias, principalmente no caso da lamotrigina, onde encontramos duas aminas primárias aromáticas.

O dublete de amina primária que aparece em 3180 e 3333 cm^{-1} ocorre devido às vibrações simétricas e assimétricas. A absorção que ocorre na frequência mais alta corresponde à vibração assimétrica, e a que ocorre em frequência mais baixa corresponde à vibração simétrica. Isto ocorre porque qualquer grupo de três ou mais

átomos, os quais, pelo menos dois sejam idênticos, há dois modos de estiramento: simétrico e assimétrico (PAVIA *et al.*, 2001).

As triazinas apresentam bandas de absorção entre 1450-1490 cm^{-1} e 1560-1520 cm^{-1} , tratando-se de vibração de deformação angular do anel (CROSS e JONES, 1969). Desta forma, entre as várias bandas presentes nessa região, sugere-se que a banda do anel triazínico esteja entre as mesmas.

Os compostos orgânicos halogenados apresentam absorção intensa que provêm da deformação axial da ligação carbono-halogênio. Os cloro-benzenos absorvem entre 1096 e 1089 cm^{-1} . Além disso, o cloro pode causar deslocamento de bandas para frequências mais altas (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). A lamotrigina apresenta dois cloros em sua estrutura, podendo-se observar bandas médias de absorção em torno de 1000 cm^{-1} .

As vibrações de deformação axial C-N de aminas aromáticas produzem uma absorção forte de deformação axial que aparecem em frequências mais altas do que as de aminas não aromáticas, já que a constante de força da ligação C-N é aumentada pela ressonância do anel (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A análise por espectrofotometria na região do infravermelho, juntamente com a calorimetria diferencial exploratória, possibilitaram a identificação positiva da lamotrigina.

4.6. Métodos para a identificação da lamotrigina em comprimidos

4.6.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica flexível, através da qual se pode identificar praticamente qualquer composto. Além disso, é de fácil execução, versátil e de baixo custo. Permite identificar o fármaco quando este é aplicado juntamente com a substância de referência, através da comparação dos valores de fatores de retenção (R_f) obtidos. Outra aplicação da CCD refere-se à possibilidade de sua utilização para verificar a presença de impurezas e produtos de degradação na amostra (WATSON, 2005).

4.6.1.1. Materiais

Para análise por cromatografia em camada delgada foram utilizadas lamotrigina SQR, carbamazepina SQR, comprimidos de lamotrigina e soluções degradadas de comprimidos de lamotrigina.

Para o sistema eluente foram utilizados metanol (Quimex), clorofórmio (Quimex) e *N-N* dimetilformamida (Synth), todos em grau analítico. Para as diluições das amostras foi utilizado como solvente o metanol. Para a filtração da solução amostra foi utilizado papel filtro qualitativo.

A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasmas aluminizadas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) com 12 cm de comprimento, 6 cm de largura e 0,25 mm de camada absorvente. Após a eluição, as placas cromatográficas foram analisadas em lâmpada de ultravioleta (UV) a 254 nm.

4.6.1.2. Método

Para o preparo da solução dos comprimidos, foi pesado o equivalente a 10 mg de LTG. A amostra foi transferida para balão volumétrico de 10 ml, completando-se o volume com metanol. A solução foi submetida à banho de ultra-som por 15 minutos. O volume foi completado com metanol e a solução com concentração de 1 mg/ml foi filtrada. Para o preparo da solução de referência foi pesado o equivalente a 10 mg de lamotrigina SQR. Esta quantidade foi transferida para balão volumétrico de 10 ml com metanol e submetida à banho de ultra-som por 15 minutos. A solução de carbamazepina SQR, um antiepiléptico que apresenta uma amina primária aromática em sua estrutura, foi preparada conforme descrito para lamotrigina SQR, sendo a concentração final de ambas as soluções igual a 1 mg/ml.

Paralelamente, foram utilizadas soluções degradadas de lamotrigina em ácido clorídrico 1 M (10 dias), hidróxido de sódio 1 M (10 dias) e fotodegradação a 254 nm (30 dias), todas estas foram preparadas a uma concentração de 1 mg/ml.

A mistura eluente foi constituída pelos solventes clorofórmio: metanol:*N-N* dimetilformamida, na proporção de (13:3,5:0,5), respectivamente.

As soluções foram aplicadas a 1 cm da borda inferior da placa por intermédio de tubos capilares. A placa foi colocada em uma cuba de vidro previamente saturada com o sistema eluente. A migração cromatográfica percorreu 10 cm a partir do ponto de aplicação. Após a evaporação do solvente, as manchas foram visualizadas com auxílio de lâmpada de ultravioleta (UV) a 254 nm. Posteriormente, os respectivos fatores de retenção (Rf) foram determinados. A análise foi realizada em triplicata para verificar a reprodutibilidade do método.

4.6.1.3. Resultados

O cromatograma da lamotrigina SQR, da amostra de comprimidos de lamotrigina e da carbamazepina SQR é apresentado na Figura 4.3.

O cromatograma da lamotrigina SQR, da amostra de comprimidos lamotrigina e das amostras degradadas de lamotrigina é apresentado na Figura 4.4.



Figura 4.3. Cromatograma e Rf obtidos por CCD na análise da solução da SQR de lamotrigina (R), solução amostra dos comprimidos de lamotrigina (A) e da solução de carbamazepina SQR (C), revelados por luz UV 254 nm.



Figura 4.4. Cromatograma e Rf obtidos por CCD na análise da solução da SQR de lamotrigina (R), solução amostra dos comprimidos de lamotrigina (A), solução amostra degradada sob luz UV 254 nm (30 dias) (L), solução amostra degradada em hidróxido de sódio 1 M (10 dias)(D1) e solução amostra degradada em ácido clorídrico 1 M (10 dias) (D2) revelados por luz UV 254 nm.

4.6.1.4. Discussão

De acordo com as características de polaridade da LTG e de sua solubilidade, vários sistemas foram testados entre os quais hexano, etanol e hidróxido de amônio em várias proporções, porém, os Rf obtidos não foram satisfatórios.

KULDEEP e BODHANKAR (2005) desenvolveram um método para a determinação de LTG em plasma por cromatografia em camada delgada de alta eficiência e determinação densitométrica, utilizando tolueno:acetona:amônia (7:3:0,5) como fase móvel. Devido à alta toxicidade do tolueno, optou-se por não testar esse sistema.

YOUSSEF e TAHA (2007) descreveram em um trabalho, juntamente com a validação de métodos espectrofotométricos e por cromatografia à líquido, a determinação da LTG por cromatografia em camada delgada, utilizando como eluente acetato de etila:metanol:amônia na proporção de (17:2:1).

O guanabenzó é um fármaco que apresenta características estruturais semelhantes à LTG como a presença de dois átomos de cloro ligados ao anel benzênico e também uma ligação guanidínica. Na Farmacopéia Americana (USP 2007) há um sistema eluente para esse fármaco que é constituído por clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio (60:40:1). O mesmo foi testado e modificado para a lamotrigina, porém os fatores de retenção obtidos foram insatisfatórios.

A substituição do hidróxido de amônio por *N-N* dimetilformamida e o ajuste da proporção de clorofórmio e metanol, permitiu a adequação do sistema cromatográfico e a determinação de valores de R_f satisfatórios para o objetivo proposto. O sistema eluente que possibilitou boa reprodutibilidade e seletividade foi clorofórmio: metanol:*N-N* dimetilformamida (13:3,5:0,5).

A identificação da LTG foi efetuada através da comparação do fator de retenção obtido pela amostra dos comprimidos e da substância de referência, sendo igual a 0,44 para ambas. O R_f para a carbamazepina foi de 0,83, mostrando que ocorre diferenciação desses dois fármacos anticonvulsivantes no sistema cromatográfico proposto.

A solução fotodegradada da lamotrigina apresentou (R_f) similar ao da lamotrigina SQR, porém foi observada uma menor intensidade na mancha e pequena quantidade ficou retida no ponto de aplicação da placa, sugerindo a presença de um produto de degradação mais polar que a lamotrigina. A solução submetida à hidrólise básica demonstrou (R_f) semelhante ao da lamotrigina SQR, apresentando um leve arraste e uma diminuição na intensidade da mancha comparada ao da SQR. A solução submetida à hidrólise ácida apresentou uma mancha com cauda proeminente no decorrer do desenvolvimento da corrida cromatográfica, que pode estar relacionada à presença de produtos de degradação do fármaco.

A identificação da LTG foi efetuada através da comparação do fator de retenção obtido pela amostra dos comprimidos e da substância de referência, sendo igual para ambas, confirmando a presença da LTG nos comprimidos.

O método proposto foi considerado adequado para a identificação do fármaco nas amostras de comprimidos. O método proposto demonstrou repetibilidade nas

três análises realizadas. A técnica de revelação foi eficiente para a visualização da LTG na placa cromatográfica.

4.7. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A espectrofotometria na região do ultravioleta é utilizada como um dos métodos de identificação de fármacos. Para tanto, compara-se os máximos e mínimos da substância em análise com uma SQR (WATSON, 2005).

A lamotrigina apresenta uma estrutura com grupamentos cromóforos através das ligações duplas conjugadas do anel benzênico e do anel triazínico, possibilitando uma absorção na região do ultravioleta. A amina primária (NH₂) é um auxócromo que, quando ligado a um cromóforo, pode alterar tanto o comprimento de onda como a intensidade de absorção (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

4.7.1. Materiais

As amostras de lamotrigina SQR e de comprimidos de lamotrigina, descritas nos itens 4.3.1 e 4.3.2, foram utilizadas para análise.

Foi empregada solução de ácido clorídrico 0,01M, preparada a partir de um ácido concentrado da marca Quimex e água ultrapura. Papel filtro qualitativo foi utilizado para o preparo das soluções amostra.

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro UV/VIS, marca Shimadzu, modelo UV 160 1 PC, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

A extração da lamotrigina nas amostras de comprimidos foi realizada em banho de ultra-som e, posteriormente, em agitador mecânico na velocidade de 250 rpm.

4.7.2. Método

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de LTG SQR, que foi transferida para balão volumétrico de 20 ml com 10 ml de ácido HCl 0,01 M. A solução foi submetida à banho de ultra-som por 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente (0,5 mg/ml). Alíquota de 2,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi completado com o mesmo solvente, obtendo-se solução com concentração final de 20 µg/ml.

Para o preparo da solução amostra foi realizado o peso médio de 20 comprimidos que foram triturados em gral e homogeneizados. Pesou-se quantidade de amostra equivalente a 25 mg de LTG, que foram transferidas para balão volumétrico de 50 ml com 25 ml de HCl 0,01 M. Esta solução foi submetida à banho de ultra-som por 15 minutos e, posteriormente, procedeu-se agitação mecânica por mais 15 minutos, sendo o volume completado com o HCl 0,01 M (0,5 mg/ml). A solução obtida foi filtrada e uma alíquota de 2,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, sendo o volume completado com o mesmo solvente. A concentração final obtida foi equivalente a 20 µg/ml de LTG.

Os espectros foram realizados a partir de leituras na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm, utilizando ácido clorídrico 0,01 M para o ajuste do zero no equipamento. Os espectros foram sobrepostos e comparados.

4.7.3. Resultados

Os espectros de absorção obtidos na faixa de comprimento de onda de 200 nm a 400 nm, das soluções de SQR e comprimidos de lamotrigina, ambas em concentração de 20 µg/ml, estão representados na Figura 4.5.

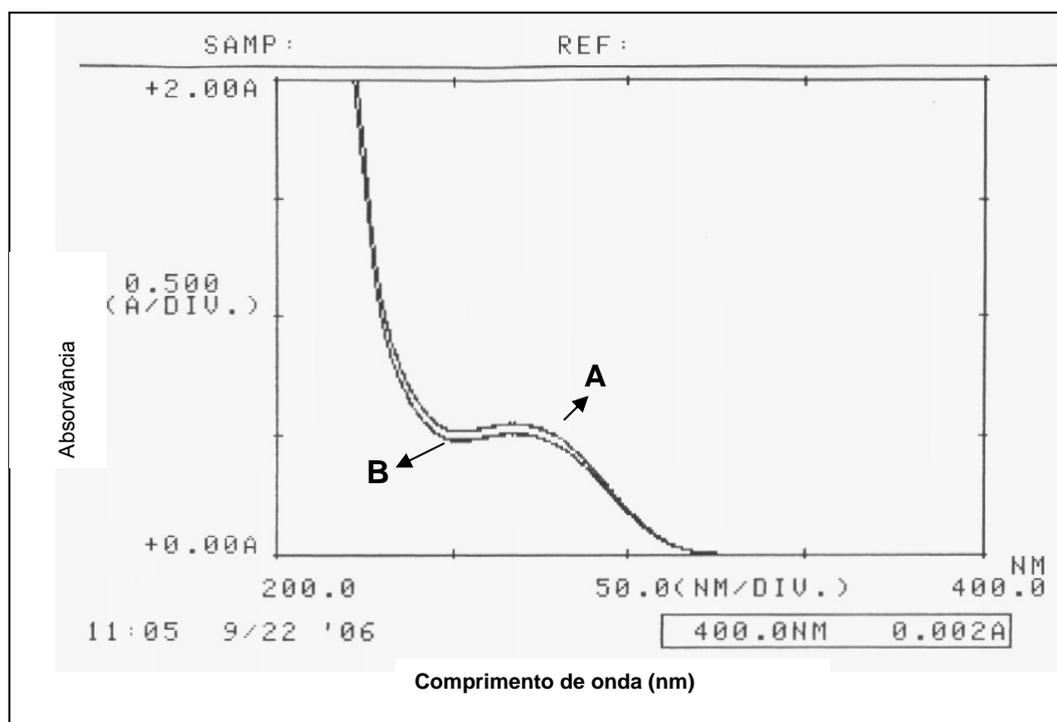


Figura 4.5. Sobreposição e comparação dos espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de LTG SQR (A) e de comprimidos de LTG (B) preparadas em HCl 0,01 M, ambas na concentração de 20 µg/ml.

4.7.4. Discussão

Primeiramente, foram testados alguns solventes comumente utilizados para a realização de ensaios por espectrofotometria de absorção na região do UV como: etanol, metanol, ácido clorídrico 0,1 M e ácido clorídrico 0,01 M. Não utilizou-se água devido à baixa solubilidade da lamotrigina nesse solvente.

Comparando-se o espectro de uma solução de lamotrigina em ácido clorídrico 0,01 M com uma solução de LTG em etanol, ambas na concentração de 20 µg/ml, pôde-se observar um deslocamento batocrômico e também um efeito hiperacrômico nas soluções preparadas em etanol na Figura 4.6 (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

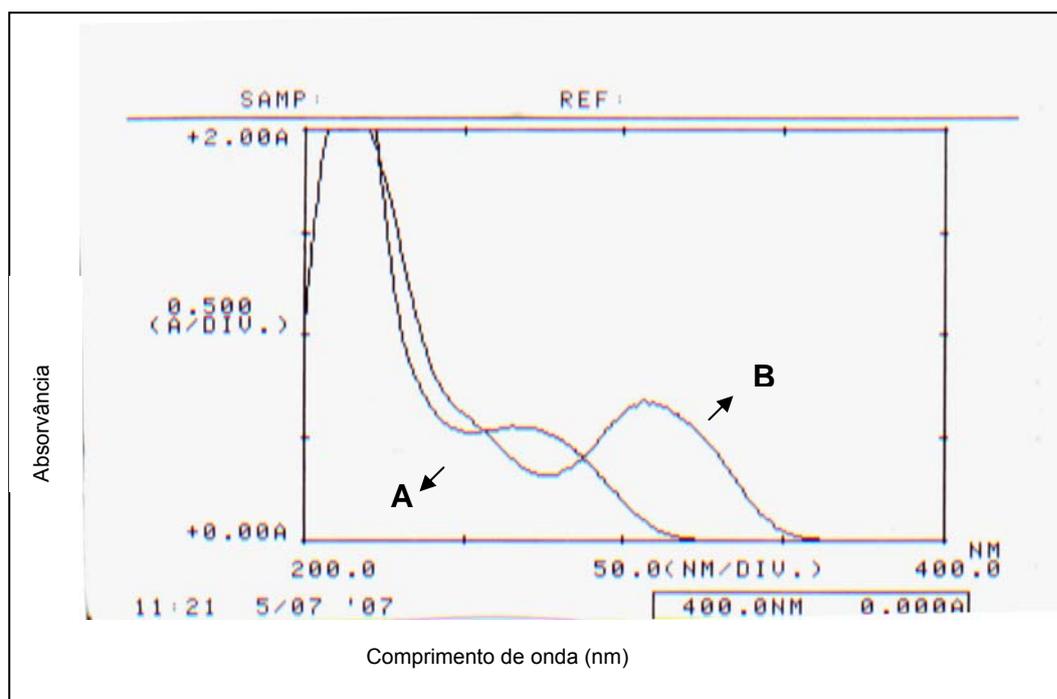


Figura 4.6. Sobreposição dos espectros da lamotrigina em diferentes solventes na concentração de 20 µg/ml. (A) ácido clorídrico 0,01 M e (B) etanol absoluto.

Uma solução de lamotrigina SQR em ácido sulfúrico 0,025 M na mesma concentração descrita para os outros solventes foi avaliada. Obteve-se um máximo de absorção em 267 nm com absorção de 0,525, semelhante aos valores encontrados para as soluções em ácido clorídrico 0,1 M e 0,01 M, já que em valores baixos de pH, o fármaco se encontra na forma ionizada e apresenta um perfil espectral semelhante.

Para a execução da análise qualitativa proposta, foi utilizado ácido clorídrico 0,01 M como solvente, pois o mesmo apresentou-se adequado, apresentando máximo de absorção em 267 nm. Além disso, optou-se por esse solvente para evitar a geração de resíduos orgânicos e pelo baixo custo da análise.

Os perfis dos espectros de absorção apresentados na Figura 4.5, obtidos a partir das soluções de SQR e dos comprimidos de LTG são similares, o que indica a presença da lamotrigina nos comprimidos. Desta forma, o método apresentou-se adequado na identificação desse fármaco, porém, cabe salientar que métodos adicionais qualitativos devem complementar a espectrofotometria de absorção no UV para a correta identificação de uma substância.

4.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE foi a técnica cromatográfica mais interessante desenvolvida nos últimos anos. Os vários tipos de colunas e detectores fazem com que a seletividade do método possa ser ajustada (WATSON, 2005). Esta técnica é utilizada para identificação, quantificação e separação de compostos. A identificação pode ser feita quando a amostra é comparada a uma substância de referência através de seus tempos de retenção.

4.8.1. Materiais

Para análise por cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizadas LTG SQR e comprimidos de LTG conforme descrito em 4.3.1 e 4.3.2.

Foram utilizados metanol (Tedia) grau CLAE, trietilamina (Merck), ácido fosfórico 10% e água ultrapura.

O teste foi realizado em cromatógrafo Agilent equipado com controlador de sistema SCL10-Avp operado pelo programa ChemStation. O equipamento é composto por sistema quaternário de bombas Q1311A, detector de arranjo de fotodiodos DAD G1315B, forno TCC-G1316A e auto-injetor ALS-G1329A.

Testes preliminares foram realizados em cromatógrafo Shimadzu equipado com controlador de sistema SCL10-ADvp operado pelo programa Class VP 6.12 SP2. O equipamento é composto por sistema binário de bombas LC-10ADvp, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10ADvp, forno CTO-10ACvp e auto-injetor SIL-10ADvp.

4.8.2. Método

A solução de SQR foi preparada através da pesagem de 10 mg da SQR e posteriormente dissolvida com metanol em balão volumétrico de 20 ml. A solução foi submetida à sonicação por 15 minutos e posterior diluição na fase móvel para a obtenção de solução com concentração de 40 µg/ml.

A solução dos comprimidos foi preparada pesando-se o equivalente a 25 mg de LTG que foram transferidos para balão volumétrico de 50 ml com metanol. A solução foi submetida à banho de ultra-som por 15 minutos e filtrada com auxílio de papel filtro qualitativo, obtendo-se solução com concentração equivalente a 0,5 mg/ml. Alíquota equivalente a 4,0 ml da solução foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, utilizando-se fase móvel como diluente, sendo a concentração final obtida equivalente a 40 µg/ml. As soluções foram filtradas com filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro e transferidas para os frascos de análise.

A fase móvel foi preparada através da solução de 0,3% de trietilamina em água (v/v), pH ajustado em 4,0, com ácido fosfórico a 10%, e metanol na proporção 62:38 (v/v), respectivamente. A fase móvel foi filtrada em membrana de nylon Millex[®] 0,45 µm, marca Millipore e desaerada em sistema desgaseificador acoplado ao cromatógrafo.

As condições cromatográficas empregadas para a realização da análise qualitativa por CLAE estão descritas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Condições cromatográficas empregadas na análise de LTG por CLAE.

CARACTERÍSTICA	DESCRIÇÃO
Coluna	ACE [®] 5 C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm de diâmetro interno)
Fase móvel	Água com 0,3 % Trietilamina (v/v) e pH ajustado a 4,0 com H ₃ PO ₄ 10 % : metanol (62:38, v/v)
Volume de injeção	20 µl
Fluxo da fase móvel	1,0 ml/minuto
Comprimento de onda	279 nm, detector de arranjo de fotodiodos
Temperatura de análise	25 °C

A coluna foi previamente estabilizada com a fase móvel durante 15 minutos a um fluxo de 1,0 ml/min. Após estabilização do sistema, as soluções da SQR e dos comprimidos de LTG, previamente filtradas, foram injetadas no cromatógrafo. Os

tempos de retenção da solução da lamotrigina SQR e da solução dos comprimidos de lamotrigina amostra foram comparados.

4.8.3. Resultado

Na Figura 4.7 podem ser observados os cromatogramas obtidos com as soluções preparadas com LTG SQR e com os comprimidos de LTG.

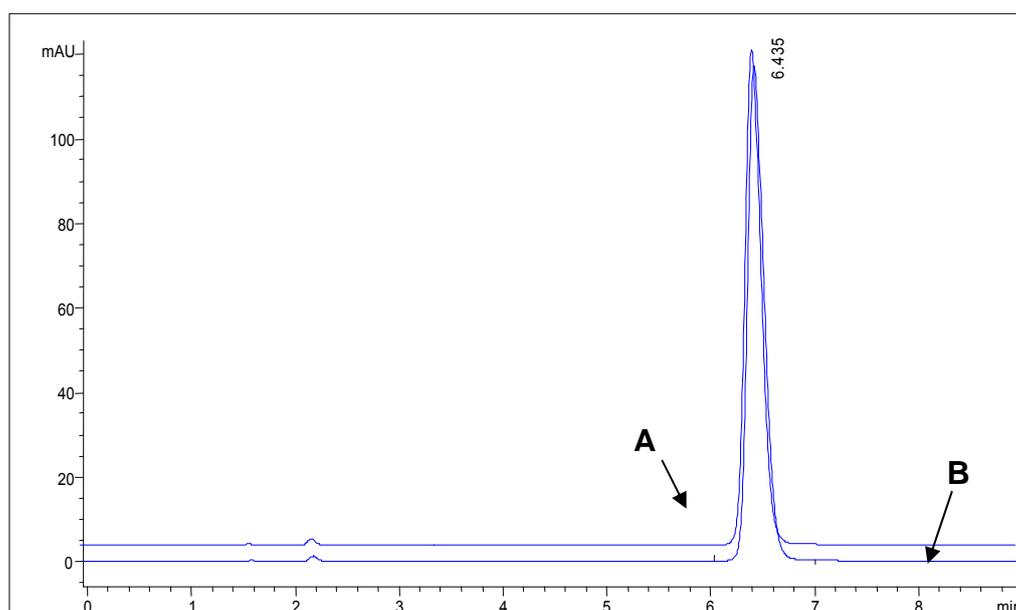


Figura 4.7. Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de LTG SQR (A) e solução de LTG comprimidos (B) ambas à concentração de 40 $\mu\text{g/ml}$. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H_3PO_4 10 %) e MeOH (62:38, v/v), fluxo de 1,0 ml/min, coluna Ace 5 C18 *end capped* (150 mm x 4,6 mm; 5 μm), detecção em 279 nm, volume de injeção 20 μl , temperatura de análise 25 $^\circ\text{C}$.

4.8.4. Discussão

Durante o desenvolvimento do método por CLAE para a determinação da lamotrigina foram testados diferentes sistemas, partindo-se das condições mais simples, aprimorando-as conforme a necessidade do método.

Primeiramente, foi testada uma proporção de fase móvel contendo 50% de água e metanol. Nessas condições, o pico da LTG foi observado em reduzido tempo de retenção, em torno de 2 minutos. Percebeu-se também a presença de uma cauda

acentuada. A constituição da fase móvel foi modificada, utilizando-se 60% de água e 40% de metanol. Com base nesta alteração, observou-se o aumento do tempo de retenção, porém com manutenção da cauda, como demonstrado na Figura 4.8 (A).

Na cromatografia de fase reversa a utilização de fase móvel com valor de pH ácido para a análise de compostos fracamente básicos ocasiona a completa protonação dos mesmos. Em função disso, as bases protonadas se tornam compostos polares que podem se ligar aos grupamentos silanóis inativos da fase estacionária ocasionando retenção e, conseqüentemente, o aparecimento de cauda pronunciada. Tais eventos podem ocorrer mesmo quando se faz uso de colunas protegidas. Esse problema pode ser resolvido com o acréscimo de uma base competitiva na fase móvel (LINDSAY, 1987).

Para fármacos básicos, o uso de colunas de fase reversa são recomendadas e a adição de aminas pode ser benéfica (SNYDER *et al.*, 1997). Desta forma, sabendo-se que a lamotrigina é uma base fraca e que pode reagir com os possíveis grupamentos silanóis livres da coluna, foi adicionada à fase móvel 0,3% de trietilamina (TEA), como demonstrado na Figura 4.8 (B). Com a adição desse reagente a cauda foi eliminada.

O ajuste do pH da solução para valores abaixo de 4,5 resulta na LTG predominantemente na forma ionizada com máximos de absorção em torno de 270 nm (CHENG *et al.*, 2005). Com isto, foi utilizado ácido fosfórico 10% (v/v) para o ajuste do pH da fase aquosa em 4,00. Testes com a fase móvel com pH ajustado em 3,5 apresentaram diminuição no número de pratos teóricos.

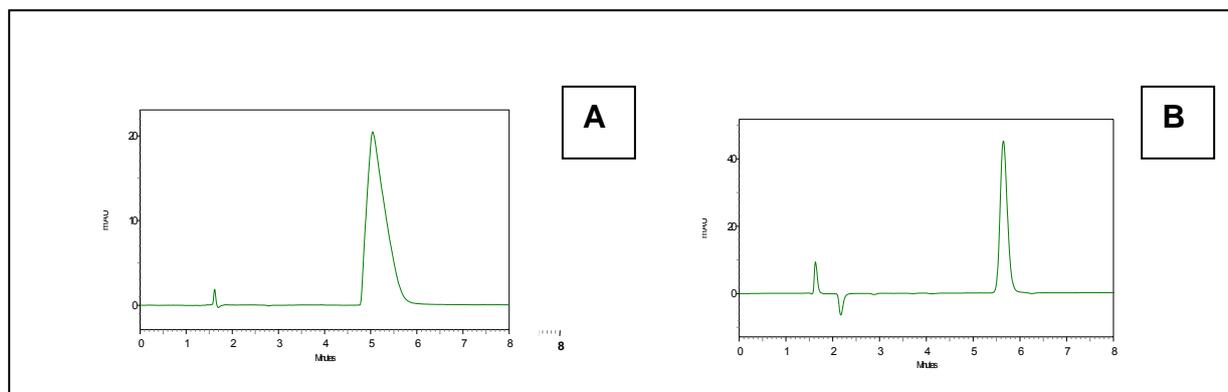


Figura 4.8. Cromatogramas realizados com a mesma fase móvel contendo água:metanol (60:40) sem 0,3% de trietilamina na água (A) e com trietilamina (B).

Inúmeros trabalhos encontrados na literatura científica relataram a utilização de tampões na fase móvel, o que não foi necessário no sistema proposto. A eliminação do tampão confere ao método vantagens, principalmente, em relação ao equipamento e ao tempo que se deve dispender na lavagem das conexões do equipamento pós-análise.

Os cromatogramas apresentados na Figura 4.7 obtidos por cromatografia a líquido de alta eficiência, a partir de soluções preparadas com lamotrigina SQR e com os comprimidos de LTG, apresentam valores de tempo de retenção similares, em torno de 6,5 minutos, o que permite sugerir que as amostras avaliadas apresentam a mesma identidade.

**5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A
DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA LAMOTRIGINA EM COMPRIMIDOS**

5.1. Introdução

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, por estudos laboratoriais, que as características de *performance* do método cumprem os requisitos para a aplicação analítica a que se destina. O desenvolvimento correto de uma série bem definida de experimentos de validação é exigido para garantir que todos os dados obtidos através do uso de um procedimento analítico, sejam realmente confiáveis. Além disso, a validação de um método analítico é um passo importante para o requerimento de registro de fármacos novos (BRITAIN, 1998; ERMER, 2001; USP 30, 2007).

Qualquer método analítico deve ser validado segundo os padrões farmacopéicos vigentes, uma vez que qualquer um deles pode potencialmente ser incluído em uma monografia, mas cada um desses deve ser validado de acordo com os parâmetros relevantes para seu desempenho. Procedimentos analíticos inapropriados podem levar a decisões incorretas (BRITAIN, 1998; ERMER, 2001).

Para a validação de método analítico não descrito em farmacopéias ou formulários oficiais, o método será considerado validado, desde que sejam avaliados os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 30, 2007).

É responsabilidade do analista identificar os parâmetros que são críticos para o desempenho do processo analítico e desenvolver protocolos próprios de validação incluindo critérios de confiabilidade e o desenvolvimento de uma análise apropriada. Cada método validado indica que o mesmo foi avaliado estatisticamente e demonstra adequabilidade para o seu propósito (ERMER, 2001).

5.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método por espectrofotometria de absorção na região do UV para determinação quantitativa da lamotrigina em comprimidos;
- Desenvolver e validar método por CLAE para determinação quantitativa da lamotrigina em comprimidos;
- Comparar estatisticamente os métodos propostos para análise quantitativa dos comprimidos de lamotrigina.

5.3. Espectrofotometria na região do Ultravioleta

Na análise farmacêutica, a espectrofotometria na região do UV pode ser um método de quantificação nas formas farmacêuticas que não possuem interferência dos excipientes. Além disso, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível é um método de fácil execução, baixo custo, rápido e que oferece a vantagem de não gerar grande quantidade de resíduos (WATSON, 2005).

Para o desenvolvimento e validação de um método adequado para a quantificação da lamotrigina em comprimidos foram testados diferentes solventes, como demonstrado anteriormente no item 4.7.4. O solvente selecionado foi o ácido clorídrico 0,01 *M*, com o qual foram avaliados os parâmetros pertinentes para a validação do método.

5.3.1 Materiais

As amostras de SQR e comprimidos de lamotrigina, descritas nos itens 4.3.1 e 4.3.2, foram utilizadas para análise. Foram empregados ácido clorídrico 0,01 *M* (HCl 0,01 *M*) e papel filtro qualitativo para o preparo das amostras.

Os excipientes contidos na formulação dos comprimidos de lamotrigina, descritos no item 4.3.2, foram utilizados para avaliação da especificidade do método por espectrofotometria na região do UV.

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro UV/VIS, marca Shimadzu, modelo UV 160 1 PC, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

5.3.2. Método

5.3.2.1. Validação

Os parâmetros analíticos avaliados para determinação da lamotrigina na forma farmacêutica comprimido por espectrofotometria na região do UV estão descritos a seguir:

5.3.2.1.1. Especificidade

As soluções de lamotrigina SQR e dos comprimidos de LTG foram preparadas em concentrações equivalentes a 20 µg/ml, conforme descrito no item 4.7.2.

A solução da amostra simulada dos excipientes (ASE) foi preparada conforme a solução obtida a partir dos comprimidos de lamotrigina, pesando-se o equivalente da mistura dos excipientes contida em material dos comprimidos equivalente a 25 mg de lamotrigina.

A composição da amostra simulada de excipientes está descrita na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Composição da amostra simulada dos excipientes (ASE).

Excipiente	Quantidade (%) *
Manitol (diluyente)	35,00
Fosfato de cálcio dibásico (diluyente)	35,00
Amido pré-gelatinizado (aglutinante)	12,50
Amido (desintegrante)	9,00
Glicolato sódico de amido (desintegrante)	4,00
Estearato de magnésio (lubrificante)	2,50
Dióxido de silício coloidal (agente de fluxo)	0,70
Amarelo de tartazina (corante)	0,01

*Quantidades aproximadas com base nas especificações de concentrações percentuais médias descritas para cada excipiente (KIBBE, 2000; FIELDER, 2002).

5.3.2.1.2. Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através da construção de três curvas padrão, contendo sete concentrações. Cada concentração de análise foi preparada em triplicata.

A partir de uma solução estoque da SQR de lamotrigina (100 µg/ml), em HCl 0,01 M, foram realizadas as diluições, através de bureta de 10 ml, de acordo com a Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Modo de preparo da curva padrão para avaliação da linearidade do método analítico por espectrofotometria na região do UV.

N	Volume de solução estoque (ml)	Balão volumétrico (ml)	Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)
1	1,0	20	5
2	2,0	20	10
3	1,5	10	15
4	2,0	10	20
5	5,0	20	25
6	3,0	10	30
7	4,0	10	40

As médias das absorvâncias obtidas a partir da análise de lamotrigina SQR foram utilizadas para determinação da curva padrão através da construção do gráfico de absorvância *versus* concentração.

O estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, foi empregado para determinação da equação da reta. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a linearidade do método.

5.3.2.1.3. Precisão

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de lamotrigina SQR, que foi posteriormente transferida para balão volumétrico de 20 ml com HCl 0,01 M. A solução foi submetida à banho de ultra-som por 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente ($C = 0,5 \text{ mg/ml}$). Foi transferida alíquota de 2,0 ml para balão volumétrico de 50 ml, utilizando ácido clorídrico 0,01 M como diluente, obtendo-se solução com concentração final de 20 $\mu\text{g/ml}$.

A precisão intradia foi determinada a partir do peso médio de 20 comprimidos de lamotrigina. Os comprimidos foram triturados em gral a pó fino e

homogeneizados. Pesou-se quantidade de amostra equivalente a 25 mg de lamotrigina que foi, em seguida, transferida para balão volumétrico de 50 ml com 20 ml de HCl 0,01 M. Esta solução foi submetida à banho de ultra-som e, posteriormente, submetida a agitação mecânica por períodos de 15 minutos cada etapa, sendo o volume completado com o mesmo solvente ($C = 0,5$ mg/ml). A solução obtida foi filtrada e uma alíquota de 2,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, sendo utilizado o mesmo solvente como diluente. A concentração final obtida foi equivalente a 20 µg/ml de LTG. Foram preparadas seis soluções a partir de seis diferentes pesagens dos comprimidos triturados de LTG.

A concentração em µg/ml das soluções de lamotrigina comprimidos (C_A) foi determinada com base na equação:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

- A_A = absorvância da solução de lamotrigina preparada a partir dos comprimidos;
- C_{SQR} = concentração da solução de lamotrigina SQR;
- A_{SQR} = absorvância da solução de lamotrigina SQR.

As percentagens de lamotrigina nos comprimidos ($C_A\%$) foram calculadas a partir da equação:

$$C_A \% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Onde:

- C_A = concentração da solução de lamotrigina comprimidos em $\mu\text{g/ml}$;
- C_T = concentração teórica da solução de lamotrigina comprimidos em $\mu\text{g/ml}$.

A precisão intermediária do método foi determinada a partir dos resultados de repetibilidade (DPR) para análises efetuadas em três dias consecutivos.

5.3.2.1.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada através do método de adição de padrão na solução dos comprimidos de LTG. Para tanto, foram preparadas soluções de lamotrigina SQR e soluções de LTG comprimidos, ambas na concentração de 0,5 mg/ml, diluídas em HCl 0,01 M, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.

Na Tabela 5.3 está representado o modo de preparo das soluções do teste de recuperação da LTG para análise da exatidão do método. As alíquotas foram transferidas através de bureta de 10 ml. As soluções foram preparadas em triplicata.

Tabela 5.3. Modo de preparo das amostras para a realização para o teste de recuperação pelo método analítico por espectrofotometria de absorção no UV para a determinação da LTG.

Balão volumétrico (50 ml)	Solução de lamotrigina SQR 0,5 mg/ml (ml)	Solução de lamotrigina comprimidos 0,5 mg/ml (ml)	Concentração* final ($\mu\text{g/ml}$)
Referência	2,0	----	20
R1	0,5	2,0	25
R2	1,0	2,0	30
R3	2,0	2,0	40
Amostra	-----	2,0	20

*Cada concentração foi preparada em triplicata.

As percentagens de recuperação (R%) obtidas para a lamotrigina SQR foram calculadas através da equação:

$$R\% = [(C_M - C_A) / C_P] \cdot 100$$

Onde:

- C_M = concentração da solução contendo lamotrigina SQR e lamotrigina em comprimidos determinada pelo método ($\mu\text{g/ml}$);
- C_A = concentração da solução de lamotrigina em comprimidos determinada pelo método ($\mu\text{g/ml}$);
- C_P = concentração resultante de lamotrigina SQR adicionada na solução final ($\mu\text{g/ml}$).

5.3.2.1.5. Robustez

Para a avaliação da robustez do método, a solução de lamotrigina SQR e a solução obtida com os comprimidos de lamotrigina foram preparadas de acordo com o descrito no item 5.3.2.1.3 diferenciando-se no preparo da solução dos comprimidos de lamotrigina no momento da extração do fármaco, onde, nesse caso, foram avaliados três diferentes procedimentos.

As soluções de comprimidos de lamotrigina, preparadas em triplicata, foram submetidas à agitação mecânica por 15 minutos, à sonicação por 15 minutos ou ainda à sonicação por 15 minutos, seguida de agitação mecânica por mais 15 minutos.

Os resultados foram avaliados com intuito de verificar a existência ou não de diferença significativa entre os métodos de extração do fármaco. Para tanto, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para diferentes tratamentos e repetições iguais (triplicata).

5.3.2.1.6. Limites de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LD) para LTG pelo método por espectrofotometria de absorção no UV foi calculado pela seguinte equação:

$$LD = (3,3 \cdot s) / I$$

Onde:

- s = desvio padrão do intercepto das três curvas padrão;
- I = inclinação média obtida nas três curvas padrão.

O limite de detecção (LQ) para a LTG para o método de espectrofotometria de absorção no UV foi calculado pela seguinte equação:

$$LQ = (10 \cdot s) / I$$

Onde:

- s = desvio padrão do intercepto das três curvas padrão;
- I = inclinação média obtida nas três curvas padrão.

5.3.2.1.7. Estabilidade das soluções

Foram avaliadas soluções de LTG SQR, preparadas na concentração de 0,5 mg/ml em ácido clorídrico 0,01 *M* e, posteriormente, diluídas no mesmo solvente conforme descrito no item 5.3.2.1.3. As soluções foram avaliadas por cinco dias armazenadas a temperatura de 4°C. As mesmas foram avaliadas através de espectrofotometria de absorção no UV para a observação da possível redução no teor do fármaco.

5.3.2.1.8. Resultados

5.3.2.1.8.1 Especificidade

Na Figura 5.1 e 5.2 estão representados os espectros das soluções preparadas com a amostra simulada de excipientes (ASE) e lamotrigina SQR, respectivamente.

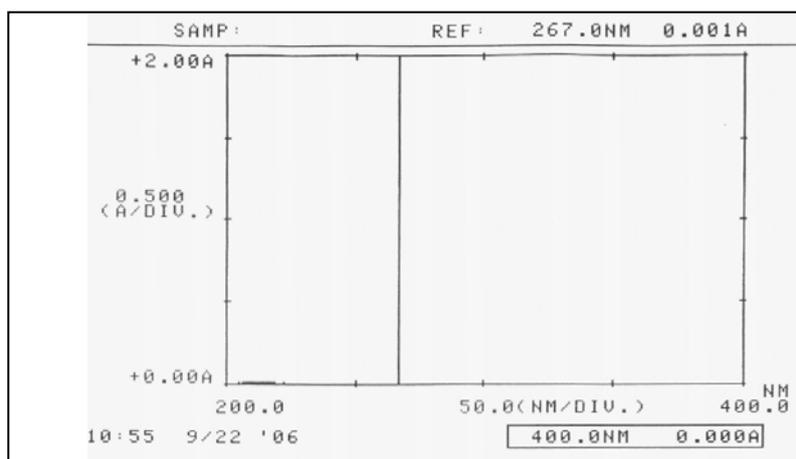


Figura 5.1. Espectro de absorção na região do UV referente à solução placebo dos excipientes dos comprimidos em HCl 0,01 M, na faixa de 200 a 400 nm.

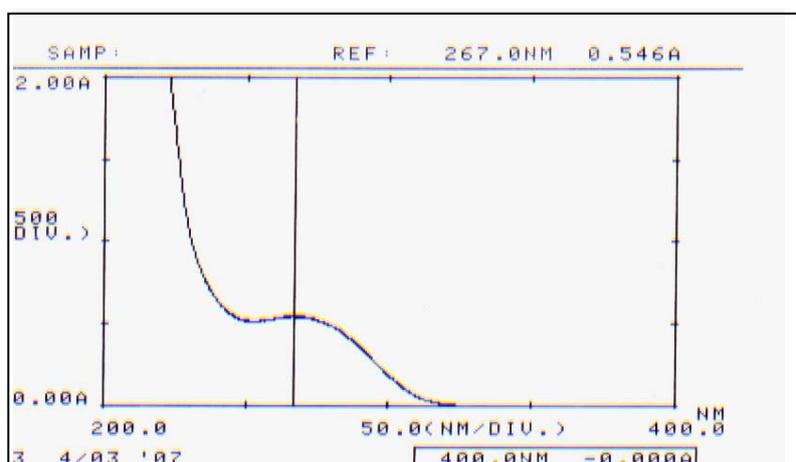


Figura 5.2. espectro de absorção na região do UV da solução de SQR de LTG em HCl 0,01 M, na faixa de 200 a 400 nm.

5.3.2.1.8.2. Linearidade

Na Tabela 5.4 estão descritos os valores das absorvâncias encontrados para o método por espectrofotometria na região do UV em 267 nm.

Tabela 5.4. Absorvâncias obtidas pelo método por espectrofotometria na região do UV a 267 nm através das curvas padrão em HCl 0,01 M.

Concentração (µg/ml)	Absorvância	Absorvância média ± e.p.m.	DPR
5	0,136	0,137 ± 0,0013	1,66
	0,140		
	0,140		
10	0,276	0,275 ± 0,0006	0,36
	0,275		
	0,274		
15	0,408	0,409 ± 0,0009	0,42
	0,411		
	0,408		
20	0,549	0,551 ± 0,0012	0,38
	0,550		
	0,553		
25	0,686	0,683 ± 0,0017	0,44
	0,683		
	0,680		
30	0,820	0,820 ± 0,0006	0,12
	0,819		
	0,821		
40	1,097	1,090 ± 0,0037	0,59
	1,087		
	1,085		

*e.p.m. - Erro padrão da média.

*DPR - Desvio padrão relativo.

A partir das absorvâncias médias obtidas na faixa de concentração estudada (5-40 µg/ml) a equação da reta foi calculada e o coeficiente de correlação (r) foi determinado (Figura 5.3).

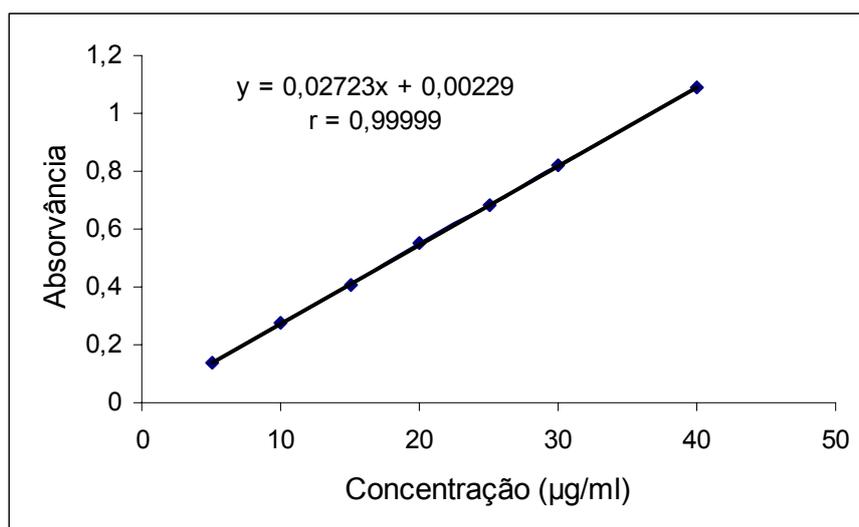


Figura 5.3. Representação gráfica da curva padrão da LTG SQR obtida por espectrofotometria de absorção no UV.

Na tabela 5.5 está demonstrada a análise de variância (ANOVA) realizada a partir dos valores experimentais obtidos por espectrofotometria de absorção no UV.

Tabela 5.5. ANOVA dos resultados experimentais obtidos através da curva padrão da LTG por espectrofotometria de absorção no UV a 267 nm.

Fontes de variação	GI	Soma dos quadrados	Variância	F calculado
Entre doses	6	1,9346	0,3224	33193,06*
Regressão linear	1	1,9346	1,9346	199152,00*
Desvio de linearidade	5	$6,20 \times 10^{-05}$	$1,24 \times 10^{-05}$	1,2764 ^{NS}
Dentro	14	$1,36 \times 10^{-04}$	$9,71 \times 10^{-06}$	-
Total	20	1,9347	-	-

* Significativo para $p < 0,05$;
NS= não significativo.

5.3.2.1.8.3. Precisão

Na Tabela 5.6, estão demonstrados os resultados experimentais obtidos através das sucessivas determinações realizadas para análise da precisão do método.

Tabela 5.6. Valores experimentais obtidos a partir da determinação da LTG nos comprimidos obtidos por espectrofotometria de absorção no UV para detreminação do teor e avaliação da precisão.

PRECISÃO INTRADIA (n=6)				
	Teor (%)		Média	DPR
Dia 1	98,18	97,45	97,64	0,37
	97,45	97,45		
	98,00	97,27		
Dia 2	100,18	99,08	98,63	1,17
	99,08	97,45		
	97,09	98,89		
Dia 3	98,90	99,08	98,99	0,35
	98,71	99,26		
	98,53	99,45		
PRECISÃO INTERDIA (n=18)				
Média			98,42	
DPR			0,71	

5.3.2.1.8.4. Exatidão

As percentagens obtidas pelo teste de recuperação realizado por espectrofotometria de absorção no UV dos comprimidos de LTG estão demonstradas na tabela 5.7.

Tabela 5.7. Resultados obtidos pelo teste de recuperação realizado por espectrofotometria de absorção no UV para determinação da LTG em comprimidos.

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)	DPR
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)*			
R1	5,00	4,88	97,60		
R2	10,00	9,89	98,90	98,63	0,94
R3	20,00	19,88	99,40		

* Cada valor representa a média de três determinações

5.3.2.1.8.5. Robustez

Na tabela 5.8 pode-se observar os valores encontrados para os teores de LTG que foram submetidos a diferentes procedimentos de extração do fármaco.

Tabela 5.8. Valores experimentais obtidos por espectrofotometria de absorção no UV para a determinação de LTG submetidas a diferentes processos de extração do fármaco.

Método de extração	Média (teor %)	DPR
Agitação 15 minutos	97,74	0,47
Sonicação 15 minutos	97,25	1,26
Agitação + sonicação (15 minutos cada)	97,61	0,39

* Cada valor é a média de três determinações

Os resultados referentes à robustez do método através dos diferentes processos de extração estão demonstrados na Tabela 5.9, onde está representada a análise de variância (ANOVA) para diferentes tratamentos com igual número de repetições.

Tabela 5.9. Tabela de ANOVA realizada para os três diferentes processos de extração efetuados para o método de espectrofotometria de absorção no UV.

Fontes de variação	GI	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado
Entre tratamentos	2	2,31	1,155	0,66
Erro experimental	6	10,41	1,735	-
Total	8	12,72	-	-

F tabelado: 5,14

5.3.2.1.8.6. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).

Na Tabela 5.10 estão demonstrados os valores calculados para o LD e LQ através dos valores obtidos pelas curvas padrão para o método por espectrofotometria de absorção no UV.

Tabela 5.10. Limites de detecção e quantificação determinados matematicamente através dos valores obtidos pelas curvas padrão.

Parâmetro Analítico	Lamotrigina
Limite de detecção (LD)	0,29 µg/ml
Limite de quantificação (LQ)	0,88 µg/ml

5.3.2.1.8.7. Estabilidade das soluções

Na Tabela 5.11 estão demonstrados os valores experimentais encontrados para as absorvâncias obtidas com as soluções da SQR em ácido clorídrico 0,01 M (C= 20 µg/ml) no intervalo de 5 dias.

Tabela 5.11. Valores experimentais obtidos a partir de soluções de LTG SQR (20 µg/ml) num intervalo de 5 dias.

Dia	Absorvância
0	0,543
5	0,543

5.3.2.1.9. Discussão

A determinação da especificidade é extremamente importante durante a validação de um método não cromatográfico, porque este não contém uma fase de separação que garanta a não interferência dos excipientes (BRITAIN, 1998).

A partir da análise dos espectros das soluções da SQR, de comprimidos de lamotrigina e da solução de amostra simulada de excipientes (ASE) verifica-se que o método proposto apresenta-se específico, já que não sofre interferência dos excipientes no comprimento de onda selecionado para o método (267 nm). A solução de ASE apresenta apenas pequena absorção em comprimento de onda em torno de 200 nm.

A faixa de linearidade do método foi avaliada através da elaboração de três curvas padrão contemplando concentrações de 5 a 40 µg/ml. A equação da reta resultante foi $y = 0,0294x + 0,0009$ e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999, determinado pelo estudo de regressão linear. O valor do coeficiente de correlação, que deve ser o mais próximo possível da unidade, apresentou-se satisfatório. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que existe regressão linear no intervalo estudado sem haver desvio da linearidade.

Através dos teores de lamotrigina obtidos pelos doseamentos realizados para verificação da precisão obteve-se uma concentração média de 98,42 mg/comprimido e um teor de 98,42%.

Os desvios padrão relativos inferiores a 2% demonstraram que através desse método pode-se determinar a LTG na concentração teste (20 µg/ml) com precisão adequada (BRASIL, 2003).

A exatidão do método foi avaliada a partir do teste de recuperação da lamotrigina SQR, cujos resultados podem ser observados na Tabela 5.7. O teste realizado demonstrou a exatidão do método proposto, sendo que a recuperação observada foi de 97,60; 98,90 e 99,40%, para 25, 50 e 100% de SQR adicionada à amostra, respectivamente.

A robustez representa uma indicação de confiabilidade do método durante o uso rotineiro (BRITAIN, 1998). Os três diferentes métodos de extração foram avaliados e pôde-se observar que não houve diferença significativa entre os mesmos, já que o *F* calculado (0,66) é inferior ao *F* tabelado (5,14) para uma probabilidade de 5%.

Os limites de detecção e de quantificação para a lamotrigina apresentaram valores baixos, demonstrando a boa sensibilidade do método para determinação e quantificação da LTG nas condições do método descritas.

A solução de lamotrigina SQR manteve-se estável na geladeira (4°C) por, pelo menos, 5 dias em ácido clorídrico 0,01 *M*.

5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais comumente utilizada para a quantificação de fármacos em suas formulações. Apresenta inúmeras aplicações e vantagens, possibilitando alta eficiência de separação. A combinação da CLAE com detectores na região ultravioleta/visível viabilizam métodos quantitativos para análise de produtos farmacêuticos com exatidão, precisão e robustez (WATSON, 2005).

Um requisito essencial para análise de separação é verificar a pureza das espécies separadas e a certeza de não haver interferentes coelundo com o pico principal. Uma impureza pode gerar resultados falsos, para tanto, a validação de métodos analíticos inclui a determinação da pureza do pico (STAHL, 2003).

A pureza do pico pode ser útil para demonstrar que o sinal do analito não é atribuído a mais do que um componente (ICH, 2005). Uma opção é utilizar arranjo

de fotodiodos, onde o pico é dividido em várias partes e o espectro de cada uma destas é determinado e comparado para avaliação de similaridade, ou seja, se todas as partes correspondem a mesma substância.

5.4.1. Materiais

As amostras de lamotrigina SQR e de comprimidos de lamotrigina, descritas nos itens 4.3.1 e 4.3.2, foram utilizadas para a análise.

A fase móvel foi preparada utilizando-se metanol (Tedia) grau CLAE, trietilamina (Merck), ácido fosfórico 10% e água ultrapura. A mesma foi filtrada em membrana de nylon Millex[®] 0,45 µm, marca Millipore e desaerada em sistema desgaseificador acoplado ao cromatógrafo.

As amostras de SQR e comprimidos foram submetidas à banho de ultra-som e o pH da fase móvel foi ajustado em potenciômetro Digimed modelo DM-20.

O método foi desenvolvido em cromatógrafo líquido Agilent LC-1200, conforme descrito em 4.8.1 e as condições cromatográficas estão descritas na Tabela 4.3.

5.4.2. Método

5.4.2.1. Validação

Os parâmetros analíticos avaliados para determinação da lamotrigina na forma farmacêutica comprimido por cromatografia líquida de alta eficiência estão descritos a seguir.

5.4.2.1.1. Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através de uma amostra simulada de excipientes, conforme descrito na Tabela 5.1 e através da degradação forçada da

solução dos comprimidos de lamotrigina. As ferramentas do software ChemStation foram utilizadas para a verificação da pureza do pico da LTG.

A solução de LTG SQR, assim como a solução dos comprimidos de lamotrigina foram preparadas conforme descrito no item 4.8.2, obtendo-se soluções com concentração final de 40 µg/ml.

5.4.2.1.1.1. Avaliação da especificidade do método frente à amostra simulada dos excipientes.

A solução da amostra simulada dos excipientes (ASE) foi preparada da mesma maneira que a solução obtida com os comprimidos de lamotrigina pesando-se, entretanto, quantidade da mistura dos excipientes equivalente à massa dos comprimidos que conteria 25 mg de lamotrigina.

As soluções obtidas foram avaliadas quanto aos seus perfis cromatográficos.

5.4.2.1.1.2. Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada

5.4.2.1.1.2.1. Fotodegradação

A especificidade do método foi verificada também a partir da avaliação dos prováveis produtos de degradação que poderiam interferir na determinação da LTG. A degradação em condições fotolíticas foi realizada através da exposição do fármaco à radiação ultravioleta a 254 nm. Para tanto, foi pesado o equivalente a 20 mg de lamotrigina a partir dos comprimidos triturados. Essa quantidade foi transferida para balão volumétrico de 20 ml, a solução foi submetida à banho de ultra-som e o volume foi completado com metanol. A solução foi filtrada e alíquotas de 1,0 ml dessa solução foram transferidas para cubetas descartáveis (Plastibrand[®]), vedadas com parafilme e mantidas por 2 e 24 horas sob incidência de luz direta a uma distância de 10 cm da lâmpada Ecovolume[®] 30 Watts, emissora de luz ultravioleta de 254 nm, em câmara de vidro espelhada internamente

(100×16×16 cm). Foram preparadas soluções de LTG SQR em concentração de 1 mg/ml, no mesmo solvente, as quais foram submetidas às mesmas condições para posterior comparação. Após transcorridos os tempos acima descritos, o conteúdo das cubetas foi transferido para balões volumétricos de 25 ml, sendo o volume completado com a fase móvel, obtendo-se concentração final de 40 µg/ml. O efeito da luz sobre o placebo foi analisado simultaneamente.

5.4.2.1.1.2.2. Hidrólise ácida e básica

Para avaliar o efeito das condições drásticas de pH sobre a LTG, foi preparada solução estoque de lamotrigina em metanol a partir dos comprimidos com concentração equivalente a 2 mg/ml. Para tanto, pesou-se o equivalente a 100 mg do fármaco que foram transferidos para balão volumétrico de 50 ml. O volume foi completado com metanol e a solução foi submetida à banho de ultra-som por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi filtrada. Para avaliar a hidrólise ácida e básica, alíquotas de 5,0 ml da solução estoque foram transferidas para balões volumétricos de 10 ml, sendo que em cada um deles foi adicionado HCl 1,0 M e NaOH 1,0 M até completar o volume, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/ml. As soluções foram preparadas em triplicata e permaneceram em contato por até 7 horas. Ao final do período de 2 e 7 horas, foram retiradas alíquotas de 1,0 ml e transferidas para balões volumétricos de 25 ml. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 ml de HCl 1,0 M nos balões referentes à hidrólise básica e 1,0 ml de NaOH 1,0 M nos balões referentes à hidrólise ácida. O volume dos balões foi completado com fase móvel. Paralelamente, foram preparadas soluções sem a adição de ácido e base, as quais foram diluídas da mesma forma. Essas soluções foram consideradas como 100%. Somente o ácido ou a base foram neutralizados e diluídos em fase móvel para avaliar o perfil cromatográfico do branco. A solução placebo, bem como solução de SQR foram submetidas a hidrólise ácida e alcalina para efeito de comparação.

5.4.2.1.1.2.3. Temperatura associada à hidrólise

Para avaliar o efeito de dois fatores como a temperatura associada à hidrólise, foram preparadas soluções dos comprimidos de LTG, conforme descrito para hidrólise ácida e básica, as quais foram, primeiramente, deixadas em contato com o ácido clorídrico 1,0 M e o hidróxido de sódio 1,0 M por duas horas. Posteriormente, essas soluções foram aquecidas em banho-maria por 1 hora numa temperatura de 80°C. As mesmas foram neutralizadas com o ácido ou a base e diluídas com a fase móvel para a obtenção de soluções com concentração final de 40 µg/ml. Essas soluções foram analisadas em Coluna Agilent Eclipse® XDB octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm; 5 µm), apresentando as mesmas especificações da coluna ACE® anteriormente utilizada para os demais testes de especificidade.

5.4.2.1.1.2.4. Efeitos de oxidação

Os efeitos de oxidação foram avaliados preparando-se soluções diluídas a partir da solução estoque (2 mg/ml) descrita para os testes de estresse com ácido e base. Para tanto, foram transferidas alíquotas de 5,0 ml da solução estoque para balões de 10 ml e o volume foi completado com peróxido de hidrogênio 30%, obtendo-se soluções com concentração de 1mg/ml. As soluções permaneceram em contato com o agente oxidante por 6 horas. Ao final deste período, foram retiradas alíquotas de 1,0 ml e transferidas para balões volumétricos de 25 ml. O volume dos balões foi completado com a fase móvel, obtendo-se solução com concentração teórica de 40 µg/ml. Foi preparada uma solução a partir dos comprimidos de LTG sem a adição do peróxido, a qual foi diluída e utilizada para comparação. O branco do peróxido de hidrogênio também foi diluído e analisado, assim como a solução placebo.

5.4.2.1.1.2.5. Efeitos da temperatura

A degradação térmica foi avaliada a partir de soluções de comprimidos de lamotrigina numa concentração de 1 mg/ml. Para tanto, foi pesado o equivalente a 50 mg de lamotrigina a partir dos comprimidos triturados. Essa quantidade foi

transferida para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi completado com ácido clorídrico 0,01 M. Alíquotas de 1,0 ml dessa solução foram transferidas para três diferentes frascos de vidro, fechados com tampa plástica e depositados por 6 dias em estufa DeLeo, regulada a uma temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 1$. Após transcorrido o tempo acima descrito, o conteúdo dos frascos foi transferido para balões volumétricos de 25 ml, sendo o volume completado com fase móvel, obtendo-se concentração teórica de 40 $\mu\text{g/ml}$.

Todas as soluções obtidas foram filtradas com filtro de 0,45 μm de diâmetro de poro e posteriormente injetadas. Os cromatogramas foram avaliados para verificar se os produtos de degradação forçada gerados poderiam interferir com o pico da LTG.

5.4.2.1.2. Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através da construção de três curvas padrão, contendo sete concentrações. Cada concentração de análise foi preparada em triplicata, sendo realizadas três determinações para cada solução.

A partir de uma solução estoque da SQR de lamotrigina ($C=0,5 \text{ mg/ml}$), em metanol, foram realizadas as diluições, através de bureta de 10 ml, de acordo com a Tabela 5.12.

Tabela 5.12. Preparação da curva padrão para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE.

N	Volume de solução estoque (ml)	Balão volumétrico	Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)
1	2,0	100	10
2	2,0	50	20
3	3,0	50	30
4	4,0	50	40
5	5,0	50	50
6	3,0	25	60
7	4,0	25	80

As médias das áreas obtidas a partir da análise LTG SQR foram utilizadas para determinação da curva padrão através da construção do gráfico de área *versus* concentração.

O estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, foi empregado para determinação da equação da reta. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a linearidade do método.

5.4.2.1.3. Precisão

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de lamotrigina SQR, que foram posteriormente transferidas para balão volumétrico de 20 ml com auxílio de metanol. A solução foi submetida à banho de ultra-som por 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente ($C = 0,5 \text{ mg/ml}$). Alíquota de 4,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, utilizando fase móvel como diluente final, obtendo-se solução com concentração final de $40,0 \mu\text{g/ml}$.

A determinação do peso médio foi realizada com 20 comprimidos de lamotrigina. Os comprimidos foram triturados em gral a pó fino e homogeneizados. Pesou-se quantidade de amostra equivalente a 25 mg de lamotrigina que foram, em seguida, transferidas para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 20 ml de

metanol. Esta solução foi submetida à banho de ultra-som por 15 minutos, sendo o volume completado com o mesmo solvente ($C = 0,5 \text{ mg/ml}$). A solução obtida foi filtrada e uma alíquota de 4,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, sendo utilizada a fase móvel como diluente. A concentração final obtida foi equivalente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de lamotrigina. Foram preparadas seis soluções a partir de seis diferentes pesagens dos comprimidos triturados de LTG.

A concentração (C_A), em $\mu\text{g/ml}$, das soluções de lamotrigina em comprimidos foi determinada através da equação:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

- A_A = área absoluta da solução de lamotrigina presente nos comprimidos;
- C_{SQR} = concentração da solução de lamotrigina SQR;
- A_{SQR} = área absoluta da solução de lamotrigina SQR.

As percentagens de lamotrigina nos comprimidos ($C_A\%$) foram calculadas a partir da equação:

$$C_A \% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Onde:

- C_A = concentração da solução de lamotrigina comprimidos em $\mu\text{g/ml}$;
- C_T = concentração teórica da solução de lamotrigina comprimidos.

A precisão intermediária do método foi determinada a partir dos resultados de repetibilidade (DPR) para análises efetuadas em três dias consecutivos.

5.4.2.1.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada através do método de adição de padrão na solução dos comprimidos de LTG. Para tanto, foram preparadas soluções de lamotrigina SQR e soluções de LTG comprimidos, ambas numa concentração de 0,5 mg/ml, diluídas em metanol, conforme descrito no item 5.4.2.1.3.

Foram transferidas alíquotas de 4,0 ml da solução de lamotrigina comprimidos para balões volumétricos de 50 ml. Alíquotas de 1,0; 2,0 e 4,0 ml da solução de lamotrigina SQR foram transferidas, através de bureta de 10 ml, para os balões anteriormente descritos. As soluções foram diluídas com a fase móvel e, com isto, foram obtidas soluções com concentrações finais equivalentes a 50, 60 e 80 µg/ml. As alíquotas adicionadas correspondem, respectivamente, a 25, 50 e 100% da concentração teste que, nesse caso, é 40 µg/ml, conforme descrito para a análise da precisão. Simultaneamente, foram preparadas soluções de lamotrigina SQR e de lamotrigina comprimidos na concentração de 40 µg/ml. As soluções foram preparadas em triplicata.

A Tabela 5.13 apresenta o modo de preparo das soluções para o teste de recuperação da lamotrigina para análise da exatidão do método por CLAE.

Tabela 5.13. Preparo das amostras para a análise da exatidão do método por CLAE para determinação de LTG.

Balão volumétrico (50,0 ml)	Solução de LTG SQR 0,5 mg/ml (ml)	Solução de LTG comprimidos 0,5 mg/ml (ml)	Concentração final (µg/ml)
Referência	4,0	----	40,0
R1	1,0	4,0	50,0
R2	2,0	4,0	60,0
R3	4,0	4,0	80,0
Amostra	-----	4,0	40,0

As percentagens de recuperação (R%) obtidas para a lamotrigina SQR foram calculadas através da equação descrita no item 5.3.2.1.4.

5.4.2.1.5. Robustez

A solução de lamotrigina SQR e a solução obtida com os comprimidos de lamotrigina foram preparadas de acordo com o descrito no item 5.4.2.1.3.

A robustez do método CLAE foi avaliada através da verificação do seu desempenho após pequenas variações nos seguintes fatores:

- Variação do pH da fase móvel;
- Variação da composição da fase móvel;
- Colunas de diferentes marcas;
- Fluxo da fase móvel.

As alterações realizadas e as condições normais de análise estão descritas na Tabela 5.14.

Tabela 5.14. Pequenas variações realizadas para a determinação da robustez do método.

Condições normais de análise	Modificações avaliadas
pH da fase móvel *	
4,0	3,8 e 4,2
Fluxo da fase móvel	
1,0 ml/min	0,8 e 1,2 ml/min
Coluna cromatográfica	
ACE [®] 5 C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)	Coluna Agilent Eclipse [®] XDB octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)
Proporções da fase móvel	
Trietilamina 0,3 % (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%):metanol	
62:38 (v/v)	60:40 (v/v) e 64:36 (v/v)

* O ajuste do pH foi feito com ácido fosfórico a 10%.

5.4.2.1.6. Limites de Detecção e de Quantificação

O LD e o LQ foram determinados experimentalmente a partir de diluições sucessivas de uma solução de lamotrigina SQR num intervalo de concentração de 0,02 a 0,5 µg/ml. Os resultados foram avaliados através do software ChemStation disponível no equipamento.

5.4.2.1.7. Estabilidade das soluções

Foram preparadas soluções de LTG SQR na concentração de 0,5 mg/ml em metanol e em ácido clorídrico 0,01 M, as quais foram armazenadas à 4°C. As mesmas foram diluídas a uma concentração de 40 µg/ml em fase móvel e injetadas durante as análises realizadas por 1 mês para avaliar o decaimento no teor do fármaco ou possível formação de produtos de degradação.

5.4.2.1.8. Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi verificada durante a validação do método através dos seguintes parâmetros: fator de cauda (TF), pratos teóricos (N), fator de capacidade (k') e precisão instrumental (repetibilidade das injeções).

5.4.2.1.9. Resultados

5.4.2.1.9.1. Especificidade

Na Figura 5.4 pode-se observar o cromatograma da solução de amostra simulada de excipientes comparado ao cromatograma da solução de LTG SQR 40 µg/ml.

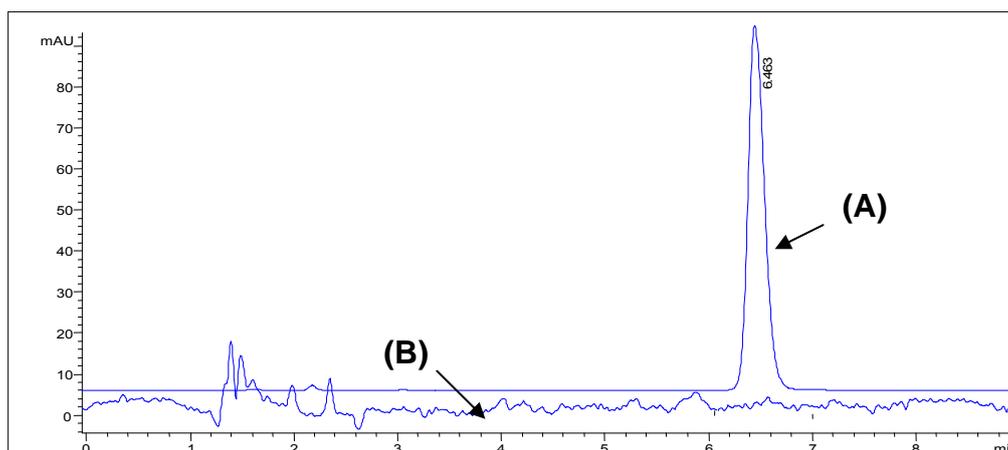


Figura 5.4. Sobreposição dos cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de lamotrigina SQR (A) e da solução da amostra simulada dos excipientes (B). Cromatogramas (A) e (B) deslocados e com escalas diferenciadas propositadamente para facilitar a visualização. Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

O decaimento no teor de LTG submetida à luz UV está demonstrado na Tabela 5.15 para a SQR e para a solução dos comprimidos do fármaco.

Tabela. 5.15. Valores experimentais encontrados para a solução referência e amostra após 2 e 24 horas em câmara de luz a 254 nm.

	Referência (%)	Amostra (%)
Tempo 0	100	100
2 horas	89,78	96,74
24 horas	84,58	91,03

A amostra submetida à luz está apresentada na Figura 5.5.

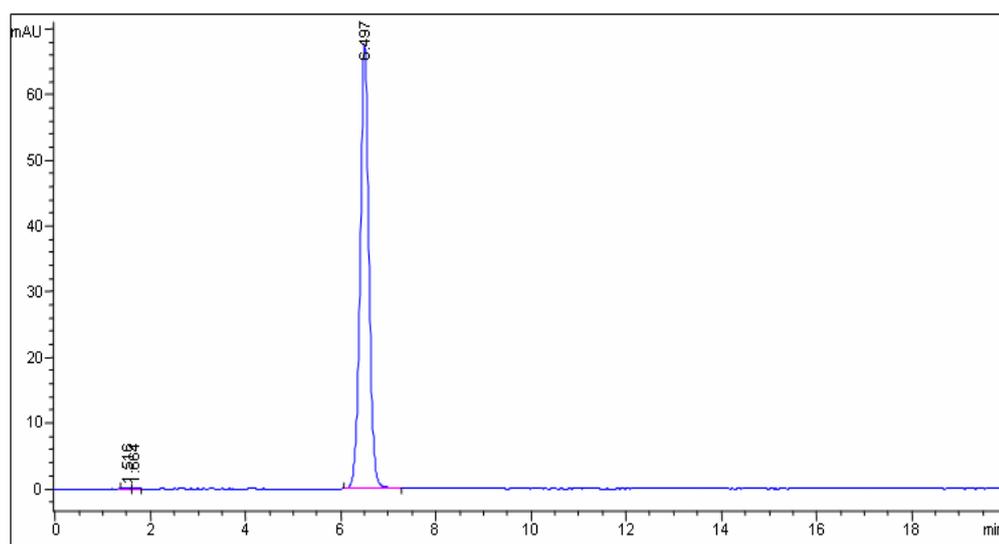


Figura 5.5. Cromatograma obtido com solução de comprimidos de lamotrigina após 24 horas em câmara de luz ultravioleta a 254 nm. Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

As amostras submetidas à hidrólise ácida estão demonstradas na Figura 5.6, onde estão sobrepostos os cromatogramas referentes aos tempos de 2 e 7 horas em contato com o ácido.

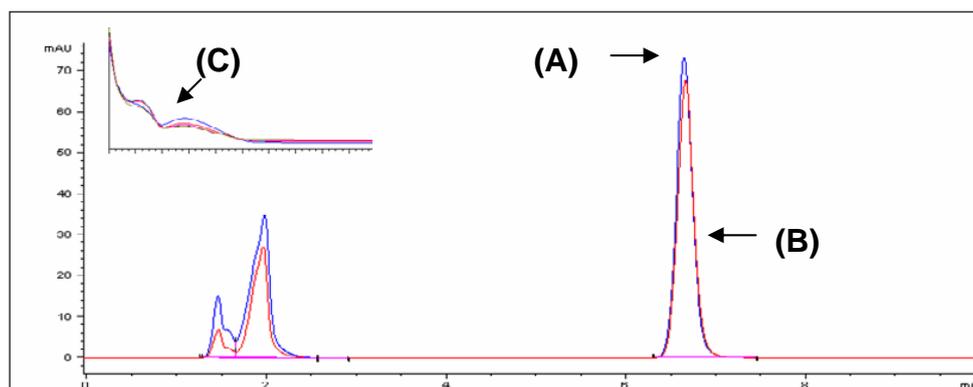


Figura 5.6. Cromatogramas sobrepostos obtidos com a solução de comprimidos de LTG após 2 horas (A) e 7 horas (B) em contato com ácido clorídrico 1 M. Espectros referentes aos picos encontrados em torno de 2 minutos (C). Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%); MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

Os cromatogramas das SQR e da amostra de LTG submetidas à hidrólise básica estão sobrepostos e apresentados na Figura 5.7.

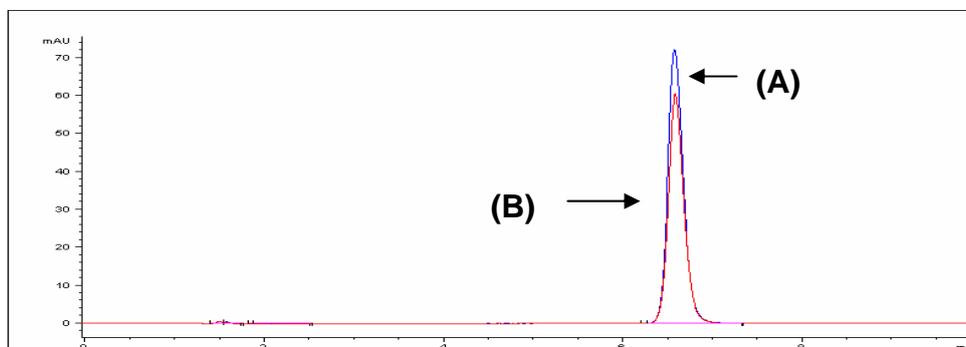


Figura 5.7. Cromatogramas sobrepostos obtidos com a solução de comprimidos de LTG após 2 horas (A) e 7 horas (B) de contato com hidróxido de sódio 1 M. Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%); MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

Na Figura 5.8 está representado o cromatograma de uma solução de LTG SQR submetida à duas horas de contato com o hidróxido de sódio 1 M. O tempo de análise foi superior ao usado para os demais ensaios, possibilitando a visualização de sinais posteriores.

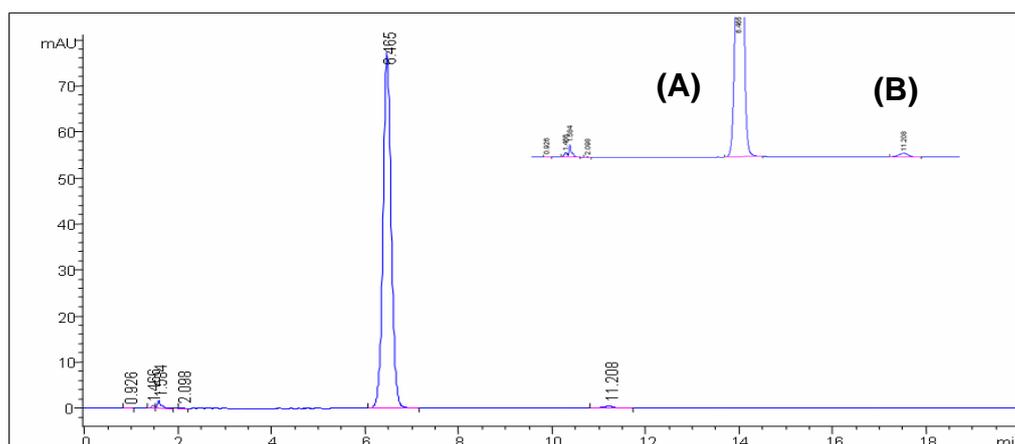


Figura 5.8. Cromatograma obtido com a solução de SQR (A) de LTG após 2 horas de contato com hidróxido de sódio 1 M. Produto desconhecido (B). Condições cromatográficas: coluna ACE® C18 (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

A associação de temperatura com ácido ou base foram analisadas. Os cromatogramas estão representados nas Figuras 5.9 e 5.10, respectivamente.

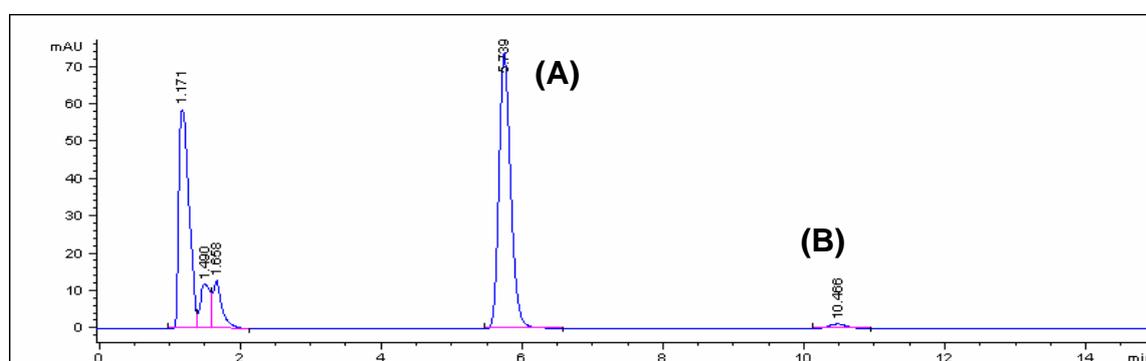


Figura 5.9. Cromatograma obtido com a solução de SQR (A) de LTG após 2 horas de contato com HCL 1 N e aquecimento a 80°C por 1 hora. Produto desconhecido (B). Condições cromatográficas: Coluna Agilent Eclipse® XDB octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

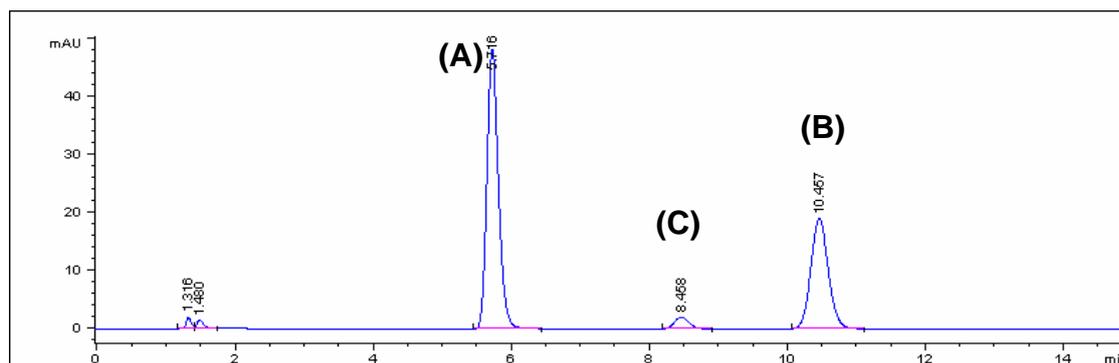


Figura 5.10. Cromatograma obtido com a solução de SQR (A) de LTG após 2 horas de contato com NaOH 1M e aquecimento a 80°C por 1 hora. Produtos desconhecidos (B) e (C). Condições cromatográficas: Coluna Agilent Eclipse® XDB octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%); MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

5.4.2.1.9.2. Linearidade

Na Tabela 5.16 estão demonstrados os valores experimentais encontrados para as áreas referentes a faixa de concentração utilizada (10-80 µg/ml) para a lamotrigina pelo método por CLAE.

Tabela 5.16. Áreas obtidas pelo método por CLAE através da curva padrão.

Concentração (µg/ml)	Área (mAU)*	Área média ± e.p.m.	DPR
10	2472160	2474922 ± 1381,01	0,09
	2476293		
	2476313		
20	4955311	4957783 ± 3733,19	0,13
	4965120		
	4952917		
30	7415609	7427652 ± 6861,96	0,16
	7427973		
	7439373		
40	9890879	9910847 ± 10841,00	0,18
	9913515		
	9928148		
50	12337901	12358936 ± 34675,01	0,48
	12312224		
	12426683		
60	14880906	14927039 ± 23088,16	0,26
	14948381		
	14951831		
80	19832603	19832228 ± 7963,04	0,07
	19845830		
	19818253		

* Cada valor é a média de três determinações.

A representação gráfica da curva padrão da lamotrigina SQR, obtida pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), encontra-se na Figura 5.11.

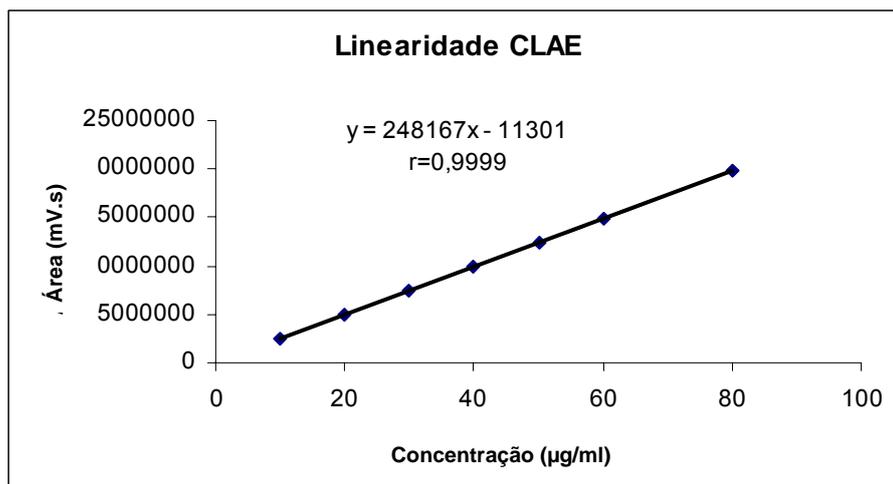


Figura 5.11. Representação gráfica da curva padrão da LTG obtida por CLAE.

A análise estatística realizada através da ANOVA para verificar a linearidade do método por CLAE está demonstrada na Tabela 5.17.

Tabela 5.17. ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão da lamotrigina por CLAE.

Fontes de variação	GI	Soma dos quadrados	Variância	F calculado
Entre doses	6	$6,44036 \times 10^{14}$	$1,07339 \times 10^{14}$	126539,8*
Regressão linear	1	$6,44024 \times 10^{14}$	$6,44024 \times 10^{14}$	759224,7*
Desvio de linearidade	5	$1,19851 \times 10^{10}$	$2,39702 \times 10^{09}$	2,83
Dentro	14	$1,18757 \times 10^{10}$	$8,48265 \times 10^{08}$	
Total	20	$6,44048 \times 10^{14}$		

* Significativo para $p < 0,05$.

5.4.2.1.9.3. Precisão

Na Tabela 5.18, estão demonstrados os resultados experimentais obtidos pelas determinações realizadas para análise da precisão do método por CLAE.

Tabela 5.18. Valores experimentais obtidos a partir da determinação da lamotrigina nos comprimidos obtidos por CLAE para avaliação da precisão.

PRECISÃO INTRADIA (n=6)				
	Teor (%)		Média	DPR
Dia 1	101,60	98,70	98,48	1,71
	97,75	96,60		
	98,32	97,92		
Dia 2	99,65	98,12	98,10	1,02
	97,05	97,50		
	98,90	97,38		
Dia 3	98,80	98,90	99,35	0,53
	99,85	99,60		
	100,00	98,98		
PRECISÃO INTERDIA (n=18)				
Média (%)			98,64	
DPR			0,65	

5.4.2.1.9.4. Exatidão

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação pela adição de SQR nas amostras de comprimidos de lamotrigina estão apresentadas na Tabela 5.19.

Tabela 5.19. Resultados experimentais obtidos pelo teste de recuperação por CLAE para determinação do LTG em comprimidos.

Concentração		Recuperação (%)	Média (%)	DPR
	Adicionada (µg/ml)			
R1	10,00	9,97	99,67	
R2	20,00	19,63	98,20	99,44
R3	40,00	40,18	100,46	1,15

* Cada valor representa a média de três determinações

5.4.2.1.9.5. Robustez

Na Tabela 5.20 estão demonstrados os valores obtidos para o teor de LTG frente às variações realizadas, bem como os valores dos tempos de retenção, fator de capacidade (K'), pratos teóricos e assimetria.

Tabela 5.20. Valores experimentais obtidos com as mudanças propositais realizadas para análise da robustez do método.

Modificações	T(%) de LTG *	Tempo de retenção (min)	Pratos teóricos (N)	Fator de capacidade (k')	Assimetria (TF)
FM pH 3,8	98,29	6,342	8207	3,23	1,26
FM pH 4,2	98,24	6,616	8530	3,42	1,13
Proporção FM ** 60:40	98,86	5,720	7082	2,82	1,09
Proporção FM ** 64:36	98,62	7,576	7694	4,07	1,15
Fluxo da fase móvel (0,8 ml/min)**	98,31	8,196	4888	3,38	0,91
Fluxo da fase móvel (1,2 ml/min)**	99,02	5,503	4736	3,42	0,94
Coluna Agilent ZORBAX®-XDB- C18 (150 x 4,6 mm; 5µm)	96,34	5,564	6489	2,72	1,26
Condições normais**	100,4	6,502	8430	3,35	1,16

* Cada valor representa média de duas determinações;

** FM: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado H₃PO₄ 10%): MeOH; (62:38).

5.4.2.1.9.6. Limites de detecção e quantificação

Na Tabela 5.21 estão descritos os valores determinados experimentalmente para os limites de detecção e de quantificação da LTG pelo método por CLAE proposto.

Tabela 5.21. Valores obtidos experimentalmente para o LD e LQ para o método por CLAE.

Limite de detecção – LD ($\mu\text{g/ml}$)	Limite de quantificação –LQ ($\mu\text{g/ml}$)
0,0500	0,1500

Nas Figuras 5.12 e 5.13 estão representados os cromatogramas referentes a determinação experimental dos LD e LQ, respectivamente. Juntamente com as figuras estão os valores de sinal:ruído obtidos através do software ChemStation.

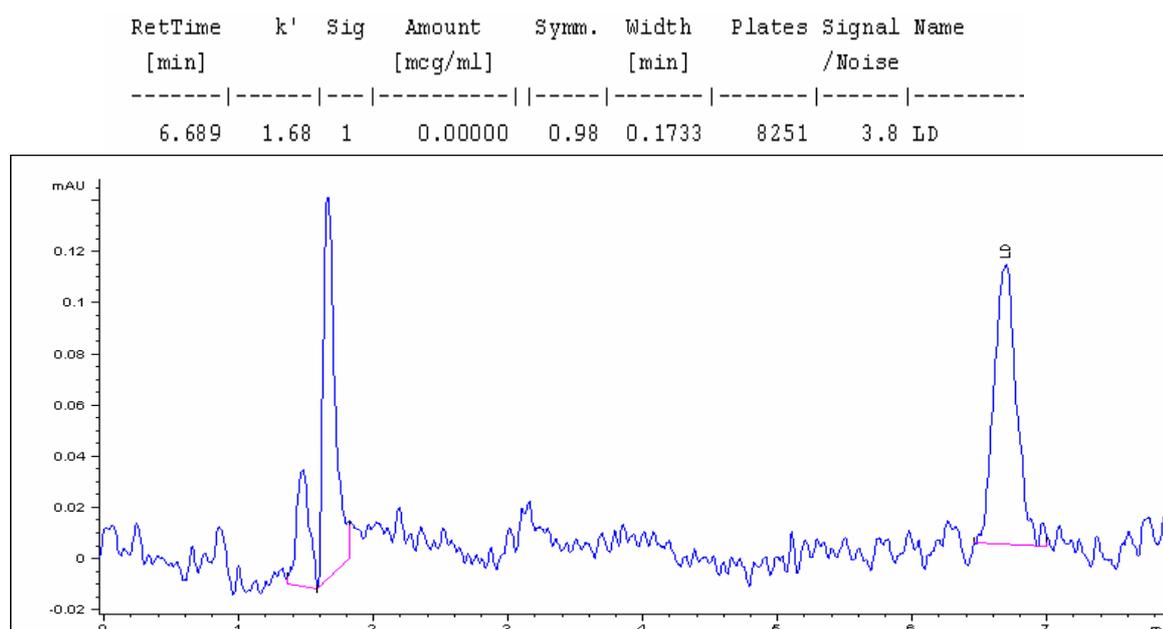


Figura 5.12. Cromatograma obtido com a solução de LTG SQR na concentração de $0,05 \mu\text{g/ml}$. Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 (150mm x 4,0 mm, 5 μm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H_3PO_4 10%): MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

RetTime [min]	k'	Sig	Amount [mcg/ml]	Symm.	Width [min]	Plates	Signal Name /Noise
6.763	1.71	1	0.00000	0.85	0.1844	7449	10.0 LQ

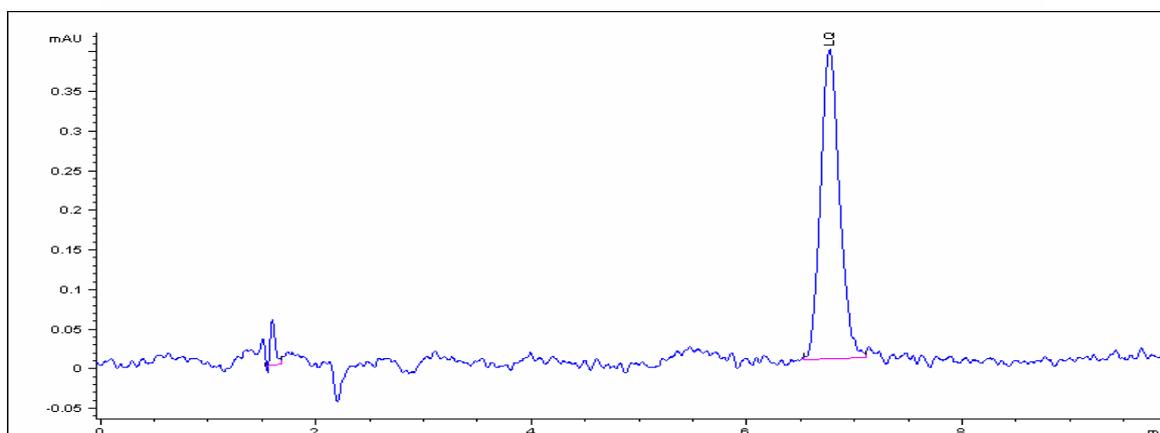


Figura 5.13. Cromatograma obtido com a solução de LTG SQR na concentração de 0,15 µg/ml. Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%); MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

Na Tabela 5.22 estão apresentados os resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos pelo método cromatográfico, bem como os valores preconizados.

Tabela 5.22. Parâmetros aproximados de adequabilidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados para CLAE (FDA, 1994; SHABIR, 2003).

Parâmetro	Recomendação	Lamotrigina
Fator de capacidade (k')	$K' > 2$	3,08
Repetibilidade das injeções	$DPR \leq 2\%$, $n \geq 5$	0,11%
Fator de cauda (TF)	$TF < 2$	1,38
Pratos teóricos (N)	$N > 2000$	7765

5.4.2.1.10. Discussão

A validação do método analítico é realizada para garantir que o mesmo seja específico, linear, preciso, exato e robusto. A avaliação de cada um desses

parâmetros assegura a credibilidade do método durante o uso rotineiro (SWARTZ e KRULL, 1998). No presente trabalho, todos esses parâmetros descritos foram experimentalmente testados no desenvolvimento do método cromatográfico.

Através da análise dos cromatogramas das soluções da SQR, dos comprimidos de lamotrigina e da solução de amostra simulada de excipientes observou-se que o método proposto apresenta especificidade, já que não sofre interferência dos excipientes junto ao sinal da LTG. Além disso, a pureza do pico da lamotrigina observada encontra-se em torno de 99,99%.

Quando amostras submetidas à degradação forçada forem utilizadas para demonstrar separação adequada, deve-se cuidar para não degradar além do necessário para evitar o surgimento de produtos de degradação secundários que não têm relevância prática. A degradação deve ser em torno de 10% (ERMER, 2001). Os períodos de teste devem ser interrompidos quando forem atingidos teores de degradação em torno de 5-15 % (KLICK et al., 2005).

Para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, os testes de estresse podem ser úteis para obtenção de informações sobre os mecanismos de degradação e potenciais produtos de degradação. Algumas guias enfatizam que as condições experimentais para testes de estresse dependem da natureza da substância e do produto acabado. Durante estes testes são observados produtos de degradação que não são formados durante estudos de estabilidade acelerados ou de longa duração. Desta forma, testes de estresse devem gerar amostras representativas capazes de demonstrar a estabilidade da substância e do produto acabado indicando a capacidade do método aplicado de ser indicativo de estabilidade (KLICK *et al.*, 2005).

Os ensaios realizados com a luz devem ser parte integrante dos testes de estresse (ICH, 2005). As amostras fotodegradadas apresentaram uma diminuição no teor, como demonstrado na Tabela 5.15. A redução do teor da LTG na solução de SQR foi de 10,22% e 15,42% para 2 e 24 horas sob a luz, respectivamente. No caso das soluções amostra a redução foi de 3,23% e 8,96% para 2 e 24 horas, respectivamente. Houve uma redução maior na solução da SQR do que na solução dos comprimidos de LTG comparadas aos respectivos tempos testados. Os

excipientes presentes na formulação podem influenciar na fotodegradação do componente ativo. A análise da solução placebo sob efeito da luz não demonstrou picos de degradação. O teor de pureza de 99,98% demonstra que o pico referente à lamotrigina não sofre interferência de outras substâncias nas condições de análise.

A hidrólise ácida provocou uma redução no teor de 8,80% para 2 horas de contato com a solução amostra de LTG e 14,91% para 7 horas de contato. O pico que se encontra em torno de 1,2 minutos aparece tanto no cromatograma das soluções amostra, como nos cromatogramas do branco do ácido, do placebo e da solução da SQR de LTG, sugerindo que este seja referente a um sinal do próprio ácido. Em torno de 1,4 minutos aparece um pico de maior intensidade que encontra-se apenas na solução amostra de LTG e na solução do placebo submetida ao ácido, podendo ser devido aos excipientes ou algum provável produto de degradação. Os picos eluíram afastados do sinal da lamotrigina, conferindo pureza do pico de 99,99%, para ambos os tempos de contato da solução amostra de LTG com o ácido.

A hidrólise básica provocou uma redução maior do que em condições ácidas nos valores das áreas, sendo 12,58% e 23,66% para 2 e 7 horas de contato com hidróxido de sódio 1 *M*, respectivamente. Nenhum pico adicional foi observado no cromatograma. O fator de pureza de 99,99% foi alcançado para 2 horas de contato com a base e 99,98% para 7 horas de contato com o mesmo solvente. Na Figura 5.8 está apresentado o cromatograma de uma solução de LTG SQR em hidróxido de sódio 1 *M* em que se observa um pequeno pico de uma substância desconhecida mais apolar que a LTG em torno de 11 minutos.

Testes realizados com a associação de temperatura com a hidrólise ácida e básica foram demonstrados nas Figuras 5.9 e 5.10, respectivamente. Os resultados demonstraram uma separação adequada dos picos com pureza de 99,99% para ambos. Ocorreu a formação de um produto de degradação majoritário que se encontra em torno de 10 minutos (B), o mesmo encontrado para a amostra degradada em ácido e submetida ao calor, porém, nesse caso, a quantidade formada é inferior, sugerindo que o pH alcalino acelera essa reação de degradação. O pico formado em torno de 10 minutos pode corresponder ao pico formado em torno de 11 minutos para a degradação em condições básicas realizadas com a SQR (Figura 5.8), corroborando que este seja um pico de degradação da lamotrigina

e que a reação é catalisada pelo calor. Houve também o aparecimento de um pico em torno de 8 minutos (D8). Ambos produtos formados apresentaram características mais apolares que a LTG, já que ficaram mais tempo retidos na coluna de fase reversa. O produto D10 apresentou-se puro com pureza de pico de 99,99% e o produto D8 com pureza de 99,97%, sendo, desta forma, produtos interessantes de serem isolados para posterior identificação.

As reações de oxidação são relativamente raras em produtos farmacêuticos como reação principal (CARSTENSEN e RHODES, 2000). No caso da exposição da LTG aos efeitos oxidativos houve redução de 5,38% no teor do fármaco para o tempo de 6 horas de contato com o agente oxidativo, sem o aparecimento de picos adicionais. O fator de pureza do pico de LTG foi de 99,99%. A redução no teor foi similar para a amostra e para a referência nas mesmas condições.

As soluções expostas ao calor seco 60°C para avaliar a degradação térmica no período de 6 dias apresentaram redução de 2,32% no teor do fármaco, demonstrando que a temperatura não é um fator preponderante para a degradação do mesmo. O fator de pureza do pico da lamotrigina encontrado foi de 99,99%.

Testes preliminares em condições mais brandas como ácido clorídrico 0,01 M, hidróxido de sódio 0,01 M e peróxido de hidrogênio 3% foram realizados, porém não foi observada degradação significativa.

A lamotrigina apresentou redução no seu teor quando submetida aos efeitos da luz, oxidação e temperatura sem o aparecimento, contudo, de picos adicionais. Nos casos em que ocorre diminuição na área, mas não há aparecimento de picos de degradação, pode ser devido à situação em que produtos não cromóforos são formados ou produtos com baixos pesos moleculares (BASHIKI, 2002).

A faixa de linearidade do método foi avaliada através da elaboração de três curvas padrão contemplando concentrações de 10 a 80 µg/ml. A equação da reta resultante foi $y=248167,3x-11301,4$ e o coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,9999, determinado pelo estudo de regressão linear. O valor de (r), que deve ser o mais próximo possível da unidade, apresentou-se satisfatório. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que existe regressão linear sem haver desvio da linearidade (Tabela 5.17).

A precisão do método por CLAE proposto foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária realizada em três dias consecutivos. Os valores percentuais médios obtidos na determinação do teor para cada dia são 98,48, 98,10 e 99,35% com desvios padrão relativos (DPR) de 1,71; 1,02 e 0,53%, respectivamente, demonstrando a repetibilidade das determinações realizadas intradia. O teor médio interdia observado a partir da análise das amostras foi de 98,64%, com desvio padrão relativo igual a 0,65%. Os valores de desvio padrão relativos abaixo de 2% indicam a elevada precisão do método.

Através dos teores de lamotrigina obtidos pelos doseamentos realizados para verificação da precisão obteve-se uma concentração média de 98,64 mg/comprimido e um teor de 98,64%.

A exatidão do método foi avaliada a partir do teste de recuperação da lamotrigina SQR, cujos resultados podem ser observados na Tabela 5.19. O teste aplicado demonstrou a exatidão do método proposto, sendo que a recuperação observada foi de 99,67%, 98,20 e 100,45%, para 25, 50 e 100% de SQR adicionada à amostra, respectivamente.

As pequenas alterações realizadas no método cromatográfico, a fim de avaliar sua suscetibilidade, foram demonstradas na Tabela 5.20. Tais resultados se assemelham àqueles obtidos na avaliação da precisão do método. O número de pratos teóricos apresentou-se inferior aos demais, principalmente quando utilizou-se fluxo de 0,8 e 1,2 ml/minuto. Dessa forma, é importante manter o fluxo de 1 ml/minuto, conforme utilizado nas condições otimizadas. Embora os tempos de retenção tenham sofrido algumas modificações em relação às condições otimizadas, o perfil cromatográfico não sofreu alterações e os teores calculados para o fármaco mantiveram-se similares, exceto quando se altera a marca da coluna, quando foi observado um pequeno decréscimo no teor do fármaco.

O limite de detecção pode ser determinado através da comparação de baixas concentrações do analito com a medida da razão sinal:ruído com o equipamento de CLAE (ICH, 2005).

A sensibilidade do método por CLAE foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) da LTG pelo método

cromatográfico empregado. Os resultados indicam que o método apresenta boa sensibilidade com valores reduzidos de limites de detecção e de quantificação aproximadamente 0,05 µg/ml e 0,15 µg/ml, respectivamente.

A estabilidade das soluções de LTG SQR, preparadas em metanol e em HCl 0,01 M foram analisadas dia-a-dia juntamente com a realização dos parâmetros de validação. Pôde-se observar que a solução preparada em metanol permanece estável por até 20 dias e, em HCL 0,01 M por até 15 dias.

5.5. Análise estatística comparativa dos métodos

Com o objetivo de avaliar a diferença entre os métodos desenvolvidos para quantificação da lamotrigina em comprimidos, realizou-se análise estatística dos valores obtidos para os dois métodos propostos neste trabalho.

5.5.1 Resultados

Na Tabela 5.23 estão apresentados os valores médios obtidos na determinação do teor de lamotrigina através dos métodos propostos e a comparação entre os mesmos efetuada através do Teste-t (Student), presumindo duas amostras com variâncias equivalentes.

Tabela 5.23 .Teste – t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.

	UV	CLAE
Média	98,4167	98,6456
Variância	0,8118	0,8059
Observações	18	18
Variância agrupada	0,8088	
Hipótese de diferença média	0	
GI	34	
Stat t	0,7338	
t crítico bi-caudal	2,0322	

5.5.2 Discussão

O t calculado é inferior ao t crítico ($t_{\text{calculado}} = 0,7338 < t_{\text{crítico}} = 2,0322$) encontrado, portanto, de acordo com o Teste-t aplicado, presumindo variâncias equivalentes, não há diferença significativa entre os métodos por espectrofotometria de absorção no UV e cromatografia líquida de alta eficiência. Desta forma, pode-se sugerir a utilização de ambos os métodos, sendo os mesmos intercambiáveis.

6. ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE

6.1. Introdução

O objetivo dos testes de estabilidade é evidenciar quanto a qualidade de uma substância ativa ou produto farmacêutico varia com o tempo sob a influência de uma variedade de fatores como temperatura, umidade e luz. A estabilidade de substâncias farmacêuticas e os produtos que as contêm depende das propriedades físicas e químicas dos fármacos, excipientes e embalagens utilizadas (MATTHEWS, 1999).

As reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Dependem de várias condições, tais como, a concentração dos reagentes, o pH, a radiação ou a presença de catalisadores (LACHMAN *et al.*, 2001).

6.2. Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade térmica preliminar da lamotrigina
- Avaliar a fotoestabilidade preliminar da lamotrigina
- Avaliar a estabilidade preliminar da lamotrigina frente ao pH ácido

6.3. Estabilidade térmica

6.3.1. Materiais

Nos itens 4.3.1 e 4.3.2 estão descritos os materiais utilizados para o desenvolvimento do estudo preliminar de estabilidade térmica.

Para realizar a degradação térmica fez-se uso de estufa Bacteriológica DeLeo regulada a uma temperatura de $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os demais equipamentos e reagentes utilizados estão descritos no item 4.8.1.

6.3.2. Método

Os comprimidos foram triturados a pó fino, após determinação do peso médio, e quantidades equivalentes a 10 mg de lamotrigina foram pesadas e acondicionadas em diferentes frascos de vidro.

As amostras foram colocadas, separadamente, em estufa à temperatura de $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por intervalos de tempo de 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10 dias. Após os respectivos tempos, as mesmas foram retiradas da estufa e transferidas, separadamente, para balão volumétrico de 20 ml e o volume foi completado com metanol. Esta solução foi submetida à banho de ultra-som por 15 minutos ($C = 0,5 \text{ mg/ml}$). A solução obtida foi filtrada e uma alíquota de 4,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, sendo utilizada a fase móvel como diluente. A concentração teórica final obtida foi $40 \mu\text{g/ml}$ de lamotrigina.

Uma das amostras não foi depositada na estufa sob a temperatura empregada, sendo considerada como o tempo zero de exposição térmica, e submetida ao mesmo tratamento das demais tomadas de amostra. A lamotrigina SQR foi preparada na concentração de $40 \mu\text{g/ml}$, conforme descrito no item 4.8.2.

A análise quantitativa da lamotrigina presente nas amostras em estudo foi realizada por CLAE, utilizando o sistema cromatográfico descrito na Tabela 4.3, com o objetivo de verificar a possível redução do teor e a formação de produtos de degradação.

6.4. Fotoestabilidade

6.4.1. Materiais

Nos itens 4.3.1 e 4.3.2 estão descritos os materiais utilizados para o estudo preliminar de fotoestabilidade.

Para realizar a fotodegradação foram preparadas soluções em ácido clorídrico 0,01 *M* a partir de comprimidos de LTG com concentração final de 1 mg/ml. Foi transferido 1,0 ml dessa solução para diferentes cubetas descartáveis (Plastibrand®). As mesmas foram submetidas à fotodegradação sob incidência de luz direta a uma distância de 10 cm da lâmpada Ecovolume® 30 Watts, emissora de luz ultravioleta de 254 nm, em câmara de vidro espelhada internamente (100×16×16 cm) a fim de verificar a estabilidade da lamotrigina frente à radiação UV. Um controle, contendo a solução de LTG na mesma concentração foi preparado cobrindo-se a cubeta com papel laminado.

Os demais equipamentos e reagentes utilizados estão descritos no item 4.8.1.

6.4.2. Método

As amostras foram colocadas, separadamente, em câmara de luz por intervalos de tempo de 1, 2, 3, 6, 8, 11 e 15 dias. Após os respectivos tempos as mesmas foram retiradas da câmara de luz, o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 25 ml e diluído na fase móvel, obtendo-se concentração final teórica de 40 µg/ml de lamotrigina. Paralelamente, foram expostas à luz UV 254 nm amostras por um período de 30 dias para posterior comparação.

Uma das amostras não foi exposta à radiação, sendo considerada como o tempo zero, e submetida ao mesmo tratamento das demais tomadas de amostra.

A análise quantitativa da lamotrigina presente nas amostras em estudo foi realizada por CLAE, utilizando o sistema cromatográfico descrito na Tabela 4.3, com o objetivo de verificar a possível redução do teor e a formação de potenciais produtos de degradação.

6.5. Hidrólise ácida

6.5.1. Materiais

Nos itens 4.3.1 e 4.3.2 estão descritos os materiais utilizados para o desenvolvimento do estudo preliminar de estabilidade frente às condições ácidas.

Para realizar a hidrólise ácida utilizou-se ácido clorídrico 1 *M*, preparado a partir de ácido clorídrico concentrado (Quimex). Os demais equipamentos e reagentes utilizados estão descritos no item 4.8.1.

6.5.2 Método

Os comprimidos foram triturados a pó fino, após determinação do peso médio, e quantidades equivalentes a 100 mg de lamotrigina foram pesadas e transferidas para balão volumétrico de 50 ml com metanol até completar o volume. A mesma foi submetida à banho de ultra-som por uma hora e, após transcorrido o tempo, filtrada em papel filtro qualitativo. Foi obtida solução com concentração final de 2 mg/ml.

A partir da solução estoque acima descrita, foram transferidas alíquotas de 10,0 ml para balões volumétricos de 10 ml, completando-se o volume com ácido clorídrico 1 *M*, obtendo-se soluções com concentração de 1 mg/ml.

As amostras foram colocadas, separadamente, em armário fechado, à temperatura ambiente e envolvidas com papel laminado. A cada intervalo de tempo de 3, 20, 30, 42, 48 e 54 horas alíquotas de 1,0 ml foram transferidas para balão volumétrico de 25 ml, adicionando-se 1,0 ml de hidróxido de sódio 1 *M* para interromper a reação. O volume foi completado com a fase móvel, obtendo-se concentração final teórica de 40 µg/ml de lamotrigina.

Uma das amostras não foi submetida à hidrólise ácida, sendo considerada como o tempo zero e submetida ao mesmo tratamento das demais tomadas de amostra. A lamotrigina SQR foi preparada em concentração de 40 µg/ml conforme descrito no item 4.8.2.

A análise quantitativa da lamotrigina foi realizada por CLAE, utilizando o sistema cromatográfico descrito na Tabela 4.3.

6.6. Resultados

Os resultados obtidos através do efeito do calor seco sobre os comprimidos triturados estão demonstrados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Teores de LTG obtidos experimentalmente nos comprimidos após submeter as amostras à temperatura de 80°C por período de 10 dias.

Tempo (dias)	Área*	Área média	Teor (%)	DPR
0	93397626	91463652	100	2,11
	91451031			
	89542298			
1	90547467	90898032	99,38	1,10
	92023730			
	90122898			
2	92030468	92965366	101,64	1,03
	92924350			
	93941281			
3	89750373	90499368	98,94	1,17
	91248364			
	-			
4	91361486	91351319	99,88	0,02
	91341153			
	-			
5	-	87320063	95,47	0,63
	87709341			
	86930785			
7	89495666	88978331	97,28	0,60
	88431445			
	89007882			
10	83134591	85149118	93,10	3,34
	87163644			
	-			

*Cada valor é a média de três determinações.

Na Tabela 6.2 estão demonstrados os valores experimentais obtidos através da exposição da LTG sob condições fotolíticas.

Tabela 6.2. Teores de LTG obtidos experimentalmente nas soluções após submeter as amostras à incidência direta de luz UV 254 nm período de 15 dias.

Tempo (dias)	Área*	Área média	Teor (%)	DPR
0	92458863	92350973	96,86	0,29
	92554382			
	92039675			
1	90087917	89953879	94,28	0,22
	89727600			
	90046120			
2	89183610	89554467	93,86	0,47
	90008698			
	89471094			
6	86008960	86134628	90,28	0,62
	85670841			
	86724083			
7	83567788	84000469	88,04	0,85
	83612966			
	84820654			
8	81696314	82379008	86,34	1,66
	81486941			
	83953768			
11	-	79213135	83,02	1,32
	80116980			
	78309290			
15	66420716	69014689	72,33	3,33
	69814709			
	70808642			

*Cada valor é a média de três determinações

Na figura 6.1. encontram-se os cromatogramas referentes às amostras fotodegradadas nos tempos 0, 6 e 11 dias.

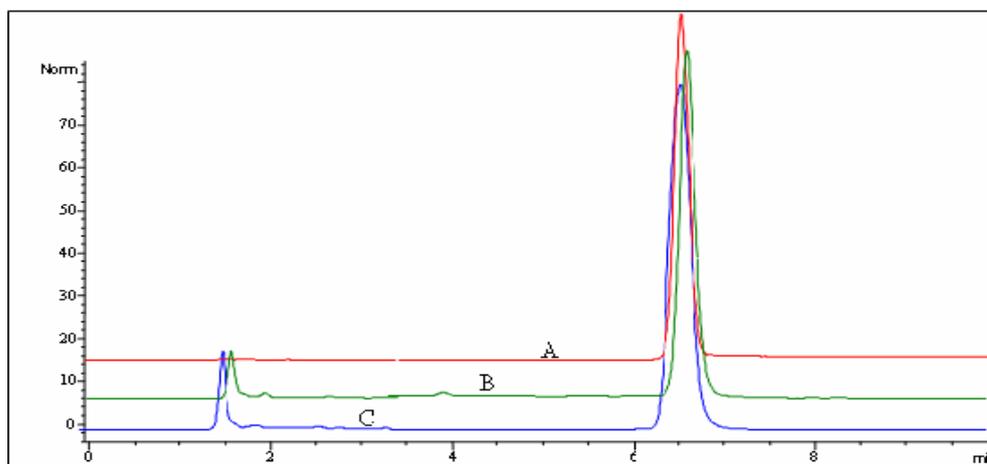


Figura 6.1. Cromatogramas obtidos com as soluções de LTG comprimidos nos tempos zero (A), após 6 dias (B) e após 11 dias (C) câmara de luz 254 nm. Os cromatogramas foram deslocados para melhor visualização. Condições cromatográficas: Coluna ACE[®] octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

Na Figura 6.2 está representado o perfil de degradação das amostras de LTG nas soluções submetidas à fotólise.

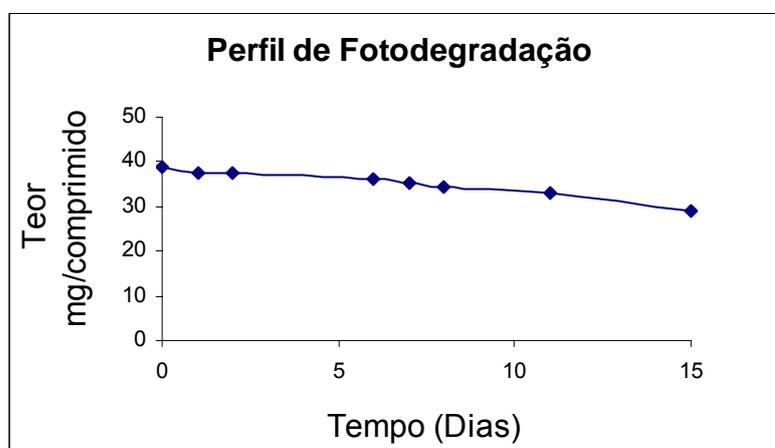


Figura 6.2. Perfil de fotodegradação obtido a partir dos resultados experimentais durante os intervalos de 0, 1, 2, 6, 7, 8, 11 e 15 dias de exposição à luz UV.

Na Figura 6.3 encontra-se o cromatograma de uma amostra de LTG submetida à luz 254 nm por 30 dias.

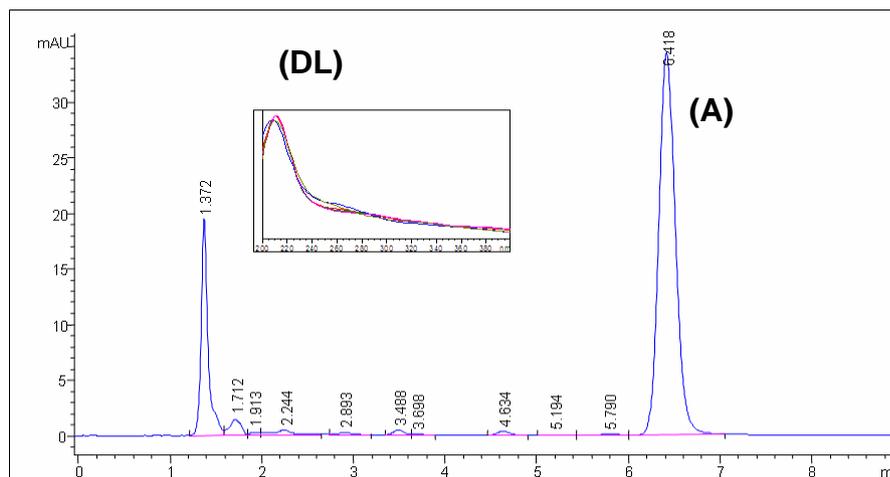


Figura 6.3. Cromatograma obtido com as soluções de LTG comprimidos submetidas a fotodecomposição por luz 254 nm durante 30 dias (A). Espectro no UV referente ao produto de degradação majoritário (DL). Condições cromatográficas: Coluna ACE[®] octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm; 5 μ m); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%); MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

Na Tabela 6.3 estão demonstrados os resultados obtidos a partir das amostras submetidas aos efeitos do ácido clorídrico 1 M durante um tempo total de 54 horas.

Tabela 6.3. Valores obtidos experimentalmente a partir das amostras de LTG submetidas à hidrólise ácida.

Tempo (horas)	Área*	Área média	Teor (%)	DPR
0	91432269	91951361	96,64	0,80
	92470453			
	-			
3	88379639	88642493	93,17	0,80
	88098248			
	89449591			
20	82795197	82426593	86,63	0,42
	82374646			
	82109937			
30	69194702	69139715	72,66	1,29
	68223016			
	70001428			
42	68344409	65129836	68,45	4,37
	64105255			
	62939844			
48	65091809	65911676	69,27	4,07
	68911713			
	63731506			
54	63227277	63349127	66,58	0,27
	-			
	63470978			

* Cada valor é a média de três determinações

Na Figura 6.4 encontra-se o perfil de degradação sob condições ácidas das amostras de LTG.

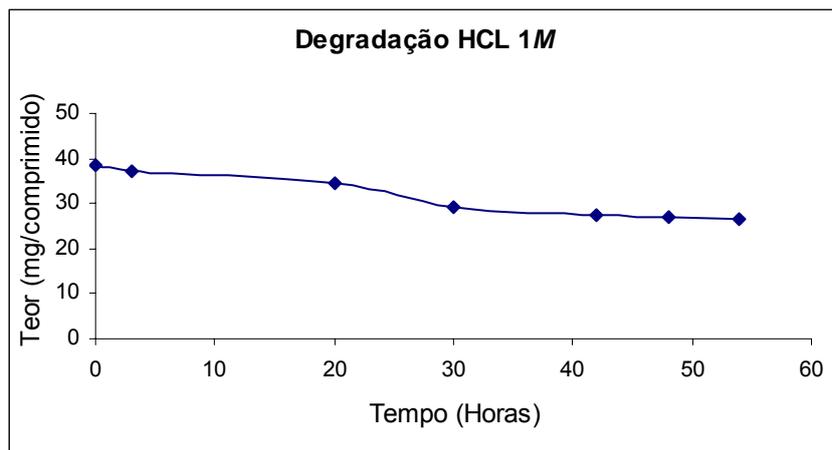


Figura 6.4. Perfil de degradação das amostras de lamotrigina submetidas aos efeitos do ácido clorídrico 1 M.

Na Figura 6.5. está representado o cromatograma das amostras de LTG submetidas à hidrólise ácida no tempo 0 e tempo 6 (54 horas).

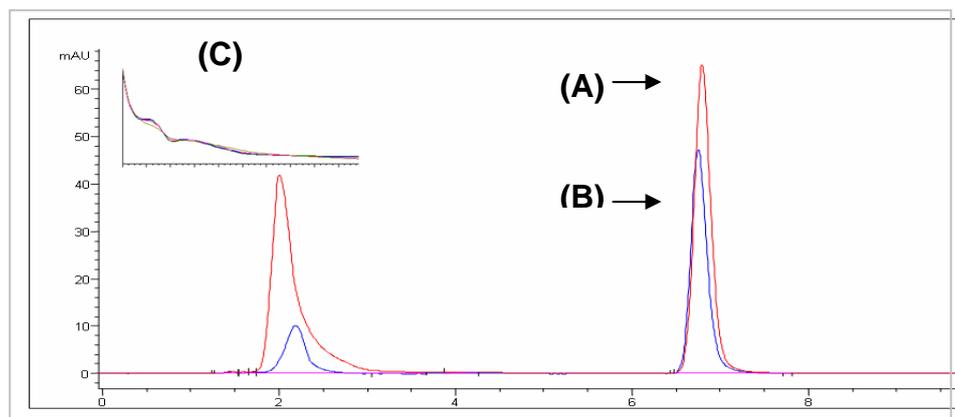


Figura 6.5. Cromatogramas obtidos com as soluções de LTG comprimidos nos tempos zero (A) e após 54 horas (B) sob condições ácidas. Espectro referente ao produto de degradação encontrado em torno de 2 minutos (C). Condições cromatográficas: Coluna ACE[®] octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

6.7. Discussão

As condições drásticas para realização dos estudos preliminares de estabilidade térmica sugerem temperaturas elevadas acima de 70°C, que podem ser

aplicadas por duas semanas para estudos utilizando amostras em estado sólido e de um dia para amostras em solução (KLICK *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos na determinação do teor de LTG nas amostras submetidas à temperatura de 80°C, apresentados na Tabela 6.1, sugerem que a amostra em estudo sofre pequena degradação, em torno de 7%, nas condições de análise aplicadas, não havendo picos de degradação.

Foi submetido ao calor seco de 80°C, durante 30 dias, um comprimido inteiro de LTG, o qual foi analisado após esse período por CLAE. Os resultados demonstraram que não houve decaimento no teor do fármaco.

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que a temperatura não seja um fator preponderante na estabilidade da lamotrigina, mesmo utilizando calor elevado de 80°C.

O conhecimento da interação fármaco-luz é um pré-requisito necessário para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos estáveis, com qualidade adequada e que realmente contenham o teor especificado (TØNNESEN, 2001).

Um grande número de reações podem ser iniciadas através dos efeitos da luz como: redução, *N*-desalquilação, hidrólise, oxidação, isomerização, alterações no anel, polimerização ou remoção de vários substituintes como halogênios e grupos carboxílicos (TØNNESEN, 2001).

Tendo em vista que as reações fotoquímicas podem ser acompanhadas por reações térmicas, foi avaliada uma solução controle que, no tempo total de análise (15 dias) não foi alterada, podendo-se concluir que a degradação alcançada foi somente devido à luz.

Na comparação das concentrações obtidas entre as amostras referentes ao T₀ (amostra não submetida à radiação UV) e a que foi submetida a 15 dias sob luz UV, observou-se um decréscimo de cerca de 25% no teor de lamotrigina, o que também pode ser observado na Figura 6.1, onde observa-se os cromatogramas da LTG nos tempos 0, 6 e 11 dias. Foi revelado, através da sobreposição dos cromatogramas, o aparecimento de um pico de degradação no início da corrida, o qual aumenta no decorrer do tempo de exposição à luz. Este produto desconhecido

(DL) apresenta polaridade maior do que a LTG, sendo seu tempo de retenção em torno de 1,5 minutos como pode ser demonstrado na Figura 6.3.

A fotodegradação da lamotrigina foi determinada durante 15 dias, já que nos testes realizados durante um tempo superior (30 dias) foram obtidos valores de decaimento superiores com o aparecimento de diversos picos referentes à produtos de degradação como demonstrado na Figura 6.3, porém os resultados demonstraram-se imprecisos. Este fato pode ser atribuído a evaporação do solvente que foi total em algumas amostras. Além disso, a SQR em solução, não submetida à luz UV, começou a apresentar sinais de decaimento, sugerindo que a degradação também esteja relacionada ao meio em que o fármaco se encontra. É importante salientar que em 30 dias foi alcançada uma degradação em torno de 56%. Observa-se, além disso, que o produto de degradação (DL) encontra-se em maior quantidade ao comparar-se com as amostras submetidas a tempos inferiores (Figura 6.1).

A estrutura química da lamotrigina apresenta grupamentos como nitrogênio e ligações duplas conjugadas, o que torna a molécula mais suscetível à fotólise (NUDELMAN, 1975).

Para determinar a cinética de reação, os ensaios devem ser conduzidos até um estágio avançado de degradação, cerca de 50%, pois do contrário, os valores obtidos podem ser pouco precisos e geralmente superiores aos valores reais. Contudo, é praticamente impossível determinar a ordem da reação quando a degradação atinge estágios avançados, 90 a 80% (NUDELMAN, 1975).

O resultado mais comumente encontrado em fármacos fotodegradados é a diminuição da potência do produto. Alguns fármacos vão decompor somente uma pequena percentagem no teor após várias semanas, enquanto outros degradam em poucos minutos, mas, em ambos os casos, tratam-se de fármacos fotossensíveis (TØNNESEN, 2001). A lamotrigina sob luz ultravioleta apresenta uma degradação lenta, porém torna-se claro que ela é sensível à luz.

Foram submetidos à luz ultravioleta 254 nm e à luz solar por 30 dias, um comprimido inteiro e um comprimido triturado, os quais foram avaliados após esse período por CLAE. Foi observado que o comprimido inteiro não sofreu degradação alguma. Na maioria dos casos, o interior da preparação não vai ser afetado

independente do tempo de exposição. A degradação na superfície não vai depender apenas dos excipientes que, muitas vezes inibem a fotodegradação, mas também do grau de penetração da luz devido ao tamanho de partícula, modificação cristalina, cor (TØNNESEN, 2001). Com relação ao comprimido triturado houve um decaimento em torno de 5% em seu teor, sem aparecimento de picos de degradação no cromatograma.

Os testes para avaliar a fotoestabilidade da LTG foram conduzidos em HCl 0,01 M, devido ao fato de que é necessário um tempo prolongado sob a luz UV para avaliar a degradação do fármaco e o metanol evapora muito rápido, gerando resultados imprecisos.

Na Tabela 6.3 estão demonstrados os valores experimentais obtidos com as amostras submetidas aos efeitos do ácido clorídrico 1 M por até 54 horas. As mesmas apresentaram um decaimento em torno de 31 % no teor da LTG. Houve, durante a realização do ensaio, o aparecimento de um precipitado que pode ser atribuído a um produto de degradação insolúvel em pH ácido ou a precipitação de algum dos excipientes presentes na formulação.

A amostra de LTG apresentou-se susceptível ao pH ácido, apresentando decréscimo no teor do fármaco e aparecimento de um pico alargado no início do cromatograma que pode ser atribuído ao próprio ácido que apresenta um sinal em torno dessa região, mas também pode estar associado a produtos de degradação.

Conforme avaliado anteriormente, a degradação em pH alcalino ocorre de forma mais intensa. Desta forma, foi conduzido um estudo de degradação simultaneamente à hidrólise ácida durante o mesmo tempo (54 horas), porém, houve aparecimento de um precipitado intenso. Haja visto que a LTG diminui sua solubilidade à medida que o pH aumenta, considerou-se a possibilidade desta estar precipitando. Além disso, os resultados obtidos foram bastante imprecisos, impossibilitando uma análise adequada dos dados obtidos, requerendo estudos adicionais.

**7. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO
PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DOS COMPRIMIDOS DE
LAMOTRIGINA**

7.1. Introdução

A resposta biológica a um fármaco relaciona-se com a concentração que o mesmo atinge em seu local de ação. Essa concentração depende da dose administrada, da quantidade absorvida e da distribuição no local, velocidade e quantidade eliminada pelo corpo. As características físicas e químicas da substância farmacêutica, particularmente a lipossolubilidade, grau de ionização e tamanho molecular determinam a atividade biológica (ANSEL, 2000).

A absorção de fármacos após administração oral, a partir de formas farmacêuticas sólidas, depende da liberação do mesmo da sua forma farmacêutica, da dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e da permeabilidade através das membranas. Qualquer fator que afete a desagregação ou a dissolução pode afetar a biodisponibilidade do fármaco (SHARGEL *et al.*, 2005).

O sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) é uma maneira científica de classificar os compostos baseados na solubilidade e permeabilidade do fármaco combinado às propriedades de dissolução do produto farmacêutico (AMIDON *et al.*, 1995). O SCB do fármaco pode ser utilizado no desenvolvimento do teste de dissolução e verificação da possibilidade de realização de correlação *in vivo-in vitro* (CIVIV) (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 2000; ROHRS, 2001). O sistema de classificação biofarmacêutica é apresentado na Tabela 7.1.

Tabela 7.1. Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Classe	Permeabilidade	Solubilidade
I	Alta	Alta
II	Alta	Baixa
III	Baixa	Alta
IV	Baixa	Baixa

* Amindon *et al.*, 1995.

A dissolução pode ser definida como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo. O ensaio de dissolução é um teste físico de natureza destrutiva, no qual o fármaco passa para uma forma solúvel a partir de uma forma farmacêutica intacta (CHOWDARY, 1987).

Os testes de dissolução são uma importante ferramenta de controle de qualidade em diferentes estágios de um medicamento (MARCOLONGO, 2003). Fornecem informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento como na produção e controle de qualidade de formas farmacêuticas (MARQUES e BROWN, 2002). Avaliações *in vitro* para formas farmacêuticas sólidas para administração oral são úteis para controlar a formulação e variáveis no processo de produção.

Além da possibilidade da CIVIV, o teste de dissolução é requisito fundamental na indústria farmacêutica para assegurar a qualidade lote a lote do produto farmacêutico, desenvolvimento de novas formulações e garantir a qualidade após mudanças na formulação e no processo de produção, avaliar a qualidade da formulação em função do tempo e condições de armazenagem durante o período de validade do produto (FDA, 1997; MARQUES e BROWN, 2002).

O teste de dissolução determina a percentagem (%) da quantidade de princípio ativo, declarado no rótulo do produto, liberado no meio de dissolução, dentro do período de tempo especificado, quando o mesmo é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas (FARMACOPÉIA

Brasileira, 1988). Atualmente, os testes de dissolução fazem parte das monografias de quase todas as formas farmacêuticas sólidas (MARCOLONGO, 2003).

A validação de métodos analíticos para dissolução de formas farmacêuticas sólidas deve incluir a avaliação da especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e estabilidade do fármaco no meio de dissolução. Para a seleção das melhores condições, também devem ser realizados testes de solubilidade e interferência de filtros (USP 30, 2007).

7.2. Desenvolvimento e validação de método analítico para a dissolução de comprimidos de lamotrigina

7.2.1. Materiais

Para o desenvolvimento e validação do método de dissolução foi utilizado equipamento de dissolução SOTAX, modelo AT7; espectrofotômetro ultravioleta Shimadzu, modelo UV-160A e cromatógrafo a líquido Agilent, modelo 1200 *series* utilizando coluna cromatográfica ACE[®] octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro interno). As condições cromatográficas foram descritas anteriormente na Tabela 4.3.

Foram utilizadas como amostra comprimidos de lamotrigina, referência e similar, com teor rotulado de 100 mg com os nomes comerciais e excipientes descritos na Tabela 7.2.

Tabela 7.2. Amostras utilizadas para o desenvolvimento do teste de dissolução.

PRODUTO FARMACÊUTICO	COMPOSIÇÃO
Lamictal [®] (referência –produto A), identificado pelo número de lote R239099, validade até maio de 2009, produzido pelo Laboratório Glaxo e distribuído por GlaxoSmithKline Brasil LTDA.	Excipientes: Lactose, celulose microcristalina, povidona, glicolato sódico de amido, óxido de ferro amarelo, estearato de magnésio.
Neural [®] (similar –produto B), identificado pelo número de lote 05129578, validade até dezembro de 2008, produzido pelo Laboratório Cristália- Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.	Excipientes: manitol, corante amarelo de tartazina nº 5, amido de milho, amido pré-gelatinizado (Explosol [®]), fosfato de cálcio dibásico diidratado, glicolato sódico de amido, dióxido de silício e estearato de magnésio.

7.2.2. Método

7.2.2.1. Doseamento dos comprimidos de LTG das especialidades farmacêuticas selecionadas

Foram preparadas soluções de LTG das especialidades farmacêuticas descritas na Tabela 7.2.

7.2.2.1.1. Preparo da SQR de lamotrigina

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de lamotrigina SQR, que foi posteriormente transferida para balão volumétrico de 20 ml com HCl 0,01 M. A solução foi submetida à banho de ultra-som por 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente (C = 0,5 mg/ml). Alíquota de 2,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, utilizando ácido clorídrico 0,01 M como diluente, obtendo-se solução com concentração final de 20 µg/ml.

7.2.2.1.2. Preparo das soluções das amostras do medicamento referência e similar

Foram pesados o equivalente a 25 mg de amostra a partir do peso médio dos comprimidos das especialidades farmacêuticas descritas na Tabela 7.1. A quantidade pesada foi transferida para balão volumétrico de 50 ml com 20 ml de HCl 0,01 *N*. Esta solução foi submetida à banho de ultra-som, sendo o volume completado com o mesmo solvente ($C = 0,5$ mg/ml). A solução obtida foi filtrada e uma alíquota de 2,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, sendo utilizado o mesmo solvente para diluição. A concentração final obtida foi equivalente a 20 µg/ml de LTG. As soluções foram preparadas em triplicata.

As absorvâncias das soluções foram avaliadas por espectrofotometria de absorção no UV a 267 nm e comparadas com as absorvâncias obtidas com a solução de LTG SQR. Os teores de lamotrigina encontrados nos comprimidos dos diferentes fabricantes do fármaco foram calculados através da equação apresentada no item 5.3.2.1.3.

7.2.2.2. Determinação da solubilidade da SQR de lamotrigina

A solubilidade é o fator que mais afeta a velocidade de dissolução e pode ser determinada por meio da adição de um excesso de fármaco ao meio, seguido de agitação, filtração e quantificação (MARCOLONGO, 2002; ABDU, 1989).

Os meios utilizados para a determinação das condições *sink* foram:

- Água ultrapura;
- Ácido clorídrico 0,01 *M*;
- Ácido clorídrico 0,1 *M*;
- Tampão acetato 0,05 *M* pH 4,7;
- Tampão fosfato 0,05 *M* pH 5,8;
- Tampão fosfato 0,05 *M* pH 6,8.

Os meios tamponados utilizados para a determinação da solubilidade foram preparados de acordo com a USP 30 (2007).

A solubilidade da lamotrigina SQR foi avaliada através do preparo, em duplicata, de soluções com concentração de 1 mg/ml nos meios acima descritos. Para tanto, foram verificados os prováveis meios de dissolução que apresentavam condição *sink*. A análise quantitativa da lamotrigina presente nas amostras em estudo foi realizada por CLAE, utilizando o sistema cromatográfico descrito na Tabela 4.3, com o objetivo de verificar a quantidade de lamotrigina dissolvida no meio em questão.

As soluções foram mantidas em banho de água a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e agitadas a cada 10 minutos em agitador de vórtex. Alíquotas de 10,0 ml das soluções foram retiradas em intervalos de tempo de 1 e 2 horas após o início do experimento e filtradas através de filtro de membrana de 0,45 μm . Foi transferida alíquota de 1,0 ml desse filtrado para balão volumétrico de 25 ml. O volume foi completado com a fase móvel de modo a obter solução na concentração teórica de 40 $\mu\text{g/ml}$.

7.2.2.3. Definição das condições para o ensaio de dissolução

Com o objetivo de definir as condições mais adequadas para o teste de dissolução, foram avaliados os meios que apresentaram condição *sink*. Entre os mesmos estão o ácido clorídrico 0,01 M, ácido clorídrico 0,1 M, tampão acetato pH 4,7, tampão fosfato pH 5,7 e, por fim, tampão fosfato pH 6,8. A temperatura foi mantida constante a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e como aparelhagem foram utilizadas pás numa rotação de 50 rpm. Para o desenvolvimento do ensaio de dissolução foram realizados testes iniciais com os comprimidos do medicamento referência Lamictal[®] (Produto A), descritos na Tabela 7.2. Os testes preliminares foram realizados com três comprimidos. As absorvâncias das soluções obtidas foram determinadas em espectrofotômetro de absorção no UV descrito no item 7.2.1.

7.2.2.3.1. Preparo da SQR

As soluções de lamotrigina SQR foram preparadas numa concentração de 0,5 mg/ml no meio de dissolução em teste, utilizando-se 5% de solvente orgânico (metanol) para os tampões, onde a LTG apresentou-se com solubilidade limitada. As soluções foram submetidas a ultra-som até solubilização. Alíquota de 2,0 ml da solução acima descrita foi transferida para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi completado com HCL 0,01 *M* em todos os casos.

7.2.2.3.2. Preparo das soluções amostra

Para avaliar a percentagem de fármaco dissolvido, alíquotas de 10,0 ml do meio de dissolução foram manualmente retiradas nos intervalos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos e imediatamente filtradas em filtro quantitativo Framex, modelo 389. Foram transferidos 4,0 ml do filtrado para balão volumétrico de 20 ml, completando-se o volume com o ácido clorídrico 0,01 *M*.

O meio de dissolução não foi repostado, porém as devidas correções de concentração foram realizadas. Com base nos resultados preliminares obtidos nos intervalos de tempo utilizados, foram definidas as condições para a validação de um método de dissolução para o controle de qualidade da lamotrigina em comprimidos.

As condições selecionadas para a validação do método de dissolução foram as seguintes:

- Meio de dissolução- Ácido clorídrico 0,01 *N*, 900 ml;
- Tempo de análise – 30 minutos;
- Aparelhagem – pás (USP 30, 2007);
- Rotação – 50 rpm;
- Quantificação do fármaco – espectrofotometria de absorção no UV-267 nm.

7.2.2.4. Determinação da estabilidade do fármaco

Para avaliar a estabilidade do fármaco no meio selecionado para o teste de dissolução foram preparadas soluções da SQR de lamotrigina nas condições do teste de dissolução, comparando as áreas obtidas das soluções mantidas à temperatura de $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 2 horas e à temperatura ambiente por 24 horas com uma solução obtida no tempo zero. A determinação da estabilidade foi realizada utilizando as condições descritas na Tabela 4.3 do método validado e indicativo de estabilidade por CLAE.

7.2.2.4.1. Preparo da solução da SQR de lamotrigina

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de lamotrigina SQR, que foi posteriormente transferida para balão volumétrico de 20 ml com HCl 0,01 M. A solução foi submetida à banho de ultra-som por 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente ($C = 0,5 \text{ mg/ml}$). Alíquota de 2,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, utilizando ácido clorídrico 0,01 M como diluente, obtendo-se solução com concentração final de $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Paralelamente, foram preparadas duas soluções a partir da pesagem de 10 mg de LTG SQR que foram transferidas para frasco de vidro com a adição de 90 ml de ácido clorídrico 0,01 M. Estas soluções foram denominadas Solução A e Solução B.

A Solução A foi submetida à banho-maria a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 2 horas. Posteriormente, foi transferida alíquota de 4,0 ml para balão volumétrico de 10 ml, completando-se o volume com a fase móvel de modo a obter uma solução com concentração de $44,44 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de lamotrigina.

A estabilidade da Solução B foi verificada após 24 horas da preparação. A solução foi mantida em temperatura ambiente. A estabilidade da SQR de lamotrigina também foi verificada realizando-se a diluição acima descrita para Solução A após transcorrido o tempo de 24 horas.

7.2.2.5. Influência do filtro

Para a análise da influência do filtro utilizado, foram preparadas soluções de LTG no meio de dissolução e a concentração das mesmas foram avaliadas antes e após as filtrações realizadas, empregando a espectrofotometria na região do UV a 267nm.

7.2.2.5.1. Preparo da solução da SQR de lamotrigina

Para o preparo das soluções de referência foram pesados, exatamente, 10 mg da SQR de lamotrigina e transferidos para frasco de vidro de 100 ml. Foram adicionados 90 ml do meio de dissolução. A solução foi mantida em ultra-som por 15 minutos (solução A). Transferiu-se uma alíquota de 4,0 ml dessa solução para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com o mesmo solvente, de modo a obter uma solução com concentração de 22,22 µg/ml de lamotrigina (sem filtração).

Para a verificação da interferência do filtro utilizado, a Solução A foi filtrada em papel de filtro quantitativo Framex, modelo 389, diluída em ácido clorídrico 0,01 M a 22,22 µg/ml de lamotrigina (com filtração).

Foram realizadas as determinações das absorvâncias das soluções SQR por espectrofotometria de absorção no UV a 267 nm, utilizando como referência a solução sem filtração. Os resultados dos teores obtidos foram comparados.

7.2.2.5.2. Preparo da solução amostra

Pesou-se o equivalente a 10 mg de lamotrigina a partir do peso médio dos comprimidos os quais foram transferidos para frasco de vidro de 100 ml. Foram adicionados 90 ml do meio de dissolução. A solução foi mantida em ultra-som por 15 minutos e, imediatamente, centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. Após foi transferida uma alíquota de 4,0 ml para balão volumétrico de 20 ml, completando-se o volume com o ácido clorídrico 0,01 M, de modo a obter uma solução com concentração de 22,22 µg/ml de lamotrigina (sem filtração).

Pesou-se o equivalente a 10 mg de lamotrigina a partir do peso médio dos comprimidos os quais foram transferidos para frasco de vidro de 100 ml. Foram adicionados 90 ml do meio de dissolução. A solução foi mantida em ultra-som por 15 minutos. A solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo Framex. Transferiu-se uma alíquota de 4,0 ml do filtrado para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com o mesmo solvente, de modo a obter uma solução com concentração de 22,22 µg/ml de lamotrigina (com filtração).

Foram realizadas as determinações das absorvâncias das soluções amostra por espectrofotometria de absorção no UV a 267 nm, utilizando como referência a solução sem filtração. Os resultados dos teores obtidos foram comparados.

7.2.2.6. Validação do método de dissolução

7.2.2.6.1. Especificidade

Transferiu-se o equivalente a 1 peso médio da mistura dos excipientes do medicamento referência e do medicamento similar, de acordo com o especificado na Tabela 7.2, para uma cuba de dissolução, utilizando 900 ml do meio de dissolução selecionado. Utilizou-se rotação de 150 rpm por 2 horas e como aparelhagem pás (USP 30, 2007). Posteriormente ao ensaio de dissolução, alíquotas de 10,0 ml foram coletadas e filtradas utilizando papel filtro quantitativo Framex, diluídas no meio de dissolução para obtenção de concentração teórica de 20 µg/ml. As soluções foram analisadas pelo método por espectrofotometria na região do UV a 267 nm.

7.2.2.6.2. Linearidade

A linearidade do método foi comprovada previamente durante validação do método para a quantificação da LTG por espectrofotometria de absorção no UV a 267 nm. Foram avaliadas três curvas padrão, preparadas em um mesmo dia, descritas no item 5.3.2.1.2.

7.2.2.6.3. Precisão

7.2.2.6.3.1. Preparo da solução da SQR de lamotrigina

Foram pesados, exatamente, 11,11 mg da SQR de lamotrigina e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 20 ml. O volume foi completado com ácido clorídrico 0,01 *M* e manteve-se a solução em banho de ultra-som por 15 minutos. Uma alíquota de 2,0 ml dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi completado com o mesmo solvente, de modo a obter uma solução com concentração de 22,22 µg/ml de lamotrigina.

7.2.2.6.3.2. Preparo da solução amostra dos comprimidos

Para a preparação da solução amostra, foram retiradas alíquotas de 10,0 ml de cada cuba de dissolução e filtradas em papel de filtro quantitativo Framex modelo 389. Transferiu-se uma alíquota de 4,0 ml dessa solução para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com o ácido clorídrico 0,01 *M*, de modo a obter uma solução com concentração teórica de 22,22 µg/ml de lamotrigina.

As absorvâncias das soluções obtidas foram determinadas em espectrofotômetro de absorção no UV a 267 nm em dois dias consecutivos por analistas diferentes.

7.2.2.6.4. Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, foram pesados 400 mg da SQR de lamotrigina e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 200 ml. Manteve-se a solução em banho de ultra-som por 60 minutos e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,01 *M*, obtendo-se uma solução com concentração de 2 mg/ml. Dessa solução foram transferidas, em duplicata, alíquotas de 10, 25 e 50 ml para as cubas de dissolução, contendo a mistura de excipientes descrita na Tabela 7.2, equivalente a um peso médio dos comprimidos do Produto A. As quantidades adicionadas correspondem a 20 mg (20%), 50 mg (50%) e 100 mg

(100 %) do teor rotulado do fármaco (100 mg). Procedeu-se ao ensaio de dissolução nas condições selecionadas durante 30 minutos. Decorrido o tempo de análise, alíquotas de 10,0 ml foram retiradas do meio de dissolução e filtradas em filtro quantitativo Framex, modelo 389. Foram transferidas alíquotas de 5,0 ml dessas soluções para balões volumétricos de 20 ml e os volumes foram completados com ácido clorídrico 0,01 M.

As soluções de lamotrigina SQR foram preparadas conforme descrito no item 7.2.2.5.1.

As absorvâncias das soluções obtidas foram determinadas em espectrofotômetro de absorção no UV a 267.

7.2.2.6.5. Robustez

A robustez do método foi avaliada no desenvolvimento do teste de dissolução, utilizando a desaeração em ultra-som por um período de 30 minutos do meio de dissolução.

7.2.2.7. Comparação dos perfis de dissolução do medicamento referência e similar

Os perfis de dissolução nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos do medicamento referência e do produto similar foram comparados. Para tanto, a temperatura foi mantida constante a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e como aparelhagem foram utilizadas pás numa rotação de 50 rpm. Os testes foram realizados com três comprimidos de cada laboratório. As absorvâncias das soluções obtidas foram determinadas em espectrofotômetro de absorção no UV descrito no item 7.2.1.

7.2.2.7.1. Preparo da SQR

A solução de lamotrigina SQR foi preparada numa concentração de 0,5 mg/ml em HCL 0,01 M. A mesma foi submetida a ultra-som até completa solubilização. Alíquota de 2,0 ml da solução acima descrita foi transferida para balão volumétrico 50 ml e o volume foi completado com HCL 0,01 M como segunda diluição.

7.2.2.7.2. Preparo das soluções amostra

Alíquotas de 10,0 ml do meio de dissolução foram manualmente retiradas nos intervalos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos e imediatamente filtradas em filtro quantitativo Framex, modelo 389. Foram transferidos 4,0 ml do filtrado para balão volumétrico de 20 ml, completando-se o volume com o ácido clorídrico 0,01 M, de modo a obter solução na concentração de 22,22 µg/ml.

O meio de dissolução não foi repostado, porém as devidas correções de concentração foram realizadas.

7.2.2.8. Ensaio de dissolução dos comprimidos de LTG nas especialidades farmacêuticas

Os comprimidos de lamotrigina descritos na Tabela 7.2 foram submetidos ao ensaio de dissolução sob as condições previamente estabelecidas no item 7.2.2.3. Para tanto, foram utilizados 6 comprimidos de cada fabricante.

Transcorridos os 30 minutos estabelecidos para o teste, alíquotas de 10 ml do meio de dissolução foram manualmente retiradas e imediatamente filtradas em filtro quantitativo Framex, modelo 389. Foram transferidos 4,0 ml do filtrado para balão volumétrico de 20 ml, completando-se o volume com o ácido clorídrico 0,01 M, de modo a obter solução na concentração de 22,22 µg/ml.

As soluções de lamotrigina SQR foram preparadas conforme descrito no item 7.2.2.5.1.

As absorvâncias das soluções obtidas foram determinadas em espectrofotômetro de absorção no UV a 267 nm e os valores foram comparados.

7.2.2.9. Resultados

Encontram-se representados na Tabela 7.3 os valores obtidos referentes às leituras e aos teores de lamotrigina encontrados nas duas formulações utilizadas no presente estudo.

Tabela 7.3. Teores de LTG obtidos através de espectrofotometria de absorção no UV em cada uma das especialidades farmacêuticas.

Especialidade farmacêutica	Absorvância	Média das absorvâncias	DPR	Teor (%)*
Produto A	0,531	0,530	0,28	97,72
	0,530			
	0,528			
Produto B	0,549	0,542	0,10	100,06
	0,550			
	0,549			

* As soluções foram comparadas com uma solução de SQR na mesma concentração e absorvância = 0,542.

Na Tabela 7.4 estão apresentados os resultados da solubilidade da SQR de lamotrigina nos meios estudados.

Tabela 7.4. Solubilidade da SQR de lamotrigina a 37,0 °C ± 0,5 °C.

Meio	Solubilidade (µg/ml) após 1 hora	Solubilidade (µg/ml) após 2 horas
Água	248,5	289,6
Ácido clorídrico 0,01 <i>N</i>	1117,8	1091,8
Ácido clorídrico 0,1 <i>N</i>	1048,0	1140,2
Tampão acetato pH 4,7	802,7	834,0
Tampão fosfato pH 5,8	337,1	401,7
Tampão fosfato pH 6,8	311,8	381,7

Na Tabela 7.5 estão demonstrados os valores experimentais encontrados utilizando o produto A (Lamictal[®]) nos tempos 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos para os seguintes meios: HCL 0,01 *M*, HCL 0,1 *M*, Tampão acetato pH 4,7, Tampão fosfato pH 5,7 e Tampão fosfato pH 6,8.

Tabela 7.5. Teor de fármaco dissolvido de acordo com o meio selecionado nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos.

Teor de fármaco dissolvido (%)					
Tempo (Minutos)	HCL 0,1 <i>M</i>	HCL 0,01 <i>M</i>	Tampão Acetato pH 4,7	Tampão Fosfato pH 5,7	Tampão Fosfato pH 6,8
5	100,75	97,72	97,07	71,24	71,92
10	101,28	99,77	101,28	91,91	91,40
15	101,62	99,94	101,62	92,75	96,46
30	102,83	100,77	101,80	98,93	101,14
45	102,83	100,44	101,63	98,11	99,16
60	103,50	99,96	102,46	97,94	98,34

Na Figura 7.1 estão demonstrados os perfis de dissolução do produto A nos diferentes meios utilizados para os tempos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos.

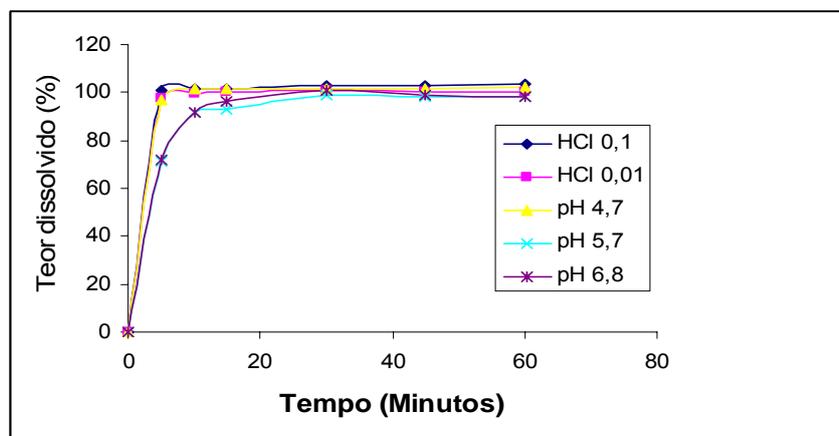


Figura 7.1. Perfis de dissolução do produto A nos diferentes meios utilizados. Condições para o teste de dissolução- Meio de dissolução: HCL 0,01 M (900 ml); Pás (50 rpm); Tempos de coleta: 5,10,15,30, 45 e 60.

Na Tabela 7.6 estão descritos os valores experimentais encontrados referentes à estabilidade do fármaco no meio de dissolução selecionado, considerando o tempo 0 como 100%.

Tabela 7.6. Valores experimentais obtidos através do teste de estabilidade para as soluções de lamotrigina SQR em HCL 0,01 M.

Condição	% de lamotrigina
SQR tempo zero em HCL 0,01 M*	-
SQR mantida a 37,0 °C ± 0,5 °C por 2 h em HCL 0,01 M	99,90
SQR mantida a temp. ambiente por 24 h em HCL 0,01 M	99,25

* SQR no tempo 0 foi considerada como 100%.

Encontram-se representados na Figura 7.2 os cromatogramas obtidos com as soluções A e B para análise da estabilidade das mesmas, bem como a solução estabelecida como tempo zero.

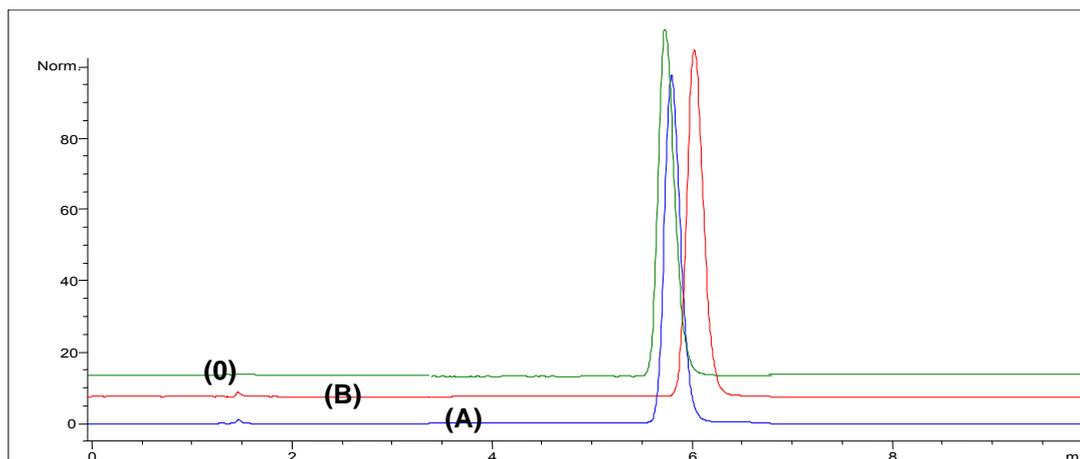


Figura 7.2. Cromatogramas obtidos com a solução de lamotrigina no tempo 0 (0), Solução A de LTG submetida a 2 horas na temperatura de 37°C (A) e solução B de LTG mantida à temperatura ambiente por 24 horas (B). Condições cromatográficas: Coluna Agilent Eclipse® XDB octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%); MeOH (62:38, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV 279 nm, temperatura de análise 25 °C.

Na Tabela 7.7 encontram-se os valores obtidos para os teores de amostra e SQR de lamotrigina após a verificação da influência do filtro utilizado no presente ensaio, considerando a referência sem filtração como 100% e a amostra centrifugada como 100%.

Tabela 7.7. Resultados experimentais obtidos para a verificação da influência do filtro na solução amostra e solução de SQR de lamotrigina.

Solução	% de lamotrigina
SQR sem filtração*	-
SQR filtrada	99,40
Amostra dos comprimidos centrifugada*	-
Amostra dos comprimidos filtrada	98,68

* A solução SQR sem filtração e Amostra centrifugada foram consideradas como 100%.

Nas Figuras 7.3 e 7.4 estão demonstrados os espectros referentes à dissolução do placebo por 2 horas numa rotação de 150 rpm para ambas formulações.

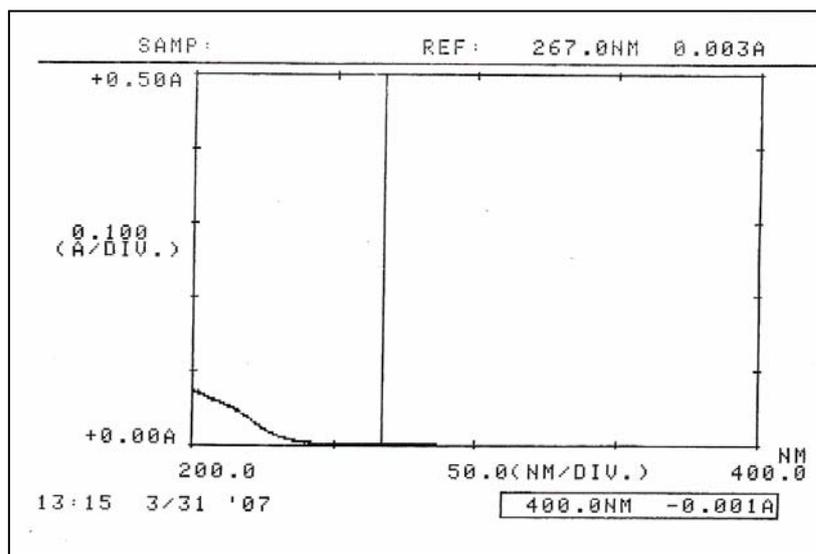


Figura 7.3. Espectro no UV referente à solução de excipientes do Produto A.

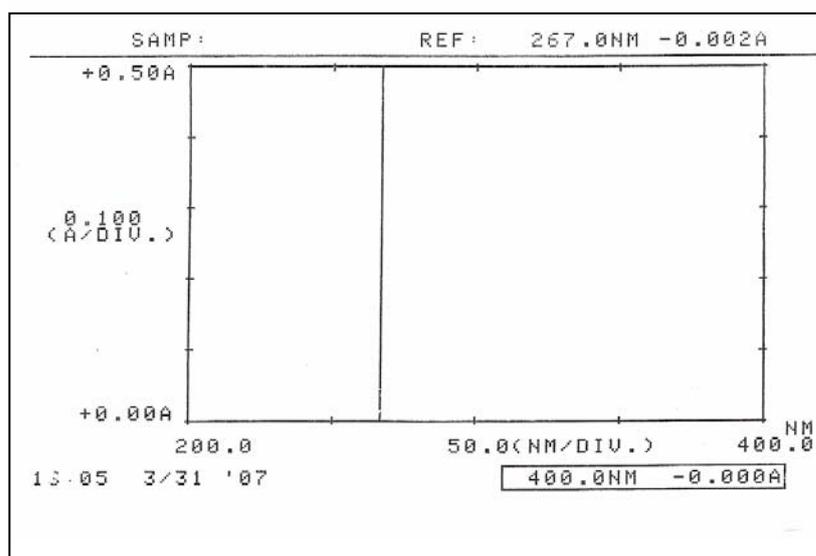


Figura 7.4. Espectro no UV referente à solução de excipientes do Produto B.

Os valores obtidos para a linearidade do método encontram-se descritos no item 5.3.2.1.8.

Os valores experimentais para a precisão intermediária estão representados na Tabela 7.8.

Tabela 7.8. Resultados de precisão intermediária do método de dissolução por espectrofotometria de absorção no UV utilizando diferentes analistas em diferentes dias.

Cuba	Analista A (% dissolvido)	Analista B (% dissolvido)
1	102,51	102,18
2	104,09	99,77
3	102,00	102,51
4	102,00	102,70
5	103,02	104,42
6	101,07	103,40

Os valores encontrados relativos à precisão interdia e intradia, bem como os valores das médias e respectivos DPR, estão apresentados na Tabela 7.9.

Tabela 7.9. Valores das médias e DPR encontrados na determinação das precisões interdia e intradia por espectrofotometria de absorção no UV.

Precisão intradia- analista A		Precisão intradia- analista B	
Média	102,44	Média	102,50
DPR	0,70	DPR	1,52
Precisão interdia			
Média	102,47		
DPR	1,23		

Na Tabela 7.10 estão apresentados os resultados referentes ao estudo de exatidão realizado através do método de adição de padrão por espectrofotometria de absorção no UV.

Tabela 7.10. Resultados referentes ao estudo de exatidão do método de dissolução por espectrofotometria de absorção no UV, realizado através do método de adição de padrão.

Concentração adicionada (µg/ml)	Concentrações recuperadas (µg/ml)	Percentual (%) de recuperação
5,57	5,77	103,59
	5,62	100,89
14,14	14,12	99,86
	14,16	100,14
28,05	27,40	98,46
	27,84	99,25

Na Tabela 7.11 estão demonstrados os valores experimentais obtidos através da desaeração do meio de dissolução para avaliar a robustez do método.

Tabela 7.11. Comparação entre as percentagens de fármaco dissolvido (%) utilizando meio desaerado por 30 minutos em ultra-som e não desaerado para avaliação da robustez do método.

Parâmetro avaliado	Percentual (%) de fármaco dissolvido
Meio sem desaeração	101,57
Meio desaerado	102,85

*Média de duas determinações.

Os resultados experimentais obtidos através da dissolução do medicamento referência (A) e o medicamento similar (B) em ácido clorídrico 0,01 M, nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 estão demonstrados na Tabela 7.12.

Tabela 7.12. Resultados experimentais obtidos pela dissolução dos produtos A e B.

Percentual (%) dissolvido						
Tempo (minutos)	5	10	15	30	45	60
Produto (A)	97,77	99,77	99,94	100,77	100,44	99,96
DPR	2,23	1,29	1,26	1,19	1,32	1,16
Produto (B)	54,73	75,77	87,27	98,98	102,29	103,59
DPR	7,85	6,92	5,50	4,89	3,83	3,71

Na Figura 7.5 estão representados graficamente os valores obtidos através dos seis tempos de coleta selecionados para a comparação dos produtos (A) e (B).

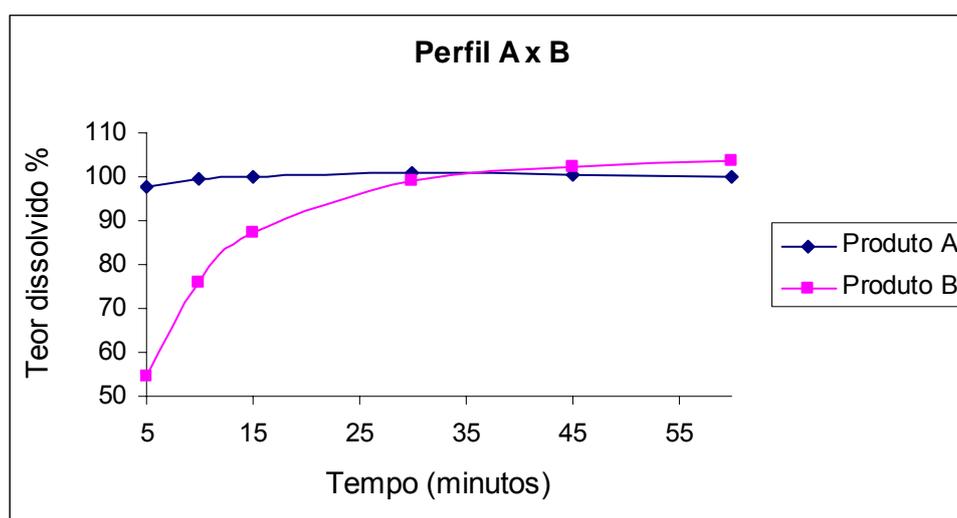


Figura 7.5. Representação gráfica dos valores experimentais obtidos através da dissolução dos produtos (A) e (B). Condições para o teste de dissolução- Meio de dissolução: HCL 0,01 M (900 ml); Pás (50 rpm); Tempos de coleta: 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos.

Os valores percentuais do teor dissolvido do fármaco para as diferentes formulações de comprimidos de LTG estão demonstrados na Tabela 7.13.

Tabela 7.13. Percentual de fármaco dissolvido em 30 minutos através do teste de dissolução.

	Produto A	Produto B
1	101,47	100,67
2	103,04	102,49
3	100,97	98,18
4	100,97	99,33
5	101,98	97,16
6	100,05	92,36
Média	101,41	98,37
DPR	1,01	3,54

Na Figura 7.6 pode-se observar a comparação com relação aos percentuais de fármaco dissolvido durante 30 minutos dos produtos (A) e (B).

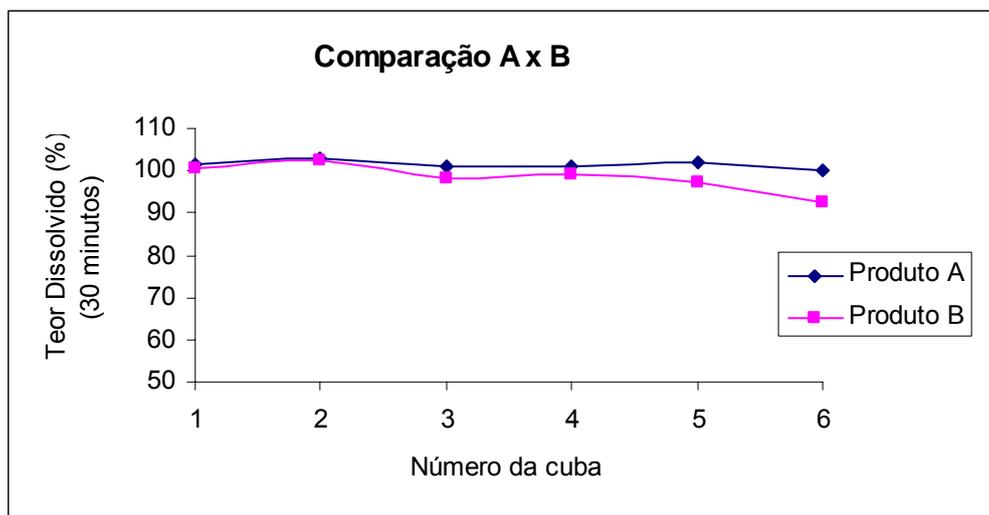


Figura 7.6. Percentual de dissolução alcançado em cada uma das cubas (n=6) para os produtos (A) e (B). Condições para o teste de dissolução- Meio de dissolução: HCL 0,01 M (900 ml); Pás (50 rpm); Tempo (30 minutos).

7.2.2.10. Discussão

A lamotrigina é rápida e completamente absorvida pelo trato gastrointestinal, atingindo concentração plasmática máxima em aproximadamente 2,5 horas. Apresenta biodisponibilidade em torno de 98% (KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004).

O doseamento realizado para o produto referência A e similar B demonstrou um teor de 97,72% e 100,06% de lamotrigina, respectivamente. Desta forma, a diferença entre os teores dos dois produtos foi de 2,34%, demonstrando que a diferença entre os mesmos é inferior a 5,0% (BRASIL, 2004).

Para a quantificação do fármaco foi selecionada a espectrofotometria de absorção no UV. As vantagens do uso desse método são a velocidade, fácil preparação das amostras e fácil automação, tornando a técnica mais usada durante os testes de rotina (SKOUG e FREEMAN, 1997).

O desenvolvimento do ensaio de dissolução foi baseado nas propriedades físico-químicas da lamotrigina, a qual apresenta solubilidade limitada em água de apenas 0,17mg/ml a 25°C. A lamotrigina é uma base fraca e, à medida que o pH aumenta, a solubilidade da mesma diminui, já que apresenta-se na forma não ionizada em pH alcalino. Os testes de solubilidade foram avaliados em torno de uma unidade acima (6,8) e uma unidade abaixo (4,7) e no próprio valor do pKa (5,7) da lamotrigina.

A condição *sink*, definida como uma quantidade de solvente não inferior a 3 vezes o volume de meio necessário para obter uma solução saturada do fármaco (MARQUES e BROWN, 2002; USP 30, 2007) foi avaliada através do ensaio de solubilidade da SQR de lamotrigina. Essa condição foi atingida quando a solubilidade do fármaco foi igual ou superior a 333,33 µg/ml, já que o teste é realizado com a dose de 100 mg de LTG em 900 ml de meio. As condições *sink*, somente não foram atingidas com a água ultrapura e em tampão fosfato pH 6,8 por um período de 1 hora.

As características de dissolução devem ser testadas na faixa de pH fisiológico entre 1,2 e 6,8 para formulações de liberação imediata (USP, 2007). De acordo com os perfis obtidos experimentalmente, foi observado que a lamotrigina dissolveu

rapidamente em ácido clorídrico 0,01 M, ácido clorídrico 0,1 M e tampão acetato pH 4,7, já que em 15 minutos, o fármaco encontrava-se totalmente dissolvido nestes meios. A dissolução para os meios referentes ao tampão fosfato pH 5,7 e pH 6,8 foi mais lenta, entretanto, e demonstrou um percentual de fármaco dissolvido no tampão pH 5,7 e 6,8 acima de 90% em 15 minutos.

Um fármaco de liberação imediata é considerado de rápida dissolução quando não menos de 85% do teor do fármaco está dissolvido em 15 minutos, utilizando pás (USP 30, 2007), numa rotação de 50 rpm, volume de 900 ml em cada um dos seguintes meios: ácido, como HCL 0,1 M, ou fluido gástrico simulado (USP) sem enzimas; tampão pH 4,5; tampão pH 6,8 ou fluido intestinal simulado (USP) sem enzimas (YU *et al.*, 2002).

A partir dos testes preliminares realizados, foi possível estabelecer as condições adequadas para a realização de um método de dissolução para análises de rotina de controle de qualidade para comprimidos de lamotrigina. Essas podem ser descritas como: meio de dissolução (ácido clorídrico 0,01 M, 900 ml; tempo (30 minutos); aparelho (pás) e velocidade de rotação (50 rpm). Apesar da LTG apresentar solubilidade elevada em ácido clorídrico 0,1 M, optou-se pelo uso de HCL 0,01 M, haja visto que o método de quantificação já havia sido desenvolvido e validado neste meio.

Os resultados para avaliação da estabilidade da solução de SQR demonstraram que o fármaco permanece estável em ácido clorídrico 0,01 M por 2 h à 37°C e por 24 h à temperatura ambiente. Não houve redução significativa no teor do fármaco, nem aparecimento de picos de degradação. O teor de LTG SQR foi de 99,90 e 99,25% para 2 h à 37°C e 24 h à temperatura ambiente, respectivamente. A faixa aceitável para a solução de SQR deve estar entre 98 e 102% (USP, 2007).

O ensaio para verificação da interferência do filtro utilizado demonstrou que o mesmo não adsorve o fármaco de forma apreciável e pode ser utilizado com segurança durante os testes de dissolução.

Os espectros de UV a 267 nm da solução placebo filtradas dos produtos A e B, demonstraram a especificidade do método (SKOUG e FREEMAN, 1997). Para ambas as formulações, não há interferência dos excipientes.

A linearidade do método analítico foi comprovada durante a validação do método para a quantificação da lamotrigina por espectrofotometria de absorção no UV e os resultados encontram-se descritos no item 5.3.2.1.8.2.

A precisão intermediária foi determinada através da realização do ensaio de dissolução em dias diferentes, por analistas diferentes. Todos os valores de DPR obtidos, tanto intradia como interdía, foram inferiores a 2%. Esses resultados demonstraram a precisão do método de dissolução (USP 30, 2007).

A exatidão do método de dissolução foi determinada através do teste de recuperação, no qual quantidades conhecidas da SQR de lamotrigina em solução foram adicionadas ao placebo da formulação nas cubas de dissolução. As percentagens médias de recuperação (Tabela 7.11) encontram-se na faixa de 98,46 a 103,59%, demonstrando a exatidão do método de dissolução proposto.

A desaeração do meio de dissolução deve ser avaliada, já que a presença de bolhas de ar podem interferir com os resultados dos testes (USP, 2007). Os valores encontrados com e sem a desaeração do meio diferenciaram-se em apenas 1,28%.

A partir dos resultados obtidos, pôde-se observar que o produto A está totalmente dissolvido nos primeiros minutos de análise em ácido clorídrico 0,01 M como meio de dissolução. Paralelamente, o produto B apresentou uma dissolução mais gradual, mantendo a característica de rápida dissolução, já que no meio testado (HCL 0,01 M, o mesmo encontra-se com teor de fármaco dissolvido superior a 85 % em 15 minutos de ensaio.

O percentual de dissolução pode ser influenciado por fatores diversos, como o processo de fabricação; as variações de formulação (tipo e quantidade de excipiente); o teor de umidade e as propriedades da substância (SKOUG e FREEMAN, 1997). Praticamente todos os excipientes envolvidos na formulação exercem alguma influência na dissolução. O amido, presente em ambas formulações, que atua como diluente e desintegrante, tende a facilitar a dissolução (WOOD, 1966; ABDON, 1989).

Os coeficientes de variação para os primeiros pontos não deve exceder 20%. Para os demais pontos considera-se o máximo de 10% (BRASIL, 2004). Nos

primeiros pontos de coleta, foram obtidos DPR abaixo de 10% para ambos os fármacos. Os valores de DPR encontrados foram entre 1,16 e 2,23 para o Produto A e 3,81 e 7,85 para o produto B. Estes valores demonstraram maior homogeneidade no processo de produção do Produto A, acarretando uma dissolução mais homogênea que os valores obtidos com o Produto B.

A comparação das percentagens dissolvidas em 30 minutos dos produtos A e B, demonstraram que ambos encontram-se totalmente dissolvidos neste período de tempo selecionado.

Nos casos em que o processo de dissolução for muito rápido, apresentando valor igual ou superior a 85% de fármaco dissolvido em 15 minutos, os fatores f_1 e f_2 perdem o seu poder discriminativo e, portanto, não é necessário calculá-los. Deve-se comprovar a rápida dissolução dos produtos através de seus perfis de dissolução (BRASIL, 2004).

Atualmente, o FDA define que os fármacos que apresentam absorção maior do que 90% da dose administrada são fármacos com alta permeabilidade. Além disso, fármacos altamente solúveis são aqueles em que a dose mais alta do mesmo apresenta-se solúvel em 250 ml dos meios aquosos na faixa de pH entre 1,0-7,5. Entretanto, há relatos publicados na literatura constatando que esses valores apresentam-se conservadores com relação à solubilidade e permeabilidade. Algumas das propostas indicam que a faixa de pH a ser avaliada deve estar entre 1,0 e 6,8, aumentando de 250 ml para 500 ml o volume em que a dose mais alta do fármaco deve apresentar-se solúvel. Com relação à permeabilidade, a redefinição consiste em que fármacos que apresentam 85% de absorção após administração oral, apresentam alta permeabilidade (YU *et al.*, 2002; YAZDANIAN *et al.*, 2004).

Foram obtidos dados controversos de que a LTG pertence à classe II do SCB (TSRL, 2007) ou classe III do SCB (FRESHPATENTS, 2007). Com base nas informações obtidas de que a LTG apresenta 98% de biodisponibilidade, sugere-se que a mesma seja de alta permeabilidade não pertencendo, portanto, à classe III do SCB. Com relação à solubilidade, foi observado nos experimentos realizados, que as condições *sink* foram obtidas nos meios testados com exceção da água. Apesar da sua baixa solubilidade em água, os comprimidos de LTG apresentaram rápida

dissolução. De acordo com as informações obtidas na literatura científica de que a mais alta dose do fármaco deve ser solúvel em 500 ml dos meios aquosos de pH entre 1,0-6,8 (YU *et al.*, 2002; YAZDANIAN *et al.*, 2004), pode-se sugerir que a mesma venha a ser um fármaco altamente solúvel, porém estudos adicionais devem ser realizados para a obtenção de dados conclusivos.

O método desenvolvido para análise de rotina em laboratórios de controle de qualidade para comprimidos de lamotrigina apresentou-se satisfatório para avaliar o percentual (%) de fármaco dissolvido no meio de dissolução proposto com especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Ademais, pode-se considerar que a LTG apresenta estabilidade adequada no meio de dissolução durante um tempo superior ao despendido para as análises.

8. DISCUSSÃO GERAL

8.1. Discussão geral

Os métodos propostos para análise qualitativa da lamotrigina permitiram, através das características físico-químicas do fármaco, a identificação do antiepiléptico em estudo.

A faixa de fusão determinada por calorimetria exploratória diferencial, 216,80-220,90°C coincide com os limites propostos pela literatura, 216-218°C (BUDAVARI et al., 2001; MOFFAT, 2004). Tais informações sugerem que o fármaco não apresenta impurezas.

A lamotrigina apresentou bandas características dos grupamentos presentes em sua estrutura química, cuja atribuição foi baseada na literatura (NAKANISHI, 1977; PAVIA *et al.*, 2001a; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000^a; WATSON, 2004; MOFFAT, 2004). As bandas presentes em frequência de absorção inferior a 1500 cm^{-1} fazem parte da região de impressão digital. A banda na região de 1625 cm^{-1} é característica da ligação guanidínica presente na estrutura do antiepiléptico analisado. As bandas pronunciadas acima de 3000 cm^{-1} possibilitaram a identificação das amins primárias aromáticas presentes na estrutura da lamotrigina.

A determinação da faixa de fusão e a realização da espectrofotometria na região do infravermelho foram eficientes para a caracterização da lamotrigina como substância química de referência.

O sistema utilizado por cromatografia em camada delgada apresentou fatores de retenção (R_f) de 0,44 para a lamotrigina SQR e para os comprimidos de lamotrigina. Além disso, a carbamazepina, utilizada para avaliar a seletividade do método, apresentou (R_f) de 0,83, distante dos valores obtidos para a LTG corroborando a eficácia do sistema desenvolvido.

A espectrofotometria na região do ultravioleta permitiu a determinação de regiões de máxima absorção, bem como valores de intensidade de absorção em diferentes solventes. Além disso, foi claramente observado que o fármaco em pH abaixo de seu pKa (5,7), estando predominantemente na forma ionizada, apresenta absorção máxima em torno de 268 nm (CHENG *et al.*, 2005). O método proposto é simples, de fácil execução e de baixo custo, além de excluir o uso de solventes orgânicos.

O método por cromatografia a líquido de alta eficiência permitiu a identificação da lamotrigina através da comparação dos cromatogramas da solução de SQR e dos comprimidos de LTG, demonstrando que eluíram no mesmo tempo de retenção, em torno de 6,5 minutos.

A validação de um método analítico visa demonstrar que o método é capaz de gerar resultados confiáveis, assegurando a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos (ERMER, 2001). Os parâmetros avaliados nos métodos validados foram especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

A quantificação da lamotrigina por espectrofotometria na região do ultravioleta apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e sensibilidade. Apresentando as vantagens descritas anteriormente inerentes ao método espectrofotométrico.

O método por cromatografia a líquido de alta eficiência utilizou solventes que permitissem a obtenção de um pico com simetria apropriada. O método por CLAE proposto foi validado de acordo com os parâmetros especificados pelas guias de validação, sendo estes: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez, limite de detecção e quantificação, além de ser avaliada a adequabilidade do sistema. Através do detector com arranjo de fotodiodos disponível no equipamento foi possível determinar a pureza do pico referente à lamotrigina.

Os métodos propostos nesse trabalho foram analisados comparativamente através do teste-t (Student), presumindo variâncias equivalentes, o qual indica que não há diferenças significativas entre os mesmos e, em função disso, os métodos

por CLAE e por UV são passíveis de serem utilizados para a quantificação do fármaco.

O estudo preliminar de estabilidade térmica realizado indica que amostra não sofre degradação nas condições de análise empregadas ($T = 80^{\circ}\text{C}$), indicando que a temperatura não é fator preponderante de degradação para o fármaco em estudo.

A avaliação preliminar da fotoestabilidade sugere que a lamotrigina é suscetível a luz, já que sofre degradação após 15 dias de exposição à radiação ultravioleta de 254 nm, nas condições experimentais aplicadas. A importância do conhecimento da sensibilidade da lamotrigina frente à luz é útil e importante para no processo de desenvolvimento, produção e de seleção de material de embalagem (KLICK *et al.*, 2005).

A expiração da patente da lamotrigina (Lamictal[®]), ocorrida em 2005, proporcionou o aparecimento de várias especialidades farmacêuticas novas. O surgimento de medicamentos genéricos é um processo natural. Para tanto, o controle de qualidade desses medicamentos devem ser criteriosamente avaliados, incluindo os testes de dissolução. No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método de fácil execução, específico, linear, preciso e robusto. A utilização do mesmo sistema de quantificação utilizado na validação do método espectrofotométrico facilita a avaliação de tais medicamentos nas rotinas laboratoriais.

9. CONCLUSÕES GERAIS

9.1. Conclusões gerais

- A SQR caracterizada por DSC e espectroscopia na região do IV, demonstrou pureza elevada, possibilitando sua utilização no desenvolvimento e validação dos métodos propostos.
- Os métodos propostos por CCD, espectrofotometria na região do UV e CLAE demonstraram-se adequados para identificação de lamotrigina em comprimidos.
- Os métodos quantitativos propostos por espectrofotometria na região do UV e CLAE demonstraram especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez; portanto, constituem ferramentas analíticas adequadas para o controle de qualidade de rotina de comprimidos de lamotrigina. Os mesmos são intercambiáveis visto que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.
- O estudo preliminar de estabilidade dos comprimidos de LTG demonstrou que a mesma é sensível à luz e hidrólise ácida. Todavia não foi atingido o percentual de decaimento em teor suficiente para a determinação da cinética de degradação em ambos os casos.
- O método de dissolução desenvolvido e validado utilizando espectrofotometria de absorção no UV para determinação da quantidade dissolvida de lamotrigina em ácido clorídrico 0,01 M foi considerado adequado para o controle de qualidade de rotina dos comprimidos do fármaco.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

- ABDOU, H.M. **Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company, 1989. 554p
- AMIDON, G.L.; CRISON, J.R. A; LENNERÑAS, H.; SHAH, V.P.; Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**. v.12. n.3, p.413-419, 1995.
- ANGELIS-STOFORDIS, P.; MORGAN, D.J.; O'BRIEN, T.J.;VAJDA, F.J.E. Determination of lamotrigine in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**. v.727: p.113-118, 1999.
- ANSEL, H.C. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, 2000. 568p.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista de medicamentos genéricos.Disponível em <<http://www.Anvisa.gov.br/hotsite/genéricos/index.htm>> Acesso em 20.9.2006.
- ASHTON, D.S. RAY, D.A.; VALKO, K. Detection of the principal route indicative impurity in lamotrigine. Internatiomnal. **Journal of Pharmaceutics**. v. 189, p. 241-248, 1999.
- AVENDAÑO, C. Síntesis de fármacos. Principios generales e Introducción al análisis farmacéutico. In:_____. **Introducción a la química farmacéutica** – Madri: Intramericana McGraw-Hill, 1993.
- AVOLI, M.; AVANNZINI, G; ROGAWASKI, M.A. Generalized epileptic disorder: an update. **Epilepsia**. v.42: p.445-457, 2001.
- BALDAUF, C.M. Novas drogas antiepilépticas. In ____: **Tratamento clínico e cirúrgico das epilepsias de difícil controle**. 1. ed. São Paulo: Lemos, 2002. p.49-68.
- BARBOSA, N.R.; MIDIO, A.F. Validated high-performance liquid chromatography method for the determination of lamotrigine in humam plasma. **Journal of Chromatography B**. v. 741, p.289-293, 2000.
- BAKSHI, M. SARANJIT, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.28, p.1011-1040, 2002.
- BEN-MENACHEN, E. New antiepileptic drugs and non-pharmacological treatments. **Current Opinions in Neurology**. v. 13, p.165-170, 2000.
- BERAN, R.G.; BERKOVIC, S.F.; BLACK, A.B.; DANTA, G.; DUNAGAN, F.M.; MAKENZIE, R; VAJDA, F.J;. *et al* . Double-blind, placebo controlled, crossover

study of lamotrigine in treatment-resistant generalized epilepsy. **Epilepsia**.v.39, p.1329-1334, 1998.

BERGEN, D.C. In: _____ . **Neurologia para o não-especialista- fundamentos básicos da neurologia contemporânea**. 4.ed. São Paulo: Santos Editora, 2003.

BIALER, M.; JOHANNESSEN, S.I.; KUPFERBERG, H.J.; LEVY, R.H.; LOISEAU, P.; PERUCCA, E. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fifth Eilat Conference (EILAT T V). **Epilepsy Research**. v. 43, p.11-58, 2001.

BIDDLECOMBE, R.A.; DEAN, C.D.; JEAL, S.C. Validation of a radioimmunoassay for the determination of human plasma concentrations of lamotrigine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 8 (8-12), p.691-694, 1990.

BRASIL-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos através de revogação do RE- nº475 publicada no D.O.U 19 março de 2002. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02. Jun, 2003.

BRASIL-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº310, de 1º de setembro de 2004. Determina a publicação do guia para a realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução através de revogação do RE- nº900 publicada no D.O.U 29 maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 agosto, 2004.

BRITTAIN, H. G. Validação de Métodos analíticos não cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**. v. 2, n. 3, p. 4-9, 1998.

BRODIE, M.J.; GIORGI, L; OVERSTALL, P.W. UK lamotrigine elderly study group. multicentre, double-blind, randomized comparison between lamotrigine and carbamazepine in elderly patients with newly diagnosed epilepsy. **Epilepsy Research**. v.37. s.3, p.81-87, 1999.

BRODIE, M.J.; Management strategies for refractory localization-related seizures. **Epilepsia**. v.42. s.3, p.27-30, 2001.

BRODIE, M.J.; KWAN, P. Staged Approach to Epilepsy Management. **Neurology**. v.58, S2-S8, 2002.

BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck Index** .13th ed. Rahway: Merck Research Laboratories, 2001.

CARPENTER, C.J.; GRIGGS, R.C.; LOSCALZO, J. **Cecil- Medicina Interna Básica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.818-819.

CARSTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. **Drug Stability**. 3. ed. Marcel Dekker, New York, 2000. 773p.

CASTEL-BRANCO, M. M.; ALMEIDA, A.M.; FALCAO, A.C.; MACEDO, T.A.; CARAMONA, M.M; LOPEZ, F.G. Lamotrigine analysis in blood and brain by high-

- performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**. v.755, p.119-127, 2001.
- CHENG, C.L.; CHOU, C.H.; HU, O.Y. Determination of lamotrigine in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**. v.817, p.199-206, 2005.
- CHOWDARY, K.P.R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharmaceutical**. v.30, n. 350, p.51-54, 1987.
- CLAS, S. D.; DALTON, C. R., HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **PSTT**, v. 2, n° 8, 1999.
- COCIGLIO, M.; ALRIC, R.; BOUVIER, O. Performance Análisis of a reversed-phase liquid chromatographic assay of lamotrigine in plasma using solvent demixing extraction. **Journal of Biomedical Applications**. v.110 (1-2). p.269-276, 1991.
- CORDIOLI, A.V. **Psicofármacos**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2000. p.134-135.
- CROCI, D.; SALMAGGI, A.; de GRAZIE, U.; BERNARDI, G. New high performance liquid chromatography method for plasma/serum analysis of lamotrigine. **Therapeutic Drug Monitoring**. v.23, n.6, p.665-668, 2001.
- CROSS, A.D.; JONES, R.A. **An Introduction to Practical Infra-red Spectroscopy**. 3. ed. London: Butherworths, 1969.
- DASGUPTA, A.; HART, A.P. Lamotrigine analysis in plasma by gas chromatography-mass spectrometry after conversion to a *terc*.butyldimethylsilyl derivative. **Journal of Chromatography B**. v.693. p. 101-107, 1997.
- DEF 2004/2005. **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas**. 33.ed. Produção Jornal Brasileiro de Medicina, 2004.
- DRUGBANK, 2007. **Lamotrigine**. Disponível em <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca.drugbank>.>DRUG INFORMATION, 2000-2001. 8. ed. Cleveland: Lexi-Comp. Inc., 2000.
- DRUG INFORMATION, 2000-2001. 8.ed. Cleveland: Lexi-Comp. Inc., 2000.
- EMANI, J.; GHASSAMI, N.; AHMADI, F. Development and validation of a new HPLC method for determination of lamotrigine and related compounds in tablet formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**. v.40 (4). p.999-1005, 2006.
- ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

FDA, Guidance for Industry: Dissolution Testing for Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), August, 1997.

FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm> Acesso em 01 jan. 2007.

FERNANDES, J.G.; SCHMIDT, M.I; MONTE, T.L.; TOZZI, S.; SANDER, W.A.S. Prevalence of epilepsy: The Porto Alegre study. **Epilepsia**. v.33, s.3, p.132, 1992.

FERREIRA, M.B.C.; CAUMO, W.; HIDALGO, M.P.L. Fármacos utilizados em dor crônica. In: _____. **Farmacologia Clínica-Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.259-261.

FIELDER. **Encyclopedia of excipients for pharmaceutical, cosmetics and related áreas**. 5.ed. Editio: Cantor Verlag, v.1. Aulendorf, 2002.

FRESHPATENTES, 2007. **Lamotrigine**. Disponível em <http://www.freshpatents.com>.>Acesso em 20 maio 2007.

FORD, J., TINMINS. In _____. **Pharmaceutical Thermal Analysis. Techniques and Applications**. New York: Ellis Hor Wood Limited, 1989. p.108-135.

FORTUNATO, D. Dissolution method development for immediate release solid oral dosage forms. **Dissolution Technologies**. p.13-14, 2005.

GUERREIRO, C.A.M; GUERREIRO, M.M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. Considerações gerais. In _____. **Epilepsia**. 3 ed., São Paulo: Lemos, 2000. p 1-10.

GUERREIRO, C.A.M; PALMINI, A. Tratamento medicamentoso das epilepsias. In _____. **Epilepsia**. 3 ed., São Paulo: Lemos, 2000. p.319-337.

GUERREIRO, C.A.M; GUERREIRO, M.M.; Novas drogas. In _____. **Epilepsia**. 3 ed., São Paulo: Lemos, 2000. p.339-350.

ICH – Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

KIBBE, A.H. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 3. ed. Washington London: American Pharmaceutical association and Pharmaceutical Press, 2000.

KLIEMANN, A.D.F.; MONTE, T.L. Antiepilépticos. In: _____. **Farmacologia clínica-Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.535-552.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; GRIEND, C.S.; BELD, C.; SOMSEN, G.W.; JONG, G.J. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. **Pharmaceutical Technology**, 2005. p.48-66.

- KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. Dicionário Terapêutico Guanabara. Edição 2004/2005. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KULDEEP, M. P.; SUBHASH, L.B. HPTLC determination of lamotrigine in serum. **Journal of Chromatography B**, v. 823, n.2, p.152-157, 2005.
- KWAN, P.; BRODIE, M.J. Neuropsychological effects of epilepsy and antiepileptic drugs. **The Lancet**. v.357, p. 216-222, 2001.
- LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. Testes de estabilidade e fundamentos da cinética química. In:_____. **Teoria e prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001, v. 2, Cap.26, p. 1277-1355.
- LINDSAY, S. **High performance liquid chromatography: analytical chemistry by open learning**. London: ACOL Thames Polytechnic, 1987. p. 100-102.
- MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Farmácia, 2003.
- MARQUES, M. R.C.; BROWN, W. **Revista Analytica**. n.1. p.48-51, 2002.
- McFARLANE, B. V.; WRIGHT, A.; OCALLAGAN,J.; BENSO, H.A.E. Chronic Neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacology and Therapeutics**. v.75, p. 1-19, 1997.
- McNAMARA, J.O. Drugs acting io the central nervous system. In:_____. **Goodman & Gilman-As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. p.391-411.
- MARTIN, R.; KUZNIECKY, R.; HO, S.; HETHERINGTON, H.; PAN, J.; SINCLAIR, K.; GILLIAM, F.; FAUGHT, E. Cognitive effects of topiramate, gabapentin, and lamotrigine in healthy young adults. **Neurology**. v.52. p. 321-27, 1999.
- MATAR, K.M.; NICHOLLS, S.A.; BAWAZIR, S.A.; AL-HASSAN, M.I.; TEKLE, A. A rapid Liquid Chromatography Method for the Determination of Lamotrigine in Plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.17, p.525-531, 1999.
- MATTHEWS, B. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 831-856, 1999.
- MOFFAT, C.A.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. **Drugs and Poisons**. 3.ed. v.2. London Pharmaceutical Press, 2004.
- NAKANISHI, K. **Infrared Absorption Spectroscopy: Practical**. 2.ed. San Francisco Tokyo: Holden-Day: Nankodo Company, 1977.
- NUDELMAN, N. E. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Atheneo, 1975.

- PAVIA, D. L.; LANPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Infrared spectroscopy. In: _____. **Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 3.ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001a. Cap. 2, p. 13-84.
- PATIL, K.M.; BODHANKAR, S.L. Simultaneous determination of lamotrigine, phenobarbitone, carbamazepine and phenytoin in human serum by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, p.181-186, 2005.
- PELLOCK, J.M.; APPLETON, R. Use of new antiepileptic drugs in the treatment of childhood epilepsy. **Epilepsia**. v.40. s.6. p.s29-s38, 1999.
- PEZOA, R.; CONCHA, A.M.; GAETE, G. Dissolución de formas farmacêuticas sólidas. **Revista del colégio químico farmacêutico**. v. 46, n.2, p.43-51, 1990.
- PLEUVRY, B.J.; LAURETTI, G.R. Biochemical Aspects of Chronic Pain and its Relationship to Treatment. **Pharmacology and Therapeutics**.v.71, p.313-324, 1996.
- PHYSICIAN'S Desk Reference**. 54. ed. Montvale: Medicinal Economics Company, 2000.
- REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L.; MULLANEY, J. F.; ALSANTE, K. M.; HATAJIK, T. D.; MOTTO, M. G. Available Guidance and Best Practices for Conducting forced Degradation Studies. **Pharmaceutical Technology**. p. 48-56. February 2002.
- ROHRS, B. Dissolution method development for poorly soluble compounds. **Dissolution Technologies**, aug.2001.
- SALLUSTIO, B.C.; MORRIS, R.G. High Performance Liquid Chromatography Quantitation of Plasma Lamotrigine Concentrations: Application Measuring Trough Concentrations in Patients with Epilepsy. **Therapeutic Drug Monitoring**. v.19 (6), p.688-693, 1997.
- SHABIR, G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.
- SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2005.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Espectrometria no infravermelho. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000a. Cap 3, p. 67 – 134.
- SKOUG, J.W.; FREEMAN, D.T. Roteiro para Desenvolvimento e Validação do Teste de Dissolução em Formas Farmacêuticas Sólidas para Uso Oral. **Pharmaceutical Technology**. v.20. n.5.
- SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; GLAJCH. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. Hoboken: John Willey & Sons, 1997.

STAHL, M. Peak Purity Analysis in HPLC and CE using diode-array technologies. agilent technologies. Publication Number 5988-8647EN. Germany, 2003. Disponível em <[http://www. Agilent.com/Chem](http://www.Agilent.com/Chem)>.

STEPHEN, L.J.; KWUAN, P.; SHAPIRO, D.; DOMINICZAK, M.; BRODIE, M.J. Hormone Profiles in young adults with epilepsy treated with sodium valproate or lamotrigine monotherapy. **Epilepsia**.v. 42. p.1002-1006, 2001.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**. v. 2. n.3. p.12-20, 1998.

THEURILLAT, R.; KUHN, M.; THORMANN, W. Therapeutic drug monitoring of lamotrigine using capillary electrophoresis. Evaluation of assay performance and quality assurance over a 4-year period in the routine arena. **Journal Of Chromatography A**. v.979 (1-2). p.353-368, 2002.

THE UNITED STATES Pharmacopeia. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

TORRA, M.; RODAMILANS,M.; ARROYO, S.; CRBELLA, J. Optimised procedure for lamotrigine analysis in serum by high performance liquid chromatography without interferentes from other frequently coadministered anticonvulsants. **Journal Of Chromatography B**. v.22, n.5, p. 621-625, 2000.

TØNNESEN, H.H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. v.225, p.1-14, 2001.

TSRL, 2007. **Lamotrigine**. Disponível em <http://www.tsrl.com>> Acesso em 22/3/07.

VIDAL, E.; PASCUAL, C.; POU, L. Determination of lamotrigine in human serum by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**. v.736, p.295-298, 1999.

YOUSSEF, N.F.; TAHA, E.A. Development and validation of spectrophotometric, TLC and HPLC methods for determination of lamotrigine in presence of it's impurity. **CHem Pharm Bull**. v.55. (4). p.541-545, 2007.

YU, L.X.; AMIDON, G.L.; POLLI, J.E.; ZHAO, H.; MEHTA, M.U.; CONNER, D.P.; SHAH, V.P.; LESKO, L.J.; CHEN, M.; LEE, V.H.L.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics Classification System: the scientific basis for biowaiver extensions. **Pharmaceutical Research**. v.19. n. 7. p921-925, 2002.

WATELLE, M.; DEMEDTS, P.; FRANCK, F.; DE DEYN, P.P.; WAUTERS, A.; NEELS, H. Analysis of the antiepileptic phenyltriazine compound lamotrigine using gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. **Therapeutic Drug Monitoring**. v. 19. p. 460-464, 1997.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis**: a textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London: Churchill Livingstone, 2005.

WOOD, J.H. *In vitro* evaluation of physiological availability of compressed tablets. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v.42, n.3, p.120-151, 1967.

YAZDANIAN, M.; BRIGGS, K.; JANKAVSKY, C.; HAWI, A. The high solubility definition of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification system may be too strict for acidic drugs. **Pharmaceutical Research**. v.21, n.2, p.293-299, 2004.