

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

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO PRELIMINAR DE
ESTABILIDADE DE MONTELUCASTE SÓDICO EM COMPRIMIDOS
REVESTIDOS**

JULIANA ROMAN

Porto Alegre, 2008

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

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE DE MONTELUCASTE SÓDICO EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS

Dissertação apresentada por **Juliana Roman**
Para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de mestrado – Pesquisa e desenvolvimento de medicamentos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 08 de agosto de 2008 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Cristiane de Bona da Silva
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Nádia Volpato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

R758v	Roman, Juliana Validação de métodos analíticos e estudo preliminar de estabilidade de montelucaste sódico em comprimidos revestidos / Juliana Roman – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xxv, 150 p.: il., tab. Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. Montelucaste sódico. 2. Controle de qualidade de medicamentos. 3. Validação: métodos de análise de fármacos. I. Steppe, Martin. II. Título. CDU: 615.2.07
-------	--

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

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 pelo exemplo pessoal e profissional, pela orientação, apoio, confiança e amizade.

Aos professores Elfrides Eva Scherman Schapoval, Tércio Oppe e Nádia Volpato pela disponibilidade, atenção e auxílio prestados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade de aprimoramento.

Ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) pela possibilidade de realização deste trabalho.

Aos colegas do LEPCQ: Ana Rita, Andréas, Cássia, Heloísa, Júlia, Juliana, Lauren, Letícia, Magda, Vanessa, Marcelo, Clésio, Gabriela, Alini, Patrícia e Natali pelo incentivo, ajuda e amizade.

Aos colegas do LCQFar- Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico: Leila e Lorena pela atenção, auxílio, incentivo, desprendimento e amizade.

Ao LDG, em especial à Giovana e Simone por auxiliar na realização do DSC.

Ao LAGEAMB por permitir o uso dos seus equipamentos e instalações.

Às amigas Christiane e Giovana pela amizade, acolhida e constante apoio nesta etapa da minha vida.

À minha família pelo incentivo e em especial ao Tarlis pelo companheirismo, afeto, carinho e atenção.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas.....	xxi
Resumo.....	xxiii
Abstract.....	xxv
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1 Aspectos gerais	11
3.1.1 Asma brônquica.....	11
3.1.2 Fármacos usados no tratamento da asma	14
3.1.3 Montelukaste	15
3.1.3.1 Mecanismo de ação.....	17
3.1.3.2 Indicações	18
3.1.3.3 Características farmacocinéticas.....	19
3.1.3.4 Reações adversas	20
3.1.3.5 Contra- indicações	21
3.1.3.6 Interações medicamentosas.....	21
3.1.3.7 Dosagem e administração	22
3.1.3.8 Determinação do montelukaste sódico.....	23
3.1.3.9 Estabilidade do montelukaste sódico.....	25
3.2 Validação de métodos analíticos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Amostras	31
4.1.1 Substância química de referência (SQR)	31
4.1.2 Produto farmacêutico.....	31
4.2 Identificação da Substância Química de Referência (SQR)	32
4.2.1 Caracteres físicos	32
4.2.2 Solubilidade	32

4.2.3 Constantes físico-químicas.....	32
4.2.3.1 Determinação da faixa e do ponto de fusão	32
4.2.3.1.1 Material.....	32
4.2.3.1.2 Método.....	33
4.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	33
4.2.3.2.1 Material.....	33
4.2.3.2.2 Método.....	34
4.2.4 Espectrofotometria na região do Infravermelho (IV)	34
4.2.4.1 Material.....	34
4.2.4.2 Método.....	34
4.3 Análise Qualitativa.....	35
4.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	35
4.3.1.1 Material.....	35
4.3.1.2 Método.....	35
4.3.2 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta – UV	36
4.3.2.1 Material.....	36
4.3.2.2 Método.....	36
4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	37
4.3.3.1 Material.....	37
4.3.3.2 Método.....	38
4.3.4 Eletroforese capilar – EC.....	40
4.3.4.1 Material.....	40
4.3.4.2 Método.....	41
4.4 Validação dos métodos analíticos para análise quantitativa de montelucaste sódico em comprimidos revestidos.....	43
4.4.1 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta – UV	43
4.4.1.1 Material.....	43
4.4.1.2 Método.....	44
4.4.1.2.1 Especificidade	44
4.4.1.2.2 Linearidade.....	45
4.4.1.2.3 Limites de Detecção e de Quantificação	46
4.4.1.2.4 Precisão.....	47

4.4.1.2.4.1 Cálculos para determinação de montelucaste sódico em comprimidos revestidos	47
4.4.1.2.5 Exatidão.....	48
4.4.1.2.5.1 Cálculos para o teste de recuperação	49
4.4.1.2.6 Robustez	50
4.4.1.2.7 Estabilidade das soluções	50
4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	50
4.4.2.1 Material.....	50
4.4.2.2 Método.....	51
4.4.2.2.1 Especificidade	51
4.4.2.2.1.1 Avaliação da especificidade do método frente à amostra simulada dos excipientes.....	51
4.4.2.2.1.2 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada.....	52
4.4.2.2.2 Linearidade.....	53
4.4.2.2.2.1 Cálculos para a curva padrão.....	54
4.4.2.2.3 Limites de Detecção e de Quantificação	54
4.4.2.2.4 Precisão.....	54
4.4.2.2.4.1 Cálculos para determinação de montelucaste sódico em comprimidos revestidos	55
4.4.2.2.5 Exatidão.....	56
4.4.2.2.5.1 Cálculos para o teste de recuperação	57
4.4.2.2.6 Robustez	58
4.4.2.2.7 Estabilidade das soluções	58
4.4.2.2.8 Adequabilidade do sistema.....	59
4.4.3 Eletroforese capilar – EC.....	59
4.4.3.1 Material.....	59
4.4.3.2 Método.....	59
4.4.3.2.1 Especificidade	60
4.4.3.2.1.1 Avaliação da especificidade do método frente à amostra simulada dos excipientes.....	60
4.4.3.2.1.2 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada.....	61
4.4.3.2.2 Linearidade.....	62
4.4.3.2.2.1 Cálculos para a curva padrão.....	62
4.4.3.2.3 Limites de Detecção e de Quantificação	62

4.4.3.2.4 Precisão.....	63
4.4.3.2.4.1 Cálculos para determinação de montelucaste sódico em comprimidos revestidos	63
4.4.3.2.5 Exatidão.....	64
4.4.3.2.5.1 Cálculos para o teste de recuperação	65
4.4.3.2.6 Robustez	66
4.4.3.2.7 Estabilidade das soluções	66
4.4.3.2.8 Adequabilidade do sistema.....	67
4.4.4 Análise comparativa dos métodos.....	67
4.5 Estudo preliminar da estabilidade dos comprimidos revestidos de montelucaste sódico	67
4.5.1 Estabilidade térmica	67
4.5.1.1 Materiais	67
4.5.1.2 Método.....	68
4.5.2 Fotoestabilidade	68
4.5.2.1 Materiais	68
4.5.2.2 Método.....	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 Identificação da Substância Química de Referência (SQR)	73
5.1.1 Caracteres físicos	73
5.1.2 Solubilidade	73
5.1.3 Constantes físico-químicas da SQR.....	73
5.1.3.1 Ponto de fusão	73
5.1.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	74
5.1.4 Espectrofotometria na região do Infravermelho (IV)	76
5.2 Análise qualitativa.....	78
5.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	78
5.2.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)	80
5.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	82
5.2.4 Eletroforese Capilar (EC).....	84
5.3 Validação dos métodos analíticos para análise quantitativa do montelucaste sódico em comprimidos revestidos.....	89
5.3.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)	89
5.3.1.1 Especificidade	89

5.3.1.2 Linearidade	90
5.3.1.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	93
5.3.1.4 Precisão.....	93
5.3.1.5 Exatidão.....	94
5.3.1.6 Robustez	95
5.3.1.7 Estabilidade das soluções	97
5.3.2 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	97
5.3.2.1 Especificidade	98
5.3.2.1.1 Avaliação da especificidade do método frente à amostra simulada dos excipientes.....	98
5.3.2.1.2 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada.....	99
5.3.2.2 Linearidade	103
5.3.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	105
5.3.2.4 Precisão.....	106
5.3.2.5 Exatidão.....	107
5.3.2.6 Robustez	108
5.3.2.7 Estabilidade das soluções	110
5.3.2.8 Adequabilidade do sistema.....	111
5.3.3 Eletroforese Capilar (EC).....	112
5.3.3.1 Especificidade	112
5.3.3.1.1 Avaliação da especificidade do método frente à amostra simulada dos excipientes.....	112
5.3.3.1.2 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada.....	113
5.3.3.2 Linearidade	117
5.3.3.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	120
5.3.3.4 Precisão.....	121
5.3.3.5 Exatidão.....	122
5.3.3.6 Robustez	123
5.3.3.7 Estabilidade das soluções	124
5.3.3.8 Adequabilidade do sistema.....	125
5.4 Análise estatística comparativa dos métodos.....	126
5.5 Estudo preliminar da estabilidade dos comprimidos revestidos de montelucaste sódico	127

5.5.1 Estabilidade térmica	128
5.5.2 Fotoestabilidade e determinação da cinética da reação.....	131
6. CONCLUSÕES	137
7. REFERÊNCIAS	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa mundial da prevalência da asma.....	11
Figura 2 Efeitos biológicos de mediadores químicos liberados de mastócitos ativados.....	14
Figura 3 Estrutura química do montelucaste sódico.....	16
Figura 4 Curva de aquecimento do montelucaste sódico SQR realizada por DSC.....	75
Figura 5 Espectro na região do IV do montelucaste sódico SQR.....	76
Figura 6 Espectro na região do IV do montelucaste sódico SQR, expandida de 1800 a 600 cm^{-1}	77
Figura 7 Representação esquemática do cromatograma obtido por CCD na análise das soluções de montelucaste sódico SQR, de MTC sódico comprimidos e zafirlucaste comprimidos utilizando como reveladores luz UV e vapores de iodo	79
Figura 8 Perfil comparativo dos espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de montelucaste sódico SQR e de comprimidos revestidos de MTC sódico.....	80
Figura 9 Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de montelucaste sódico SQR e de montelucaste sódico comprimidos revestidos	82
Figura 10 Eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções de montelucaste sódico SQR e de comprimidos revestidos de MTC sódico	85
Figura 11 Eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções de MTC sódico SQR	87
Figura 12 Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria ultravioleta das soluções de montelucaste sódico SQR, de comprimidos de MTC sódico e da amostra simulada dos excipientes.....	90
Figura 13 Representação gráfica da curva padrão do montelucaste sódico SQR obtida por espectrofotometria de absorção no UV.....	92

Figura 14 Sobreposição dos cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de montelucaste sódico SQR e da solução da amostra simulada dos excipientes	98
Figura 15 Cromatograma obtido com a solução de montelucaste sódico na degradação térmica a 80° C durante 5 horas.....	99
Figura 16 Cromatograma obtido com a solução de montelucaste sódico submetida à radiação UV (352 nm) durante 15 minutos.....	100
Figura 17 Cromatograma obtido com a solução de montelucaste sódico submetida à oxidação em peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂ 3%, v/v) durante 2 horas.....	100
Figura 18 Cromatograma obtido com a solução de montelucaste sódico submetida à hidrólise ácida em ácido clorídrico (HCl 0,1 M) durante 2 horas.....	101
Figura 19 Cromatograma obtido com a solução de montelucaste sódico submetida à hidrólise alcalina em hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) durante 2 horas.....	101
Figura 20 Representação gráfica da curva padrão do montelucaste sódico SQR obtida por CLAE.....	104
Figura 21 Cromatograma obtido com a solução de MTC sódico SQR na concentração de 0,03 µg/ml.....	105
Figura 22 Cromatograma obtido com a solução de MTC sódico SQR na concentração de 0,09 µg/ml.....	106
Figura 23 Sobreposição dos eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções de montelucaste sódico SQR e da solução da amostra simulada dos excipientes (Placebo).....	113
Figura 24 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico em concentração de 1 mg/ml submetida à degradação térmica a 80° C durante 5 horas.....	114
Figura 25 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico em concentração de 1 mg/ml submetida à fotólise sob radiação UV (352 nm) durante 15 minutos.....	114
Figura 26 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico em concentração de 1 mg/ml submetida à oxidação em peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂ 3%, v/v) durante 2 horas.....	115

Figura 27 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico em concentração de 1 mg/ml submetida à hidrólise ácida em ácido clorídrico (HCl 0,1 M) durante 2 horas.....	115
Figura 28 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico em concentração de 1 mg/ml submetida à hidrólise alcalina em hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) durante 2 horas.....	116
Figura 29 Representação gráfica da curva padrão do montelucaste sódico SQR obtida por EC.....	119
Figura 30 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico SQR na concentração de 0,75 µg/ml.....	120
Figura 31 Cromatograma obtido com a solução de MTC sódico SQR na concentração de 2,00 µg/ml.....	121
Figura 32 Cromatograma do MTC sódico submetido a 18 minutos de exposição à radiação UV (352 nm).....	133
Figura 33 Representação gráfica da cinética de ordem zero de reação de fotodegradação obtida por CLAE após degradação forçada da solução de MTC sódico em câmara de luz UV de 352 nm.....	135
Figura 34 Representação gráfica da cinética de primeira ordem de reação de fotodegradação obtida por CLAE após degradação forçada da solução de MTC sódico em câmara de luz UV de 352 nm.....	135
Figura 35 Representação gráfica da cinética de segunda ordem obtida por CLAE após degradação forçada de solução de MTC sódico em câmara de luz UV de 352 nm.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Métodos para determinação de montelucaste sódico em fluidos biológicos encontrados na literatura científica.....	24
Tabela 2 Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	27
Tabela 3 Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	28
Tabela 4 Parâmetros de conformidade do sistema recomendações.....	39
Tabela 5 Condições cromatográficas empregadas na análise de montelucaste sódico por CLAE.....	40
Tabela 6 Condições eletroforéticas empregadas para análise de MTC por eletroforese capilar.....	42
Tabela 7 Composição da amostra simulada dos excipientes.....	45
Tabela 8 Preparo das soluções para realização do teste de recuperação por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	49
Tabela 9 Preparo das soluções para realização do teste de recuperação por cromatografia a líquido de alta eficiência.....	57
Tabela 10 Alterações nas condições de análise por CLAE para verificação da robustez do método.....	58
Tabela 11 Preparo das soluções para realização do teste de recuperação por eletroforese capilar.....	65
Tabela 12 Alterações nas condições de análise por EC para verificação da robustez do método.....	66
Tabela 13 Valores obtidos para o ponto de fusão do montelucaste sódico.....	74
Tabela 14 Atribuição das principais bandas do espectro de IV do montelucaste sódico SQR.....	77
Tabela 15 Absorvâncias obtidas na curva padrão do montelucaste sódico SQR por espectrofotometria na região do UV a 280 nm.....	91
Tabela 16 Análise de variância das absorvâncias obtidas para obtenção da curva padrão do montelucaste sódico SQR por espectrofotometria no ultravioleta.....	92

Tabela 17 Valores obtidos para determinação do LD e do LQ do montelucaste sódico determinados matematicamente através dos valores obtidos pela curva padrão.....	93
Tabela 18 Apresentação dos valores experimentais obtidos a partir da determinação do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos obtidos por UV para avaliação da precisão.....	94
Tabela 19 Resultados obtidos pelo teste de recuperação por espectrofotometria no UV para a determinação de MTC sódico em comprimidos.....	95
Tabela 20 Valores experimentais obtidos por espectrofotometria de absorção no UV para determinação da robustez do método.....	95
Tabela 21 Teste– <i>t</i> : duas amostras presumindo variâncias equivalentes para as diferentes marcas de solvente.....	96
Tabela 22 Teste– <i>t</i> : duas amostras presumindo variâncias equivalentes para os diferentes tipos de agitação.....	96
Tabela 23 Valores experimentais obtidos a partir de soluções de MTC sódico SQR num intervalo de 5 dias.....	97
Tabela 24 Áreas absolutas do montelucaste sódico SQR obtidas por CLAE para determinação da curva padrão.....	103
Tabela 25 Análise de variância das áreas absolutas obtidas para obtenção da curva padrão do montelucaste sódico SQR por CLAE.....	104
Tabela 26 Valores obtidos experimentalmente para o LD e LQ para o método por CLAE.....	105
Tabela 27 Apresentação dos valores experimentais obtidos a partir da determinação do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos obtidos por CLAE para avaliação da precisão.....	107
Tabela 28 Resultados do teste de recuperação por CLAE para determinação do MTC sódico em comprimidos revestidos.....	108
Tabela 29 Variações aplicadas ao método por CLAE na determinação do MTC sódico para avaliação da robustez do método.....	109
Tabela 30 Valores experimentais obtidos a partir de soluções de MTC sódico SQR num intervalo de 30 dias.....	110
Tabela 31 Análise de variância das áreas absolutas obtidas para obtenção da estabilidade das soluções de MTC sódico.....	110
Tabela 32 Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados para CLAE.....	111

Tabela 33 Áreas absolutas do montelucaste sódico SQR obtidas por EC para determinação da curva padrão.....	118
Tabela 34 Análise de variância das áreas absolutas obtidas para obtenção da curva padrão do montelucaste sódico SQR por EC.....	119
Tabela 35 Valores obtidos experimentalmente para o LD e LQ para o método por EC.....	120
Tabela 36 Apresentação dos valores experimentais obtidos a partir da determinação do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos obtidos por EC para avaliação da precisão.....	122
Tabela 37 Resultados do teste de recuperação por EC para determinação do MTC sódico em comprimidos revestidos.....	123
Tabela 38 Variações aplicadas ao método por EC na determinação do MTC sódico para avaliação da robustez do método.....	124
Tabela 39 Valores experimentais obtidos a partir de soluções de MTC sódico SQR num intervalo de 28 dias.....	125
Tabela 40 Parâmetros aproximados de adequabilidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados para CLAE e EC.....	125
Tabela 41 Resultados obtidos na determinação de MTC sódico em comprimidos revestidos por espectrofotometria no UV, CLAE e EC.....	126
Tabela 42 ANOVA dos valores obtidos na determinação de MTC sódico em comprimidos revestidos por espectrofotometria no UV, CLAE e EC.....	127
Tabela 43 Valores experimentais obtidos no estudo de estabilidade térmica das soluções de MTC sódico, obtidas por CLAE.....	129
Tabela 44 Valores experimentais obtidos no estudo de estabilidade térmica dos comprimidos triturados de MTC sódico, obtidas por CLAE.....	129
Tabela 45 Valores experimentais obtidos no estudo de estabilidade térmica dos comprimidos intactos de MTC sódico, obtidas por CLAE.....	130
Tabela 46 Valores experimentais obtidos no estudo de fotoestabilidade das soluções de MTC sódico, obtidas por CLAE.....	131
Tabela 47 Valores experimentais obtidos no estudo de fotoestabilidade dos comprimidos triturados de MTC sódico, obtidas por CLAE.....	132

Tabela 48 Valores experimentais obtidos no estudo de fotoestabilidade dos comprimidos intactos de MTC sódico, obtidas por CLAE..... 132

LISTA DE ABREVIATURAS

DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
e.p.m	Erro padrão da média
EC	Eletroforese capilar
GI	Graus de liberdade
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEKC	Cromatografia capilar eletrocinética micelar
MTC	Montelucaste
Rf	Fator de retenção
SQ	Soma dos quadrados
SQR	Substância química de referência
UV	Ultravioleta

RESUMO

Validação de métodos analíticos e estudo preliminar de estabilidade de montelucaste sódico em comprimidos revestidos

Palavras chave: Montelucaste sódico, controle de qualidade, validação, métodos analíticos.

O montelucaste (MTC) sódico é um agente antagonista do receptor de cisteinil-leucotrienos, utilizado para o tratamento da asma e comercializado no Brasil sob a forma de comprimidos revestidos, comprimidos mastigáveis e grânulos orais com o nome de Singulair[®]. Embora seja um medicamento amplamente comercializado, há poucas referências relativas aos métodos de análise da forma farmacêutica. Este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para o controle de qualidade do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos, bem como a realização de estudos preliminares de estabilidade térmica e de fotoestabilidade. A análise qualitativa do MTC sódico foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC). Para análise quantitativa, foram validados os métodos por espectrofotometria na região do UV, CLAE e EC. A validação foi efetuada de acordo com as guias de validação disponíveis na literatura. No estudo preliminar de estabilidade térmica utilizaram-se amostras de comprimidos revestidos submetidos à temperatura de 60° C por 35 dias. A fotoestabilidade foi realizada em câmara de luz ultravioleta de 352 nm, por um período de 72 horas. Estas amostras foram analisadas por CLAE para determinação de MTC sódico e seus produtos de degradação. Os métodos qualitativos foram efetivos para identificação do MTC sódico. Os métodos quantitativos propostos foram validados de acordo com os parâmetros analíticos preconizados, podendo ser perfeitamente intercambiáveis. O estudo preliminar de estabilidade térmica não apresentou degradação da amostra nas condições de análise empregadas. O estudo de fotoestabilidade apresentou degradação intensa nas condições testadas.

ABSTRACT

Validation of analytic methods and preliminary stability study of the sodium montelukast in coated tablets

KEYWORDS: sodium montelukast, quality control, validation, analytical methodology.

The sodium montelukast is a selective leukotriene receptor antagonist used for the treatment of asthma, available in Brazil as a coated tablets, chewable tablets and oral granules named Singulair[®]. Even though, it is widely commercialized, there are few references related to the quality control methods of its pharmaceutical dosage form. The aim of this work was the development and validation of analytical methodology for the quality control of sodium montelukast in coated tablets, as well the preliminary thermal and photostability studies. The qualitative analysis was performed by thin layer chromatography, ultraviolet spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). For quantitative analysis, the methods of ultraviolet spectrophotometry, HPLC and CE were validated. The validation of the methods was performed according to the parameters of validation guidances available in the literature. The preliminary thermal studies were evaluated by exposing samples of coated tablets to temperatures of 60 °C for 35 days. The photostability was verified in an ultraviolet light chamber of 352 nm, during 72 hours. The sodium montelukast and their degradation products were determined in the samples by HPLC. The methods employed for the qualitative analysis demonstrated to be useful for the sodium montelukast identification. The quantitative methods were validated in accordance to the analytic parameters related in the validation guides, allowing perfect interchanges. The thermal stability study had not presented sample degradation in the applied analysis conditions. The photostability study demonstrated an accentuated degradation in the described test conditions.

1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença extremamente comum, responsável por 1 a 3% de todos os atendimentos realizados em consultórios médicos, 500.000 internações hospitalares por ano e maior responsável por internações em hospitais pediátricos do que qualquer outra doença isolada. Nos Estados Unidos, mais de 5.000 crianças e adultos morrem todos os anos devido às crises de asma. Esse número poderia ser reduzido pelo tratamento apropriado (UNDEM E LICHTENSTEIN, 2003).

Existem duas grandes categorias de substâncias antiasmáticas: os broncodilatadores e os antiinflamatórios. As substâncias utilizadas como broncodilatadores incluem os agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos, as xantinas, os antagonistas dos receptores muscarínicos e os antagonistas do receptor de cisteinil-leucotrienos. As principais substâncias utilizadas pela sua ação antiinflamatória na asma são os glicocorticóides (RANG *et al.*, 2007).

Os antagonistas dos receptores de cisteinil-leucotrienos incluem o montelucaste, zafirlucaste, cinalucaste e quinlucaste. Estes fármacos inibem competitivamente os receptores de cisteinil-leucotrienos (UNDEM E LICHTENSTEIN, 2003).

O montelucaste sódico aumenta a função pulmonar, diminuindo os sintomas da asma com conseqüente decréscimo da necessidade de terapia β_2 -agonista adrenérgica suplementar de ação rápida. A redução da terapia com corticosteróides se dá em 30 a 47%, mostrando a importância da utilização de montelucaste sódico como agente antiasmático, visto que, os efeitos adversos presentes nos demais fármacos que fazem parte da terapia antiasmática, trazem conseqüências graves ao organismo (DRUG INFORMATION, 2008).

Comercialmente, é encontrado na forma de comprimidos mastigáveis de 4 e 5 mg, sachês com grânulos de 4 mg e comprimidos revestidos de 10 mg, com o nome comercial de Singulair®, marca registrada da Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda.

Apesar de sua utilização e importância terapêutica, até o momento os compêndios oficiais não descrevem métodos de análise do fármaco em preparações farmacêuticas, havendo poucos relatos na literatura de métodos para análise do mesmo. A avaliação da estabilidade deste fármaco praticamente não é relatada.

Estudos anteriores revelam que a maioria dos métodos analíticos descritos para o MTC sódico são métodos cromatográficos para determinação do fármaco em fluidos biológicos (AMIN *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1997; OCHIAI *et al.*, 1998; ALRAWITHI *et al.*, 2001; KITCHEN *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2004; ALSARRA, 2004; PAPP *et al.*, 2007). Para formas farmacêuticas, há relatos de determinação por método voltamétrico (ALSARRA *et al.*, 2005-a), extração líquida de alta pressão (HOANG *et al.*, 2002), espectrofluorimetria (ALSARRA *et al.*, 2005-b), espectroscopia no ultravioleta por derivação e cromatografia líquida de alta eficiência para montelucaste associado ao fármaco loratadina (RADHAKRISHNA *et al.*, 2003). Desta forma, o desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos são importantes para o controle de qualidade de novos fármacos que estejam sendo introduzidos na terapêutica.

A validação é essencial para definir se os métodos desenvolvidos estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Desta forma, possibilita o conhecimento das limitações e da confiabilidade nas medidas realizadas nas análises (ERMER, 2001).

Dependendo do propósito do método, alguns dos parâmetros apresentados podem deixar de ser avaliados. Deve-se ressaltar que o método pode ser considerado validado, mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos na literatura, mas que sejam criteriosamente conhecidos e, portanto, adequados aos objetivos do estudo a ser realizado (ERMER, 2001).

O desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o montelucaste sódico em comprimidos, bem como seu estudo preliminar de estabilidade, visam a colaborar com o controle de qualidade deste fármaco, tornando mais segura sua utilização e resposta terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para análise de montelucaste sódico na forma farmacêutica comprimido revestido, bem como realizar teste preliminar de sua estabilidade.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a Substância Química de Referência (SQR), através da determinação do ponto de fusão, calorimetria exploratória diferencial e espectrofotometria na região do infravermelho;
- Desenvolver método analítico de cromatografia em camada delgada, espectroscopia na região do ultravioleta, eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência, na identificação de montelucaste sódico na forma farmacêutica comprimido revestido;
- Desenvolver e validar método analítico de espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar para quantificação de montelucaste sódico na forma farmacêutica comprimido revestido;
- Analisar comparativamente os métodos propostos;
- Realizar estudos preliminares de estabilidade, para verificar a presença ou ausência de produtos de degradação de montelucaste sódico, na forma de comprimido revestido, frente a condições extremas de temperatura e luz.

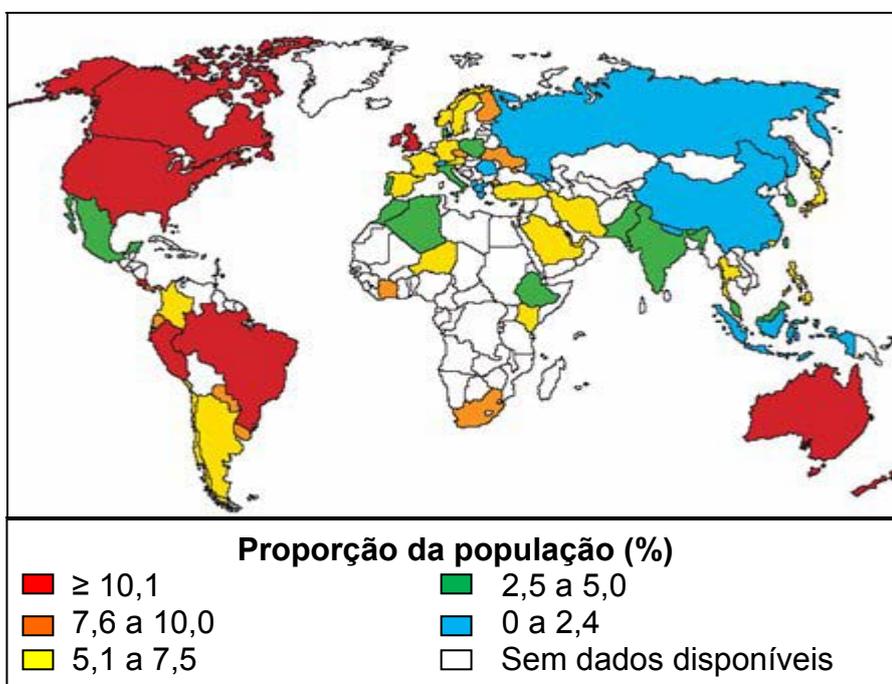
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais

3.1.1 Asma brônquica

A asma é uma doença inflamatória que pode ser definida, de maneira geral, como uma síndrome caracterizada pela obstrução “reversível” recorrente do fluxo de ar nas vias aéreas em resposta a estímulos que, por si só, não são nocivos e não afetam os indivíduos não-asmáticos (RANG *et al.*, 2007).

A asma representa uma das condições patológicas crônicas de maior incidência no mundo contemporâneo. Cronologicamente, constituía uma fisiopatologia rara no início do século, entretanto, sua prevalência em países industrializados tem crescido assustadoramente, assumindo proporções epidêmicas, acometendo cerca de 155 milhões de pessoas por todo mundo (Figura 1) (BRONCHIAL ASTHMA, 2007).



Fonte: Global Initiative for Asthma. Global Burden of Asthma. 2004.

Figura 1. Mapa mundial da prevalência da asma.

O custo do tratamento de pacientes asmáticos é substancial, estimando-se gastos da ordem de US\$ 6 bilhões nos EUA, US\$ 3 bilhões na Alemanha e US\$ 1,6 bilhões anuais na Inglaterra, acreditando-se que o custo sócio-econômico desta fisiopatologia supere o custo combinado de infecções como a tuberculose e a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), rendendo à indústria farmacêutica um lucro da ordem de US\$ 5,5 bilhões/ano (LIMA *et al.*, 2002).

A constatação do crescimento no número de mortes associadas à asma caracteriza a letalidade desta fisiopatologia e justifica o investimento destinado à busca de novos agentes antiasmáticos mais eficazes que, juntamente com o tratamento profilático, permitam reverter o significativo impacto sócio-econômico desta patologia. Dados da Organização Mundial da Saúde revelam que o coeficiente global de mortalidade por asma no Brasil apresenta uma tendência à elevação, a partir do início da década de 90, estimando-se média de 2,05 óbitos/ano em cada 100.000 habitantes (SANTO, 2006).

No Brasil, Costa Rica, Panamá, Peru e Uruguai a prevalência dos sintomas de asma na população varia de 20 a 30% (BRONCHIAL ASTHMA, 2007).

A asma e a rinite alérgica apresentam características epidemiológicas, histológicas, fisiológicas e imunopatológicas similares, e a chave para o manejo de ambas as desordens é a prevenção e alívio dos sintomas da inflamação alérgica crônica das vias aéreas superiores e inferiores (SIMONS, 2003).

A asma pode ser crônica ou aguda. Na asma crônica, o indivíduo sofre ataques intermitentes de dispnéia, sibilos e tosses, em que a dispnéia consiste em dificuldade de expirar o ar. A asma aguda grave não é facilmente revertida, pode ser fatal e exige tratamento imediato e enérgico. A asma alérgica surge quando as alterações estão relacionadas à sensibilização prévia e surgem após sua ocorrência (RANG *et al.*, 2007).

Em muitos indivíduos, a crise asmática consiste em duas fases: fase imediata após exposição ao agente desencadeante, que consiste, principalmente, em broncoespasmo, e fase tardia, que consiste num tipo especial de inflamação nos bronquíolos, caracterizada por vasodilatação, edema, secreção de muco e

broncoespasmo causados por mediadores inflamatórios liberados pelos eosinófilos e por outras células (RANG *et al.*, 2007).

A fisiopatologia do processo asmático está relacionada aos mecanismos de ativação, produção e liberação de mediadores químicos endógenos de células sanguíneas e teciduais, como mastócitos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, basófilos e plaquetas. Nestas últimas, os estudos pioneiros de Capron e colaboradores (1986) demonstraram a presença de receptores de imunoglobulina E (IgE) de baixa afinidade (FC RII) em sua superfície membranar. De forma análoga, a presença de receptores de IgE de alta afinidade (FC RI) na superfície membranar de mastócitos, confere a estas células importante papel no desenvolvimento da resposta de fase imediata da asma brônquica, por meio da liberação de autacóides aminados, como a histamina e serotonina, e lipídicos, tais como os leucotrienos cisteínicos, LTC₄, LTD₄, LTE₄ e prostaglandina D₂ (PGD₂), que atuam sinergicamente no desenvolvimento da broncoconstrição característica desta fase do processo asmático. Além disso, a ativação e degranulação de mastócitos por estímulos antigênicos levam à liberação de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e as diferentes interleucinas (IL-1, IL-4, IL-5, IL-8 e IL-13) que agem de forma sinérgica na resposta inflamatória, característica da fase tardia da asma brônquica (Figura 2). Portanto, os mastócitos são considerados como células efetoras de respostas alérgicas associadas a IgE, contribuindo, significativamente, na expressão de aspectos da resposta imune adquirida em reações de fase tardia como a inflamação crônica-alérgica das vias aéreas (LIMA *et al.*, 2002).

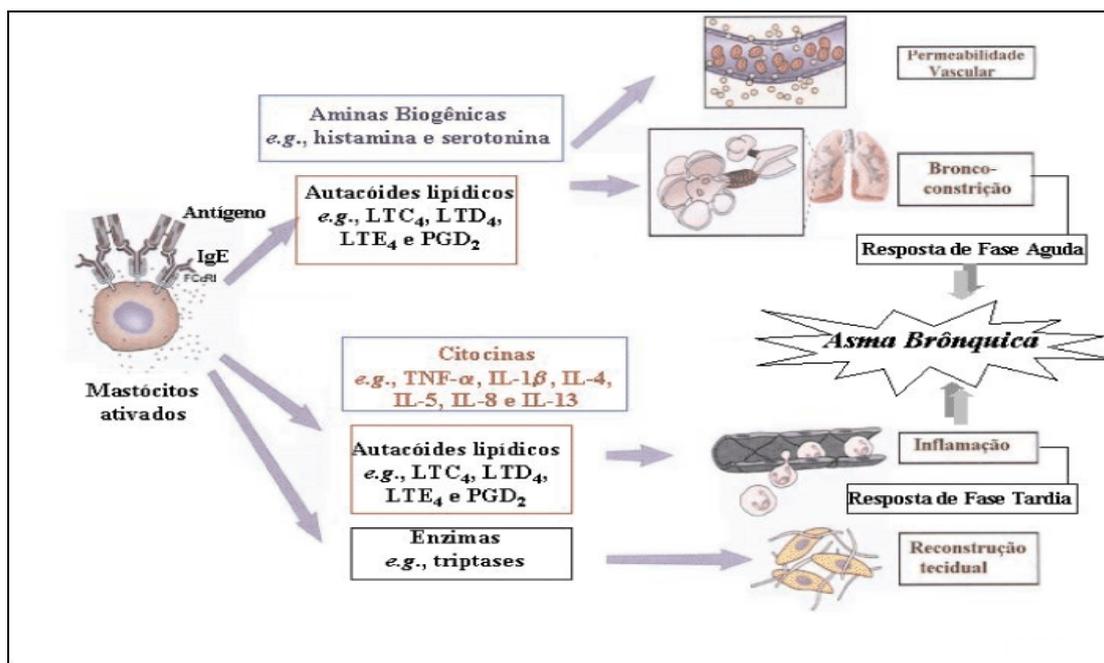


Figura 2 Efeitos biológicos de mediadores químicos liberados de mastócitos ativados (LIMA *et al.*, 2002).

Os mediadores mais importantes envolvidos no processo incluem leucotrienos C₄ e D₄, várias quimiotaxinas e quimiocinas (em ambas as fases) e proteínas dos eosinófilos que causam lesão tecidual (fase tardia) (DRUG INFORMATION, 2008).

O envolvimento de leucotrienos na asma é baseado na evidência do aumento de sua concentração nos fluidos biológicos (urina, plasma, fluido nasal) de pacientes com asma, comparado com indivíduos saudáveis (DRUG INFORMATION, 2008).

A asma é uma doença que pode ser grave e incapacitadora, e pode causar desde sérios inconvenientes à qualidade de vida do paciente, como internações ou dias de repouso em casa, com conseqüente ausência trabalhista, perdas de escolaridade para as crianças e visitas não programadas ao médico. Todavia, hoje a asma tem tratamento, seus sintomas são controláveis e o paciente pode levar uma vida normal (SANTO, 2006).

3.1.2 Fármacos usados no tratamento da asma

Existem duas grandes categorias de substâncias antiasmáticas: os broncodilatadores e os antiinflamatórios. As substâncias utilizadas como

broncodilatadores incluem os agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos, as xantinas, os antagonistas dos receptores muscarínicos e os antagonistas do receptor de cisteinil-leucotrienos. As principais substâncias utilizadas pela sua ação antiinflamatória na asma são os glicocorticóides. Os broncodilatadores mostram-se eficazes para reverter o broncoespasmo e os agentes antiinflamatórios são eficazes na inibição ou prevenção dos componentes inflamatórios (RANG *et al.*, 2007).

Os antagonistas dos receptores de cisteinil-leucotrienos incluem o montelucaste, zafirlucaste, cinalucaste e o quinlucaste. Os fármacos modificadores dos leucotrienos atuam como antagonistas competitivos dos receptores localizados em mediadores inflamatórios, ou como inibidores da sua síntese (UNDEM E LICHTENSTEIN, 2003).

O mercado mundial de antagonistas de receptores de leucotrienos movimenta bilhões de dólares e cresce anualmente, por representar a melhor alternativa terapêutica para o tratamento da asma, suplantando os agentes antiasmáticos convencionais (broncodilatadores e corticosteróides) (LIMA *et al.*, 2002).

3.1.3 Montelucaste

O montelucaste sódico (Figura 3) foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1998, como um antagonista seletivo do receptor de cisteinil leucotrienos (Cys LTs) (GRAFF *et al.*, 2003; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2005).

O montelucaste sódico é descrito quimicamente como o sal sódico do ácido 7-cloro-2-quinolinil-etenilfenil{[(1-hidroxi-etiletil)fenil]propil}tiometilciclopropanoacético. Sua fórmula empírica é $C_{35}H_{35}ClNaO_3S$, e sua massa molecular é 608,18 (FDA, 1998).

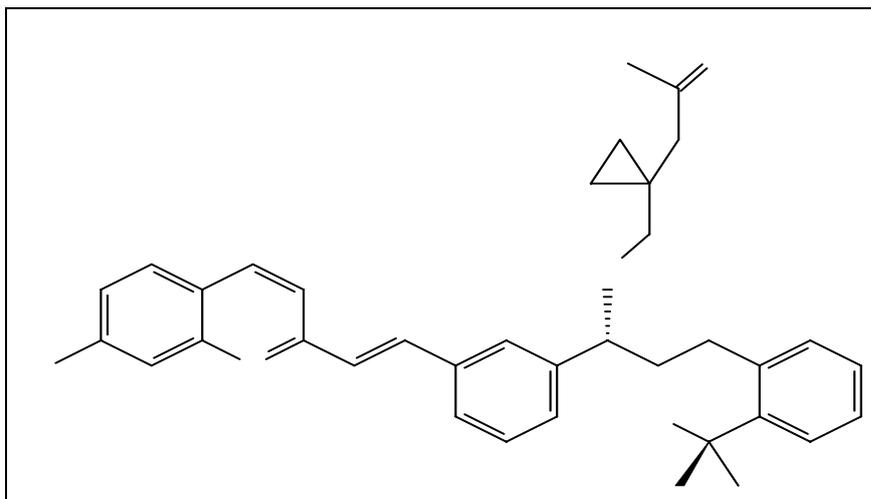


Figura 3 Estrutura química do montelucaste sódico

O montelucaste sódico apresenta propriedades físico-químicas anfífilas porque possui grupos polares e apolares em lados opostos da molécula (DRUG INFORMATION, 2008). O fármaco possui um centro quiral e é ativo apenas na forma *R*-enantiômero (LIU *et al.*, 1997).

Montelucaste sódico é um pó higroscópico, branco a quase branco. É facilmente solúvel em etanol, metanol, pouco solúvel em água, e praticamente insolúvel em acetonitrila (FDA, 1998; CLARKE'S, 2004b; DEF, 2007; DRUGBANK, 2008).

Seu registro no Chemical Abstracts (CAS) é 151767-02-1 (SWEETMAN, 2007) e sua Denominação Comum Brasileira (DCB) é montelucaste de sódio.

Possui pK_a estimado em etanol/água em proporções diferentes: (70:30, v/v) e (90:10, v/v), sendo os valores calculados $2,9 \pm 0,1$ e $2,0 \pm 0,1$ respectivamente (MERÁS *et al.*, 2007).

Montelucaste sódico apresenta-se comercialmente em comprimidos mastigáveis de 4 mg e de 5 mg; sachês com grânulos orais de 4 mg e comprimidos revestidos de 10mg, sob o nome comercial de Singulair®, marca registrada da Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda (FDA, 1998; DEF, 2007).

O montelucaste sódico, juntamente com o zafirlucaste, são os dois antagonistas de receptores de leucotrienos mais frequentemente prescritos (DEMPSEY, 2000). Nos últimos anos, além do uso no tratamento da asma e rinite alérgica, outros estudos experimentais têm evidenciado efeitos benéficos destes fármacos no controle de diferentes processos patológicos. No trato gastrointestinal, o MTC sódico tem evidenciado melhora no dano à mucosa gástrica induzido por etanol e outras substâncias deletérias (SENER *et al.*, 2005b), bem como na mucosa colônica em colites experimentais (HOLMA *et al.*, 2001) e lesões ileais e hepáticas induzidas por sepse (SENER *et al.*, 2005c). O MTC sódico também mostrou reduzir a lesão pulmonar induzida pelo tabagismo (YUKSEL *et al.*, 2003). No sistema nervoso central, observou-se efeito protetor do fármaco na isquemia cerebral focal (YU *et al.*, 2005). Em estudos experimentais com queimaduras cutâneas, por mecanismo neutrófilo-dependente, o MTC sódico tem apresentado efeitos antiinflamatórios e protetores contra lesão oxidativa da pele (KABASAKAL *et al.* 2005; SENNER *et al.*, 2005a).

Por sua ação antiinflamatória e, possivelmente, de inibição da contração cicatricial, os antagonistas de receptores de leucotrienos tem sido implicados também na prevenção e tratamento de contraturas capsulares de implantes de silicone após mamoplastias de aumento e reconstruções mamárias. A ação inibitória destes fármacos sobre os receptores Cys LTs, bem como um possível efeito supressor sobre os miofibroblastos poderiam explicar estas evidências clínicas (SCHLESINGER *et al.*, 2002; GRYSKIEWICZ, 2003; REID, GREVE e CASAS, 2005; BASTOS *et al.*, 2005; SCUDERI *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2007).

3.1.3.1 Mecanismo de ação

Os leucotrienos cisteínicos (LTC₄, LTD₄, LTE₄) são potentes eicosanóides inflamatórios, produtos do metabolismo do ácido araquidônico e liberados de várias células, incluindo mastócitos e eosinófilos (SILVA, 2006; RANG *et al.*, 2007). Esses importantes mediadores pró-asmáticos ligam-se aos receptores de leucotrienos cisteínicos (Cys LTs) (FDA, 1998).

Os Cys LTs foram correlacionados com a fisiopatologia da asma e da rinite alérgica. Na asma, os efeitos mediados pelos leucotrienos incluem broncoconstrição, secreção de muco, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de eosinófilos (SILVA, 2006; RANG *et al.*, 2007).

Os Cys LTs produzem seus efeitos biológicos ligando-se e ativando receptores específicos localizados na membrana celular das células-alvo. Dois subtipos de receptores dos Cys LTs foram caracterizados farmacologicamente (COLEMAN *et al.*, 1995). Os receptores Cys LT1 tem sido identificados em células de animais experimentais e humanas, incluindo células musculares lisas e macrófagos das vias aéreas, entre outras células inflamatórias. Os receptores Cys LT2 foram encontrados somente em células musculares lisas das vias aéreas dos humanos. Todos os antagonistas de receptores Cys LTs atualmente disponíveis inibem seletivamente os receptores de subtipo Cys LT1. Com base nos ensaios bioquímicos e farmacológicos, ele se liga com alta afinidade e seletividade ao receptor Cys LT₁ (preferindo-o a outros receptores farmacologicamente importantes das vias aéreas, tais como os receptores prostanóides, colinérgicos ou α -adrenérgicos). O MTC sódico inibe as ações fisiológicas do LTC₄, LTD₄ e LTE₄ no receptor Cys LT₁ sem atividade agonista (FDA, 1998).

O MTC sódico é um fármaco que melhora significativamente os parâmetros da inflamação, como infiltrado de eosinófilos, linfócitos e leucotrienos que causam permeabilidade microvascular, levando a edema e inchaço dos tecidos das vias aéreas e, também, a excessiva produção de muco. Os efeitos contráteis dos leucotrienos cisteínicos na musculatura lisa dentro das paredes das vias aéreas levam a broncoconstrição potente e mantida, de forma até 5.000 vezes mais potente do que a histamina (MATOS *et al.*, 2001).

3.1.3.2 Indicações

O montelucaste sódico é utilizado para o tratamento da asma em adultos e crianças a partir de 1 ano de idade (DRUG FACTS, 2004). O fármaco é muito efetivo em múltiplos parâmetros do controle da asma crônica com efeito positivo no

tratamento comparado a grupos controle, segundo BARNES e colaboradores (2001). Também é utilizado para a prevenção de broncoespasmos induzidos por exercícios (DRUG INFORMATION, 2008). Alivia os sintomas de rinite alérgica, urticária crônica e dermatite atópica (DRUG FACTS, 2004).

É efetivo isoladamente ou em associação a outros medicamentos utilizados no tratamento da asma crônica (SILVA, 2006).

A terapia antileucotriena pode ser usada concomitantemente com corticóides inalatórios, com a finalidade de redução gradativa da necessidade desses fármacos, que promovem severos efeitos adversos ao organismo (BARNES *et al.*, 2001).

3.1.3.3 Características farmacocinéticas

Montelucaste sódico é rapidamente absorvido após administração oral. O tempo de meia-vida do fármaco é em média 2,7 a 6,7 horas em pessoas saudáveis (GRAFF *et al.*, 2003). A biodisponibilidade oral média é de 64% para comprimidos revestidos de 10 mg e de 73% para comprimidos mastigáveis de 5 mg. A alimentação não tem influência clínica importante (DRUG INFORMATION, 2008).

A ligação do montelucaste sódico às proteínas plasmáticas é superior a 99%. O volume de distribuição em estado de equilíbrio é de 8 a 11 litros (FDA, 1998).

O montelucaste sódico é extensivamente metabolizado. Em estudos nos quais se utilizou doses terapêuticas, as concentrações plasmáticas dos metabólitos do MTC sódico, em estado de equilíbrio, não foram detectáveis (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2005).

A depuração plasmática do montelucaste sódico é 30,8 a 50,4 mL/min. A eliminação do fármaco não é via renal, pois menos de 0,2% do mesmo ou de seus metabólitos foram encontrados na urina. O MTC sódico é praticamente metabolizado, em sua totalidade, pelo fígado, tendo a maior parte de sua eliminação biliar (GRAFF *et al.*; 2003). Pacientes que têm a função renal comprometida, não necessitam de ajustes posológicos (BALANI *et al.*, 1997). Pacientes que têm fibrose cística podem utilizar o MTC sódico, pois esta condição não interfere na ação do

fármaco (SCHMITT *et al.*, 2002; GRAFF *et al.*, 2003). Em pacientes que têm a função hepática afetada, há um decréscimo em 41% no metabolismo do MTC sódico para comprimidos de 10 mg, tornando sua eliminação mais prolongada (DRUG FACTS, 2004).

A farmacocinética do montelucaste sódico é quase linear para doses de até 50 mg administradas pela manhã ou à noite (KNORR *et al.*, 1999; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2005).

Não há diferenças aparentes relacionadas à idade, a respeito dos parâmetros farmacocinéticos do montelucaste sódico quando comparados os dados de uma população adulta e uma população de pacientes pediátricos (MIGOYA *et al.*, 2004).

3.1.3.4 Reações adversas

Não foram detectadas diferenças significativas entre o tratamento de grupos, quanto à frequência dos efeitos colaterais ou dos efeitos colaterais individuais, em comparação com o grupo placebo em estudo realizado por KNORR e colaboradores (2001).

No estudo feito por OVERBEEK e colaboradores (2004), onde foi comparado o efeito de MTC sódico com outros medicamentos para asma e corticóides, nenhum efeito adverso foi reportado pelos grupos em tratamento.

O aparecimento esporádico de dores de cabeça, náusea, diarreia, dor abdominal, vômito, dispepsia, sinusites, dores abdominais, laringite, faringite e reações de hipersensibilidade a fórmula, que incluem urticária e angioedema, podem ocorrer após tratamento com o fármaco (DRUG FACTS, 2004).

MIGOYA e colaboradores (2004) descrevem, também, o aparecimento de diarreia e sonolência, possivelmente associadas ao tratamento com montelucaste sódico.

3.1.3.5 Contra- indicações

O montelucaste sódico é contra-indicado à pacientes com hipersensibilidade a qualquer componente da formulação (DRUG INFORMATION, 2008).

Existem várias precauções a serem observadas quanto à utilização de montelucaste sódico: o uso nos ataques agudos de asma deve ser evitado, pois este tratamento ainda não foi estabelecido; o uso na gravidez e amamentação não é recomendado, pois, o fármaco atravessa a placenta em ratas; não devem fazer uso do fármaco pacientes com menos de um ano de idade; MTC sódico não pode ser utilizado como monoterapia no tratamento de broncoconstrição induzida por exercícios; a substituição abrupta de MTC sódico por corticosteróides orais ou inalados deve ser evitada (DRUG FACTS, 2004).

3.1.3.6 Interações medicamentosas

O montelucaste sódico pode ser administrado com outros medicamentos usados rotineiramente para a profilaxia e o tratamento crônico da asma e para o tratamento da rinite alérgica. Em estudos de interações medicamentosas, a dose terapêutica recomendada de MTC sódico não apresenta efeito clinicamente importante na farmacocinética dos seguintes medicamentos: teofilina, prednisona, prednisolona, contraceptivos orais, terfenadina, digoxina e varfarina. Embora não tenham sido realizados outros estudos específicos de interação, o fármaco foi utilizado em estudos clínicos concomitantemente a uma ampla variedade de medicamentos comumente prescritos, sem evidência de interações clínicas adversas. A área sob a curva de concentração plasmática-tempo (AUC) do MTC sódico diminuiu, aproximadamente, 40% em indivíduos nos quais foi administrado fenobarbital concomitantemente (FDA, 1998; DEF, 2007; DRUG FACTS, 2004).

3.1.3.7 Dosagem e administração

O montelucaste sódico na forma farmacêutica comprimidos mastigáveis de 4 mg pode ser administrado em dose única diária, por via oral ou misturando a alimento leves, junto com as refeições (DRUG FACTS, 2004). É uma terapia efetiva para crianças asmáticas entre 1 e 5 anos de idade, geralmente bem tolerada e sem efeitos adversos clinicamente importantes (KNORR *et al.*, 2001; MIGOYA *et al.*, 2004).

A dose de MTC sódico para crianças de 6 a 14 anos foi selecionada através da identificação da dose de comprimido mastigável em administração única, que apresentava uma área sob a curva, de concentração-tempo (AUC), comparável com a obtida com os comprimidos revestidos de 10 mg em adultos. Após vários estudos farmacocinéticos a dose normatizada para pacientes entre 6 e 14 anos foi comprimido mastigável de 5 mg, em administração única diária (KNORR *et al.*, 1999).

Em adultos, estudos avaliaram múltiplas doses e intervalos de administração para determinar a dose e o regime mais adequados para o MTC sódico. O comprimido revestido de 10 mg de administração única diária foi selecionado como a menor dose que produz máximo efeito contra a obstrução pulmonar na asma crônica e na broncoconstrição induzida por exercícios. O melhor horário de administração do fármaco é à noite, período no qual se obtém nível plasmático máximo e mais rápido (4 a 7 horas), coincidindo com o período do dia em que a manifestação asmática é mais freqüente (KNORR *et al.*, 1999).

Doses de 10 mg até 200 mg produzem resultados similares, enquanto que 2 mg produz uma subdose. Além disso, estudos demonstram que a administração do fármaco em duas vezes ao dia não acrescenta nenhum benefício adicional se comparado com a administração única (KNORR *et al.*, 1999).

Segurança e tolerabilidade do MTC sódico têm sido demonstrados em adultos em doses de até 800 mg e em doses de 200 mg utilizadas por 22 semanas (MIGOYA *et al.*, 2004).

3.1.3.8 Determinação do montelucaste sódico

Foram encontrados na literatura alguns trabalhos relatando a quantificação de montelucaste sódico em fluidos biológicos e em formas farmacêuticas por diferentes técnicas analíticas.

A cromatografia a líquido de alta eficiência utilizando detector de fluorescência foi proposta para determinação de MTC sódico em fluidos biológicos. Na Tabela 1 estão demonstradas algumas condições cromatográficas descritas nos trabalhos já publicados.

Tabela 1 Métodos para determinação de montelucaste sódico em fluidos biológicos encontrados na literatura científica.

Coluna	Fase Móvel	Deteção	Referência
Apex C18 (50 x 4,6 mm, 3µm)	Acetonitrila:fosfato de amônio 20 mM (pH 3,5) (65:35, v/v)	Fluorescência $\lambda_{emis.} = 350$ nm $\lambda_{excit.} = 400$ nm	AMIN <i>et al.</i> , 1995
Chiral AGP (100 x 4,0 mm, 5µm)	(A) Acetonitrila:acetato de amônio 10 mM (pH 3,6)-(10:100, v/v) (B) Acetonitrila:acetato de amônio 10 mM (pH 5,8)-(32,5:100, v/v)	Fluorescência $\lambda_{emis.} = 350$ nm $\lambda_{excit.} = 400$ nm	LIU <i>et al.</i> , 1997
Capcell pak C18 (250 x 4,6 mm, 5µm)	Acetonitrila:tampão acetato 25 mM (80:20, v/v)	Fluorescência $\lambda_{emis.} = 350$ nm $\lambda_{excit.} = 400$ nm	OCHIAI <i>et al.</i> , 1998
Novapak C8 (100 x 8,0 mm, 4µm)	Acetato de sódio 25 mM (pH 4,0, ajustado com ac. acético):acetonitrila (20:80, v/v)	Fluorescência $\lambda_{emis.} = 350$ nm $\lambda_{excit.} = 400$ nm	AI-RAWITHI <i>et al.</i> , 2001
Apex C18 (50 x 4,6 mm, 3µm)	Acetonitrila:fosfato de amônio 20 mM (pH 3,5) (65:35, v/v)	Fluorescência $\lambda_{emis.} = 350$ nm $\lambda_{excit.} = 400$ nm	KITCHEN <i>et al.</i> , 2003
Genesis C18 (100 x 3,0 mm, 3µm)	Acetonitrila:água: ac.acético (75:25:0,25, v/v/v)	Fluorescência $\lambda_{emis.} = 350$ nm $\lambda_{excit.} = 400$ nm	SMITH <i>et al.</i> , 2004
Waters C18 (150 x 3,9 mm, 5µm)	Acetonitrila:fosfato de potássio desidrogenado 50 mM (pH 3,5) (70:30, v/v)	UV $\lambda = 345$ nm	ALSARRA, 2004
Merck KG _a A C18 (250 x 4,6mm, 5µm)	(A) Ácido fórmico:água (0,5:100, v/v) (B) Ácido fórmico: acetonitrila (0,5:100, v/v)	LC-MS	PAPP <i>et al.</i> , 2007

A determinação espectrofluorimétrica de MTC sódico em plasma humano e formas farmacêuticas foi obtida com sucesso em outro estudo, o qual baseou-se na propriedade fluorescente do fármaco em solução (ALSARRA *et al.*, 2005b).

A análise de comprimidos de MTC sódico foi descrita por alguns autores. RADHAKRISHNA e colaboradores (2003) desenvolveram uma técnica de espectroscopia no UV derivada para eliminar a interferência dos demais componentes da formulação. Foram analisadas amostras de MTC sódico e loratadina por derivação do espectro em 250 - 375 nm usando uma mistura de acetonitrila-água (80:20, v/v). Este método foi comparado com o método de CLAE, utilizando coluna C₁₈, fase móvel composta de uma mistura de acetonitrila e solução tampão de fosfato de sódio dihidrogenado (80:20, v/v) e detector UV em 225 nm. Os métodos foram validados e se mostraram adequados para a quantificação de MTC sódico e loratadina simultaneamente em formas farmacêuticas.

Um método alternativo foi estudado em substituição aos métodos cromatográficos: a determinação voltamétrica para análise de comprimidos. Este método foi comparado estatisticamente com o cromatográfico e demonstrou exatidão e precisão segundo o teste *t* de *Student* e teste *F*, respectivamente (ALSARRA *et al.*, 2005a).

A determinação de MTC sódico em formas farmacêuticas sólidas também foi avaliada pela técnica de extração líquida de alta pressão, a qual utiliza solventes similarmente a um fluido supercrítico, que, em elevadas temperaturas e pressão, extrai seletivamente os componentes da formulação, sendo analisados por CLAE. A técnica mostrou-se eficaz para determinação de MTC sódico em comprimidos (HOANG *et al.*, 2002).

3.1.3.9 Estabilidade do montelucaste sódico

As indústrias farmacêuticas realizam estudos de degradação forçada durante a etapa de pré-formulação para auxiliar na seleção de compostos e excipientes, para facilitar a seleção ou otimização da formulação e para produzir amostras para o desenvolvimento de métodos analíticos indicadores de estabilidade. Testes de

estresse proporcionam, também, informações sobre mecanismos e produtos de degradação em potencial. Tais informações são relevantes no desenvolvimento de processos de fabricação e/ou para selecionar materiais de embalagem. Esses estudos também podem ser utilizados no preparo de substâncias de referência ou na elucidação de produtos de degradação (KLICK *et al.*, 2005).

O montelucaste sódico é um composto foto-sensível com um grupo funcional trans-etenil. A forma trans é convertida em forma cis, sob irradiação de luz ultravioleta. Isto indica que proteção contra luz ultravioleta é necessária durante a experimentação (OCHIAI *et al.*, 1998).

RADHAKRISHNA e colaboradores (2003) avaliaram as amostras de MTC sódico armazenadas em condições normais de luz e sob proteção da luz. As amostras foram verificadas durante três dias e os dados foram comparados com solução recém-preparada. As soluções mantidas sob proteção da luz se mantiveram estáveis e perderam menos de 2% do teor em relação à solução recém preparada. A solução de MTC sódico mantida em condições normais de luz apresentou degradação com o tempo, obtendo-se o isômero-cis como impureza.

AL-OMARI e colaboradores (2007) demonstraram que a estabilidade do MTC sódico frente à luz e ao calor varia com sua fonte e meio. Sob efeito da luz de sódio ou neon, o montelucaste sódico apresentou máxima estabilidade, mesmo em solução. Já sob a luz UV 254 nm, a solução de MTC sódico foi totalmente degradada em 24 horas. Em pó ou em comprimidos intactos, fora da embalagem de alumínio original, o MTC sódico também não é estável em presença de luz UV. Em relação à estabilidade térmica, o meio foi determinante. Utilizando-se HCl 0,1 M e H₂O₂ 3% como meio de diluição, o MTC sódico apresentou degradação, ao contrário do obtido em meio alcalino.

3.2 Validação de métodos analíticos

O objetivo da validação de métodos analíticos é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-

quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

As características de execução de um método são expressas em termos de parâmetros analíticos que devem ser determinados durante a validação do mesmo. Estes parâmetros visam verificar a linearidade, a precisão, a exatidão, a especificidade, os limites de detecção e de quantificação e a robustez do método de análise proposto (ICH, 2005; USP 30, 2007; BRASIL, 2003).

Os testes necessários para a validação são classificados em quatro categorias conforme a Tabela 2.

Tabela 2 Classificação dos testes, segundo sua finalidade:

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
IV	Testes de identificação.

Fonte: (BRASIL, 2003)

Para cada categoria será exigido um conjunto de testes, relacionados na Tabela 3.

Tabela 3 Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Intermediária	**	**	Não		Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: (BRASIL, 2003)

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

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

Os parâmetros analíticos para a quantificação conforme a ICH (2005) são: exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), especificidade, limite de quantificação, limite de detecção, linearidade, intervalo de linearidade e robustez.

O analista deve 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 é adequado para seu propósito (ERMER, 2001).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

4.1.1 Substância química de referência (SQR)

A substância química de referência utilizada para o desenvolvimento do trabalho foi o montelucaste sódico, obtido da empresa Sequoia Research Products Ltda, Inglaterra, com teor declarado em 100%.

4.1.2 Produto farmacêutico

Comprimidos revestidos contendo 10 mg de montelucaste, adquiridos no comércio local sob o nome comercial de Singulair[®] (Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda), identificados pelo lote A005593 foram empregados para análise.

Cada comprimido contém (DEF, 2007):

- 10,4 mg de montelucaste sódico, que são equivalentes a 10,0 mg do ácido livre, como composto ativo.
- Excipientes: celulose microcristalina, lactose monoidratada, croscarmelose sódica, hidroxipropilcelulose e estearato de magnésio. O revestimento consiste de hidroxipropilmetilcelulose, hidroxipropilcelulose, dióxido de titânio, óxido vermelho de ferro, óxido amarelo de ferro e cera de carnaúba.

4.2 Identificação da Substância Química de Referência (SQR)

4.2.1 Caracteres físicos

Aspecto, cor e odor do fármaco foram avaliados conforme descrito na carta de aprovação do fármaco junto ao FDA (FDA, 1998).

4.2.2 Solubilidade

O ensaio foi realizado conforme descrito na F. Bras. IV (1988). Os solventes utilizados foram água, etanol, metanol e acetonitrila, de acordo com as informações descritas na carta de aprovação do fármaco junto ao FDA (FDA, 1998).

4.2.3 Constantes físico-químicas

4.2.3.1 Determinação da faixa e do ponto de fusão

4.2.3.1.1 Material

A substância química de referência (SQR) descrita no item 4.1.1 foi empregada para determinação do ponto e da faixa de fusão. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Farmacêutica da UFRGS.

A faixa de fusão foi determinada através do aparelho Koffler (REICHERT).

O equipamento de ponto de fusão automático METTLER TOLEDO, modelo FP81HT, acoplado a processador central FP90, foi utilizado para determinação do ponto de fusão.

4.2.3.1.2 Método

A técnica utilizada pelo aparelho Koffler (REICHERT) está fundamentada na observação dos cristais da amostra até sua completa fusão, visualizados em microscópio acoplado a um bloco aquecido por resistência. Uma pequena quantidade de amostra (SQR) foi disposta entre lâmina e lamínula e colocada sobre o bloco aquecido. As temperaturas, inicial e final da faixa de fusão foram registradas através da observação simultânea da amostra e do termômetro acoplado ao bloco metálico. Para a calibração foi utilizado o ácido benzóico (ponto de fusão 122,4 °C).

No equipamento METTLER TOLEDO, as amostras (SQR) foram introduzidas em tubos capilares de 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento e depositados nas células de aquecimento, cujo ponto de fusão é determinado automaticamente no momento em que as amostras, iluminadas por fonte de luz, coalescem e fundem por completo, dando origem a um fluido transparente, que permite a passagem de luz através do tubo capilar. Para a calibração foi utilizado o ácido benzóico (Mettler ME-18555 A.8.92 Calibration Substance, com ponto de fusão 122,4 °C), SQR que acompanha o equipamento.

Foram realizadas três determinações para o montelucaste sódico SQR em cada equipamento.

4.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

4.2.3.2.1 Material

A substância química de referência (SQR) descrita no item 4.1.1 foi empregada para determinação da DSC.

As análises foram realizadas na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, utilizando calorímetro exploratório diferencial modelo DSC-60, marca SHIMADZU, adaptado ao controlador de fluxo FC-60A, integrador TA 60 WS e software TA 60 versão 2.0, com compensação de potência, calibrado com índio (156,6° C, energia de transição – 28,45 J/g) e com zinco (419,58° C, energia de transição – 100,50 J/g).

4.2.3.2.2 Método

Para determinação da faixa de fusão por DSC, 1,8 mg de montelucaste sódico SQR foi introduzido em porta-amostra de alumínio com capacidade de 4 µl, o qual foi selado e inserido no equipamento de DSC. Esta técnica térmica compara e avalia 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.

Foi realizada a determinação da faixa de fusão da SQR por DSC utilizando rampa de aquecimento de 10 °C por minuto, sob atmosfera inerte de nitrogênio, com fluxo de 50 ml/min, até 300 °C.

4.2.4 Espectrofotometria na região do Infravermelho (IV)

4.2.4.1 Material

A substância química de referência (SQR) descrita no item 4.1.1 foi empregada para determinação da espectroscopia na região do infravermelho.

O experimento foi realizado no Laboratório da Central Analítica da Faculdade de Química – Campus do Vale (UFRGS).

O espectro na região do infravermelho do motelucaste sódico SQR, foi obtido utilizando-se espectrofotômetro FTIR, marca SHIMADZU, modelo 8300. As pastilhas destinadas à análise foram preparadas em dispersão de brometo de potássio.

4.2.4.2 Método

Em gral de ágata foram misturados 1,5 mg de montelucaste sódico SQR e 150 mg de brometo de potássio, previamente dessecado a 105 °C por duas horas.

Em seguida, a mistura foi transferida para pastilhador e a pastilha obtida foi destinada à análise espectrofotométrica.

4.3 Análise Qualitativa

4.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

4.3.1.1 Material

Para análise da cromatografia em camada delgada foram utilizadas as amostras de montelucaste sódico SQR, de comprimidos revestidos de MTC sódico, descritos nos itens 4.1.1 e 4.1.2, respectivamente, e amostra de zafirlucaste comprimidos revestidos de 20 mg obtidos no comércio local sob o nome comercial Accolate[®] (Astra Zeneca), lote 50310.

Os solventes clorofórmio (QUIMEX), acetato de etila (NUCLEAR) e acetona (QUIMEX), ambos de grau analítico, constituíram o sistema eluente. Etanol de grau analítico e papel filtro (FRAMEX) foram empregados no preparo das amostras.

A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasmas aluminizadas de gel-sílica 60 F₂₅₄ (MERCK) com 12 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de espessura de camada absorvente. Os reveladores empregados foram lâmpada ultravioleta (UV) a 254 nm e vapor de iodo, este último obtido a partir de iodo grau analítico (INCAS).

4.3.1.2 Método

Foram preparadas soluções em etanol com o montelucaste sódico SQR, comprimidos revestidos de MTC sódico e zafirlucaste comprimidos revestidos na concentração final de 500 µg/ml. As soluções foram colocadas em banho de ultrassom por 20 minutos, sendo que as soluções de comprimidos revestidos de MTC sódico e zafirlucaste foram, posteriormente, filtradas com papel filtro.

O sistema eluente foi composto por clorofórmio, acetato de etila e acetona, na proporção 10:6:1 (v/v/v), respectivamente.

A aplicação das soluções descritas acima ocorreu com o auxílio de tubos capilares, a uma distância de 1 cm da borda inferior da placa. A migração cromatográfica percorreu 10 cm a partir do ponto de aplicação, sendo as placas cromatográficas dispostas em cubas previamente saturadas com o eluente escolhido.

A visualização das manchas foi realizada após a evaporação do solvente residual através da exposição à lâmpada UV 254 nm e aos vapores de iodo, sendo, posteriormente, determinados os respectivos fatores de retenção (R_f) e o fator R_x .

As análises por CCD foram realizadas em triplicata.

4.3.2 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta – UV

4.3.2.1 Material

As amostras de montelucaste sódico SQR e comprimidos revestidos de MTC sódico descritas nos itens 4.1.1 e 4.1.2, foram utilizadas para análise.

Foram empregados etanol de grau analítico (TEDIA) e papel filtro (FRAMEX) para o preparo das amostras.

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro UV/VIS, marca SHIMADZU, modelo UV 160A, equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

4.3.2.2 Método

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de montelucaste sódico SQR, e posteriormente transferida para balão volumétrico de 100 ml com o auxílio de 70 ml de etanol. A solução foi submetida a banho de ultrassom por 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente. Foi

transferida alíquota de 2,0 ml para balão volumétrico de 20 ml, utilizando etanol como diluente, obtendo então solução com concentração final de 10,0 µg/ml.

Foi realizado o peso médio de 20 comprimidos revestidos que foram triturados a pó fino. Pesou-se quantidade de amostra equivalente a 10 mg de montelucaste sódico, que foi, em seguida, transferida para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 70 ml de etanol. Esta suspensão foi submetida a banho de ultra-som por 15 minutos, sendo o volume completado com o mesmo solvente. A suspensão obtida foi filtrada e uma alíquota de 2,0 ml desta foi transferida para balão volumétrico de 20 ml, sendo utilizado etanol como diluente. A concentração final obtida foi equivalente a 10,0 µg/ml de MTC sódico.

Os espectros foram sobrepostos e comparados quanto a seus perfis característicos a partir de leituras na faixa de comprimento entre 200 e 400 nm, utilizando etanol como branco.

4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

4.3.3.1 Material

Foram analisadas as amostras de montelucaste sódico SQR e de comprimidos revestidos de MTC sódico, descritas nos itens 4.1.1 e 4.1.2 respectivamente.

Para o preparo das soluções foi utilizado metanol em grau analítico (TEDIA) e papel filtro (FRAMEX). Para a filtragem das amostras e da fase móvel foram empregados filtros de nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro (MILLIPORE).

A fase móvel foi composta por água ultrapura produzida pelo sistema de filtros FILTROSUL modelo Meta III, acetonitrila (TEDIA) e metanol (TEDIA) de grau analítico. O pH da fase móvel foi ajustado com ácido acético glacial (NUCLEAR) e verificado em medidor de pH, marca Digimed, modelo DM-20.

O desenvolvimento e validação deste método foram realizados em cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência, marca AGILENT, modelo 1200

SÉRIES, equipado com 4 bombas de fluxo G1311A, injetor automático G1329A, termostato G1330B, desaerador G1322A, detector de arranjo de diodos G1322A e sistema de dados Chemstation. A coluna cromatográfica ZORBAX Eclipse XDB – C18 *end capped* (4,6 mm x 150 mm, 5 µm), foi utilizada nas análises descritas neste estudo.

4.3.3.2 Método

Na etapa de desenvolvimento do método por CLAE foram efetuados ensaios preliminares utilizando os sistemas cromatográficos propostos na literatura consultada.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- I. Composição da fase móvel;
- II. pH da fase móvel;
- III. Comprimento de onda;
- IV. Velocidade de fluxo.

As características de conformidade teórica dos cromatogramas obtidos a partir dos sistemas testados foram analisadas.

A conformidade do sistema cromatográfico foi avaliada de acordo com os parâmetros e recomendações apresentados na Tabela 4 (SHABIR, 2003).

Tabela 4 Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.

Parâmetros	Recomendação
Fator de retenção (k)	O pico principal deve estar bem resolvido dos demais picos e do pico não retido, geralmente $k > 2,0$.
Repetibilidade	É aconselhável $DPR \leq 1 \%$ para $N \geq 5$.
Resolução (Rs)	$R_s > 2$ entre o pico de interesse e o do interferente potencial mais próximo (impureza, excipiente, produto de degradação, padrão interno,...)
Assimetria (T)	$T \leq 2$
Pratos Teóricos (N)	Em geral deve ser maior que 2000.

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de montelucaste sódico SQR, e posteriormente transferida para balão volumétrico de 50 ml com o auxílio de 30 ml de metanol. A solução foi submetida a banho de ultra-som por 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente. Alíquota de 2,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 20 ml, utilizando metanol como diluente, obtendo-se solução com concentração final de 20,0 µg/ml.

Foi realizado o peso médio de 20 comprimidos revestidos que foram triturados a pó fino. Pesou-se quantidade de amostra equivalente a 10 mg de MTC sódico e transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de metanol. A suspensão foi submetida a banho de ultra-som por 15 minutos, sendo o volume completado com o mesmo solvente. Em seguida, a suspensão foi filtrada e uma alíquota de 2,0 ml desta foi transferida para balão volumétrico de 20 ml, sendo utilizado metanol como diluente. A concentração final obtida foi equivalente a 20,0 µg/ml de MTC sódico. As soluções foram filtradas com filtro de nylon de 0,45 µm e transferidas para frasco âmbar, para posterior análise.

A fase móvel foi preparada através da mistura de acetonitrila, água e metanol na proporção de 75:15:10 (v/v/v), respectivamente, sendo esta ajustada para pH 3,8 com ácido acético glacial. A fase móvel foi filtrada com auxílio de membrana de nylon com diâmetro de poro de 0,45 µm e desaerada com sistema acoplado ao cromatógrafo.

As condições cromatográficas para análise estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 Condições cromatográficas empregadas na análise de montelucaste sódico por CLAE.

Característica	Descrição
Coluna	C18 ZORBAX Eclipse <i>and capped</i> (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)
Fase móvel	Acetonitrila: água (pH ajustado a 3,8 com ácido acético glacial): metanol, (75:15:10, v/v).
Volume de injeção	20 µl
Fluxo da fase móvel	0,8 ml/minuto
Comprimento de onda	280 nm
Temperatura de análise	25 °C ± 1 °C

O montelucaste sódico foi identificado nos comprimidos através da comparação entre os tempos de retenção obtidos com a solução preparada com estes e o verificado para a solução de MTC sódico SQR.

4.3.4 Eletroforese capilar – EC

4.3.4.1 Material

As amostras de montelucaste sódico SQR e comprimidos revestidos de MTC sódico, descritas nos itens 4.1.1 e 4.1.2 respectivamente, foram utilizadas para análise.

Tetraborato de sódio decaidratado grau analítico (MERCK), dodecilsulfato de sódio grau analítico (SYNTH) e água ultrapura (META III-FILTROSUL) foram utilizados na composição do eletrólito para análise eletroforética. O pH do eletrólito foi verificado em potenciômetro DIGIMED modelo DM-20.

Foram empregados metanol grau analítico (TEDIA), tampão tetraborato de sódio e papel filtro (FRAMEX) para o preparo das amostras.

A análise de MTC sódico por este método ocorreu em sistema de eletroforese capilar HP^{3D}-CE (HEWLETT-PACKARD), equipado com detector de arranjo de fotodiodos. O software HP Chemstation, Rev.A.0601[403], (HEWLETT-PACKARD) foi utilizado para controle do sistema, aquisição e tratamento dos dados. Para preparação eletroforética foi empregado capilar de sílica fundida com 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo) e 75 µm de diâmetro interno (AGILENT). Para ativação e limpeza do capilar foi utilizado hidróxido de sódio (MERCK).

Membranas de éster de celulose contendo 0,45 µm de diâmetro de poro foram empregadas para filtração da água, da solução de hidróxido de sódio, do eletrólito e das amostras precedendo a análise eletroforética do MTC sódico.

4.3.4.2 Método

Na etapa de desenvolvimento do método por EC foram efetuados ensaios preliminares utilizando condições eletroforéticas diferenciadas.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- I. pH do eletrólito;
- II. Concentração do eletrólito;
- III. Voltagem;
- IV. Injeção da amostra.

Os eletroferogramas obtidos a partir dos sistemas testados foram analisados.

O eletrólito para análise foi constituído por uma mistura de tampão tetraborato de sódio 10 mM e dodecilsulfato de sódio 30 mM, sendo pH ajustado para 9,4. Esta solução foi preparada em água ultrapura e permaneceu em banho de ultra-som durante 15 minutos, sendo posteriormente filtrada através de membrana de éster de celulose de 0,45 µm de diâmetro de poro.

A ativação inicial do capilar ocorreu com lavagem de solução de hidróxido de sódio 1 M, durante 1 hora. A ativação diária do capilar consistiu em lavagens de solução de hidróxido de sódio 0,1 M, água ultrapura e eletrólito por 30, 15 e 15 minutos, respectivamente. Para as demais corridas, o capilar foi submetido à pré-condicionamento através de lavagens de solução de hidróxido de sódio 0,1 M, água ultrapura e eletrólito por 2, 2 e 3 minutos respectivamente. Após a migração de cada amostra, o capilar foi submetido ao pós-condicionamento através de lavagens de água ultrapura durante 3 minutos, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições eletroforéticas empregadas para análise de MTC por eletroforese capilar.

Característica	Descrição
Capilar de sílica fundida	48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno).
Eletrólito	Tampão tetraborato de sódio 10 mM e dodecilsulfato de sódio 30 mM, pH 9,3.
Tensão aplicada	25 kV
Injeção hidrodinâmica	50 mBar
Tempo de injeção	5 segundos
Comprimento de onda	280 nm
Pré-condicionamento	2 min NaOH 0,1 M; 2 min H ₂ O; 3 min eletrólito
Pós-condicionamento	3 min H ₂ O
Temperatura	25°C ± 1°C

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 50 mg de montelucaste sódico SQR, e posteriormente transferido para balão volumétrico de 50 ml com o auxílio de 40 ml de metanol. A solução foi submetida a banho de ultrassom por 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente. Foi transferida alíquota de 1,0 ml para balão volumétrico de 20 ml, utilizando tetraborato de sódio 10 mM como diluente, obtendo-se, então, solução com concentração final de 50,0 µg/ml.

Foi realizado o peso médio de 20 comprimidos revestidos que foram triturados a pó fino. Pesou-se quantidade de amostra equivalente a 20 mg de montelucaste sódico e transferida para balão volumétrico de 20 ml com auxílio de

15 ml de metanol. Esta suspensão foi submetida a banho de ultra-som por 15 minutos, sendo o volume completado com o mesmo solvente. Logo após, a suspensão foi filtrada. Em seguida, alíquota de 1,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 20 ml, sendo utilizado tetraborato de sódio 10 mM como diluente. A concentração final foi equivalente a 50,0 µg/ml de MTC sódico. As soluções foram filtradas com filtro de nylon de 0,45 µm e transferidas para frasco âmbar para posterior análise.

A identificação do MTC sódico presente nos comprimidos revestidos, utilizando a EC, foi determinada através da semelhança entre o tempo de migração observado na solução preparada com estes e o obtido na solução de MTC sódico SQR.

4.4 Validação dos métodos analíticos para análise quantitativa de montelucaste sódico em comprimidos revestidos

4.4.1 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta – UV

4.4.1.1 Material

As amostras de montelucaste sódico SQR e de comprimidos revestidos, descritas nos itens 4.1.1 e 4.1.2, foram utilizadas para análise. Foram empregados etanol de grau analítico (MERCK) e papel filtro (FRAMEX) para o preparo das amostras.

Os excipientes contidos na formulação dos comprimidos revestidos de montelucaste sódico, descritos no item 4.1.2, foram utilizados para avaliação da especificidade do método.

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro UV/VIS, marca SHIMADZU, modelo UV 160A, equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

4.4.1.2 Método

Os parâmetros analíticos avaliados para determinação e validação do montelucaste sódico na forma farmacêutica comprimido revestido por espectrofotometria ultravioleta estão descritos abaixo:

4.4.1.2.1 Especificidade

A possível interferência dos excipientes na determinação quantitativa de MTC sódico foi investigada, comparando os perfis espectrofotométricos da solução de montelucaste sódico SQR, comprimidos revestidos e da amostra simulada de excipientes, utilizando etanol como branco.

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de MTC sódico SQR, e posteriormente transferida para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 70 ml de etanol. A solução foi submetida a banho de ultra-som por 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente. Alíquota de 2,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 20 ml, utilizando etanol como diluente, obtendo-se solução com concentração final de 10,0 µg/ml.

O peso médio foi realizado com a pesagem de 20 comprimidos de MTC sódico. Os comprimidos foram triturados a pó fino e quantidade de amostra equivalente a 10 mg de MTC sódico foi transferida para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 70 ml de etanol. A suspensão foi submetida a banho de ultra-som por 15 minutos, sendo o volume completado com o mesmo solvente. Logo após, a suspensão foi filtrada. Alíquota de 2,0 ml foi filtrada e transferida para balão volumétrico de 20 ml, sendo utilizado etanol como diluente. A concentração resultante foi equivalente a 10,0 µg/ml de MTC sódico.

Amostra simulada dos excipientes foi preparada de forma similar à solução de comprimidos revestidos de MTC sódico pesando-se, contudo, o equivalente da mistura dos excipientes contidos em 1 comprimido de 10 mg de montelucaste sódio.

A composição da amostra simulada de excipientes está descrita na Tabela 7.

Tabela 7 Composição da amostra simulada dos excipientes.

Excipiente	Quantidade (mg) *
Celulose microcristalina	41,140
Lactose	110,950
Croscarmelose sódica	4,114
Hidroxipropilcelulose	10,285
Hidroxipropilmetilcelulose	20,570
Estearato de magnésio	2,057
Dióxido de titânio	2,057
Óxido vermelho de ferro	0,205
Óxido amarelo de ferro	0,205
Cera de carnaúba	4,114

* Quantidades aproximadas com base nas especificações de concentrações percentuais médias descritas para cada excipiente (KIBBE, 2000). A quantidade dos excipientes foi calculada de acordo com o valor, em mg, do peso médio obtido para os comprimidos (205,7 mg).

A avaliação dos perfis espectrofotométricos permitiu a determinação do melhor comprimento de onda para análise do montelucaste sódico.

4.4.1.2.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas padrão, desenvolvidas no mesmo dia, contendo sete níveis de concentrações em cada uma delas.

A solução de montelucaste sódico SQR, preparada em etanol, a uma concentração equivalente a 0,1 mg/ml, foi utilizada para a construção da curva padrão. A partir desta solução, foram transferidas alíquotas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 ml, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 20 ml, sendo utilizado como diluente etanol. As concentrações obtidas para as soluções preparadas foram respectivamente: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5 µg/ml. Cada concentração de análise foi preparada em triplicata, sendo realizadas três determinações para cada solução.

As leituras foram realizadas em comprimento de onda (λ) de 280 nm.

As médias das absorvâncias absolutas obtidas na análise de montelucaste sódico SQR foram utilizadas na obtenção da curva padrão através da construção de um gráfico de absorvância *versus* concentração.

A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA).

4.4.1.2.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LD) para o MTC sódico pelo método espectrofotometria no ultravioleta foi estabelecido a partir dos dados obtidos para a curva padrão, sendo determinado pela seguinte equação:

$$LD = (3,3. s) / I$$

Onde:

- s = desvio padrão obtido para o intercepto de três curvas padrão;
- I = inclinação média obtida nas três curvas padrão.

O limite de quantificação (LQ) para o MTC sódico pelo método espectrofotometria no ultravioleta foi estabelecido a partir dos dados obtidos para a curva padrão, sendo determinado pela seguinte equação:

$$LD = (10. s) / I$$

Onde:

- s = desvio padrão obtido para o intercepto de três curvas padrão;
- I = inclinação média obtida nas três curvas padrão.

4.4.1.2.4 Precisão

As soluções de montelucaste sódico SQR e dos comprimidos revestidos de MTC sódico foram preparadas em concentrações equivalentes a 10 µg/ml, conforme descrito no item 4.4.1.2.1.

Foram preparadas seis soluções, a partir de seis pesagens dos comprimidos revestidos triturados de MTC sódico, por dia. Para cada solução obtida, foram realizadas leituras em triplicata.

A determinação do teor de MTC sódico nos comprimidos foi determinada a partir da avaliação dos dados obtidos com a repetibilidade das análises. A precisão intermediária do método foi determinada através da avaliação intradia e interdía do desvio padrão relativo (DPR) obtido para análises efetuadas em três dias consecutivos.

4.4.1.2.4.1 Cálculos para determinação de montelucaste sódico em comprimidos revestidos

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

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

Onde:

- A_A = absorvância da solução de MTC sódico preparada com os comprimidos revestidos;
- C_{SQR} = concentração da solução de MTC sódico SQR;
- A_{SQR} = absorvância da solução de MTC sódico SQR.

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

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

Onde:

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

4.4.1.2.5 Exatidão

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação. Os resultados foram expressos em percentagem de recuperação.

Para a elaboração do teste de recuperação foram preparadas soluções de montelucaste sódico SQR e de comprimidos revestidos de MTC sódico, diluídas em etanol, ambas em concentração de 0,1 mg/ml, conforme especificado no item 4.4.1.2.1.

Foram transferidas, com auxílio de pipeta volumétrica, alíquotas de 2,0 ml da solução de MTC sódico comprimidos revestidos para balões volumétricos de 20 ml denominados de A, R₁, R₂ e R₃. Alíquotas de 0,5; 1,0 e 1,5 ml da solução de MTC sódico SQR foram transferidas para os balões denominados R₁, R₂ e R₃, respectivamente. Simultaneamente, foi transferida alíquota de 2,0 ml de solução de MTC sódico SQR para balão volumétrico de 20 ml, denominado P. O volume das soluções foi completado com etanol, e as concentrações finais foram equivalentes a 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 10,0 $\mu\text{g/ml}$ para os balões denominados A, R₁, R₂, R₃ e P, respectivamente. As soluções foram preparadas em triplicata. Para cada solução foram realizadas três determinações.

A Tabela 8 apresenta de modo esquemático o preparo das soluções para o teste de recuperação do MTC sódico.

Tabela 8 Preparo das soluções para realização do teste de recuperação por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Balão volumétrico	Volume de solução de MTC sódico* 0,1 mg/ml** (ml)	Volume de solução de MTC sódico SQR 0,1 mg/ml** (ml)	Concentração final (µg/ml)
A	2,0	----	10,0
R ₁	2,0	0,5	12,5
R ₂	2,0	1,0	15,0
R ₃	2,0	1,5	17,5
P	-----	2,0	10,0

* MTC sódico comprimidos revestidos.

** Concentração de MTC.

4.4.1.2.5.1 Cálculos para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação (R%) obtidas para o montelucaste sódico SQR foram calculadas através da equação:

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

Onde:

- C_M = concentração da solução contendo montelucaste sódico SQR e comprimidos revestidos de MTC sódico determinadas pelo método (µg/ml);
- C_A = concentração da solução contendo MTC sódico comprimidos revestidos determinada pelo método (µg/ml);
- C_P = concentração de MTC sódico SQR adicionado na solução final (µg/ml).

4.4.1.2.6 Robustez

A robustez foi avaliada através da constatação da suscetibilidade do método frente a pequenas variações nas condições espectrofotométricas, incluindo diferentes marcas de solventes e diferentes tipos de agitação.

Para realização deste ensaio foram preparadas soluções de montelucaste sódico SQR e de comprimidos revestidos de MTC sódico em etanol das marcas MERCK e TEDIA, em concentração equivalente a 10 µg/ml para ambas, conforme descrito no item 4.4.1.2.1. Para a avaliação do tipo de agitação foram preparadas soluções de montelucaste sódico SQR e de comprimidos revestidos de MTC sódico em etanol (MERCK), conforme descrito no item 4.4.1.2.1, diferindo na maneira de agitação, 15 minutos manual e 15 minutos em banho de ultra-som. As soluções foram preparadas em triplicata, sendo realizada três determinações.

4.4.1.2.7 Estabilidade das soluções

Foram avaliadas soluções de montelucaste sódico SQR, preparadas na concentração de 10 µg/ml conforme descrito no item 4.4.1.2.1. As soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, a temperatura de 2 a 8 °C (em geladeira) por 5 dias para observação da possível redução no teor do fármaco.

4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

4.4.2.1 Material

No item 4.3.3.1 estão descritos os materiais utilizados para o desenvolvimento e validação deste método.

Os excipientes contidos na formulação dos comprimidos revestidos de MTC sódico descritos no item 4.1.2, foram utilizados para realização do teste de especificidade.

Na avaliação da especificidade do método a partir da degradação forçada do fármaco, foram utilizadas solução de NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N e peróxido de hidrogênio 3%, preparados a partir de reagentes de grau analítico, câmara espelhada internamente (100x16x16 cm) com luz ultravioleta de 352 nm Ecolume (Black Light Blue Lamp-Orion UV-A, 30 W, 130 V, $1,26 \times 10^{-3}$ watts/cm²) e estufa Bacteriológica DeLeo.

Para o ensaio de robustez foi utilizada coluna cromatográfica ACE-121-1546 C18 *end capped* (150 mm x 4,6 mm; 5 µm).

4.4.2.2 Método

O procedimento proposto para análise cromatográfica foi descrito anteriormente no item 4.3.3.2 e as condições analíticas empregadas para a determinação do MTC sódico por cromatografia líquida de alta eficiência estão descritas na Tabela 5.

A validação do método proposto foi efetuada através da avaliação dos parâmetros analíticos abaixo propostos.

4.4.2.2.1 Especificidade

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

Para verificação da especificidade do método foram utilizados montelucaste sódico SQR e a amostra simulada dos excipientes especificados nos itens 4.1.1 e 4.1.2.

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de montelucaste sódico SQR, que foi posteriormente transferida para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 70 ml de metanol. A solução foi submetida a banho de

ultra-som por 15 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente. Alíquota de 4,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 20 ml, utilizando metanol como diluente, obtendo-se solução com concentração final de 20,0 µg/ml.

A solução da amostra simulada dos excipientes foi preparada da mesma forma que a solução obtida com os comprimidos revestidos de MTC sódico pesando-se, contudo, o equivalente da mistura dos excipientes contidos em comprimidos de 10 mg de MTC sódio.

A composição da amostra simulada de excipientes está descrita na Tabela 7.

As soluções obtidas foram avaliadas quanto aos seus perfis cromatográficos.

4.4.2.2.1.2 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada

A especificidade do método foi também verificada a partir da avaliação dos prováveis produtos de degradação que poderiam interferir na determinação do MTC sódico.

No mínimo três soluções foram geradas para avaliação de cada condição de estresse: a solução amostra e a solução sem adição do fármaco (placebo) submetidas à degradação; e solução de referência não submetida à degradação.

- *Degradação térmica*: aquecimento da solução amostra (0,1 mg/ml) e do placebo em estufa a 80 °C, durante 5 horas.

- *Fotólise*: exposição da solução amostra (0,1 mg/ml) e do placebo à lâmpada de radiação UV 352 nm durante 15 minutos. As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo (UV-CUVETTE MICRO-BRAND), em câmara espelhada. Cubetas com solução amostra e do placebo envoltas com papel alumínio foram, também, colocadas à câmara, com o objetivo de verificar alguma interferência devida à elevação da temperatura no seu interior.

- *Oxidação*: exposição da solução amostra (0,1 mg/ml) e do placebo, separadamente, ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 3%, v/v), na proporção de 1:5 (v/v), durante 2 horas.
- *Hidrólise ácida*: exposição da solução amostra (0,1 mg/ml) e do placebo, separadamente, ao ácido clorídrico (HCl 0,1 M), na proporção de 1:5 (v/v), durante duas horas.
- *Hidrólise alcalina*: exposição da solução amostra (0,1 mg/ml) e do placebo, separadamente, ao hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M), na proporção de 1:5 (v/v), durante duas horas.

As alíquotas da solução amostra e placebo foram neutralizadas, quando necessário, diluídas e filtradas com filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro antes de serem injetadas no cromatógrafo. Os resultados foram comparados com os da solução SQR não submetida às degradações, injetadas da mesma maneira. Dados do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foram coletados com o propósito de avaliar a pureza do pico do MTC sódico.

Os cromatogramas foram avaliados a fim de se detectar possíveis interferentes na especificidade do método.

4.4.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção de três curvas padrão, preparadas no mesmo dia, contendo sete níveis de concentrações em cada uma delas.

A curva padrão foi construída a partir de uma solução metanólica de montelucaste sódico SQR com concentração inicial de 0,1 mg/ml. Em seguida, alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 ml desta solução foram transferidas, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 20 ml. Os volumes foram completados com metanol para obtenção de concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 e 35,0 µg/ml, respectivamente. Para cada concentração em análise foram preparadas soluções em triplicata, sendo realizadas três determinações.

4.4.2.2.1 Cálculos para a curva padrão

A curva padrão foi obtida através da construção de um gráfico de concentração *versus* área absoluta. A equação da reta foi determinada a partir do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a análise de variância – ANOVA – foi realizada para verificação da linearidade do método.

4.4.2.2.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o MTC sódico pelo método de CLAE foi estabelecido a partir dos dados obtidos experimentalmente de diluições sucessivas de MTC sódico SQR, em um intervalo de concentração de 0,01 a 1,0 µg/ml. Os resultados foram avaliados através do software Chemstation disponível no equipamento, onde os limites de detecção e de quantificação encontrados foram obtidos a partir da análise do sinal-ruído.

4.4.2.2.4 Precisão

As soluções de montelucaste sódico SQR e dos comprimidos revestidos de MTC sódico foram preparadas em concentrações equivalentes a 20 µg/ml, conforme descrito no item 4.4.2.2.1.1.

Foram preparadas seis soluções, a partir de seis pesagens dos comprimidos revestidos triturados de MTC sódico, por dia. Para cada solução foram realizadas leituras em triplicata.

A determinação do teor de MTC sódico nos comprimidos foi realizada a partir da avaliação dos dados obtidos com a repetibilidade das análises. A precisão intermediária do método foi determinada através da avaliação intradia e interdia do desvio padrão relativo (DPR) obtido para análises efetuadas em três dias consecutivos.

4.4.2.2.4.1 Cálculos para determinação de montelucaste sódico em comprimidos revestidos

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

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

Onde:

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

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

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

Onde:

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

4.4.2.2.5 Exatidão

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação. Os resultados foram expressos em percentagem de recuperação.

Foram preparadas soluções de montelucaste sódico SQR e de comprimidos revestidos de MTC sódico, diluídas em metanol, ambas em concentração de 0,1 mg/ml, conforme descrito no item 4.4.2.2.1.1 para o preparo da primeira diluição.

Foram transferidas, através de pipeta volumétrica, alíquotas de 4,0 ml da solução obtida com os comprimidos revestidos de MTC sódico para balões volumétricos de 20 ml, denominados de A', R₁, R₂ e R₃. Alíquotas de 1,0; 2,0 e 3,0 ml da solução de MTC sódico SQR foram transferidas, através de pipetas volumétricas, para os balões denominados R₁, R₂ e R₃, correspondendo, respectivamente, a 25, 50 e 75% da concentração teste (20 µg/ml). Simultaneamente, foi transferida alíquota de 4,0 ml de solução de MTC sódico SQR para balão volumétrico de 20 ml, denominado P'. As soluções foram diluídas em metanol, sendo obtidas soluções com concentrações finais equivalentes a 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 e 20,0 µg/ml para os balões denominados A', R₁, R₂, R₃ e P', respectivamente.

A Tabela 9 apresenta, de modo esquemático, o preparo das soluções para o teste de recuperação do montelucaste sódico.

As soluções dos balões denominados A', R₁, R₂, R₃ e P' foram preparadas em triplicata. Para cada solução foram realizadas três determinações.

Tabela 9 Preparo das soluções para realização do teste de recuperação por cromatografia a líquido de alta eficiência.

Balão volumétrico	Volume de solução de MTC sódico* 0,1 mg/ml** (ml)	Volume de solução de MTC sódico SQR 0,1 mg/ml** (ml)	Concentração final (µg/ml)
A'	4,0	----	20,0
R ₁	4,0	1,0	25,0
R ₂	4,0	2,0	30,0
R ₃	4,0	3,0	35,0
P'	-----	4,0	20,0

* MTC sódico comprimidos revestidos.

** Concentração de MTC sódico.

4.4.2.2.5.1 Cálculos para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação (R%) obtidas para o montelucaste sódico SQR foram calculadas através da equação:

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

Onde:

- C_M = concentração da solução contendo montelucaste sódico SQR e comprimidos revestidos de MTC sódico determinadas pelo método (µg/ml);
- C_A = concentração da solução preparada com os comprimidos revestidos contendo MTC sódico determinada pelo método (µg/ml);
- C_P = concentração de MTC sódico SQR adicionado na solução final (µg/ml).

4.4.2.2.6 Robustez

A solução de montelucaste sódico SQR e a solução obtida com os comprimidos revestidos de MTC sódico foram preparadas de acordo com o descrito no item 4.4.2.2.1.1.

A robustez do método foi avaliada através da verificação da suscetibilidade a variações nas condições cromatográficas, após pequenas alterações nas proporções, pH e velocidade de fluxo da fase móvel, e através da utilização de uma segunda coluna cromatográfica. As alterações realizadas e as condições normais de análise estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 Alterações nas condições de análise por CLAE para verificação da robustez do método.

Condições normais de análise	Modificações avaliadas
Proporções da fase móvel*	
75:15:10 (v/v)	77:13:10 (v/v) e 73:17:10 (v/v)
pH da fase móvel **	
3,8	3,6 e 4,0
Fluxo da fase móvel	
0,8 ml/min	0,7 e 0,9 ml/min
Coluna cromatográfica	
Agilent Eclipse® XDB C18 <i>end capped</i> (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)	ACE® 5 C18 <i>end capped</i> (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)

*Composição da fase móvel: Acetonitrila: água: metanol.

**Valor de pH ajustado com ácido acético glacial.

4.4.2.2.7 Estabilidade das soluções

Foram preparadas soluções de montelucaste sódico SQR na concentração de 20 µg/ml conforme descrito no item 4.4.2.2.1.1, as quais foram armazenadas a temperatura de 2 a 8 °C. Estas soluções foram analisadas durante um mês para avaliar o decaimento no teor do fármaco ou possível formação de produtos de degradação.

4.4.2.2.8 Adequabilidade do sistema

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

4.4.3 Eletroforese capilar – EC

4.4.3.1 Material

No item 4.3.4.1 estão descritos os materiais utilizados para o desenvolvimento e validação deste método.

Os excipientes contidos na formulação dos comprimidos revestidos de montelucaste sódico descritos no item 4.1.2, foram utilizados para realização do teste de especificidade.

Na avaliação da especificidade do método a partir da degradação forçada do fármaco, foram utilizadas soluções de NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N e peróxido de hidrogênio 3%, preparados a partir de reagentes de grau analítico, câmara espelhada internamente (100x16x16 cm) com luz ultravioleta de 352 nm Ecolume (Black Light Blue Lamp-Orion UV-A, 30 W, 130 V, $1,26 \times 10^{-3}$ watts/cm²) e estufa Bacteriológica DeLeo.

4.4.3.2 Método

O procedimento proposto para análise eletroforética foi descrito anteriormente no item 4.3.4.2 e as condições analíticas empregadas para a determinação do montelucaste sódico por eletroforese capilar estão descritas na Tabela 6.

A validação do método proposto foi efetuada através da avaliação dos parâmetros analíticos abaixo propostos.

4.4.3.2.1 Especificidade

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

Para verificação da especificidade do método foram utilizados montelucaste sódico SQR, comprimidos revestidos de MTC sódico e a amostra simulada dos excipientes especificados nos itens 4.1.1 e 4.1.2.

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 20 mg de montelucaste sódico SQR, que foi posteriormente transferida para balão volumétrico de 20 ml com auxílio de 15 ml de metanol. A solução foi submetida a banho de ultra-som por 15 minutos e o volume completado com o mesmo solvente. Alíquota de 1,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 20 ml, utilizando solução de tetraborato de sódio decaidratado 10 mM como diluente, obtendo, então, solução com concentração final de 50,0 µg/ml.

A determinação do peso médio foi realizada com 20 comprimidos de MTC sódico. Os comprimidos foram triturados a pó fino. Pesou-se quantidade de amostra equivalente a 20 mg de MTC sódico que foi, em seguida, transferida para balão volumétrico de 20 ml, com auxílio de 15 ml de metanol. A suspensão obtida foi submetida a banho de ultra-som por 15 minutos, sendo o volume completado com o mesmo solvente. Após filtração, alíquota de 1,0 ml desta foi transferida para balão volumétrico de 20 ml, utilizando solução de tetraborato de sódio decaidratado 10 mM como diluente. A concentração final obtida foi equivalente a 50,0 µg/ml de MTC sódico.

A solução da amostra simulada dos excipientes foi preparada da mesma forma que a solução obtida com os comprimidos revestidos de MTC sódico pesando-se, contudo, o equivalente da mistura dos excipientes contidos em quantidade de amostra dos comprimidos correspondente a 20 mg de MTC sódico. A composição da amostra simulada de excipientes está descrita na Tabela 7.

As soluções obtidas foram avaliadas quanto aos seus perfis eletroforéticos.

4.4.3.2.1.2 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada

A especificidade do método foi, também, verificada a partir da avaliação dos prováveis produtos de degradação que poderiam interferir na determinação do montelucaste sódico.

No mínimo três soluções foram geradas para avaliação das condições de estresse: a solução amostra e a solução sem adição do fármaco (placebo) submetidas à degradação; e a solução de referência não submetida à degradação.

- *Degradação térmica*: aquecimento da solução amostra (1,0 mg/ml) e do placebo em estufa a 80 °C, durante 5 horas.
- *Fotólise*: exposição da solução amostra (1,0 mg/ml) e do placebo à lâmpada de radiação UV 352 nm. As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo (UV-CUVETTE MICRO-BRAND), em câmara espelhada. Cubetas com solução amostra e do placebo envoltas com papel alumínio foram, também, colocadas à câmara, com o objetivo de verificar alguma interferência devida à elevação da temperatura no seu interior.
- *Oxidação*: exposição da solução amostra (1,0 mg/ml) e do placebo, separadamente, ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 3%, v/v).
- *Hidrólise ácida*: exposição da solução amostra (1,0 mg/ml) e do placebo, separadamente, ao ácido clorídrico (HCl 0,1 M).
- *Hidrólise alcalina*: exposição da solução amostra (1,0 mg/ml) e do placebo, separadamente, ao hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M).

As alíquotas da solução amostra e placebo foram neutralizadas, quando necessário, diluídas e filtradas com filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro antes de serem analisadas. Os resultados foram comparados com os da solução SQR não submetida às degradações. Dados do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foram coletados com o propósito de avaliar a pureza do pico de montelucaste sódico.

Os eletroferogramas foram avaliados a fim de se detectar possíveis interferentes na especificidade do método.

4.4.3.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção de três curvas padrão desenvolvidas no mesmo dia, contendo sete níveis de concentrações em cada uma delas.

A curva padrão foi construída a partir de uma solução de montelucaste sódico SQR com concentração inicial de 1,0 mg/ml em metanol. Em seguida, alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 ml desta solução foram transferidas, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 50 ml. Os volumes foram completados com tetraborato de sódio decaidratado 10mM para obtenção de concentrações de 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 80,0 e 100,0 µg/ml, respectivamente. Para cada concentração em análise foram preparadas soluções em triplicata, sendo realizadas três determinações para cada solução.

4.4.3.2.2.1 Cálculos para a curva padrão

A curva padrão foi obtida através da construção de um gráfico de concentração *versus* área absoluta. A equação da reta foi determinada a partir do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a análise de variância – ANOVA – foi realizada para verificação da linearidade do método.

4.4.3.2.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o montelucaste sódico pelo método de EC foi estabelecido a partir dos dados obtidos experimentalmente de diluições sucessivas de MTC sódico SQR, em um intervalo de concentração de 1,0 a 6,0 µg/ml. Os resultados foram avaliados através do software Chemstation

disponível no equipamento, onde os limites de detecção e de quantificação encontrados foram obtidos a partir da análise do sinal-ruído.

4.4.3.2.4 Precisão

As soluções de montelucaste sódico SQR e dos comprimidos revestidos de MTC sódico foram preparadas em concentrações equivalentes a 50 µg/ml, conforme descrito no item 4.4.3.2.1.1.

Foram preparadas seis soluções a partir de seis pesagens dos comprimidos revestidos triturados de MTC sódico por dia, e para cada solução obtida foram realizadas leituras em triplicata.

A determinação do teor de MTC sódico nos comprimidos foi realizada a partir da avaliação dos dados obtidos com a repetibilidade das análises. A precisão intermediária do método foi determinada através da avaliação intradia e interdia do desvio padrão relativo (DPR) obtido para análises efetuadas em três dias consecutivos.

4.4.3.2.4.1 Cálculos para determinação de montelucaste sódico em comprimidos revestidos

A concentração (C_A), em µg/ml, das soluções de comprimidos revestidos de MTC sódico foi determinada através da equação:

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

Onde:

- A_A = área absoluta da solução de MTC sódico presente nos comprimidos revestidos;
- C_{SQR} = concentração da solução de MTC sódico SQR;

- A_{SQR} = área absoluta da solução de MTC sódico SQR.

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

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

Onde:

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

4.4.3.2.5 Exatidão

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação. Os resultados foram expressos em percentagem de recuperação.

Foram preparadas soluções de montelucaste sódico SQR e de comprimidos revestidos de MTC sódico, diluídas em metanol, ambas em concentração de 1,0 mg/ml, conforme descrito no item 4.4.3.2.1.1 para o preparo da primeira diluição. As soluções foram novamente diluídas transferindo-se alíquotas de 5,0 ml para balões volumétricos de 20 ml, utilizando como diluente solução de tetraborato de sódio decaidratado 10 mM, para concentração final de 250 $\mu\text{g/ml}$.

Foram transferidas, através de pipeta volumétrica, alíquotas de 4,0 ml da solução obtida com os comprimidos revestidos de MTC sódico para balões volumétricos de 20 ml denominados de A', R₁, R₂ e R₃. Alíquotas de 1,0; 2,0 e 3,0 ml da solução de montelucaste sódico SQR foram transferidas, para os balões denominados R₁, R₂ e R₃, correspondendo, respectivamente, a 25, 50 e 75% da concentração teste (50 $\mu\text{g/ml}$). Simultaneamente, foi transferida alíquota de 4,0 ml de solução de montelucaste SQR para balão volumétrico de 20 ml, denominado P'.

As soluções foram diluídas em tetraborato de sódio decaidratado 10 mM, sendo obtidas soluções com concentrações finais equivalentes a 50,0; 62,5; 75,0; 87,5 e 50,0 µg/ml para os balões denominados A', R₁, R₂, R₃ e P', respectivamente.

A Tabela 11 apresenta, de modo esquemático, o preparo das soluções para o teste de recuperação do montelucate sódico.

As soluções dos balões denominados A', R₁, R₂, R₃ e P' foram preparadas em triplicata. Para cada solução foram realizadas três determinações.

Tabela 11 Preparo das soluções para realização do teste de recuperação por eletroforese capilar.

Balão volumétrico	Volume de solução de MTC sódico* 250 µg/ml**	Volume de solução de MTC sódico SQR 250 µg/ml**	Concentração final (µg/ml)
A'	4,0	----	50,0
R ₁	4,0	1,0	62,5
R ₂	4,0	2,0	75,0
R ₃	4,0	3,0	87,5
P'	-----	4,0	50,0

* MTC sódico comprimidos revestidos.

** Concentração de MTC sódico.

4.4.3.2.5.1 Cálculos para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação (R%) obtidas para o montelucate sódico SQR foram calculadas através da equação:

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

Onde:

- C_M = concentração da solução contendo montelucate sódico SQR e comprimidos revestidos de MTC sódico determinadas pelo método (µg/ml);

- C_A = concentração da solução preparada com os comprimidos revestidos contendo MTC sódico determinada pelo método ($\mu\text{g/ml}$);
- C_P = concentração de MTC sódico SQR adicionado na solução final ($\mu\text{g/ml}$).

4.4.3.2.6 Robustez

A solução de montelucaste sódico SQR e a solução obtida com os comprimidos revestidos de MTC sódico foram preparadas de acordo com o descrito no item 4.4.3.2.1.1.

A robustez do método foi avaliada através da verificação da suscetibilidade a variações nas condições eletroforéticas após pequenas alterações no pH e concentração do eletrólito, voltagem aplicada ao sistema e tempo de injeção da amostra. As alterações realizadas e as condições normais de análise estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12 Alterações nas condições de análise por EC para verificação da robustez do método.

Condições normais de análise	Modificações avaliadas
pH do eletrólito*	
9,4	9,3 e 9,5
Concentração do eletrólito	
10 mM	8 mM e 12 mM
Tensão aplicada	
25 kV	24 kV e 26 kV
Tempo de injeção da amostra	
5 segundos	4 e 6 segundos

* Eletrólito: Tetraborato de sódio decaidratado 10 mM + Dodecilsulfato de sódio 30 mM.

4.4.3.2.7 Estabilidade das soluções

Foram preparadas soluções de montelucaste sódico SQR na concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ conforme descrito no item 4.4.3.2.1.1, as quais foram armazenadas a

temperatura de 2 a 8 °C. Estas soluções foram analisadas durante 28 dias para avaliar o decaimento no teor do fármaco ou possível formação de produtos de degradação.

4.4.3.2.8 Adequabilidade do sistema

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

4.4.4 Análise comparativa dos métodos

A análise comparativa dos métodos propostos foi realizada através de análise de variância (ANOVA).

4.5 Estudo preliminar da estabilidade dos comprimidos revestidos de montelucaste sódico

4.5.1 Estabilidade térmica

4.5.1.1 Materiais

Nos itens 4.1.1 e 4.1.2 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 60 °C ± 1 °C.

Os demais equipamentos e reagentes estão descritos no item 4.3.3.1.

4.5.1.2 Método

Foi preparada solução metanólica de comprimidos de MTC sódico a uma concentração de 0,2 mg/ml, conforme descrito no item 4.3.3.2, e acondicionada em frascos de vidro âmbar. As amostras foram colocadas em estufa a temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e retiradas em intervalos de tempo de 1, 3, 5, 10, 15 e 20 dias, em triplicata.

Comprimidos foram triturados a pó fino e após a determinação do peso médio, quantidades equivalentes a 10 mg de montelucaste sódico foram acondicionados em frascos de vidro âmbar, assim como comprimidos intactos foram colocados sobre vidros de relógio. As amostras foram colocadas em estufa, separadas por intervalos de tempo de 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias, em triplicata. Após os respectivos intervalos de tempo, as amostras foram retiradas da estufa e preparadas conforme descrito no item 4.3.3.2 até concentração final de 20 $\mu\text{g/ml}$.

Amostras não armazenadas a temperatura empregada foram consideradas como tempo zero de exposição térmica, e submetidas ao mesmo tratamento das demais. A solução de montelucaste sódico SQR foi preparada na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$, conforme descrito no item 4.3.3.2.

A análise quantitativa das amostras de MTC sódico foi realizada por CLAE, utilizando o sistema cromatográfico descrito na Tabela 5, com o objetivo de verificar a possível redução do teor e a formação de produtos de degradação.

4.5.2 Fotoestabilidade

4.5.2.1 Materiais

Nos itens 4.1.1 e 4.1.2 estão descritos os materiais utilizados para o desenvolvimento do estudo preliminar de fotoestabilidade.

A avaliação preliminar da fotoestabilidade foi desenvolvida em câmera espelhada internamente, com dimensões de 100 x 16 x 16 cm, contendo lâmpada de

radiação UV 352 nm (Black Light Blue Lamp-Orion UV-A, 30 W, 130 V, 1,26 x 10⁻³ watts/cm²). Cubetas (UV-CUVETTE MICRO-BRAND) foram utilizadas para acondicionar a solução amostra de montelucaste sódico.

Os demais equipamentos e reagentes estão descritos no item 4.3.3.1.

4.5.2.2 Método

Foi preparada solução metanólica a partir de comprimidos de MTC sódico, a uma concentração de 0,2 mg/ml, conforme descrito no item 4.3.3.2. As amostras foram colocadas em câmara espelhada separadas por intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15 e 18 minutos, em triplicata.

Comprimidos foram triturados a pó fino e após a determinação do peso médio, quantidades equivalentes a 10 mg de MTC sódico foram espalhados, uniformemente, sobre vidros de relógio e colocados em câmara espelhada, separados por intervalos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 32 horas, em triplicata.

Comprimidos intactos foram colocados sobre vidros de relógio. As amostras foram colocadas em câmara espelhada separadas por intervalos de tempo de 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas, em triplicata.

Controles com amostra de MTC sódico em solução, comprimidos triturados e intactos, envoltos com papel alumínio foram colocados à câmara com o objetivo de verificar alguma interferência devida à elevação da temperatura em seu interior.

Após os respectivos intervalos de tempo, as amostras foram retiradas da câmara e preparadas conforme descrito no item 4.3.3.2 até concentração final de 20 µg/ml.

Amostras não armazenadas na câmara foram consideradas como tempo zero de exposição à lâmpada UV, e submetidas ao mesmo tratamento das demais tomadas de amostra. A solução de MTC sódico SQR foi preparada na concentração de 20 µg/ml, conforme descrito no item 4.3.3.2.

A análise quantitativa das amostras de MTC sódico foi realizada através de CLAE, utilizando o sistema cromatográfico descrito na Tabela 5, com o objetivo de verificar a possível redução do teor e a formação de produtos de degradação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação da Substância Química de Referência (SQR)

5.1.1 Caracteres físicos

O fármaco apresentou-se como pó higroscópico, branco e inodoro, resultado que indica conformidade com a carta aprovada do montelucaste sódico apresentada pelo FDA.

5.1.2 Solubilidade

A solubilidade foi testada conforme descrito no item 4.2.2. O fármaco apresentou-se livremente solúvel em metanol e etanol, levemente solúvel em água e muito pouco solúvel em acetonitrila. O resultado está de acordo com a carta aprovada do montelucaste sódico apresentada pelo FDA.

5.1.3 Constantes físico-químicas da SQR

5.1.3.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão do montelucaste sódico foi determinado em dois equipamentos de acordo com o item 4.2.3.1. Os valores obtidos em três determinações do ponto de fusão do fármaco estão apresentados na Tabela 13. Utilizou-se o ácido benzóico (122,4 °C) para calibração.

Tabela 13 Valores obtidos para a faixa e ponto de fusão do montelucaste sódico.

Equipamento	1	2	3
Koffler (Reichert)	59 °C a 71 °C	60 °C a 73 °C	56 °C a 65 °C
Mettler Toledo FP 90	66,5 °C	67,0 °C	67,1 °C

O ponto de fusão para o montelucaste sódico não é apresentado na literatura.

A determinação da faixa e do ponto de fusão são testes físico-químicos que auxiliam a identificação dos fármacos, entretanto não possibilitam a conclusão definitiva da identidade dos compostos pesquisados. Estas análises fornecem informações do grau de pureza do produto em ensaio, sendo possível a constatação da presença de contaminantes através de alteração no valor obtido (F. BRAS., 1988).

Os valores obtidos para a faixa e o ponto de fusão do montelucaste sódico, demonstram que a técnica não é adequada para identificação da SQR.

Devido ao tamanho da estrutura química do MTC sódico, com peso molecular de 608,18, esperava-se um ponto de fusão elevado. A ampla faixa de fusão observada, bem como os reduzidos valores de temperatura podem ser atribuídos a baixa energia de coesão intramolecular que dificulta a determinação precisa do ponto de fusão. Além disso, sais de compostos orgânicos na forma salina apresentam intervalo de temperatura considerável, mesmo estando puros (BENVENUTI, 2006).

A pureza e a identificação do fármaco não podem ser constatadas através deste teste devido à impossibilidade de comparação de resultados com a literatura.

5.1.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Na Figura 4 encontra-se a curva de aquecimento obtida na análise do ponto de fusão do montelucaste sódico SQR.

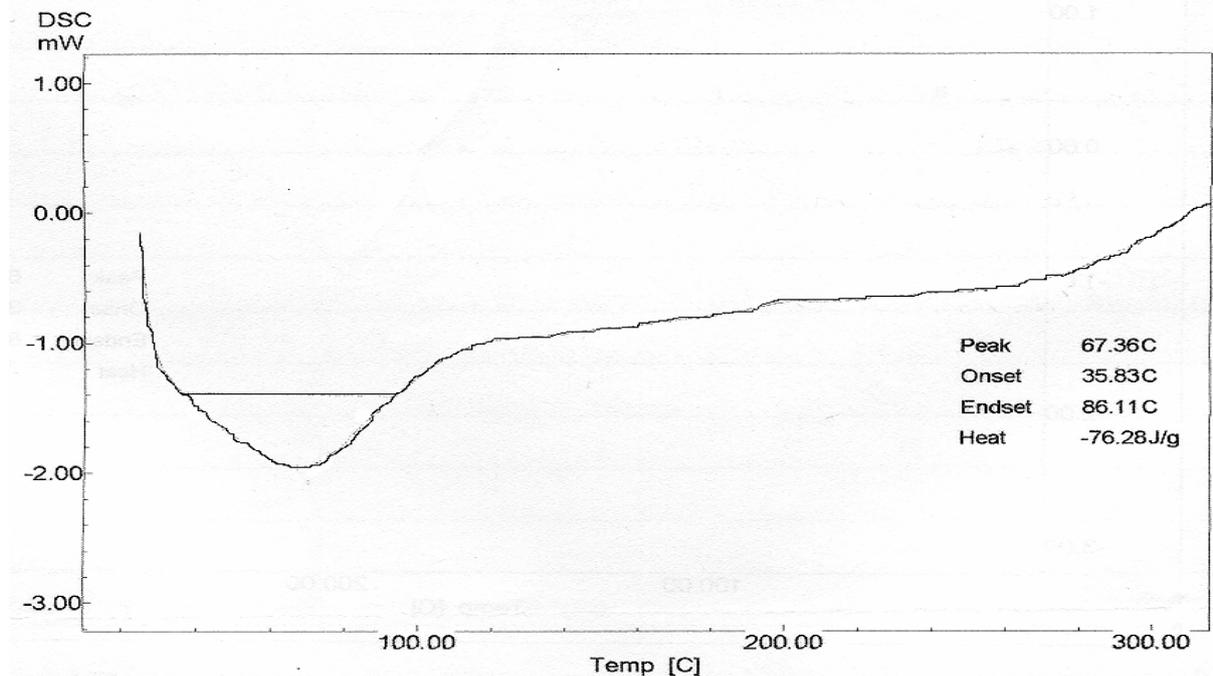


Figura 4 Curva de aquecimento do montelucaste sódico SQR realizada por DSC.

A calorimetria exploratória diferencial (*DSC – differential scanning calorimetry*) é o método de análise térmica mais amplamente utilizada, no qual, as diferenças no fluxo de calor na substância amostra e referência são medidas como uma função da temperatura da amostra, enquanto estas são submetidas a um programa de temperatura controlada. Trata-se de um método calorimétrico no qual são medidas diferenças em energia (BRITTAIN *et al.*, 1991; SKOOG *et al.*, 2002).

A *DSC* é, freqüentemente, a técnica de análise térmica preferida devido à capacidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância. A *DSC* fornece a temperatura de fusão com a exatidão que métodos clássicos, ocasionalmente, não permitem, além de fornecer a entalpia de fusão, indicar a pureza de uma amostra, determinando se esta sofreu alguma degradação, decomposição ou conversão polimórfica durante o processo de fusão (CLAS *et al.*, 1999).

Os valores obtidos na curva de aquecimento do MTC sódico mostram que a *DSC* não é uma técnica adequada como indicador de identidade e pureza da SQR e a ausência de um pico afilado impede a determinação da pureza do fármaco. Os resultados se equivaleram em relação à medida da faixa e ponto de fusão através dos equipamentos Koffler (Reichert) e Mettler Toledo.

A falta de dados na literatura indica que as técnicas termoanalíticas não constituem ferramentas adequadas para assegurar a pureza do MTC sódico.

5.1.4 Espectrofotometria na região do Infravermelho (IV)

A espectrofotometria no IV é um ensaio de identificação por excelência (F. Bras. IV, 1988). A análise espectrofotométrica do montelucaste sódico SQR na região do infravermelho foi realizada de acordo com o item 4.2.4 e o espectro está ilustrado nas Figuras 5 e 6.

As bandas de absorção características do fármaco, e as possíveis atribuições, com base em bibliografia de referência, encontram-se na Tabela 14.

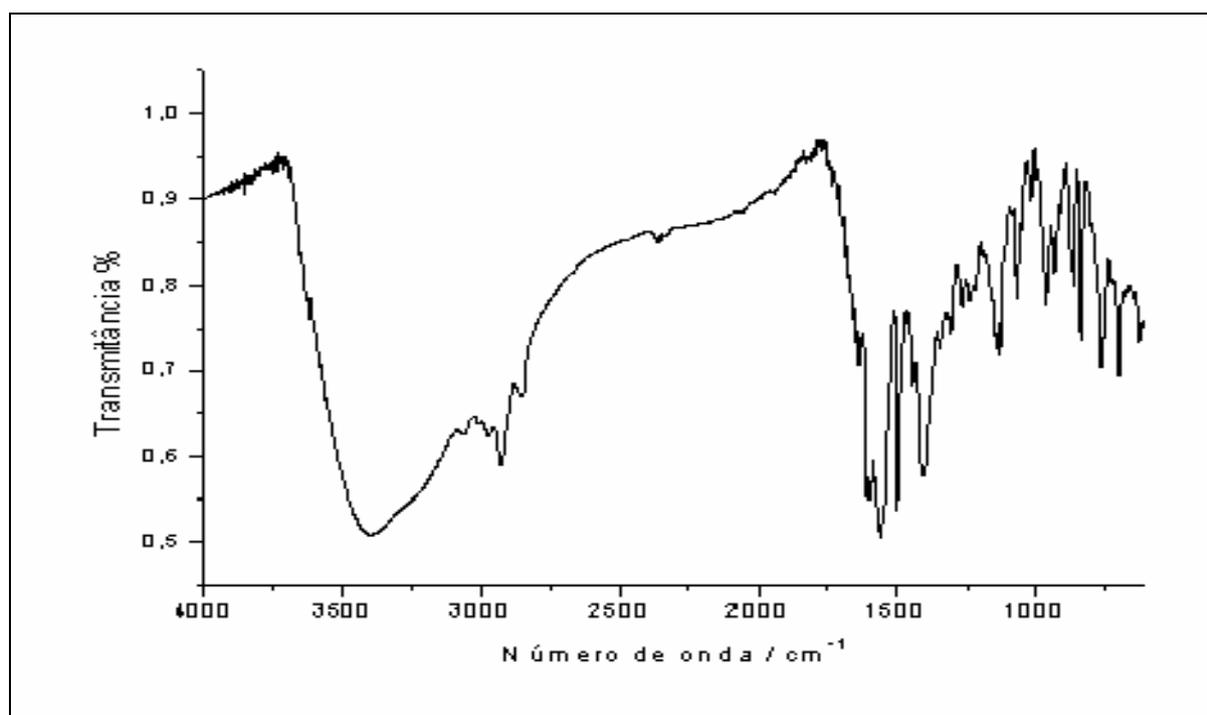


Figura 5 Espectro na região do IV do montelucaste sódico SQR.

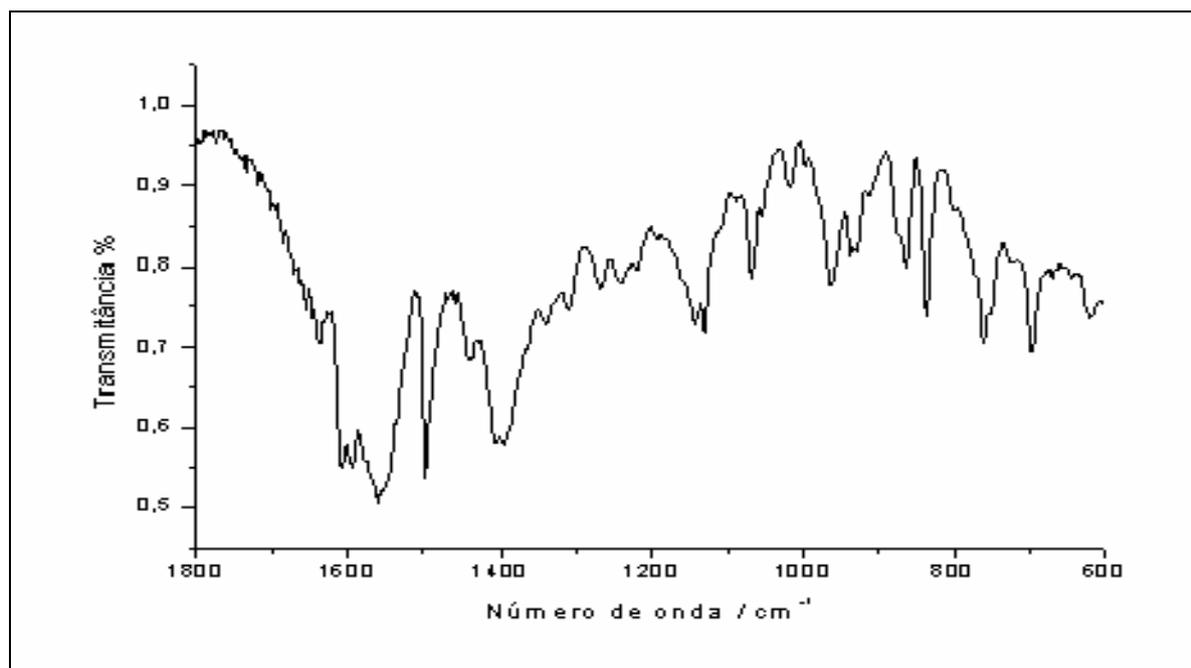


Figura 6 Espectro na região do IV do montelucaste sódico SQR, expandida de 1800 a 600 cm^{-1} .

Tabela 14 Atribuição das principais bandas do espectro de IV do montelucaste sódico SQR.

Frequência de absorção (cm^{-1})	Atribuição
696	Deformação angular fora do plano das ligações C=C do anel ^a
1150	Deformação axial de OH ^c
1406	Deformação axial simétrica do ânion carboxilato ^b
1496	Deformação axial de C=C do anel ^a
< 1500	Região de impressão digital ^d
1560	Deformação axial assimétrica do ânion carboxilato ^a
1608	Deformação axial de C=N de anel ^c
1625	Vibração do anel quinolínico ^c
2921	Deformação axial de C-H de metila ^b
3396	Deformação axial de OH ^b

a (Silverstein; Webster, 2000a), b (Pavia *et al.*, 2001), c (Nakanishi, 1977) e d (Watson, 2005).

A análise espectrofotométrica na região do infravermelho é um dos métodos mais empregados para identificação de fármacos, já que é capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais, com exceção dos isômeros ópticos (CIENFUGOS; VAITSMAN, 2000). O espectro de infravermelho permite determinar características estruturais da molécula através da análise das bandas características dos grupamentos químicos determinados no espectro. Certamente, a identificação de uma substância torna-se mais simples quando se compara o espectro da amostra em análise com o da substância de referência, uma vez que uma simples molécula pode originar um complexo espectro (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000a).

Na ausência de um espectro de infravermelho para fins de comparação, a atribuição dos picos foi efetuada considerando a região de absorção, o formato e a intensidade dos picos. O íon carboxilato dá origem a duas bandas, uma das quais, em 1560 cm^{-1} , é intensa e provém da deformação axial assimétrica. A outra mais fraca, observada em 1406 cm^{-1} , provém da deformação axial simétrica. A banda observada em 1608 é característica de ligação C=N de anel e a banda de pequena intensidade em 1625 provém de vibração do anel quinolínic. A banda observada em 3396 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial O-H, característica dos ácidos carboxílicos. Sais do íon carboxilato possuem freqüentemente bandas largas na região de 3400 cm^{-1} devido ao fato de serem higroscópicos.

A análise por espectrofotometria na região do infravermelho auxiliou na identificação da substância química utilizada como referência.

5.2 Análise qualitativa

5.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os cromatogramas do montelucaste sódico SQR, da amostra de comprimidos de MTC sódico e da amostra de comprimidos de zafirlucaste estão apresentados na Figura 7.

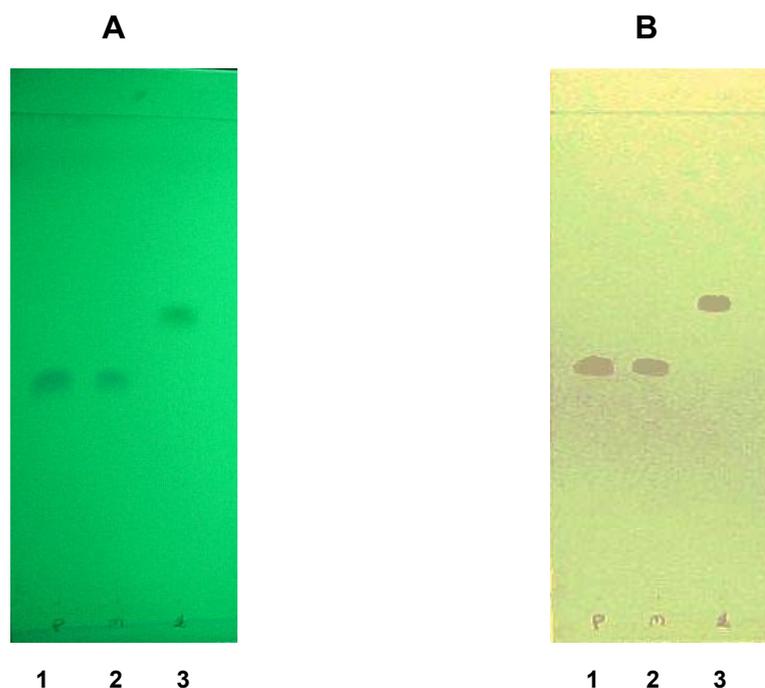


Figura 7 Representação esquemática do cromatograma obtido por CCD na análise das soluções de montelucaste sódico SQR (1) de MTC sódico comprimidos (2) e zafirlucaste comprimidos (3), utilizando como reveladores luz UV em λ de 254 nm (A) e vapores de iodo (B).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de fácil execução e compreensão, versátil e com baixo custo se comparada às demais técnicas analíticas empregadas na identificação de compostos.

Previamente foi realizada pesquisa bibliográfica a fim de encontrar algum trabalho que descrevesse técnica por cromatografia em camada delgada para o montelucaste sódico, sendo verificada a ausência de tais relatos na literatura consultada.

Para o desenvolvimento de um método destinado à identificação de MTC sódico através da CCD foi realizado um estudo inicial com a combinação de alguns solventes orgânicos, entre os quais, etanol, metanol, clorofórmio, acetato de etila em várias combinações e proporções, a fim de verificar qual o melhor sistema eluente a ser empregado na análise.

O sistema eluente composto pela mistura de clorofórmio, acetato de etila e acetona, na proporção 10:6:1 (v/v/v), respectivamente, permitiu a adequação do

sistema cromatográfico e a determinação de R_f satisfatórios para o objetivo proposto, apresentando reprodutibilidade e seletividade.

A semelhança das manchas e dos valores de R_f obtidos ($R_{f\text{SQR}} = R_{f\text{comp.}} = 0,49$) indica a presença do montelucaste sódico nos comprimidos. O R_f obtido para o zafirlucaste ($R_f = 0,64$), também antagonista de cisteinil leucotrieno, com R_x de 1,31, comprovou a seletividade do método, mostrando diferenciação entre os valores. Observou-se que tanto as revelações sob lâmpada UV (254 nm), quanto por exposição da placa aos vapores de iodo mostram-se eficientes.

5.2.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

Os espectros de absorção obtidos, na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, das soluções de montelucaste sódico SQR e dos comprimidos revestidos de MTC sódico, ambas em concentração de 10 µg/ml, estão representados na Figura 8.

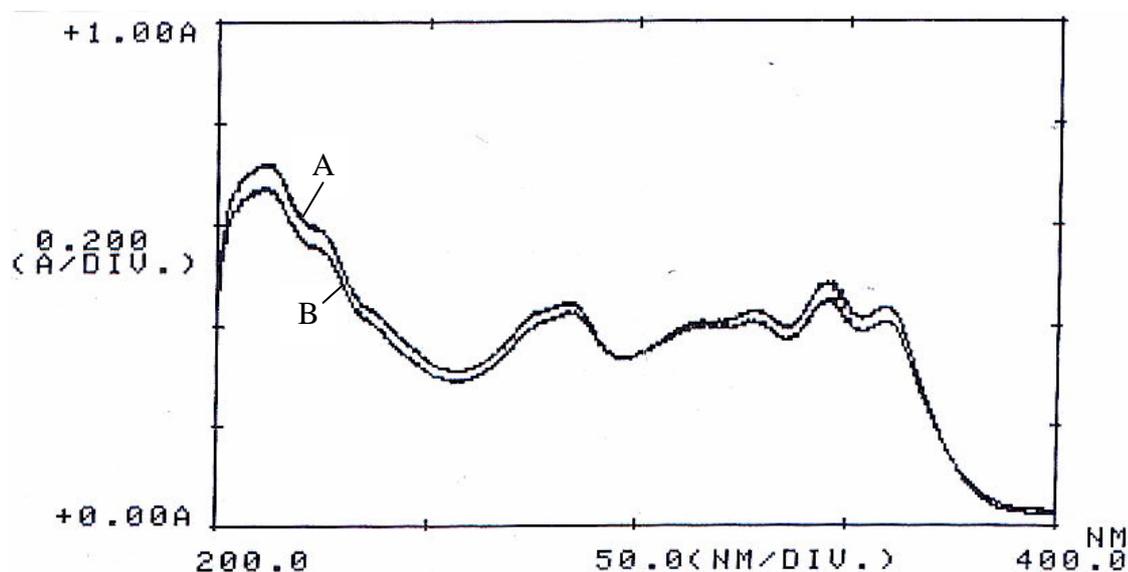


Figura 8 Perfil comparativo dos espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de montelucaste sódico SQR (A) e de comprimidos revestidos de MTC sódico (B) preparadas em etanol, ambas em concentração de 10 µg/ml.

A espectrofotometria na região do ultravioleta aplica-se na identificação e quantificação de fármacos, apesar de apresentar algumas limitações, pois depende da existência de grupamentos cromóforos na estrutura do composto a ser analisado, o que compromete, também, sua especificidade. Entretanto, apresenta-se como método de doseamento alternativo na ausência de equipamentos mais sofisticados como o cromatógrafo a líquido de alta eficiência (SKOOG *et al.*, 2002).

O montelucaste sódico apresenta uma estrutura com grupamentos cromóforos através das ligações duplas conjugadas do anel quinolínico e dos anéis benzênicos, possibilitando uma absorção na região do ultravioleta.

Na etapa de desenvolvimento do método de espectrofotometria na região do UV foram efetuados ensaios preliminares utilizando vários tipos de solventes e concentrações do analito. Primeiramente, foram testados alguns solventes comumente utilizados na realização de ensaios por espectrofotometria de absorção na região do UV, como etanol, metanol, ácido clorídrico 0,1 M e água.

Devido à solubilidade baixa em água e a degradação do montelucaste na solução de ácido clorídrico 0,1 M, os espectros de absorção na região do UV para estes solventes não se mostrou adequada. Já com a utilização de etanol e metanol como solventes, os perfis dos espectros de absorção no UV resultantes foram adequados devido à característica de solubilidade do fármaco. O solvente selecionado para utilização no método foi etanol devido à menor toxicidade e custo. A concentração do analito testada variou de 10 a 30 µg/ml e a que melhor se adequou ao desenvolvimento do método foi a de 10 µg/ml.

Os perfis dos espectros de absorção apresentados na Figura 8, obtidos a partir das soluções de MTC sódico SQR e dos comprimidos de MTC sódico são similares, apresentando dois comprimentos de onda característicos em 280 nm e em 345 nm, o que indica a presença do fármaco nos comprimidos. Desta forma o método apresentou-se adequado na identificação deste fármaco, porém, cabe salientar que métodos adicionais qualitativos devem complementar a espectroscopia de absorção no ultravioleta para a correta identificação de uma substância.

5.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Na Figura 9 podem ser observados os cromatogramas obtidos com as soluções preparadas com montelucaste sódico SQR e com os comprimidos revestidos de MTC sódico através de cromatografia a líquido de alta eficiência.

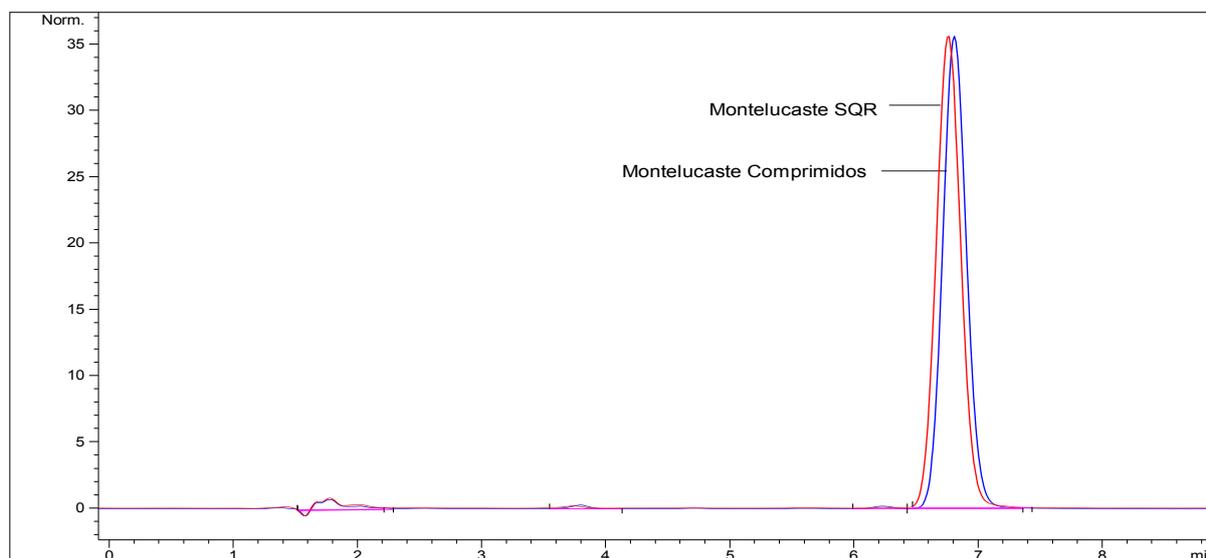


Figura 9 Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de montelucaste sódico SQR e de montelucaste sódico comprimidos revestidos, ambas à concentração de 20 µg/ml, preparadas em metanol. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (pH 3,8) (75:10:15, v/v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna ZORBAX XDB – C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm), AGILENT, detecção em λ de 280 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

A cromatografia líquida de alta eficiência 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 permite a utilização de métodos sensíveis de detecção, onde pequena quantidade de amostra pode ser separada, identificada e analisada qualitativamente e quantitativamente (BEESLEY *et al.*, 2001).

Na literatura consultada, foram encontrados trabalhos relatando a aplicação de CLAE para análise de MTC sódico em fluidos biológicos, empregando diferentes composições de fases móveis com variações na concentração do tampão, no pH, na natureza e na concentração de solventes orgânicos empregados (AMIN *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1997; OCHIAI *et al.*, 1998; AI-RAWITHI *et al.*, 2001; KITCHEN *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2004; PAPP *et al.*, 2007). RADHAKRISHNA e colaboradores (2003)

desenvolveram uma técnica por CLAE para quantificação de loratadina e MTC sódico, simultaneamente, em formas farmacêuticas, utilizando coluna C18, fase móvel composta de uma mistura de acetonitrila e solução tampão de fosfato de sódio dihidrogenado (80:20, v/v) e detector UV em 225 nm. A fim de aperfeiçoar o método para análise qualitativa e quantitativa dos comprimidos revestidos de MTC sódico foram avaliadas algumas modificações nos sistemas cromatográficos propostos.

Diversas proporções de fases móveis, constituídas de acetonitrila e água foram testadas e, em todas, o tempo de retenção do fármaco foi elevado (entre 15 e 24 minutos) e não houve adequada separação entre o MTC sódico e os produtos de degradação. Proporções de metanol e água também foram testadas e não foram suficientes para eluir o MTC sódico antes de 40 minutos. A fim de melhorar as condições obtidas anteriormente, foram testadas proporções de fases móveis constituídas por metanol, acetonitrila e água. Quanto maior a concentração de solvente orgânico na fase móvel, menor foi o tempo de retenção do fármaco. A concentração de acetonitrila provocou maior influência na retenção do MTC sódico visto que torna maior a interação da parte não polar do fármaco com a coluna cromatográfica. A utilização de acetonitrila, metanol e água (75:10:15, v/v/v), apresentou melhores resultados em relação às condições testadas anteriormente em relação à vários parâmetros cromatográficos, como tempo de retenção, simetria e repetibilidade da análise.

Foi observado o efeito do pH na retenção do MTC sódico, nas melhores condições cromatográficas até então estabelecidas, em uma faixa de 3,0 a 8,0. Com o aumento do pH da fase móvel, houve uma diminuição do tempo de retenção, porém parâmetros como o fator de retenção (k) e assimetria (T) não se mostraram satisfatórios.

A fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila, metanol e água (pH 3,8 ajustado com ácido acético) (75:10:15, v/v/v) proporcionou uma análise rápida, parâmetros adequados e separação satisfatória entre o MTC sódico e o produto de degradação majoritário formado a partir da degradação da solução metanólica dos comprimidos em câmara de luz ultravioleta de 352 nm. Além disso, o tempo de

retenção, cerca de 6,8 minutos, é adequado para análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade.

O sistema de eluição isocrático se mostrou satisfatório para determinação do MTC sódico. Este sistema apresenta uma série de vantagens como alta reprodutibilidade dos tempos de retenção, uma maior robustez e uma forma mais econômica de utilização da fase móvel através de reciclagem (CLARKE'S, 2004a).

A velocidade de fluxo foi testada entre 0,8 a 1,0 ml/min. Os melhores parâmetros dos cromatogramas foram encontrados para a velocidade de 0,8 ml/min, a qual foi estabelecida para o método.

O comprimento de onda de 280 nm foi preferido por apresentar maior absorção (mAU) em função das concentrações de MTC sódico avaliadas.

Inúmeros trabalhos encontrados na literatura científica relataram a utilização de tampões na fase móvel e o uso de padrão interno, como descrito no trabalho de Radhakrishna e colaboradores (2003), o qual utilizou fase móvel composta por acetonitrila e solução tampão de fosfato de sódio dihidrogenado o que não foi necessário no sistema proposto. A não utilização de 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 9, obtidos por cromatografia a líquido de alta eficiência, a partir de soluções preparadas com montelucaste sódico SQR e com os comprimidos revestidos de MTC sódico, apresentam valores de tempo de retenção similares, 6,801 e 6,810 minutos, respectivamente, o que permite sugerir que as amostras avaliadas apresentam a mesma identidade.

5.2.4 Eletroforese Capilar (EC)

Os eletroferogramas obtidos a partir da análise de montelucaste sódico SQR e de comprimidos revestidos de MTC sódico sob as condições de análise selecionadas podem ser visualizados na Figura 10.

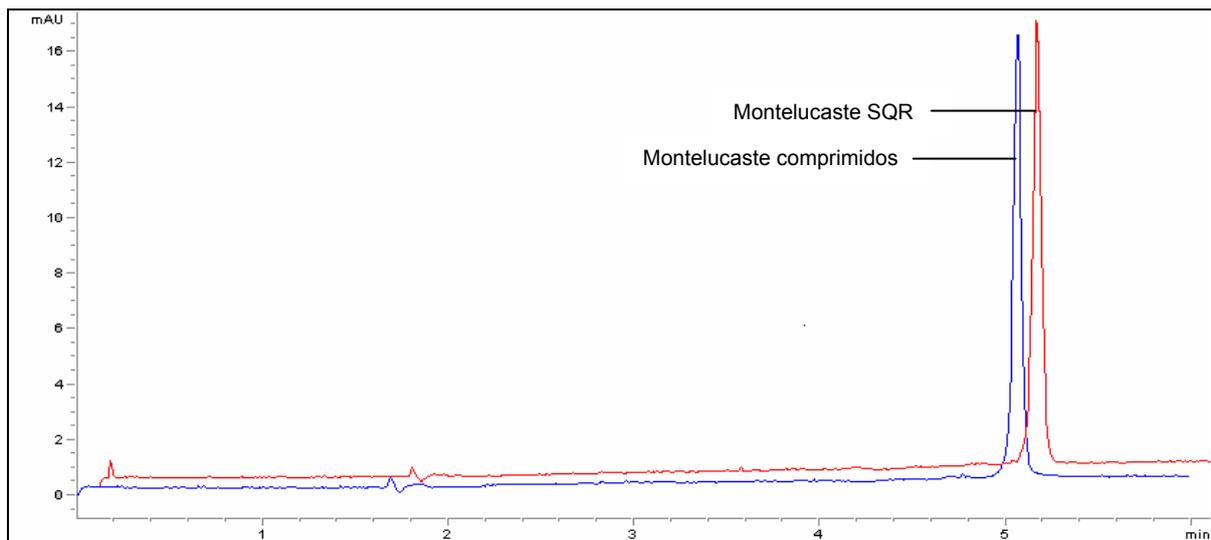


Figura 10 Eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções de montelukaste sódico SQR e de comprimidos revestidos de MTC sódico, preparadas em metanol e diluídas em solução de tetraborato de sódio 10 mM, ambas em concentração de 50 µg/ml. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno, eletrólito tampão tetraborato de sódio: dodecilsulfato de sódio (10 mM: 30 mM), pH 9,4, tensão aplicada de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos, detecção UV λ de 280 nm, temperatura de análise 25 °C \pm 1 °C

A eletroforese capilar oferece ampla seletividade em combinação com alta eficiência de separação, trabalhando com pequenos volumes de amostra e tempo de análise reduzido, sendo, portanto, uma técnica alternativa e complementar à cromatografia líquida de alta eficiência (RADHAKRISHNA *et al.*, 2003). Esta técnica é menos sensível se comparada à CLAE, mas tem como vantagens a geração de uma pequena quantidade de resíduos, bem como não requerer a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos (CLARKES, 2004a).

Para compostos ácidos, a eletroforese capilar em solução livre com pH elevado é ideal em função da maior ionização do fármaco. No entanto, para fármacos em que o pKa não é conhecido, é apropriado que se teste outras opções, como a cromatografia capilar eletrocínética micelar (MEKC) (ALTRIA, 1998).

Diversos parâmetros devem ser considerados para a otimização das separações em EC, tais como: composição e pH do eletrólito, dimensões e temperatura do capilar, voltagem aplicada, modo e tempo de injeção (BAKER, 1995).

O desenvolvimento de um método eletroforético para a análise do MTC sódico foi realizado primeiramente através da escolha do melhor diluente para o fármaco. Em função da alta solubilidade do montelucaste sódico em etanol e metanol, estes foram os primeiros diluentes testados. No entanto, não foi observada nenhuma corrente no sistema eletroforético. Foi testada, então, solução de tetraborato de sódio, mas não houve completa solubilização do fármaco. Finalmente, para resolver estes problemas, a primeira diluição foi realizada em metanol e a segunda diluição em solução de tetraborato de sódio 10 mM.

A técnica de eletroforese capilar em solução livre foi testada primeiramente devido à facilidade de sua implementação. O tampão fosfato de potássio monobásico foi utilizado como eletrólito nesta primeira análise, sendo testada concentração de 30 mM e pH 6,8; 7,4 e 8,0. As demais condições eletroforéticas empregadas neste método estão descritas na Tabela 6. Os resultados foram insatisfatórios devido ao aparecimento de picos largos e assimétricos (Figura 11, A). O tampão tetraborato de sódio, nas concentrações de 10 a 30 mM e pH 8,7 e 9,4 também foi testado. Os resultados para a concentração de 10 mM mostraram picos com maior simetria em relação às condições anteriores, porém, ainda largos (Figura 11, B).

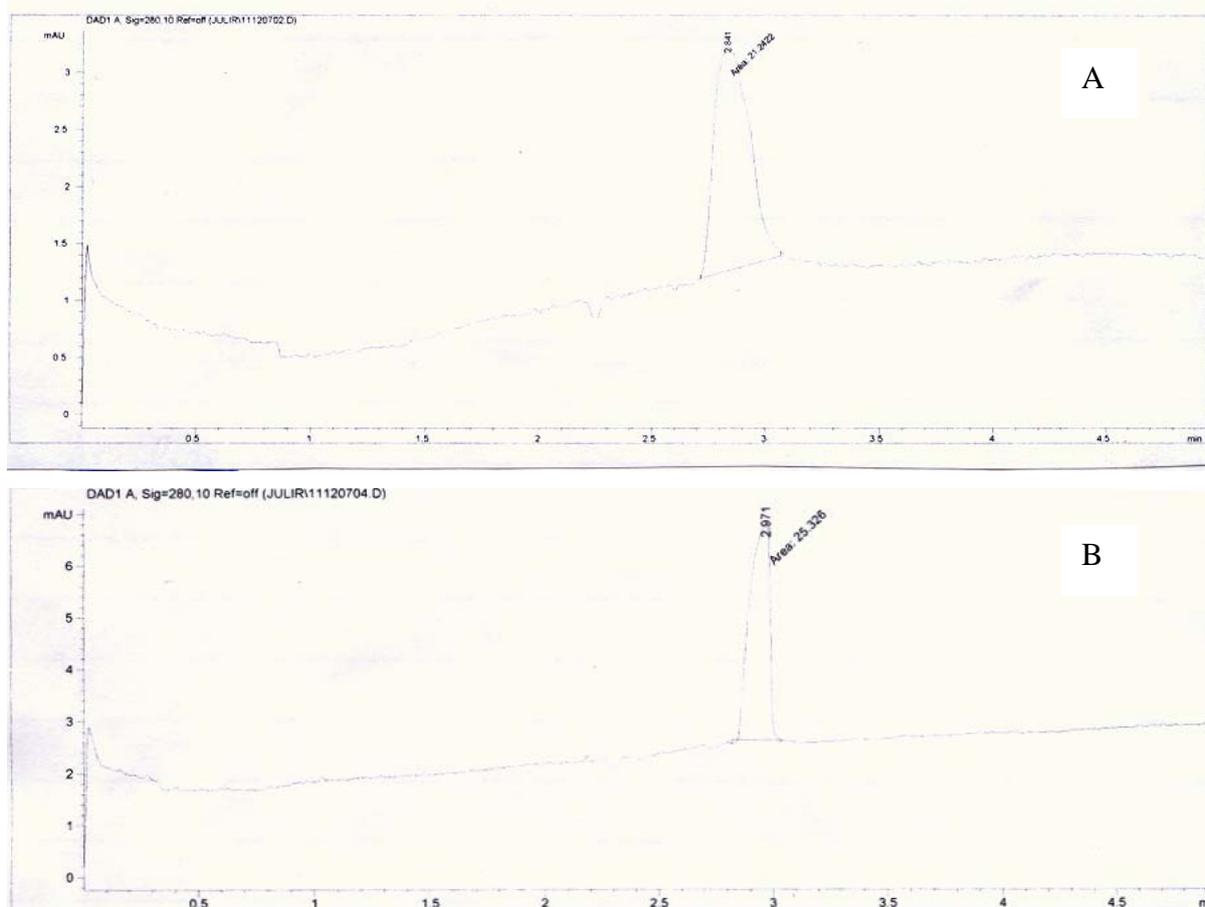


Figura 11 Eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções de MTC sódico SQR preparadas em metanol e diluídas em solução de tetraborato de sódio 10 mM, ambas em concentração de 50 µg/ml. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno, eletrólito tampão fosfato de potássio monobásico 30 mM, pH 8,0 (A) e tampão tetraborato de sódio 10 mM, pH 9,4 (B), tensão aplicada de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos, detecção UV λ de 280 nm, temperatura de análise 25 °C \pm 1 °C.

A fim de melhorar as condições eletroforéticas obtidas, foi testada a técnica de cromatografia capilar electrocinética micelar, onde foi adicionado o tensoativo dodecilsulfato de sódio 30 mM ao tampão tetraborato de sódio 10 mM, em concentração superior à concentração micelar crítica. O MTC sódico interage, possivelmente, através da ligação de seus grupamentos polares com a parte terminal ionizada da micela, migrando junto com esta, proporcionando melhor perfil cromatográfico.

Foram testadas, também, variações de pH entre 8,6 e 9,4, no eletrólito composto por tetraborato de sódio 10 mM e dodecilsulfato de sódio 30 mM. Quanto

mais alto o pH da solução tampão, menor o tempo de migração e melhor a simetria do pico do MTC sódico. Sendo assim, o pH selecionado foi 9,4.

A presença de solventes orgânicos no eletrólito é sugerida por muitos autores, por apresentar melhor desempenho de análise, permitindo a redução do tempo de migração, maior eficiência e simetria dos picos (ALTRIA, 1998). Foi adicionado metanol em várias concentrações (5, 10 and 15%, v/v) à solução tampão de tetraborato de sódio 10 mM e dodecilsulfato de sódio 30 mM, pH 9,4. O tempo de migração do MTC sódico, nestas condições, aumentou significativamente em todas as análises. Por esta razão, o metanol foi excluído da composição do eletrólito de análise.

Os efeitos da voltagem sobre o sistema eletroforético foram testados entre 20 e 30 kV. Usando tetraborato de sódio 10 mM e dodecilsulfato de sódio 30 mM, pH 9,4, como solução tampão, foi observado menor tempo de migração e picos finos e simétricos com o aumento da voltagem. Entretanto, altas voltagens conferem altas correntes e aumento da temperatura do sistema. Para limitar o aquecimento do capilar, a voltagem selecionada foi de 25 kV.

O tempo de injeção foi testado, pois afeta a simetria e a área do pico. Soluções foram injetadas no modo hidrodinâmico a 50 mbar durante 3 a 6 segundos. A área e a simetria do pico aumentam com o aumento do tempo de injeção. Entretanto, após 5 segundos, o pico de montelucaste sódico apresenta elevada assimetria. O tempo de injeção selecionado foi, então, 5 segundos.

Os eletroferogramas apresentados na Figura 10 obtidos por eletroforese capilar, a partir de soluções preparadas com montelucaste sódico SQR e com os comprimidos revestidos de MTC sódico, apresentam valores de tempo de retenção similares, 5,03 e 5,07 minutos, respectivamente, o que permite sugerir que as amostras avaliadas apresentam a mesma identidade.

5.3 Validação dos métodos analíticos para análise quantitativa do montelucaste sódico em comprimidos revestidos

5.3.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A absorção da radiação ultravioleta (UV) por muitos compostos ocorre em uma faixa reduzida de comprimento de onda. Por consequência disso, a absorção na região do UV oferece possibilidades para identificação de grupos funcionais mais restritas do que outros métodos espectroscópicos como o infravermelho e a ressonância magnética nuclear. Contudo, as aplicações dos métodos quantitativos de absorção no ultravioleta/visível não são apenas numerosas, como também atingem todos os campos nos quais informações químicas quantitativas sejam necessárias, uma vez que o método é simples, rápido, de fácil execução e de baixo custo (SKOOG *et al.*, 2002).

5.3.1.1 Especificidade

A especificidade do método espectrofotométrico foi avaliada através da comparação dos espectros obtidos, o que permite avaliar a possível interferência dos excipientes na determinação do MTC sódico.

As soluções de montelucaste sódico SQR, dos comprimidos de MTC sódico e da amostra simulada de excipientes foram preparadas conforme descrito no item 4.4.1.2.1. A composição da amostra simulada de excipientes está descrita na Tabela 7.

Na Figura 12 os espectros obtidos, por espectrofotometria na região do UV, com as soluções de montelucaste sódico SQR, comprimidos revestidos de MTC sódico e amostra simulada dos excipientes estão sobrepostos.

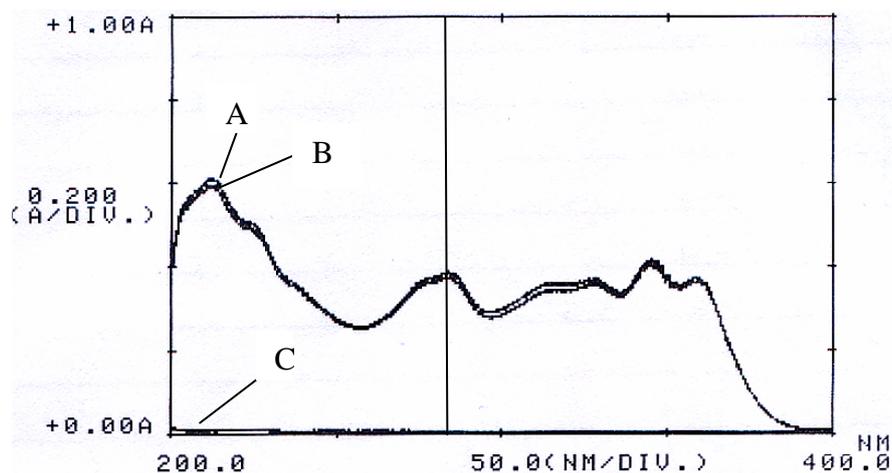


Figura 12 Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria ultravioleta das soluções de montelukaste sódico SQR (A), de comprimidos de MTC sódico (B) e da amostra simulada dos excipientes (C) preparadas em etanol em concentrações de 10 µg/ml.

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 (BRITTAIN, 1998).

A partir da análise dos espectros das soluções de montelukaste sódico SQR, de comprimidos de MTC sódico e da solução de amostra simulada de excipientes, foi observado que o método proposto é específico, já que não sofre interferência dos excipientes no comprimento de onda selecionado (280 nm). A solução de amostra simulada de excipientes apresenta apenas pequena absorção em torno de 200 a 240 nm.

5.3.1.2 Linearidade

As absorvâncias obtidas para cada concentração analisada na curva padrão estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 Absorvâncias obtidas na curva padrão do montelucaste sódico SQR por espectrofotometria na região do ultravioleta a 280 nm.

Concentração (µg/ml)	Absorvância *	Absorvância média ± e.p.m.	DPR
2,5	0,100	0,101 ± 0,0009	1,50
	0,101		
	0,103		
5,0	0,202	0,204 ± 0,0009	0,75
	0,205		
	0,204		
7,5	0,302	0,302 ± 0,0008	1,51
	0,301		
	0,304		
10,0	0,411	0,408 ± 0,0021	0,88
	0,404		
	0,409		
12,5	0,508	0,505 ± 0,0027	0,91
	0,500		
	0,508		
15,0	0,606	0,605 ± 0,0006	0,17
	0,605		
	0,604		
17,5	0,707	0,707 ± 0,0020	0,47
	0,710		
	0,703		

* Cada valor é resultante da média de três determinações.

e.p.m. - Erro padrão da média

DPR - Desvio padrão relativo

A partir das absorvâncias médias obtidas na faixa de concentração estudada (2,5 a 17,5 µg/ml) a equação da reta foi calculada e o coeficiente de correlação (r) foi determinado (Figura 13).

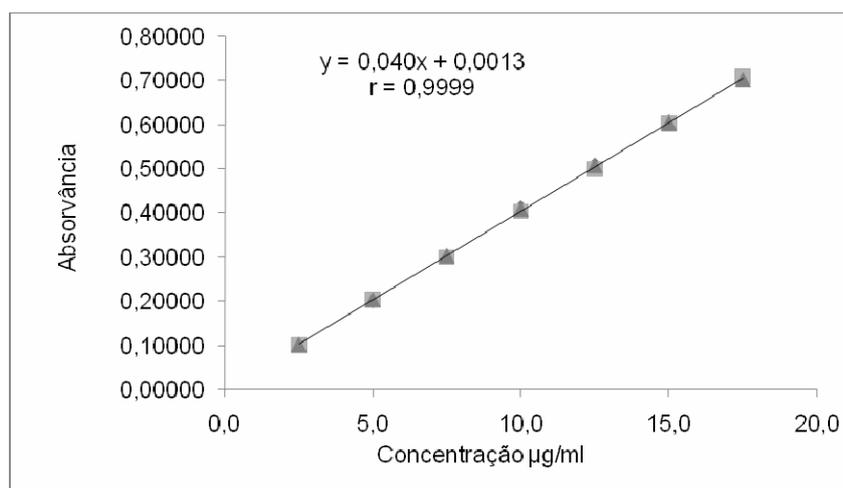


Figura 13 Representação gráfica da curva padrão do montelucaste sódico SQR obtida por espectrofotometria de absorção no UV.

A Tabela 16 apresenta os valores encontrados na análise de variância (ANOVA) a partir dos valores experimentais obtidos por espectroscopia de absorção no UV.

Tabela 16 Análise de variância das absorvâncias obtidas para obtenção da curva padrão do montelucaste sódico SQR por espectrofotometria no ultravioleta.

Fontes de variação	GI	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	6	0,8531	0,1422	18206,390*
Regressão linear	1	0,8530	0,8530	109231,820*
Desvio de linearidade	5	0,00005108	0,00001021	1,308
Resíduo	14	0,00010933	0,00000781	---
Total	20	0,8532	---	---

* Significativo para $p < 0,05$.

A linearidade do método foi verificada através da construção de três curvas padrão em um único dia, na faixa de concentração de 2,5 a 17,5 µg/ml. A equação da reta resultante foi $y = 0,040x + 0,0013$ 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 da unidade, foi satisfatório. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que existe regressão linear sem haver desvio da linearidade, o que confere validade do método proposto em termos de linearidade.

5.3.1.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os valores obtidos para determinação dos limites de detecção e de quantificação do montelucaste sódico através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17 Valores obtidos para determinação do LD e do LQ do montelucaste sódico determinados matematicamente através dos valores obtidos pela curva padrão.

Parâmetro Analítico	Montelucaste sódico
Limite de detecção (LD)	0,20 µg/ml
Limite de quantificação (LQ)	0,62 µg/ml

Os limites de detecção e quantificação para o montelucaste sódico apresentam valores baixos, demonstrando a sensibilidade do método para determinação e quantificação do MTC sódico nas condições descritas.

5.3.1.4 Precisão

Os valores experimentais obtidos na determinação do montelucaste sódico em comprimidos revestidos por espectrofotometria na região do ultravioleta estão descritos na Tabela 18, bem como os resultados obtidos a partir da determinação da precisão intermediária realizada em três dias consecutivos.

Tabela 18 Apresentação dos valores experimentais obtidos a partir da determinação do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos obtidos por UV para avaliação da precisão.

	Teor (%) das soluções de MTC sódico (10 µg/ml)*			Teor Intradia (%) ± e.p.m.	DPR
	Dia 1	101,40 99,51	100,01 98,81	100,90 99,75	100,06 ± 0,367
Dia 2	101,41 99,02	100,50 99,26	99,75 99,51	99,91 ± 0,365	0,89
Dia 3	102,45 100,24	100,00 103,92	98,77 100,02	100,89 ± 0,776	1,88
Teor médio interdias (%)				100,28 ± 0,215	
				DPR	0,52

* Cada valor representa a média de três determinações.

A precisão do método proposto foi realizada em três dias diferentes, nos quais foram realizadas seis determinações das amostras preparadas individualmente para cada dia. O teor obtido para o montelucaste sódico nos comprimidos foi equivalente a 100,06%, 99,91% e 100,89% para o primeiro, segundo e terceiro dias de análise respectivamente, com desvios padrão inferiores a 2% para avaliação da precisão intradia e teor de 100,28% com desvio padrão de 0,52% para avaliação da precisão interdia, demonstrando boa repetibilidade, conforme ICH, 2005, dos resultados obtidos a partir da execução deste método.

5.3.1.5 Exatidão

As percentagens obtidas pelo teste de recuperação realizado por espectrofotometria de absorção no UV de MTC sódico podem ser observadas na Tabela 19.

Tabela 19 Resultados obtidos pelo teste de recuperação por espectrofotometria no UV para a determinação de MTC sódico em comprimidos.

	Concentração (µg/ml)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR
	Adicionada	Recuperada *			
R1	2,50	2,50	100,00		
R2	5,00	5,09	101,98	100,95	0,87
R3	7,50	7,54	100,87		

* Cada valor representa a média de três determinações

A exatidão do método foi comprovada através do teste de recuperação do montelucaste sódico SQR. Os resultados observados demonstraram a exatidão do método proposto, sendo que o percentual médio de recuperação foi equivalente a 100,95%.

5.3.1.6 Robustez

A Tabela 20 apresenta os valores encontrados para os teores de montelucaste sódico que foram submetidos a diferentes procedimentos de extração do fármaco.

Tabela 20 Valores experimentais obtidos por espectrofotometria de absorção no UV para determinação da robustez do método.

Parâmetros		Média (teor %)*	DPR
Solvente	Etanol marca MERCK	102,55	0,35
	Etanol marca TEDIA	102,54	0,71
Tipo de agitação	Agitação manual 15 min	100,71	0,94
	Sonicação 15 min	102,46	0,82

* Cada valor é a média de três determinações

As Tabelas 21 e 22 apresentam a comparação entre as diferentes marcas de solvente e os tipos de agitação, para determinação da robustez do método efetuada através do Teste-*t*, presumindo duas amostras com variâncias equivalentes.

Tabela 21 Teste-*t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes para as diferentes marcas de solvente.

	Solvente marca MERCK	Solvente marca TEDIA
Média	102,55	102,54
Variância	0,1344	0,52
Observações	9	9
Variância agrupada	0,9295	
Hipótese de diferença média	0	
gl	16	
Stat <i>t</i>	0,99	
<i>t</i> crítico bi-caudal	4,30	

Tabela 22 Teste-*t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes para os diferentes tipos de agitação.

	Agitação 15 min	Sonicação 15 min
Média	100,71	102,46
Variância	0,91	0,70
Observações	9	9
Variância agrupada	0,4325	
Hipótese de diferença média	0	
gl	16	
Stat <i>t</i>	2,00	
<i>t</i> crítico bi-caudal	4,30	

A robustez representa uma indicação de confiabilidade do método durante o uso rotineiro (BRITAIN, 1998). Os parâmetros avaliados para a robustez do método proposto, duas marcas de solventes e dois tipos de agitação, não apresentaram diferenças significativas entre si, através do teste-*t*, já que o *t* calculado (0,99 e 2,00 respectivamente) é inferior ao tabelado (4,30), comprovando a robustez do método, para os critérios testados.

5.3.1.7 Estabilidade das soluções

Na Tabela 23 estão demonstrados os valores experimentais obtidos por espectrofotometria no UV de soluções de MTC sódico SQR, preparadas na concentração de 10 µg/ml, avaliadas durante cinco dias armazenadas a temperatura de 2 a 8 °C.

Tabela 23 Valores experimentais obtidos a partir de soluções de MTC sódico SQR num intervalo de 5 dias.

Dia	Absorvância*
0	0,408
5	0,407

*Média de três determinações

A solução de montelucaste sódico SQR preparada em etanol manteve-se estável na geladeira (2 a 8 °C) por, 5 dias. Os espectros na região do UV dos isômeros são diferentes, descartando-se a hipótese do resultado obtido ser a soma destes.

Com base na avaliação dos resultados obtidos através dos parâmetros analíticos preconizados nas guias de validação para a espectrofotometria de absorção no UV para a determinação de montelucaste sódico em comprimidos revestidos, pode-se afirmar que o método foi validado de maneira satisfatória e, portanto, é adequado para o controle de qualidade deste fármaco.

O método por espectrofotometria no UV desenvolvido e validado para a quantificação do MTC sódico pode, futuramente, ser empregado para análise do fármaco em testes de dissolução, por ser de fácil execução e rápido.

5.3.2 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

Os parâmetros analíticos avaliados para a determinação do montelucaste sódico na forma farmacêutica por cromatografia a líquido de alta eficiência estão descritos a seguir.

5.3.2.1 Especificidade

5.3.2.1.1 Avaliação da especificidade do método frente à amostra simulada dos excipientes

A especificidade do método cromatográfico foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos, o que permite avaliar a possível interferência dos excipientes na determinação do montelucaste sódico.

As soluções de MTC sódico SQR e da amostra simulada de excipientes foram preparadas conforme descrito no item 4.4.1.2.1. A composição da amostra simulada de excipientes está descrita na Tabela 7.

A Figura 14 mostra os cromatogramas obtidos, por CLAE, com as soluções de MTC sódico SQR (20 µg/ml) e da amostra simulada dos excipientes sobrepostos.

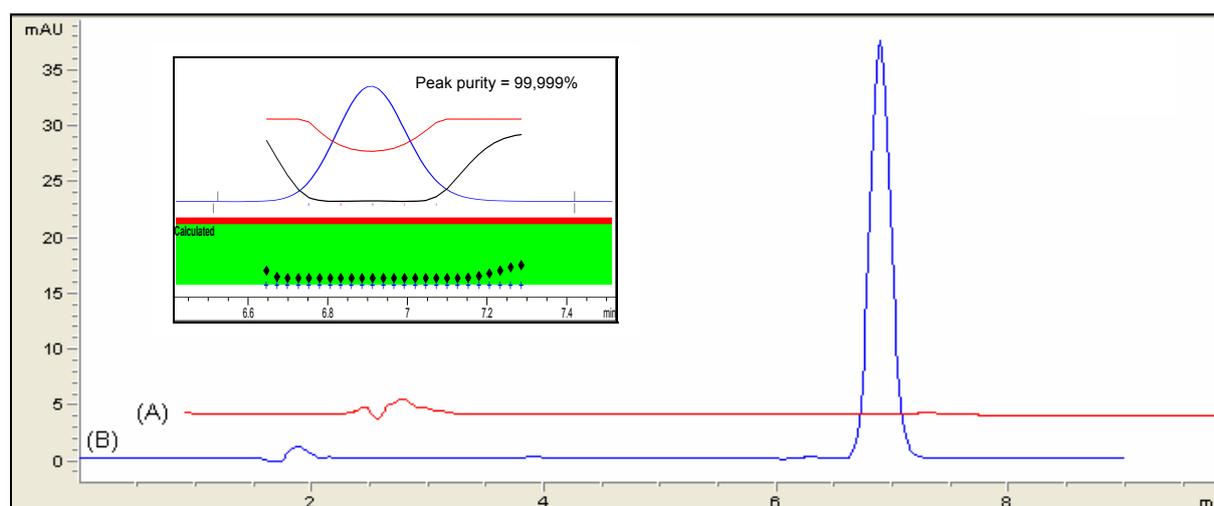


Figura 14 Sobreposição dos cromatogramas obtidos através da análise por CLAE da solução da amostra simulada dos excipientes (A) e das soluções de montelucaste sódico SQR (B) e bem como, representação da pureza do pico. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (pH 3,8) (75:10:15, v/v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna ZORBAX XDB – C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) AGILENT, detecção em λ de 280 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

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

5.3.2.1.2 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada

A avaliação do método por CLAE quanto a sua especificidade para o montelucaste sódico foi realizada frente aos potenciais produtos de degradação formados por degradação térmica, fotólise, hidrólise ácida, alcalina e oxidação.

As soluções de montelucaste sódico preparadas a partir dos comprimidos revestidos foram submetidas a condições extremas de análise com intuito de provocar a formação de prováveis produtos de degradação e avaliar a possível interferência destes na determinação do MTC sódico.

A Figura 15 mostra o cromatograma obtido com a solução de MTC sódico na degradação térmica a 80 °C, durante 5 horas.

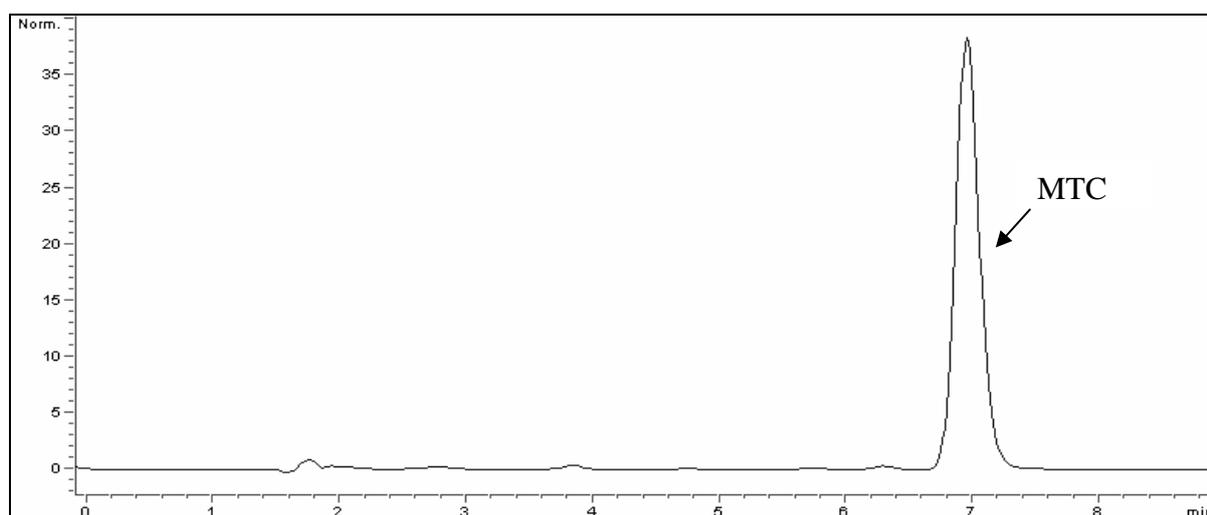


Figura 15. Cromatograma obtido com a solução de montelucaste sódico na degradação térmica a 80 °C, durante 5 horas. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (pH 3,8) (75:10:15, v/v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna ZORBAX XDB – C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) AGILENT, detecção em λ de 280 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

A Figura 16 mostra o cromatograma obtido com a solução de MTC sódico submetido à radiação UV (352 nm) durante 15 minutos.

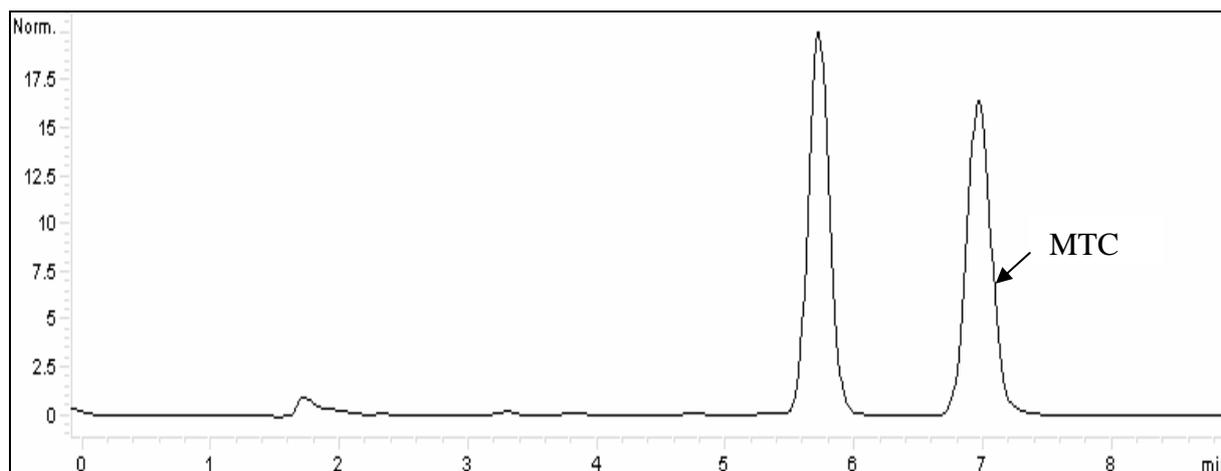


Figura 16 Cromatograma obtido com a solução de montelucaste sódico submetida à radiação UV (352 nm), durante 15 minutos. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (pH 3,8) (75:10:15, v/v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna ZORBAX XDB – C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) AGILENT, detecção em λ de 280 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

A Figura 17 mostra o cromatograma obtido com a solução de MTC sódico submetida à oxidação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3%, v/v) durante 2 horas.

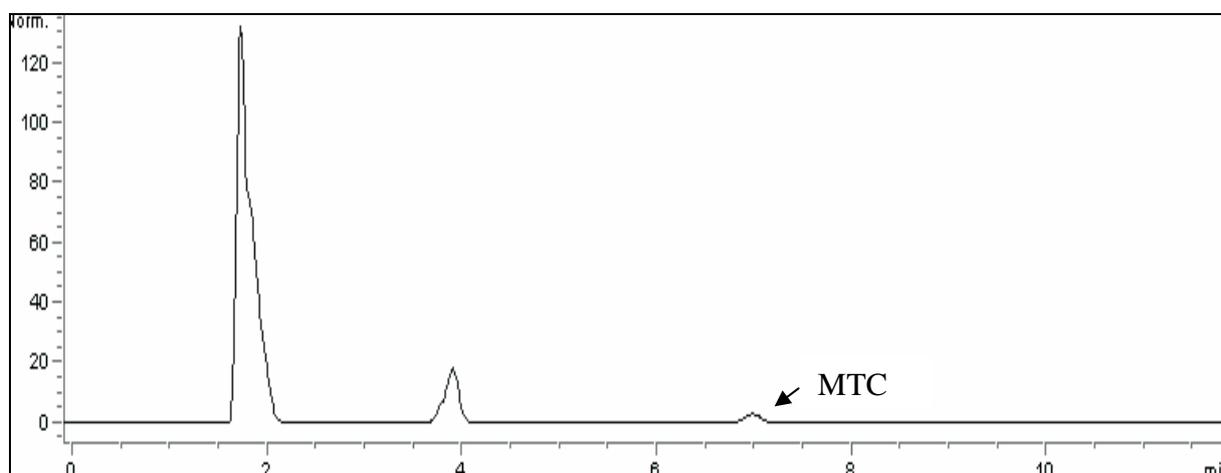


Figura 17 Cromatograma obtido com a solução de montelucaste sódico submetida à oxidação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3%, v/v), durante 2 horas. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (pH 3,8) (75:10:15, v/v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna ZORBAX XDB – C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) AGILENT, detecção em λ de 280 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

A Figura 18 mostra o cromatograma da solução de MTC sódico submetida à hidrólise ácida em ácido clorídrico (HCl 0,1 M) durante 2 horas.

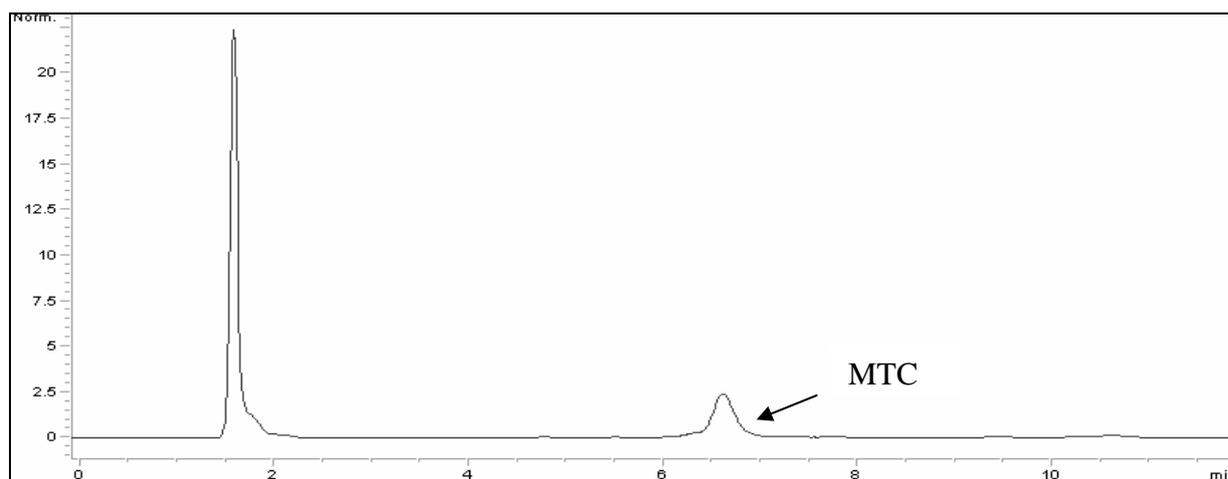


Figura 18 Cromatograma obtido com a solução de montelucaste sódico submetida à hidrólise ácida em ácido clorídrico (HCl 0,1 M), durante 2 horas. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (pH 3,8) (75:10:15, v/v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna ZORBAX XDB – C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) AGILENT, detecção em λ de 280 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

A Figura 19 mostra o cromatograma da solução de MTC sódico submetida à hidrólise alcalina em hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) durante 2 horas.

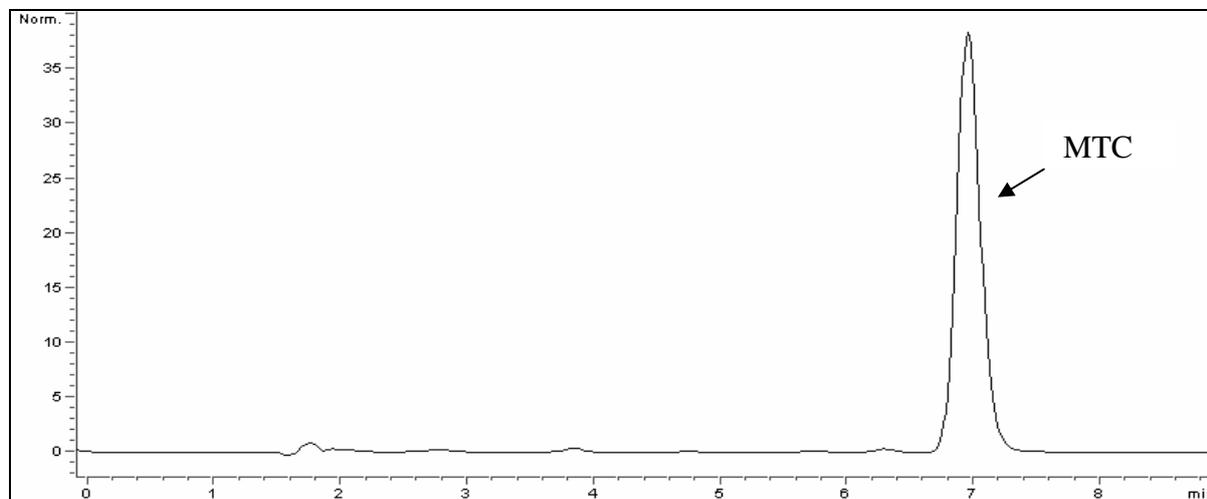


Figura 19 Cromatograma obtido com a solução de montelucaste sódico submetida à hidrólise alcalina em hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) durante 2 horas. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (pH 3,8) (75:10:15, v/v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna ZORBAX XDB – C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) AGILENT, detecção em λ de 280 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

Para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, os testes de estresse podem ser úteis para a obtenção de informações sobre 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 ser indicativo de estabilidade (KLICK *et al.*, 2005).

Na solução submetida à degradação térmica (80 °C) não foi observado nenhum pico de degradação ou diminuição no pico do montelucaste sódico (Figura 15). O cromatograma da solução placebo não apresentou nenhum pico.

Os ensaios realizados com a luz devem ser parte integrante dos testes de estresse (ICH, 2005). As amostras fotodegradadas apresentaram uma diminuição no teor em 57,90% e um potencial pico de degradação em 5,7 minutos (Figura 16). Segundo AL-OMARI e colaboradores (2007), este pico de degradação pode ser o isômero *cis* inativo do MTC sódico. O cromatograma da solução placebo não apresentou nenhum pico.

O estresse sob condição oxidante (H₂O₂ 3%, v/v) mostrou, pelo menos, um potencial produto de degradação, com tempo de retenção de 3,92 minutos e uma diminuição de 76,84% no teor de MTC sódico. O cromatograma apresentou um pico extra possivelmente devido ao próprio peróxido de hidrogênio, em 1,78 minutos (Figura 17), pois também aparece nos cromatogramas das soluções de H₂O₂ 3% e do placebo.

A hidrólise ácida (HCl 0,1 M), apresentou um pico em, aproximadamente, 1,55 minutos e uma redução de 93,42% no teor de MTC sódico (Figura 18). O cromatograma da solução placebo e da solução de HCl 0,1 M apresentaram o mesmo pico em 1,55, sugerindo que este seja referente a um sinal do próprio solvente ácido.

Na hidrólise alcalina (NaOH 0,1 M), não foi observado nenhum pico de degradação ou diminuição no pico do montelucaste sódico (Figura 19). O cromatograma da solução placebo não apresentou nenhum pico.

A análise da pureza dos picos realizada através do software Chemstation, comprovou que nenhum dos picos dos potenciais produtos de degradação interferiu com o pico do montelucaste sódico após os testes de degradação acelerada. Este resultado indica que o método por CLAE é específico para o fármaco.

5.3.2.2 Linearidade

Na Tabela 24 estão demonstrados os valores experimentais encontrados para as áreas referentes à faixa de concentração utilizada (5,0 - 35,0 µg/ml) para o montelucaste sódico SQR por CLAE.

Tabela 24 Áreas absolutas do montelucaste sódico SQR obtidas por CLAE para determinação da curva padrão.

Concentração (µg/ml)	Área absoluta *	Área média ± e.p.m.	DPR
5,0	126,2968	125,0671 ± 1,7776	2,46
	121,5634		
	127,3410		
10,0	243,9392	243,7989 ± 0,5198	0,37
	244,6208		
	242,8366		
15,0	366,8545	365,7938 ± 1,0399	0,49
	363,7141		
	366,8129		
20,0	485,3617	483,6333 ± 0,9922	0,32
	482,3010		
	483,2372		
25,0	605,9542	605,0822 ± 0,4449	0,13
	604,7809		
	604,5021		
30,0	722,2330	719,4579 ± 4,0445	0,97
	711,4903		
	724, 6504		
35,0	838,2424	837,4019 ± 0,7583	0,16
	835,8883		
	838,0750		

* Cada valor representa a média de três determinações.

e.p.m. – Erro padrão da média

DPR – Desvio padrão relativo

A representação gráfica da curva padrão do montelucaste sódico SQR, obtida pela técnica de CLAE, encontra-se na Figura 20.

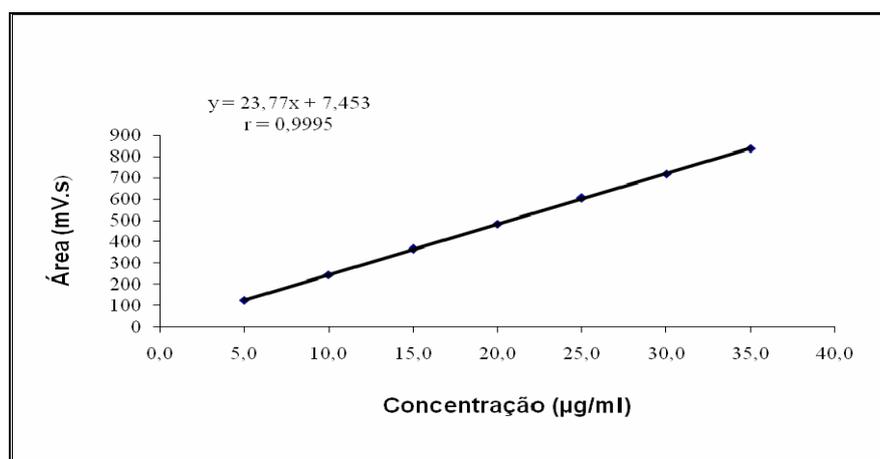


Figura 20 Representação gráfica da curva padrão do montelucaste sódico SQR obtida por CLAE.

A análise estatística através da ANOVA para verificar a linearidade do método por CLAE está demonstrada na Tabela 25.

Tabela 25 Análise de variância das áreas absolutas obtidas para obtenção da curva padrão do montelucaste sódico SQR por CLAE.

Fontes de variação	GI	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	6	1186940	197823	20366,23*
Regressão linear	1	1186872	1186872	122190,35*
Desvio de linearidade	5	69	14	1,41
Resíduo	14	136	10	---
Total	20	1187076	---	---

* Significativo para $p < 0,05$.

A linearidade do método foi verificada através da construção de três curvas padrão em um único dia, na faixa de concentração de 5,0 a 35,0 µg/ml. A equação da reta resultante foi $y = 23,77x + 7,453$ e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9995, mostrando-se satisfatório. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que existe regressão linear (F calculado = 122190,35 > F crítico = 4,6; $p < 0,05$), sem haver desvio da linearidade (F calculado = 1,41 < F crítico = 2,96; $p > 0,05$), o que confere linearidade ao método.

5.3.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores obtidos para determinação dos limites de detecção e de quantificação do montelucaste sódico, através do método de CLAE, podem ser observados na Tabela 26.

Tabela 26 Valores obtidos experimentalmente para o LD e LQ para o método por CLAE.

Parâmetro Analítico	Montelucaste sódico
Limite de detecção (LD)	0,03 µg/ml
Limite de quantificação (LQ)	0,09 µg/ml

Nas figuras 21 e 22 estão representados os cromatogramas referentes à determinação experimental dos LD e LQ, respectivamente. Juntamente com as figuras estão os valores do sinal:ruído obtidos através do software ChemStation.

RetTime [min]	k'	Sig	Amount [ng/ul]	Symm.	Width [min]	Plates	Signal Name /Noise
6.655	-	1	not f	0.00	-	-	-
6.655	2.17	1	0.00000	0.98	0.2178	5174	3.1 montelucaste

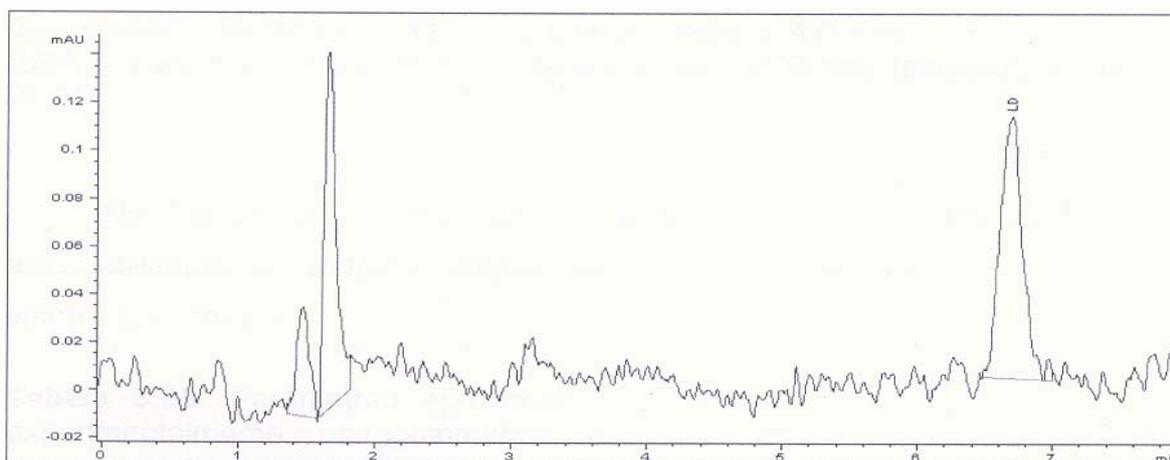


Figura 21 Cromatograma obtido com a solução de MTC sódico SQR na concentração de 0,03 µg/ml. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (pH 3,8) (75:10:15, v/v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna ZORBAX XDB – C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) AGILENT, detecção em λ de 280 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

RetTime [min]	k'	Sig	Amount [ng/ul]	Symm.	Width [min]	Plates	Signal Name /Noise
6.893	2.11	1	0.00000	0.92	0.2111	5906	9.9 montelucaste

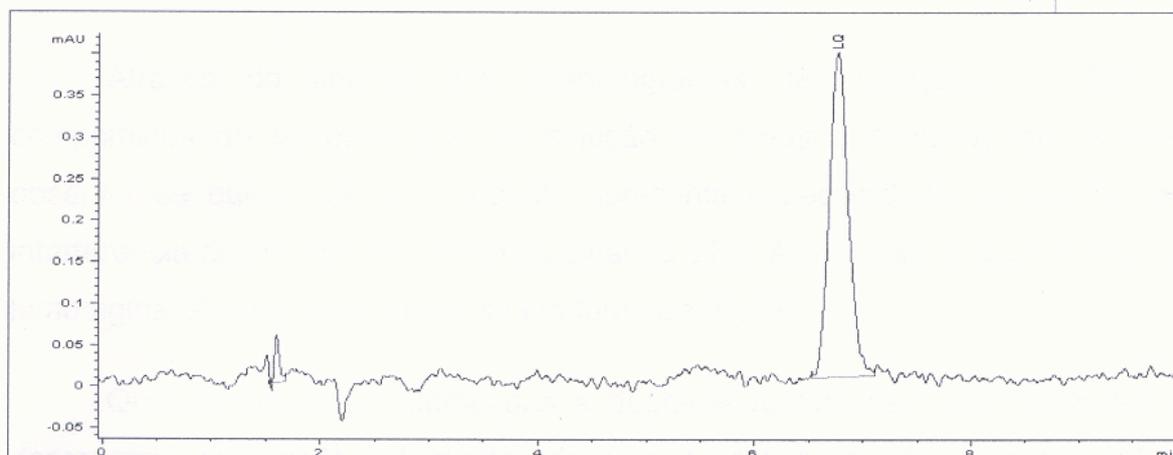


Figura 22 Cromatograma obtido com a solução de MTC sódico SQR na concentração de 0,09 µg/ml. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (pH 3,8) (75:10:15, v/v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna ZORBAX XDB – C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) AGILENT, detecção em λ de 280 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

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).

Os limites de detecção e quantificação para o montelucaste sódico apresentaram valores baixos de concentração do analito e correspondem aos valores calculados (LD = 0,03 µg/ml e LQ = 0,09 µg/ml) a partir da curva padrão, demonstrando a elevada sensibilidade do método para determinação e quantificação do MTC sódico nas condições do método descritas.

5.3.2.4 Precisão

Os valores experimentais obtidos na determinação do montelucaste sódico em comprimidos revestidos por CLAE estão descritos na Tabela 27, bem como os resultados obtidos a partir da determinação da precisão intermediária realizada em três dias consecutivos.

Tabela 27 Apresentação dos valores experimentais obtidos a partir da determinação do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos obtidos por CLAE para avaliação da precisão.

	Teor (%) das soluções de MTC sódico (10 µg/ml)*			Teor Intradia (%) ± e.p.m.	DPR
	Dia 1	100,65	101,68	101,42	101,13 ± 0,185
Dia 2	101,97	101,64	102,41	101,76 ± 0,159	0,38
Dia 3	100,17	101,37	100,72	100,77 ± 0,176	0,42
Teor médio interdias (%)				101,22 ± 0,289	
				DPR	0,49

* Cada valor representa a média de três determinações.

A precisão do método proposto foi realizada em três diferentes dias, nos quais foram realizadas seis determinações das amostras preparadas individualmente para cada dia. O teor obtido para o montelucaste sódico no teste intradia foi equivalente a 101,13%, 101,76% e 100,77%, respectivamente para o primeiro, segundo e terceiro dias. O teor interdias foi equivalente a 101,22%, com desvios padrão inferiores a 2% (BRASIL, 2003), o que foi equivalente ao obtido por RADHAKRISHNA e colaboradores (2003), demonstrando boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados a partir da execução deste método.

5.3.2.5 Exatidão

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação do montelucaste sódico SQR, para avaliação da exatidão, estão apresentadas na Tabela 28.

Tabela 28 Resultados do teste de recuperação por CLAE para determinação do MTC sódico em comprimidos revestidos.

	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)		Recuperação	Média	DPR
	Adicionada	Recuperada *	(%)	(%)	
R1	5,00	4,97	99,43		
R2	10,00	10,08	100,80	100,24	0,72
R3	15,00	15,07	100,49		

* Cada valor representa a média de três determinações

O método desenvolvido demonstrou exatidão através dos resultados obtidos, exibindo percentagem de recuperação média de 100,24%, resultado equivalente em exatidão ao obtido por RADHAKRISHNA e colaboradores (2003), de 100,35%.

5.3.2.6 Robustez

Os resultados obtidos na determinação do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos, através de pequenas alterações nas condições cromatográficas, podem ser observados na Tabela 29.

Tabela 29 Variações aplicadas ao método por CLAE na determinação do MTC sódico para avaliação da robustez do método.

Modificações	Teor (%) de MTC sódico*	Tempo de retenção (min)	Pratos teóricos (N)	Fator de retenção (k)	Assimetria (T)
FM pH 3,6	99,10	6,86	6349	2,02	1,06
FM pH 4,0	99,15	6,81	6103	2,09	1,06
Proporção FM ** 77:13:10	100,09	5,96	6239	2,09	1,07
Proporção FM ** 73:17:10	99,89	5,89	5792	2,01	1,06
Fluxo da FM** (0,7 ml/min)	99,31	7,91	6448	2,21	1,07
Fluxo da FM** (0,9 ml/min)	99,89	6,13	5697	2,22	1,06
Coluna ACE® 5 C18 (150 x 4,6 mm; 5µ)	98,99	6,46	4631	2,07	1,11
Condições normais	100,31	6,89	6295	2,21	1,07

* Cada valor representa a média de três determinações.

** FM: Acetonitrila: água (pH ajustado com ác. acético para 3,8): metanol; (75:15:10, v/v/v). Fluxo de 0,8 ml/min.

As alterações propositais realizadas no método cromatográfico, a fim de avaliar sua suscetibilidade a variações na determinação do montelucaste sódico, foram denominadas de robustez. A partir de alterações como o pH, a proporção dos componentes da fase móvel, o fluxo e a procedência da coluna cromatográfica pode-se observar que, apesar de variações do tempo de retenção do fármaco, os teores calculados para o fármaco mantiveram-se similares às condições normais de análise, exceto quando se altera a marca da coluna, quando foi observado um pequeno decréscimo no teor e valor reduzido de pratos teóricos. Entretanto, esta diferença pode ser atribuída às características específicas das colunas utilizadas e ao processo de empacotamento das mesmas.

5.3.2.7 Estabilidade das soluções

Na Tabela 30 estão demonstrados os valores experimentais obtidos por CLAE de soluções de montelucaste sódico SQR, preparadas na concentração de 20 µg/ml, acondicionadas em frascos de vidro âmbar, avaliadas durante 30 dias e armazenadas a temperatura de 2 a 8 °C.

Tabela 30 Valores experimentais obtidos a partir de soluções de MTC sódico SQR num intervalo de 30 dias.

Dia	Área	Teor (%)
0	483,63334	100,15
15	483,98769	100,24
30	482,99768	100,03

*Média de três determinações

O tratamento estatístico dos valores obtidos entre os diferentes dias de análise do montelucaste sódico está demonstrado na Tabela 31.

Tabela 31 Análise de variância das áreas absolutas obtidas para obtenção da estabilidade das soluções de MTC sódico.

Fontes de variação	Gl	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre grupos	2	1,45351	0,72675	17,72626*
Dentro	6	0,24599	0,04099	---
Total	8	1,69950	---	---

* Significativo para $p < 0,05$.

O resultado da ANOVA, segundo a Tabela 31, demonstrou que há diferença significativa entre os resultados da análise nos diferentes dias testados, para um nível de significância de 5%, indicando degradação de MTC sódico em solução por um período superior a 15 dias, armazenado sob refrigeração. A solução de montelucaste sódico SQR manteve-se estável na geladeira (2 a 8 °C) por 15 dias em metanol, como pode ser observado na Tabela 30.

5.3.2.8 Adequabilidade do sistema

Na Tabela 32 estão apresentados os resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos pelo método cromatográfico, bem como os valores preconizados.

Tabela 32 Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados para CLAE (FDA, 1994; SHABIR, 2003).

Parâmetro	Recomendação	MTC sódico
Fator de retenção (k)	$k > 2$	2,21
Repetibilidade das injeções	$DPR \leq 1, n \geq 5$	0,23 (n= 6)
Assimetria (T)	$T \leq 2$	1,07
Pratos teóricos (N)	$N > 2000$	6295

O teste de adequabilidade do sistema é essencial para assegurar a qualidade no desempenho do sistema cromatográfico (FDA, 1994).

Todos os parâmetros testados, conforme mostrado na Tabela 32, apresentaram valores de acordo com o recomendado.

Com base na avaliação dos resultados obtidos através dos parâmetros analíticos verificados no procedimento de validação, é possível afirmar que o método por cromatografia a líquido de alta eficiência para análise do montelucaste sódico é adequado para o controle de qualidade do fármaco em estudo.

O método desenvolvido e validado por cromatografia a líquido de alta eficiência para análise de MTC foi selecionado para utilização nos testes preliminares de estabilidade, por apresentar como característica elevada sensibilidade, comprovada pelos baixos limites de detecção e quantificação, quando comparada aos outros métodos. A sensibilidade e seletividade do método é fator preponderante nos estudos de estabilidade, para detecção de potenciais produtos de degradação.

5.3.3 Eletroforese Capilar (EC)

Os parâmetros analíticos avaliados para a determinação do montelucaste sódico na forma farmacêutica por eletroforese capilar estão descritos a seguir.

5.3.3.1 Especificidade

5.3.3.1.1 Avaliação da especificidade do método frente à amostra simulada dos excipientes

A especificidade do método eletroforético foi avaliada através da comparação dos eletroferogramas obtidos, o que permite avaliar a possível interferência dos excipientes na determinação do montelucaste sódico.

As soluções de montelucaste sódico SQR e da amostra simulada de excipientes foram preparadas conforme descrito no item 4.4.3.2.1.1. A composição da amostra simulada de excipientes está descrita na Tabela 7.

A Figura 23 mostra os eletroferogramas obtidos, por EC, com as soluções de montelucaste sódico SQR (50 µg/ml) e da amostra simulada dos excipientes.

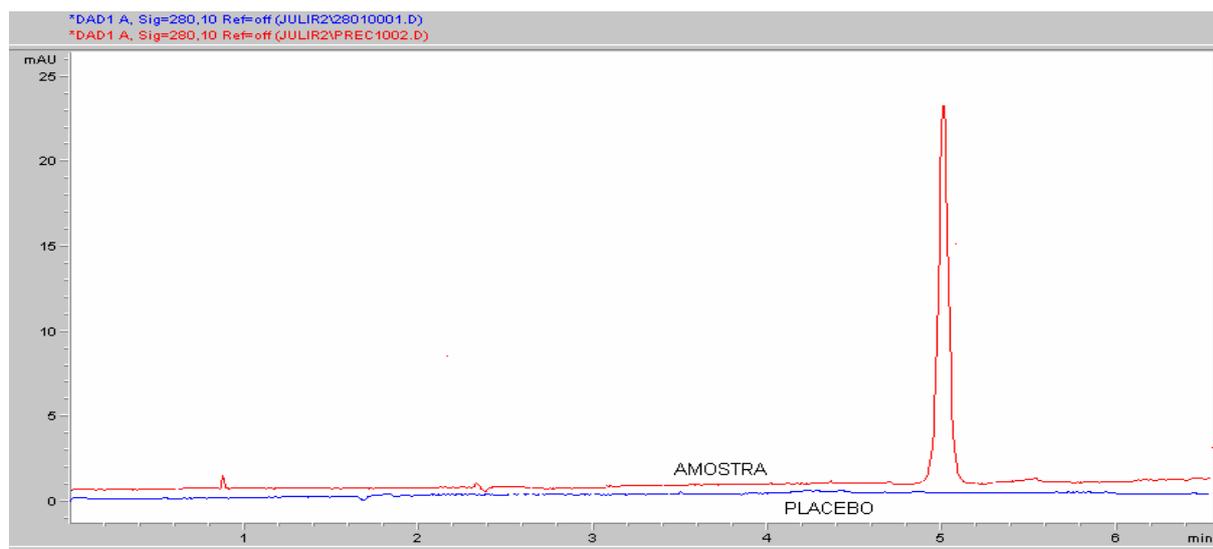


Figura 23 Sobreposição dos eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções de montelucaste sódico SQR e da solução da amostra simulada dos excipientes (placebo). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno, eletrólito tampão tetraborato de sódio: dodecilsulfato de sódio (10 mM: 30 mM), pH 9,4, tensão aplicada de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos, detecção UV λ de 280 nm, temperatura de análise 25 $^{\circ}\text{C} \pm 1$ $^{\circ}\text{C}$.

Através da análise dos eletroferogramas das soluções de montelucaste sódico SQR e amostra simulada de excipientes, observou-se que o método proposto apresenta especificidade, já que não sofre interferência dos excipientes junto ao pico do MTC sódico. Além disso, a pureza do pico observado para o montelucaste sódico encontra-se em torno de 99,99%.

5.3.3.1.2 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada

As soluções de montelucaste sódico preparadas a partir dos comprimidos revestidos foram submetidas a condições extremas de análise com intuito de provocar a formação de prováveis produtos de degradação e avaliar a possível interferência destes na determinação do MTC sódico.

A Figura 24 mostra o eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico submetida à degradação térmica a 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 horas.

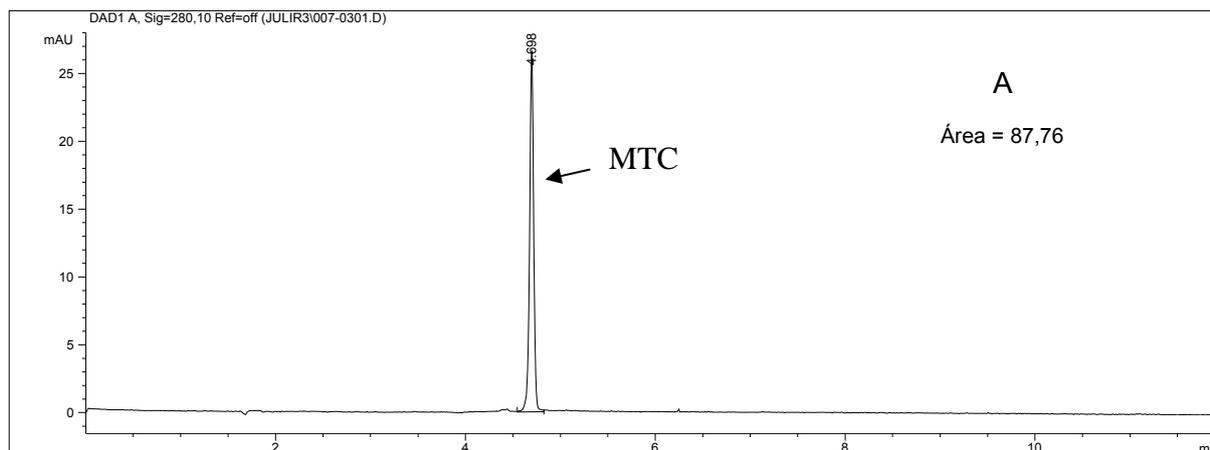


Figura 24 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico em concentração de 50 µg/ml submetida à degradação térmica a 80 °C durante 5 horas. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno, eletrólito tampão tetraborato de sódio: dodecilsulfato de sódio (10 mM: 30 mM), pH 9,4, tensão aplicada de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos, detecção UV λ de 280 nm, temperatura de análise 25 °C \pm 1 °C.

A Figura 25 mostra o eletroferograma da solução de MTC sódica submetida à fotólise sob radiação UV (352 nm) durante 15 minutos.

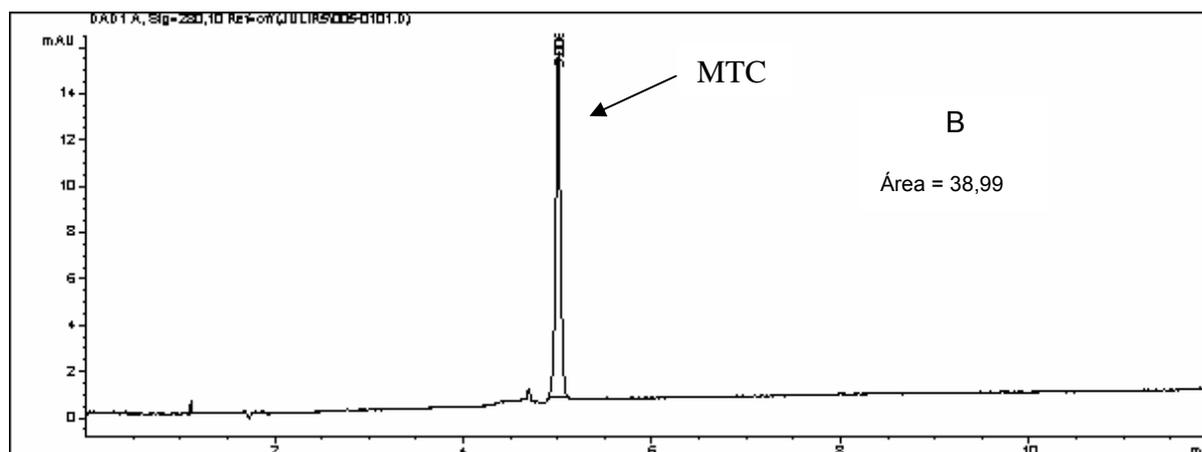


Figura 25 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico em concentração de 50 µg/ml submetida à fotólise sob radiação UV (352 nm) durante 15 minutos. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno, eletrólito tampão tetraborato de sódio: dodecilsulfato de sódio (10 mM: 30 mM), pH 9,4, tensão aplicada de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos, detecção UV λ de 280 nm, temperatura de análise 25 °C \pm 1 °C.

A Figura 26 mostra o eletroferograma da solução de MTC sódico submetida à oxidação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3%, v/v) durante 2 horas.

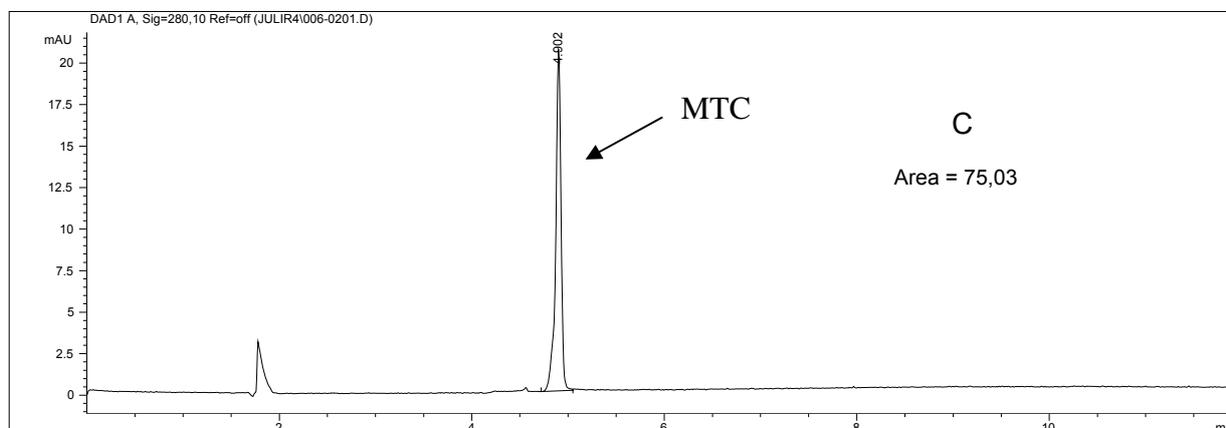


Figura 26 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico em concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ submetida à oxidação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3%, v/v) durante 2 horas. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno, eletrólito tampão tetraborato de sódio: dodecilsulfato de sódio (10 mM: 30 mM), pH 9,4, tensão aplicada de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos, detecção UV λ de 280 nm, temperatura de análise 25 $^\circ\text{C} \pm 1$ $^\circ\text{C}$.

A Figura 27 mostra o eletroferograma da solução de MTC sódico submetida à hidrólise ácida em ácido clorídrico (HCl 0,1 M) durante 2 horas.

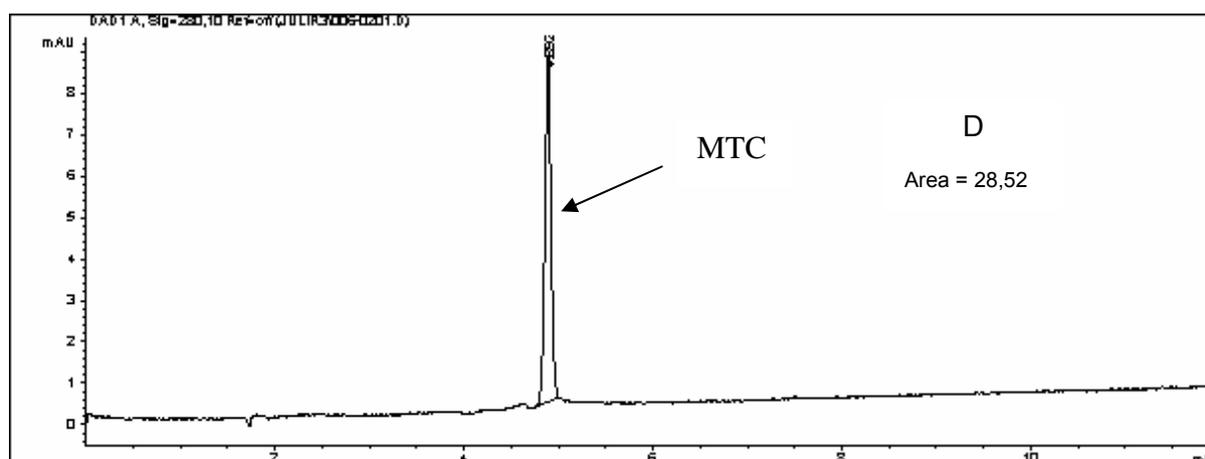


Figura 27 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico em concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ submetida à hidrólise ácida em ácido clorídrico (HCl 0,1 M) durante 2 horas. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno, eletrólito tampão tetraborato de sódio: dodecilsulfato de sódio (10 mM: 30 mM), pH 9,4, tensão aplicada de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos, detecção UV λ de 280 nm, temperatura de análise 25 $^\circ\text{C} \pm 1$ $^\circ\text{C}$.

A Figura 28 mostra o eletroferograma da solução de MTC sódico submetida à hidrólise alcalina em hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) durante 2 horas.

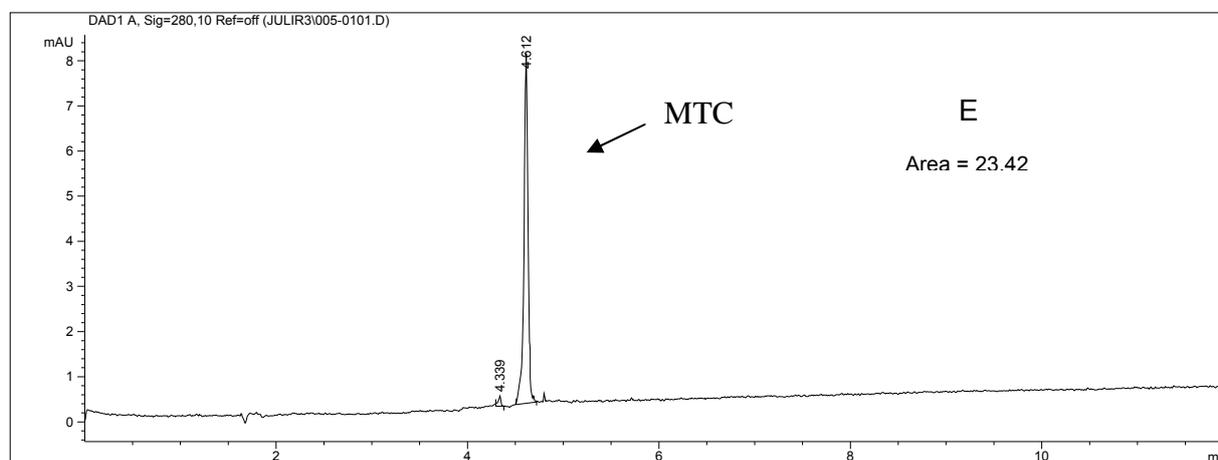


Figura 28 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico em concentração de 50 µg/ml submetida à hidrólise alcalina em hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) durante 2 horas. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno, eletrólito tampão tetraborato de sódio: dodecilsulfato de sódio (10 mM: 30 mM), pH 9,4, tensão aplicada de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos, detecção UV λ de 280 nm, temperatura de análise 25 °C ± 1 °C.

Na solução submetida à degradação térmica (80 °C) não foi observado nenhum pico de degradação ou diminuição no pico do montelucaste sódico (Figura 24). A solução placebo não apresentou nenhum pico.

O teste de fotólise (352 nm) apresentou um potencial pico de degradação em 4,75 minutos. Houve uma diminuição no teor do MTC sódico em 55% (Figura 25), equivalente ao resultado obtido pelo método de CLAE. A solução placebo não apresentou nenhum pico.

O estresse sob condição oxidante (H₂O₂ 3%, v/v) mostrou uma redução do teor de MTC sódico em 10%, mas não mostrou nenhum potencial produto de degradação. O eletroferograma apresentou um pico extra, possivelmente devido ao próprio peróxido de hidrogênio em 1,88 minutos (Figura 26), pois também aparece nos eletroferogramas da solução de H₂O₂ a 3% e no placebo.

Na hidrólise ácida (HCl 0,1 M e alcalina (NaOH 0,1 M) foi observado uma diminuição da área do pico em 67,92% e em 73,08 % respectivamente, sem o aparecimento de picos adicionais para a hidrólise ácida, e um sinal pequeno em 4,3 minutos para a hidrólise alcalina, sugerindo a possível degradação do MTC sódico nestas condições.

O MTC sódico apresentou redução no seu teor quando submetida aos efeitos da oxidação e hidrólise ácida sem o aparecimento, contudo, de picos adicionais. A diminuição na área do fármaco, sem aparecimento de picos adicionais, pode ser devido à formação de produtos de degradação não cromóforos, ou mesmo à presença de compostos com baixos pesos moleculares (BAKSHI e SINGH, 2002).

A análise dos picos através do software do equipamento (ChemStation) comprovou que nenhum dos picos dos potenciais produtos de degradação interferiu com o pico do montelucaste sódico após os testes de degradação acelerada. O fator de pureza dos picos do montelucaste sódico encontrados ficaram em torno de 99,99%. Este resultado indica que o método por EC é específico para o fármaco.

5.3.3.2 Linearidade

Na Tabela 33 estão demonstrados os valores experimentais encontrados para as áreas referentes à faixa de concentração utilizada (20,0 - 100,0 µg/ml) para o montelucaste sódico SQR por EC.

Tabela 33 Áreas absolutas do montelucaste sódico SQR obtidas por EC para determinação da curva padrão.

Concentração (µg/ml)	Área absoluta *	Área média ± e.p.m.	DPR
20,0	34,0856	35,4905 ± 0,8483	4,14
	35,3690		
	37,0169		
30,0	51,6980	53,2398 ± 0,7713	2,94
	53,9654		
	54,0256		
40,0	69,8776	69,8417 ± 0,8673	2,15
	68,3218		
	71,3256		
50,0	86,0587	87,7686 ± 0,9305	1,83
	87,9874		
	89,2598		
60,0	105,3698	107,1028 ± 0,8967	1,45
	107,5698		
	108,3690		
80,0	140,9856	141,7937 ± 0,7881	0,96
	141,0258		
	143,3698		
100,0	176,9584	177,7700 ± 0,6368	0,62
	177,3258		
	179,0258		

* Cada valor representa a média de três determinações.

e.p.m. – Erro padrão da média

DPR – Desvio padrão relativo

A representação gráfica da curva padrão do montelucaste sódico SQR, obtida pela técnica de EC, encontra-se na Figura 29.

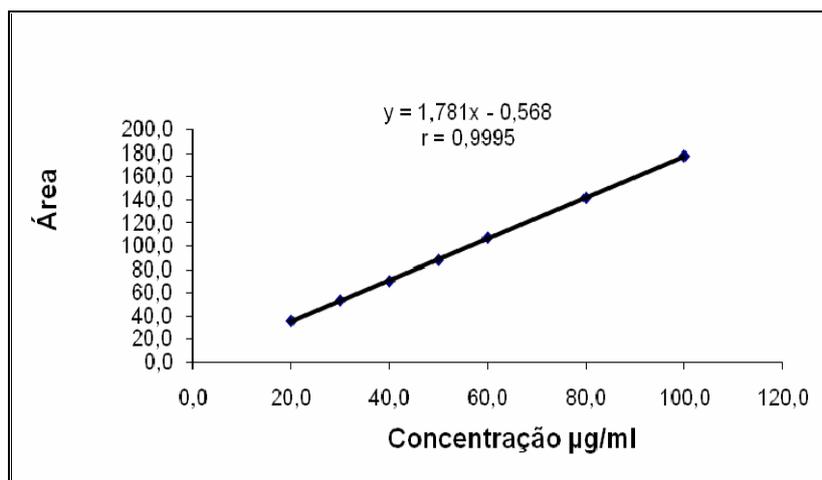


Figura 29 Representação gráfica da curva padrão do montelucaste sódico SQR obtida por EC.

A análise estatística através da ANOVA para verificar a linearidade do método por EC está demonstrada na Tabela 34.

Tabela 34 Análise de variância das áreas absolutas obtidas para obtenção da curva padrão do montelucaste sódico SQR por EC.

Fontes de variação	GI	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	6	45452	7575	2866,265*
Regressão linear	1	45445	45445	17185,146 *
Desvio de linearidade	5	7	1	2,489
Resíduo	14	37	3	---
Total	20	45489	---	---

* Significativo para $p < 0,05$.

A linearidade do método foi verificada através da construção de três curvas padrão em um único dia, na faixa de concentração de 20,0 a 100,0 µg/ml. A equação da reta resultante foi $y = 1,781x - 0,582$ e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9995, determinado pelo estudo de regressão linear. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que existe regressão linear (F calculado = 17185,146 > F crítico = 4,6; $p < 0,05$) sem haver desvio da linearidade (F calculado = 2,489 < F crítico = 2,96; $p > 0,05$), o que confere validade do método proposto em termos de linearidade.

5.3.3.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores obtidos para determinação dos limites de detecção e de quantificação do montelucaste sódico através do método de EC podem ser observados na Tabela 35.

Tabela 35 Valores obtidos experimentalmente para o LD e LQ para o método por EC.

Parâmetro Analítico	Montelucaste sódico
Limite de detecção (LD)	0,75 µg/ml
Limite de quantificação (LQ)	2,00 µg/ml

Nas Figuras 30 e 31 estão representados os eletroferogramas referentes à determinação experimental dos LD e LQ, respectivamente. Juntamente com as figuras estão os valores do sinal:ruído obtidos através do software Chemistation.

RetTime [min]	k'	Sig	Amount [ng/ul]	Sym.	Width [min]	Plates	Signal /Noise	Name
5.031	2.55	1	0.000	1.11	0.000	57908	3.4	

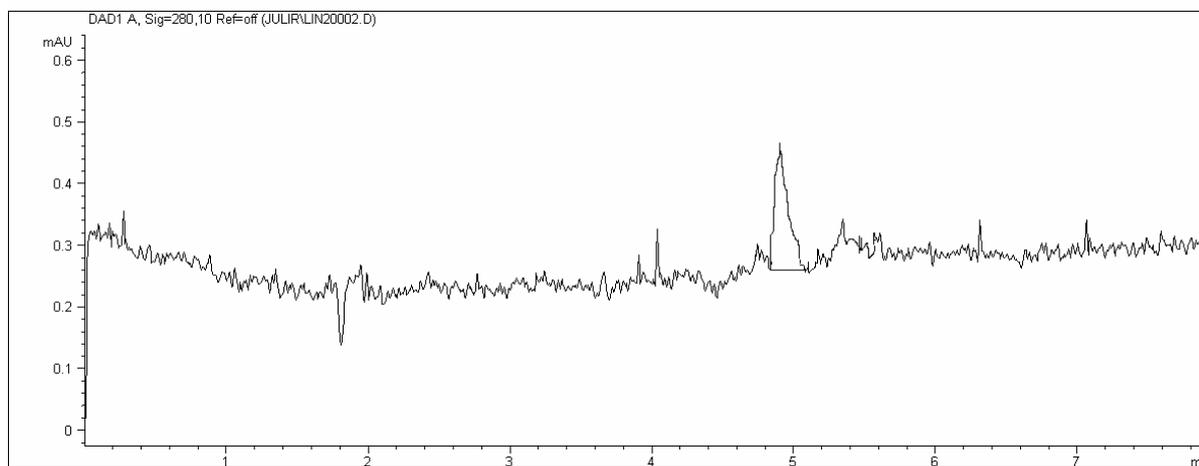


Figura 30 Eletroferograma obtido com a solução de MTC sódico SQR na concentração de 0,75 µg/ml. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno, eletrólito tampão tetraborato de sódio: dodecilsulfato de sódio (10 mM: 30 mM), pH 9,4, tensão aplicada de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos, detecção UV λ de 280 nm, temperatura de análise 25 °C \pm 1 °C.

RetTime [min]	k'	Sig	Amount [ng/ul]	Symm.	Width [min]	Plates	Signal Name / Noise
5.039	2	1	0.000	1.10	0.000	65980	9.4

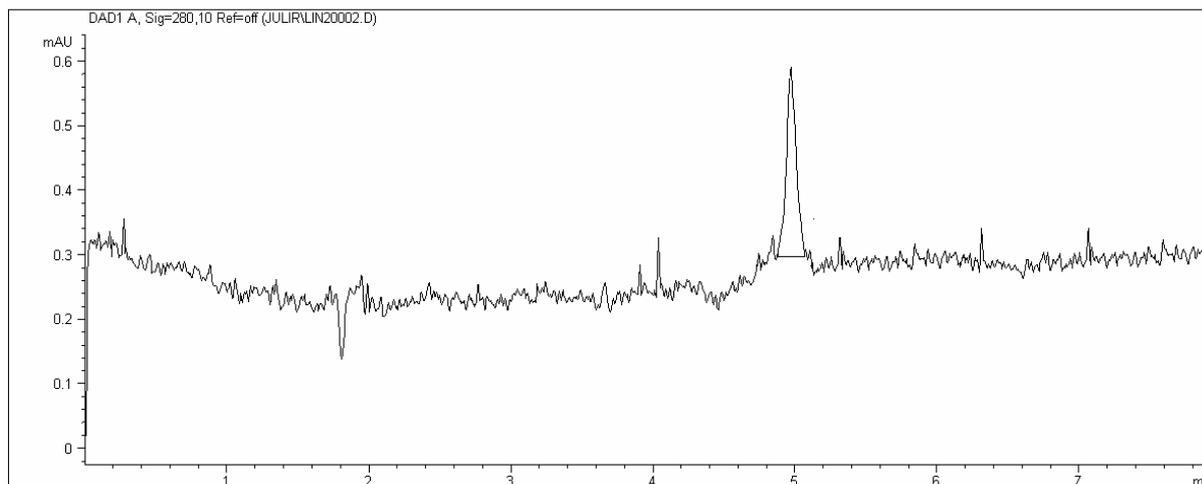


Figura 31 Electroferograma obtido com a solução de MTC sódico SQR na concentração de 2,00 µg/ml. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno, eletrólito tampão tetraborato de sódio: dodecilsulfato de sódio (10 mM: 30 mM), pH 9,4, tensão aplicada de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos, detecção UV λ de 280 nm, temperatura de análise 25 °C \pm 1 °C.

Os limites de detecção e quantificação para o montelucaste sódico apresentam valores baixos de concentração do analito, 0,75 e 2,00 µg/ml, respectivamente, demonstrando a elevada sensibilidade do método para determinação e quantificação do MTC sódico.

5.3.3.4 Precisão

Os valores experimentais obtidos na determinação do montelucaste sódico em comprimidos revestidos por EC estão descritos na Tabela 36, bem como os resultados obtidos a partir da determinação da precisão intermediária realizada em três dias consecutivos.

Tabela 36 Apresentação dos valores experimentais obtidos a partir da determinação do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos obtidos por EC para avaliação da precisão.

	Teor (%) das soluções de MTC sódico (10 µg/ml)*			Teor Intradia (%) ± e.p.m.	DPR
	Dia 1	101,76 100,46	100,01 100,56	102,68 100,08	100,92 ± 0,434
Dia 2	101,97 100,64	103,41 100,07	101,94 102,34	101,72 ± 0,491	1,18
Dia 3	101,67 101,97	101,02 102,88	101,35 100,03	100,49 ± 0,327	0,79
Teor médio interdias (%)				100,96 ± 0,519	
DPR				0,81	

* Cada valor representa a média de três determinações.

A precisão do método proposto foi realizada em três diferentes dias, nos quais foram realizadas seis determinações das amostras preparadas individualmente para cada dia. O teor intradia obtido para o montelucaste sódico nos comprimidos foi equivalente a 100,92%, 101,72% e 100,49%, no primeiro, segundo e terceiro dias, respectivamente. O teor interdias foi 100,96% e desvio padrão de 0,81, demonstrando boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados a partir da execução deste método.

5.3.3.5 Exatidão

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação do montelucaste sódico SQR, para avaliação da exatidão, estão apresentadas na Tabela 37.

Tabela 37 Resultados do teste de recuperação por EC para determinação do MTC sódico em comprimidos revestidos.

	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR
	Adicionada	Recuperada *			
R1	12,50	12,31	98,48		
R2	25,00	25,17	100,68	99,67	1,11
R3	37,50	37,45	99,86		

* Cada valor representa a média de três determinações

O método desenvolvido demonstrou exatidão através dos resultados obtidos, exibindo percentagem de recuperação média de 99,67%.

5.3.3.6 Robustez

Os resultados obtidos na determinação do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos, através de pequenas alterações nas condições eletroforéticas, podem ser observados na Tabela 38.

Tabela 38 Variações aplicadas ao método por EC na determinação do MTC sódico para avaliação da robustez do método.

Modificações	Teor (%) de MTC sódico*	Tempo de retenção (min)	Pratos teóricos (N)	Assimetria (T)
pH 9,3**	99,10	5,09	64980	1,06
pH 9,5**	100,25	4,99	66239	1,06
24 kV**	99,78	5,17	66448	1,07
26 kV**	99,69	4,96	65697	1,11
4 s /50 mBar**	99,91	5,06	63349	1,06
6 s /50 mBar**	99,09	5,21	66106	1,14
Condições normais	100,11	5,06	65950	1,07

* Cada valor representa a média de três determinações.

**Eletrólito: tampão tetraborato de sódio: dodecilsulfato de sódio (10 mM: 30 mM) pH 9,4, tensão de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar/ 5 segundos.

A análise eletroforética das diferentes condições analíticas foi realizada separadamente. Os parâmetros eletroforéticos do pico do MTC sódico apresentaram poucas alterações. A avaliação da robustez do método garante a validade do procedimento analítico sempre que utilizado, pois as alterações no pH do eletrólito, na tensão aplicada ao sistema e no tempo de injeção da amostra não influenciaram na determinação quantitativa do MTC sódico, apesar de apresentarem diferenças no tempo de retenção do fármaco. Dessa forma, é possível afirmar que o método proposto apresenta robustez.

5.3.3.7 Estabilidade das soluções

Na Tabela 39 estão demonstrados os valores experimentais obtidos por EC de soluções de montelucaste sódico SQR, preparadas na concentração de 50 µg/ml, armazenadas a temperatura de 2 a 8 °C e avaliadas durante 28 dias.

Tabela 39 Valores experimentais obtidos a partir de soluções de MTC sódico SQR num intervalo de 28 dias.

Dia	Área	Teor (%)
0	87,78990	100,11
7	87,65789	99,95
14	67,98765	77,52
21	50,98705	58,14
28	35,98762	41,03

*Média de três determinações

A solução de montelucaste sódico SQR não permaneceu estável na geladeira (2 a 8 °C), preparada conforme descrito no item 4.4.3.2.1. Sendo assim, as soluções de MTC sódico utilizadas no desenvolvimento do método de eletroforese capilar foram preparadas diariamente, a fim de evitar possíveis degradações das amostras.

5.3.3.8 Adequabilidade do sistema

Na Tabela 40 estão apresentados os resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos pelo método eletroforético, bem como os valores preconizados.

Tabela 40 Parâmetros aproximados de adequabilidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados para CLAE e EC (FDA, 1994; SHABIR, 2003).

Parâmetro	Recomendação	MTC sódico
Repetibilidade das injeções	DPR ≤ 1, n ≥ 5	0,99 (n= 6)
Fator de cauda (T)	T ≤ 2	1,07
Pratos teóricos (N)	N > 2000	66950

Todos os parâmetros testados, conforme mostrado na Tabela 40, apresentaram valores de acordo com o recomendado.

Com base na avaliação dos resultados obtidos através dos parâmetros analíticos verificados no procedimento de validação, é possível afirmar que o método de eletroforese capilar para análise do montelucaste sódico é adequado para o controle de qualidade do fármaco.

5.4 Análise estatística comparativa dos métodos

Com o objetivo de avaliar a capacidade de utilizar indistintamente os métodos desenvolvidos para quantificação do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos, realizou-se a análise estatística, através de ANOVA, dos valores obtidos para os três métodos propostos neste trabalho.

Na Tabela 41 estão apresentados os valores médios obtidos na determinação do teor do MTC sódico através dos métodos propostos.

Tabela 41 Resultados obtidos na determinação de MTC sódico em comprimidos revestidos por espectrofotometria no UV, CLAE e EC.

	Espectrofotometria UV	CLAE	EC
Teor (%)*	100,21	101.22	100,96
DPR	0,52	0,49	0,81

*Média de dezoito determinações

O tratamento estatístico dos valores obtidos pelos diferentes métodos quantitativos propostos está demonstrado na Tabela 42.

Tabela 42 ANOVA dos valores obtidos na determinação de MTC sódico em comprimidos revestidos por espectrofotometria no UV, CLAE e EC.

Fontes de Variação	Gl	Soma de Quadrados	Variância	F
Entre grupos	2	0,72680	0,36340	0,62466
Resíduo	51	29,66958	0,58175	
Total	53	30,39638		

O resultado da ANOVA, segundo a Tabela 42, demonstrou que não há diferença significativa entre os métodos desenvolvidos, para um nível de significância de 5%. Estes resultados comprovam que os métodos desenvolvidos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa de MTC sódico em comprimidos revestidos.

5.5 Estudo preliminar da estabilidade dos comprimidos revestidos de montelucaste sódico

Os medicamentos devem manter suas características de identidade, eficácia, potência, pureza e segurança desde sua produção e período em que se encontram no mercado até o momento de seu uso (NUDELMAN, 1975). A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto, como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005; USP 30, 2007).

Estudos preliminares de estabilidade têm o objetivo de determinar quais os principais fatores que interferem no teor do fármaco, na toxicidade, na eficácia e nas

características farmacotécnicas e organolépticas. Os testes de estresse fornecem informações úteis sobre os potenciais mecanismos e produtos de degradação e a estabilidade intrínseca da molécula do fármaco, assim como para validar métodos analíticos indicadores de estabilidade (ICH, 2003; KLICK *et al.*, 2005). No entanto, as condições experimentais devem ser realistas e conduzir à formação de produtos de degradação relevantes, não havendo necessidade de exceder a exposição do fármaco pelo período de três meses e/ou não os degradando mais que 5 a 15% (KLICK *et al.*, 2005).

A capacidade de separação e detecção do fármaco de seus potenciais produtos de degradação, mesmo em baixas concentrações, faz da cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) o método analítico indicador de estabilidade mais amplamente empregado, pois apresenta alta capacidade de resolução, sensibilidade e especificidade se comparado aos métodos convencionais de análise (BAKSHI e SINGH, 2002).

5.5.1 Estabilidade térmica

Para o estudo de estabilidade térmica as amostras das soluções de MTC sódico, comprimidos triturados e intactos foram mantidas em estufa, a uma temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao final de cada tempo, o teor residual de MTC sódico foi determinado por CLAE e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 43, 44 e 45.

Tabela 43 Valores experimentais obtidos no estudo de estabilidade térmica das soluções de MTC sódico, obtidas por CLAE.

Tempo (dias)	Teor (%)*	DPR
0	100,50	0,34
1	100,29	1,09
3	99,98	0,89
5	99,99	0,56
10	100,28	1,22
15	100,90	0,18
20	100,03	0,78

*Cada valor representa a média de nove determinações.

O teor médio obtido de MTC sódico presente em solução metanólica foi equivalente a 100,28%.

Tabela 44 Valores experimentais obtidos no estudo de estabilidade térmica dos comprimidos triturados de MTC sódico, obtidas por CLAE.

Tempo (dias)	Teor (%)*	DPR
0	100,40	2,84
1	102,29	1,99
7	100,69	1,04
14	101,04	1,51
21	100,88	0,92
28	100,91	1,59
35	102,33	1,70

*Cada valor representa a média de nove determinações.

O teor médio obtido de MTC sódico presente nos comprimidos triturados para todos os dias de análise apresentou valor equivalente a 101,22%.

Tabela 45 Valores experimentais obtidos no estudo de estabilidade térmica dos comprimidos intactos de MTC sódico, obtidas por CLAE.

Tempo (dias)	Teor (%)*	DPR
0	100,40	0,84
1	100,09	0,29
7	101,47	1,89
14	100,24	1,04
21	100,98	1,02
28	100,19	0,98
35	99,93	0,79

*Cada valor representa a média de nove determinações.

O teor médio obtido de MTC sódico nos comprimidos intactos, para todos os dias de análise, foi equivalente a 100,47%.

Os resultados obtidos na determinação do teor de MTC sódico nas amostras avaliadas sugerem que a amostra em estudo não sofre degradação nas condições de análise aplicadas, mostrando-se estável a 60 °C por até 20 dias em solução, e 35 dias em comprimidos triturados e intactos. Os cromatogramas não apresentaram picos referentes a potenciais produtos de degradação nas condições estabelecidas para a avaliação da estabilidade térmica.

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que a temperatura não seja fator preponderante na estabilidade do montelucaste sódico.

5.5.2 Fotoestabilidade e determinação da cinética da reação

Para o estudo de fotoestabilidade as amostras foram mantidas em câmara sob lâmpada de radiação UV em 352 nm, e ao final de cada tempo, o teor de MTC sódico foi determinado por CLAE. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 46, 47 e 48.

Tabela 46 Valores experimentais obtidos no estudo de fotoestabilidade das soluções de MTC sódico, obtidas por CLAE.

Tempo (minutos)	Teor (%)*	DPR
0	100,50	0,34
3	92,59	1,95
6	80,08	0,49
9	64,83	0,41
12	54,80	0,39
15	46,20	1,45
18	36,72	0,70

*Cada valor representa a média de nove determinações.

Tabela 47 Valores experimentais obtidos no estudo de fotoestabilidade dos comprimidos triturados de MTC sódico, obtidas por CLAE.

Tempo (horas)	Teor (%)*	DPR
0	100,59	0,56
4	94,98	1,14
8	88,22	1,16
12	81,32	0,98
16	75,58	0,50
20	69,05	2,72
24	63,20	0,84
32	57,39	1,47

*Cada valor representa a média de nove determinações.

Tabela 48 Valores experimentais obtidos no estudo de fotoestabilidade dos comprimidos intactos de MTC sódico, obtidas por CLAE.

Tempo (horas)	Teor (%)*	DPR
0	100,59	0,56
6	100,19	0,39
12	100,47	0,99
24	100,04	1,67
36	100,18	1,22
48	100,43	0,98
72	100,11	0,70

*Cada valor representa a média de nove determinações.

Os resultados mais prováveis para a foto-decomposição de um fármaco são a perda de teor do produto e uma possível formulação terapeuticamente inativa.

Embora este não seja freqüentemente o caso, a fotodegradação pode levar a outros problemas, como a formação de subprodutos durante o tempo de armazenagem que possam causar efeitos adversos ao paciente. 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).

Para que uma reação fotoquímica ocorra é necessário que a molécula em estudo apresente máximos de absorção na região de amplitude da fonte de radiação. Compostos contendo grupamentos como o nitrogênio e ligações duplas conjugadas são mais sensíveis à fotólise quanto maior for o número desses cromóforos na molécula, especialmente se estão conjugados ou ocorrer a possibilidade de interação entre os elétrons móveis de cada grupo (NUDELMAN, 1975). O MTC sódico apresenta em sua estrutura química grupamentos de nitrogênio e ligações duplas conjugadas tornando-o suscetível à fotólise.

Os resultados obtidos mostraram que as amostras de MTC sódico em solução e em comprimidos triturados, sob exposição à lâmpada de radiação UV, sofreram degradação com notável diminuição do teor. A comparação das concentrações obtidas entre as amostras em solução referentes ao T_0 (amostra não submetida à radiação UV) e a que foi submetida a 18 minutos de luz UV, sugere um decréscimo de cerca de 63 % no teor do MTC sódico. A Figura 32 mostra o cromatograma da solução de MTC sódico após 18 minutos de exposição à radiação UV (352 nm).

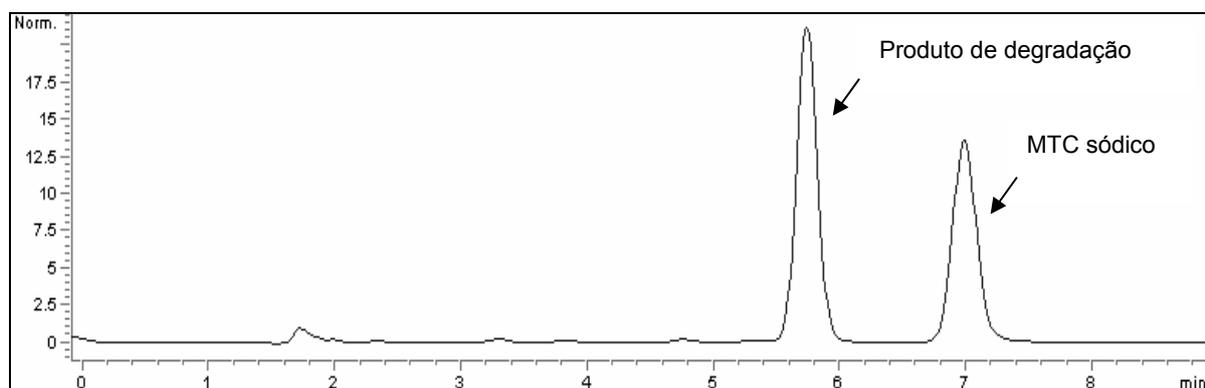


Figura 32 Cromatograma do MTC sódico submetido a 18 minutos de exposição à radiação UV (352 nm). Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (pH 3,8) (75:10:15, v/v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna ZORBAX XDB – C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m) AGILENT, detecção em λ de 280 nm, volume de injeção 20 μ l, temperatura de análise 25 $^{\circ}$ C.

À medida que o MTC sódico reduz seu teor durante a exposição à radiação UV, o pico do produto de degradação majoritário aumenta. SMITH e colaboradores (2004) sugerem que na presença de luz, o MTC sódico rapidamente se transforma em seu isômero geométrico *cis*, terapeuticamente inativo.

Já a comparação entre as amostras de comprimidos triturados entre o T_0 e 32 horas sugere um decréscimo de 42% no teor do fármaco. O fármaco em comprimidos triturados apresentou menor degradação em relação a solução devido ao menor grau de penetração da luz sob as partículas do fármaco ou, ainda, a presença dos excipientes que muitas vezes inibem a fotodegradação.

Já os comprimidos intactos de MTC sódico mostraram-se estáveis à exposição UV durante 72 horas, sugerindo a eficácia do revestimento do comprimido. O teor médio obtido para todos os dias de análise dos comprimidos intactos foi equivalente a 100,28%.

Tendo em vista que as reações fotoquímicas podem ser acompanhadas por reações térmicas, foi avaliada uma solução controle que, no tempo total de análise (72 horas) não foi alterada, podendo-se concluir que a degradação alcançada foi somente devido à luz.

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 de reação quando a degradação atinge estágios avançados, 90 a 80% (NUDELMAN, 1975). Sendo assim, a cinética de reação foi determinada apenas para a solução fotodegradada de MTC. Com objetivo de determinar a ordem de reação foram plotados os seguintes gráficos:

A. Ordem zero: tempo de exposição à radiação UV x concentração ($\mu\text{g/ml}$);

B. Primeira ordem: tempo de exposição à radiação UV x logaritmo da concentração ($\mu\text{g/ml}$);

C. Segunda ordem: tempo de exposição à radiação UV x 1/ concentração ($\mu\text{g/ml}$).

Os gráficos obtidos estão apresentados nas Figuras 33, 34 e 35.

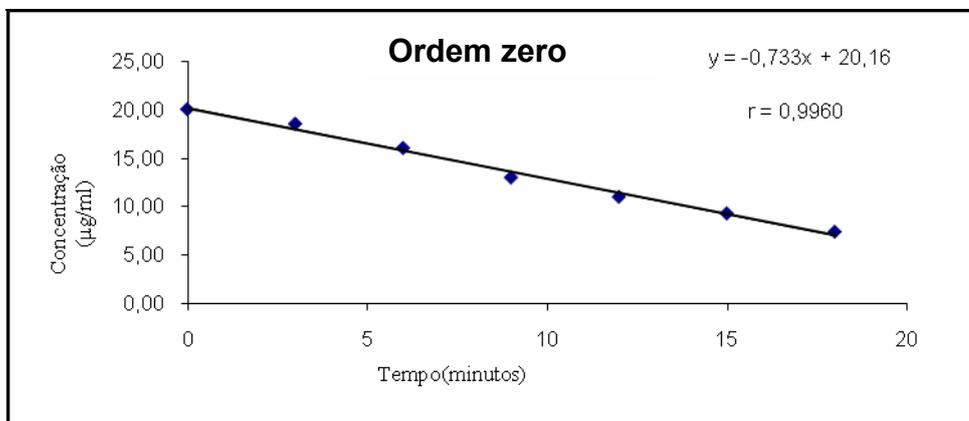


Figura 33 Representação gráfica da cinética de ordem zero de reação de fotodegradação obtida por CLAE após degradação forçada da solução de MTC sódico em câmara de luz UV de 352 nm.

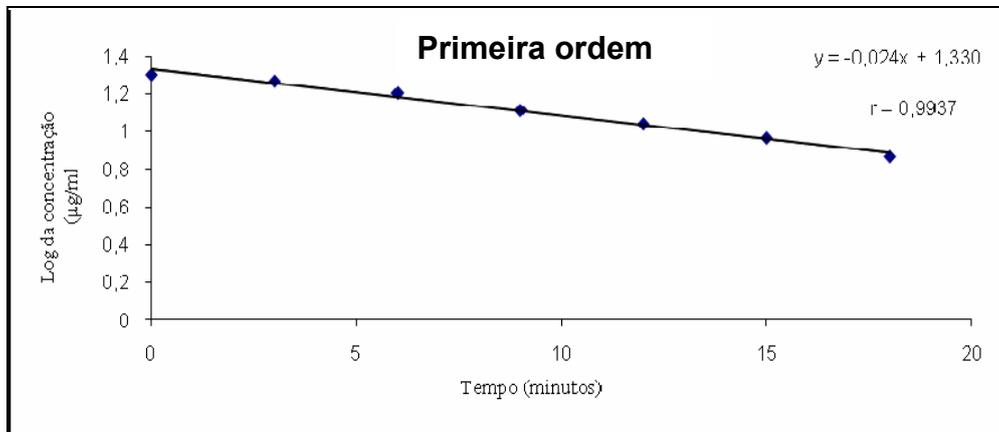


Figura 34 Representação gráfica da cinética de primeira ordem de reação de fotodegradação obtida por CLAE após degradação forçada da solução de MTC sódico em câmara de luz UV de 352 nm.

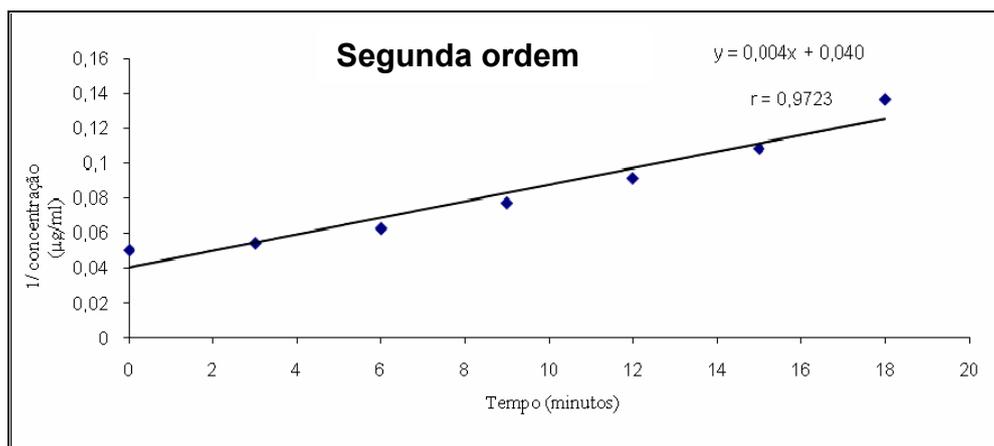


Figura 35 Representação gráfica da cinética de segunda ordem obtida por CLAE após degradação forçada de solução de MTC sódico em câmara de luz UV de 352 nm.

As reações de degradação ocorrem em velocidades definidas e são dependentes de várias condições, tais como concentração dos reagentes, temperatura, pH, da radiação ou da presença de catalisadores. A ordem de reação permite, em muitos casos, definir a variação da velocidade da reação em função das concentrações dos reagentes (LACHMAN *et al.*, 2001).

A avaliação dos resultados ilustrados nas Figuras 33, 34 e 35, demonstraram que a reação de ordem zero apresenta o melhor coeficiente de correlação ($r = 0,9960$), o que sugere que a degradação da amostra por radiação de ultravioleta de 352 nm obedeça a uma cinética de ordem zero, ou seja, a concentração (teor) do MTC sódico diminui proporcionalmente em função do aumento do tempo de exposição à luz UV. Além disso, a acentuada degradação do MTC sódico observada nas condições de análise empregadas justifica o revestimento da forma farmacêutica estudada.

6. CONCLUSÕES

- A caracterização do montelucaste sódico SQR foi efetuada satisfatoriamente. O método de espectrofotometria na região do infravermelho permitiu determinar características relevantes para identificação do anti-asmático em estudo;
- As análises por cromatografia em camada delgada, cromatografia a líquido de alta eficiência, espectrofotometria na região do ultravioleta e eletroforese capilar permitiram a identificação segura do montelucaste sódico nos comprimidos revestidos;
- Os métodos por espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia a líquido de alta eficiência e eletroforese capilar foram validados e demonstraram especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e sensibilidade adequadas para determinação do montelucaste sódico e nos comprimidos revestidos;
- A avaliação comparativa entre os métodos quantitativos propostos neste trabalho demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos;
- O ensaio preliminar de estabilidade térmica dos comprimidos revestidos sugere que o MTC sódico é estável à temperatura de 60 °C nas condições de análise empregadas;
- O estudo de fotoestabilidade indica a formação de um pico em 5,7 minutos como principal produto de degradação do MTC sódico quando exposto à radiação ultravioleta de 352 nm, nas condições experimentais aplicadas;
- O estudo preliminar de fotoestabilidade efetuado permitiu inferir que o MTC sódico em solução sofre degradação intensa e apresenta cinética de reação de ordem zero quando exposto à radiação ultravioleta de 352 nm nas condições experimentais aplicadas.

7. REFERÊNCIAS

AL-OMARI, M. M.; ZOUBI, R. M.; HASAN, E. I.; KHADER, T. Z.; BADWAN, A. Effect of light and heat on the stability of montelukast in solution and its solid state. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol: 45, p. 465-471, 2007.

AL-RAWITHI, S.; AL-GAZLAN, S.; AL-AHMADI, W.; ALSHOWAIER, I. A.; YUSUF, A.; RAINES, D. A. Expedient liquid chromatography method with fluorescence detection for montelukast sodium in micro-samples of plasma. **Journal of chromatography B, Biomedical Sciences and Applications**, vol: 754, n° 2, p. 527-531, 2001.

ALSARRA, I. Development of a stability-indicating HPLC method for the determination of montelukast in tablets and human plasma and its applications to pharmacokinetic and stability studies. **Saudi Pharmaceutical Journal**, vol. 12, n° 4, p. 136-143, 2004.

ALSARRA, I.; AL-OMAR, M.; GADKARIEM, E. A.; BELAL F. Voltametric determination of montelukast sodium in dosage forms and human plasma. **Farmaco**. Jun-Jul; 60 (6-7) p. 563-567, 2005a.

ALSARRA, I.; KHALIL, N. Y.; SULTAN, M.; AL-ASHBAN, R.; BELAL, F. Spectrofluorometric determination of montelukast in dosage forms and spiked human plasma. **Pharmazie**. Vol. 60, n. 11, p. 823-826, 2005b.

ALTRIA, K. D. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. II. **Trends in Analytical chemistry**, vol. 17, n. 4, p. 214-217, 1998.

AMIN, R. D.; CHENG, H.; ROGERS, J. D. Determination of MK-0476 in human plasma by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol: 13, n° 2, p. 155-158, 1995.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York: Willey, 1995. P.159-164.

BALANI, S. K.; XU, X.; PRATHA, V.; KOSS, M. A.; AMIN, R. D.; DUFRESNE, C.; MILLER, R.R.; ARISON, B. H.; DOSS, G. A.; CHIBA, M.; FREEMAN, A.; HOLLAND, S. D.; SCHWARTZ, J. I.; LASSETER, K. C.; GERTZ, B. J.; ISENBERG, J. I.; ROGERS, J. D.; LIN, J. H.; BAILLIE, T. A. A metabolic profiles of montelukast sodium (Singulair) , a potent cysteinyl leukotriene 1 receptor antagonist, in human plasma and bile. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, vol. 25, n° 11, p. 1282-1287, 1997.

BARNES, N.; WEI, L. X.; LEFF, J. A.; SHINGO, S.; YU, C.; EDELMAN, J. M. Analysis of montelukast in mild persistent asthmatic patients with near-normal lung function. **Respiratory Medicine**, vol: 95, p. 379-386, 2001.

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

BASTOS, E. M. **Efeito do zafirlukast na contratura capsular de implantes de silicone, em ratas**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Plástica Reparadora) – Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica Reparadora, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2005.

BASTOS, E. M.; NETO, M. S.; ALVES, M. T.; GARCIA, E. B.; SANTOS, R. A.; HEINK, T.; PEREIRA, J. B.; FERREIRA, L. M. Histologic analysis of zafirlukast's effect on capsule formation around silicone implants. **Aesthetic Plast. Surg.**, New York, v. 31, p. 559-565, 2007.

BEESELEY, T. E.; BUGLIO, B.; SCOTT, R. P. W. The critical factors that govern a successful quantitative chromatographic analysis. **Quantitative chromatographic analysis**. New York: Marcel Dekker, 2001, cap. 1, p. 3-19.

BENENUTI, E. T.; **Química Inorgânica: Átomos, Moléculas, Líquidos e Sólidos**. Editora UFRGS, 2ªed, p. 58-59, 2006.

BRASIL- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos através da revogação do RE- nº475 publicada no D.O.U. 19 de março de 2002. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de Jun, 2003.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 01 agosto de 2005.

BRITAIN, H. G. Validação de métodos não cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**. V. 2, n. 3, p. 4-9, 1998.

BRITAIN, H. G.; BOGDANOWICH, S. J.; BUGAY, D. E.; DEVICENTIS, J.; LEWEN, G.; NEWMAN, A. W. Physical characterization of pharmaceutical solids. **Pharmaceutical Research**, v. 8(8), p. 963-973, 1991.

BRONCHIAL Asthma. Disponível em: <<http://www.who.int/>>. Acesso em 15.03.2007.

CAPRON, A.; MARTIN, V. O.; AFCHAIN, D.; CESBRON, J. Y.; ARIAS, E. Immunoglobulina E y enfermedad de chagas/ immunoglobulina E and chagas disease. **Medicina**, vol. 43, nº 2, p. 262-266, 1986.

CIENFUEGOS, F.; VAISTMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, p 41, 55, 287, 2000.

CLARKES'. **Analysis of Drugs And Poisons in Pharmaceuticals Body fluids and Postmortem material**. 3ª ed. Volume 1. Londres, p. 313, 500, 534, 2004a.

CLARKES'. **Analysis of Drugs And Poisons in Pharmaceuticals Body fluids and Postmortem material**. 3ª ed. Volume 2. Londres, p. 1299, 2004b.

CLAS, S. D.; DALTON, C. R., HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **PSTT**, v. 2, n° 8, 1999.

COLEMAN, R. A., EGLIN, R. M.; JONES, R. L.; NARUMIYA, S.; SHIMIZU, T.; SMITH, W. L.; DAHLEN, S-E.; DRAZEN, J. M.; GARDINER, P. J.; JACKSON, W. T.; JONES, T. R.; KRELL, R. D.; NICOSIA, S. Prostanoid and leukotriene receptors: a progress report from the IUPHAR working parties on classification and nomenclature. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Research**, New York, v. 23, p. 283-285, 1995.

DEF 2007/2008. **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas**. 36ª ed. Produção Jornal Brasileiro de Medicina, 2007.

DEMPSEY, O. J. Leukotriene receptor antagonist therapy. **Postgrad. Med. Journal**. London, v. 76, p. 767-773, 2000.

DRUGBANK, 2008. Montelukaste. Disponível em [http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca.drugbank.>DRUG INFORMATION](http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca.drugbank.>DRUG%20INFORMATION,%202007-2008), 2007-2008. 8ª ED. Cleveland: Lexi-Comp. Inc., 2008. Acesso em 24.03.2008.

DRUG FACTS AND COMPARISONS. 58 ed. St. Louis, USA. Ed. Facts and Comparisons, 2004.

DRUG INFORMATION, 2008. American Society of Health – System Pharmacists, 2008.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 24, p. 755-767, 2001.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4ª Edição. São Paulo, Editora: Atheneu, 1988.

FDA – Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Validation of Chromatographic Methods, 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf>. Acesso em 25.05.2008.

FDA – Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Approval Letter**. 1998. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/pediatric/labels/montelukast%2012-31-02.pdf>. Acesso em: 24.03.2008.

GRAFF, G.R.; WEBER, A.; WESSLER-STARMAN, D.; SMITH, A.L. Montelukast pharmacokinetics in cystic fibrosis. **Journal of Pediatrics**, vol. 142, n° 1, p. 53-56, 2003.

GRYSKIEWICZ, J. M. Investigation of accolate and singulair for treatment of capsular contracture yields safety concerns. **Aesthetic Surg. Journal**, St. Louis, v. 23, p. 98-102, 2003

HOANG, T. H.; FARKAS, R.; WELLS, C.; MCCLINTOCK, S.; DI MASO, M. Application of pressurized liquid extraction technology to pharmaceutical solid dosage forms analysis. **Journal of Chromatography A**, vol: 968, nº 1-2, p. 257-261, 2002.

HOLMA, R.; SALMENPERA, P.; RIUTTA, A.; VIRTANEN, I.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Acute effects of the cys-leukotriene-1 receptor antagonist, montelukast, on experimental colitis in rats. **Eur. Journal of Pharmacology**. Amsterdam, v. 429, p. 309-318, 2001

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical methods: (definitions and terminology). Topic Q2A, 1994.

ICH – Harmonised Tripartite Guideline. Stability Testing of New Drug Substances and Products, Q1A(R2). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2003.

ICH – Harmonized 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.

KABASAKAL, L.; SENER, G.; CETINEL, S.; CONTUK, G.; GEDIK, N.; YEGEN, B. C. Burn-induced oxidative injury of the gut is ameliorated by the leukotriene receptor blocker montelukast. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, Edinburgh, v. 72, p. 431-440, 2005.

KITCHEN, C. J.; WANG, A. Q.; MUSSON, D. G.; YANG, A. Y.; FISHER, A. L. A semi-automated 96-well protein precipitation method for the determination of montelukast in human plasma using high performance liquid chromatography/fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol: 31, nº 4, p. 647-654, 2003.

KIBBE, A. H. (Ed.) **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3th ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, O.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDIN, T.; DEBETS, A.; CRIEND, C.; BELD, C.; SONSEN, G.; JONG, G. Toward a generic approach for stress testing and rug products. **Pharmaceutical Technology**, p. 48-66. February, 2005.

KNORR, B.; LARSON, P.; NGUYEN, H. H.; HOLLAND, S.; REISS, T. F.; CHERVINSKY, P.; BLAKE, K.; NOONAN, G.; FREEMAN, A.; HAESSEN, R.; MICHIELS, N.; ROGERS, J.D.; AMIN, R. D.; ZHAO, J.; XU, X.; SEIDENBERG, B. C.; GERTZ, B. J.; SPIELBERG, S. Montelukast dose selection in 6 to 14 year olds: comparison of single-dose pharmacokinetics in children and adults. **Journal of Clinical Pharmacology**, vol. 38, nº 8, p. 786-793, 1999.

- KNORR, B.; FRANCHI, L. M.; BISGAARD, H.; VERMEULEN, J. H.; LESOUEF, P.; SANTANELLO, N.; MICHELE, T. M.; REISS, T. F.; NGUYEN, H. H.; BRATTON, D. L. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, for de treatment of persistent asthma in children aged 2 to 5 years. **Pediatrics**, vol. 108, n° 3, 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.
- LIMA, M. L.; FRAGA, A. M.; BARREIRO, E. J. Agentes antiasmáticos modernos: Antagonistas de receptores de leucotrienos cisteínicos. **Química Nova**, vol. 25, n° 5, p.825-834, 2002.
- LIU, L.; CHENG, H.; ZHAO, J. J.; ROGERS, D. Determination of montelukast (MK-0476) and its S-enantiomer in human plasma by stereoselective high-performance liquid chromatography with column-switching. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol: 15, n° 5, p. 631-638, 1997.
- MATOS, F. L.; MARTINEZ, J. A. B.; SALA, T. F.; VIANNA, E. O. Avaliação da inflamação de vias aéreas em asmáticos após o teste de broncoprovocação com metacolina. **Jornal de Pneumologia**, vol. 27 n° 4, p. 172-176, 2001.
- MERÁS, I. D.; MANSILLA, A. E.; RODRIGUEZ, D. A. Complexation study of cinalukast and montelukast with ciclodextrines. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, vol. 43, p. 1025-1032, 2007.
- MIGOYA E.; KEARNS, G.L.; HARTFORD, A.; ZHAO, J.; ADELSBERG, J.; TOZZI, C.;KNORR, B.; DEUTSCH, P. Pharmacokinetics of montelukast in asthmatic patients 6 and 24 months old. **Journal of Clinical Pharmacology**, vol. 44, n° 5, p. 487-494, 2004.
- NAKANISHI, K. **Infrared Absorption Spectroscopy: Practical**. 2nd ed. San Francisco Tokyo: Holden-Day: Nankodo Company, 1977.
- NUDELMAN, N.S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneu, 1975.
- OCHIAI, H.; UCHIYAMA, N.; TAKANO, T.; HARA, K.; KAMEI, T. Determination of montelukast sodium in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications**, vol: 713, n°. 2, p. 409-414, 1998.
- OVERBEEK, S. E.; O'SULLIVAN, S.; LEMAN, K.; MULDER, P. G. H.; HOOGSTEDEN, H. C.; PRINS, J. B. Effect of montelukast compared with inhaled fluticasone on airway inflammation. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for allergy and Clinical immunology**, vol. 34, n° 9, p. 1388-1394, 2004.
- PAPP, R.; LUK, P.; MULLETT, W. M.; KWONG, E. A rapid and sensitive method for the quantitation of montelukast in sheep plasma using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, vol: 858, p. 282-286, 2007.

PAVIA, D. L. **Introduction to Spectroscopy**. 3^a ed. South Melbourne: Brookscole, 2001.

RADHAKRISHNA, T.; NARASARAJU, A.; RAMAKRISHNA, M.; SATYANARAYANA, A. Simultaneous determination of montelukast and loratadine by HPLC and derivative spectrophotometric methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses**, vol: 31, n^o2, p. 359-368, 2003.

RAMAKRISHNAN, R.; MIGOYA, E.; KNORR, B. A population pharmacokinetic Model for montelukast disposition in adults and children. **Pharmaceutical Research**, vol. 22, n^o 4, p. 532-540, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 6^a ed. Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro, 2007.

REID, R. R.; GREVE, S. D.; CASAS, L. A. The effect of zafirlukast (accolate) on early capsular contracture in the primary augmentation patient: a pilot study. **Aesthetic Surg. Journal**, St. Louis, v. 25, p. 26-30, 2005.

SANTO, A. H. Mortalidade relacionada à asma, Brasil, 2000: um estudo usando causas múltiplas de morte. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 22, 2006.

SCHLESINGER, S. L.; ELLENBOGEN, R.; DESVIGNE, M. N.; SVEHLAK, S.; HECK, R. Zafirlukast (accolate): a new treatment for capsular contracture. **Aesthetic Surg. Journal**, St. Louis, v. 22, p. 329-336, 2002.

SCHMITT, S.; EICKMEIER, O.; SCHUBERT, R.; BEZ, C.; ZIELEN, S. Anti-inflammatory effects of montelukast in mild cystic fibrosis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**: official publication of the American College of Allergy, Asthma & Immunology, vol: 89, n^o. 6, p. 599-605, 2002.

SCUDERI, N.; MAZZOCCHI, M.; FIORAMONTI, P.; BISTONI, G. The effects of zafirlukast on capsular contracture: preliminary report. **Aesthetic Plast. Surg.**, New York, v. 30, p. 513-520, 2006.

SENER, G.; KABASAKAL, L.; CETINEL, S.; CONTUK, G.; GEDIK, N.; YEGEN, B. C. Leukotriene receptor blocker montelukast protects against burn-induced oxidative injury of the skin and remote organs. **Burns**, Oxford, v. 31, p. 587-596, 2005a.

SENER, G.; KAPUCU, C.; CETINEL, S.; CIKLER, E.; AYANOGLU-DULGER, G. Gastroprotective effect of leukotriene receptor blocker montelukast in alendronatinduced lesions of the rat gastric mucosa. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, Edinburgh, v. 72, p. 1-11, 2005b.

SENER, G.; SEHIRLI, O.; CETINEL, S.; ERCAN, F.; YUKSEL, M.; GEDIK, N.; YEGEN, B. C. Amelioration of sepsis-induced hepatic and ileal injury in rats by the leukotriene receptor blocker montelukast. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, Edinburgh, v. 73, p. 453-462, 2005c.

SHABIR, G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

- SILVA, P. **Farmacologia**. 7ª ed. Guanabara Koogan S.A., 2006.
- 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.
- SIMONS, F. E. R. More relevant than ever in the treatment of allergic disorders. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 5, p. 2-12, 2003.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- SMITH, G. A.; RAWLS, C. M.; KUNKA, R. L. An automated method for the determination of montelukast in human plasma using dual-column HPLC analysis and peak height summation of the parent compound and its photodegradation product. **Pharmaceutical Research**. Vol 21, n° 9, p. 1539-1544, 2004.
- SWEETMAN, S. **Martindale: The Complete Drug Reference**. 35ª ed. The pharmaceutical press, 2007.
- TØNNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 225, p. 1-14, 2001.
- UNDEM, B. J.; LICHTENSTEIN, L.M. Fármacos usados no tratamento da asma. In:____. **Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª ed. Rio de Janeiro, 2003. p. 551-563.
- USP 30. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30º ed. Rockville: United States Pharmacopeical Convention, 2007. p. 2748-2751.
- WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. 2ª ed. Edinburgh. Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
- YU, G. L.; WEI, E. Q.; ZHANG, S. H.; XU, H. M.; CHU, L. S.; ZHANG, W. P.; HANG, Q.; CHEN, Z.; MEI, R. H.; ZHAO, M. H. Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist, dose- and time-dependently protects against focal cerebral ischemia in mice. **Pharmacology**, Basel, v. 73, p. 31-40, 2005.
- YUKSEL, H.; OZBILGIN, K.; COSKUN, S.; TUGLU, I. Protective effect of leukotriene receptor antagonist montelukast on smoking-induced lung injury in Wistar rats. **Acta Med. Okayama**, Okayama, v. 57, p. 13-19, 2003.

