

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANA CAROLINA GUIMARÃES RIBEIRO**

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA SULFATO  
DE SALBUTAMOL INALATÓRIO PRESSURIZADO DOSIMETRADO**

**Belo Horizonte - MG  
2015**

**ANA CAROLINA GUIMARÃES RIBEIRO**

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA SULFATO  
DE SALBUTAMOL INALATÓRIO PRESSURIZADO DOSIMETRADO**

Dissertação como requisito parcial para obter o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares - UFMG

**Belo Horizonte - MG  
2015**

*Dedico o grau de Mestre*

*Ao meu pai Wilson Ribeiro por sempre ter me incentivado a estudar, pelo amor incondicional e por ter sido o meu grande exemplo de disciplina e empenho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu marido Breno por todo o apoio, incentivo e compreensão nos momentos de minha ausência devido aos estudos. Por ter acumulado tarefas para me possibilitar realizar um sonho no período de início do casamento. Acima de tudo pelo amor que me fortaleceu nos momentos mais difíceis.

A minha amada mãe Margarete pelo amor incondicional, incentivo, apoio e carinho. Por ser exemplo de mulher contemporânea e que acima de tudo é uma mãe maravilhosa que sempre prezou o amor à família. Obrigada por não poupar esforços na minha educação.

Ao meu saudoso e amado pai Wilson por ter me deixado de herança a dignidade e por ser minha maior motivação para que eu possa fazer a diferença na vida das pessoas.

A minha orientadora Profa. Dra. Cristina por ter acreditado na minha capacidade de contribuir para o desenvolvimento da ciência como pesquisadora. Agradeço à prontidão e boa vontade em discutir assuntos relacionados a esse trabalho sem importar com hora, data e local. Obrigada pela amizade e pelos ensinamentos.

Ao Pharmascience Laboratórios pela parceria nesse trabalho e pela permissão de conciliar as rotinas industrial e acadêmica. Agradeço ser pioneira no estabelecimento da relação entre indústria farmacêutica e academia na região metropolitana de Minas Gerais.

À farmacêutica Fernanda Moura por acreditar em bons resultados a partir da conciliação entre meus estudos de pós-graduação e a rotina de trabalho na indústria Pharmascience e pelos ensinamentos na profissão.

Ao farmacêutico Igor Felipe Rodrigues Ribeiro pelas produtivas discussões e ensinamentos sobre desenvolvimento de métodos analíticos e por ser um exemplo de

profissional da área. Agradeço a confiança em mim depositada diante do meu trabalho, bem como dos meus estudos.

Aos meus colegas do LCQ-FAFAR pelo bom convívio e pelas experiências compartilhadas.

Aos meus colegas do Pharmascience Laboratórios pelo companheirismo e contribuições.

À Profa. Leticia Malta Costa pelas discussões e ensinamentos sobre planejamentos experimentais por Quimiometria.

Aos meus grandes amigos do Colégio Batista Mineiro.

À colega de laboratório Naialy pela companhia e auxílios durante o período de mestrado.

A minha colega Taízia pela troca de experiências em trabalhos com medicamentos inalatórios e pelos conselhos enquanto à carreira acadêmica.

Aos meus familiares, principalmente ao meu irmão Breno, a minha cunhada Celina e a minha prima Eunice pelo amor e companheirismo.

## RESUMO

Os medicamentos broncodilatadores administrados pela via inalatória são utilizados no tratamento de doenças respiratórias por atuarem diretamente no alvo terapêutico e produzirem menos efeitos sistêmicos adversos. Dentre eles, está o sulfato de salbutamol (SS) inalatório que é amplamente administrado e listado na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais/RENAME. Os testes de controle de qualidade físico-químico para estes produtos são pouco difundidos entre os laboratórios brasileiros e não há instruções para execução desses testes na Farmacopeia Brasileira. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos analíticos para a avaliação da qualidade físico-química de medicamentos inalatórios, utilizando-se o SS inalatório pressurizado dosimetrado/IPD (Aerofrin<sup>®</sup> - 100 µg/dose), com base nas instruções das Farmacopeias Americana e Britânica. Logo, para a quantificação de SS desenvolveu-se método por CLAE por meio de planejamento Doehlert nas condições C18, 100x4,6 mm, 3,5 µm, 25 °C, fase móvel acetato de amônio 0,1% (p/v):metanol (78:22), fluxo 0,6 mL/min, λ 225 nm, na faixa de concentração linear de 1,5-12,0 µg/mL (R<sup>2</sup> 0,99998). Para o teste substâncias relacionadas o teor total foi abaixo do limite 0,5%. A identificação por espectrofotometria na região do infravermelho e por CLAE (3,48 min, k 1,85), foi positiva frente ao padrão. O doseamento e a uniformidade de dose liberada (UDL) foram desenvolvidos por meio do dispositivo de captação de dose emitida (*Dosage Unit Sampling Apparatus/DUSA*). O teor de SS encontrado no medicamento foi 111,69% do valor rotulado (VR) e as doses captadas no teste de UDL ficaram dentro da faixa de 75,0-125,0% VR. Para o teste distribuição aerodinâmica de partículas (DAP), dois métodos foram desenvolvidos por meio do impactador de cascata Andersen (*Andersen Cascade Impactor/ACI*) e do impactador duplo de vidro (*Glass Twin Impinger/GTI*). O diâmetro médio das partículas determinado por difração a laser foi de 3,48 µm. Os resultados dos parâmetros de validação estão de acordo com as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde/Anvisa-MS. Os testes para o controle de qualidade de medicamentos inalatórios desenvolvidos e validados neste trabalho serão propostos para compor a Farmacopeia Brasileira, a fim de aumentar a acessibilidade às instruções específicas aos laboratórios brasileiros.

Palavras-chave: sulfato de salbutamol, inalatório, broncodilatador, planejamento Doehlert, impactador em cascata, diâmetro aerodinâmico de partícula, cromatografia líquida, controle de qualidade.

## ABSTRACT

Bronchodilator drugs administered by inhalation are used in the treatment of respiratory diseases because they act directly on the therapeutic target and cause fewer systemic adverse effects. Among them is salbutamol sulphate (SS) for inhalation which is widely administered and listed in the National List of Essential Drugs/RENAME. The physical-chemical quality control tests for these products are little known among Brazilian laboratories and there are no instructions for such testing in the Brazilian Pharmacopeia. Thus, the objective of this work was to develop analytical methods for evaluating the physicochemical quality of inhalation medications, using SS pressurized metered-dose inhaled/pMDI, based on the instructions of the United States and British pharmacopeias. The developed quantitation of SS by HPLC using Doehlert matrix followed the conditions: C18, 100x4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  25 °C, mobile phase 0.1% ammonium acetate (w/v):methanol (78:22), flow rate 0.6 mL/min,  $\lambda$  225 nm, in the linear concentration range from 1.5 to 12.0  $\mu\text{g/mL}$  ( $R^2$  0.9999). For the related substances test the total content was below the limit of 0.5%. The identification by infrared spectrophotometry and HPLC (3.48 min,  $k$  1.85) was positive against SS standard. The assay and the uniformity of released dose (URD) were developed through the emitted dose pickup device (dosage unit sampling apparatus/DUSA). The SS content found was 111.69% of the labeled value (LV) and the doses taken in URD test were within the range 75.0 to 125.0% LV. For the aerodynamic particle size distribution test (APD), two methods have been developed through the Andersen Impactor Cascade (ACI) and Glass Twin Impinger (GTI). The average particle diameter determined by laser diffraction was 3.48  $\mu\text{m}$ . The results of the validation parameters were in accordance with the specifications of the National Health Surveillance Agency - Ministry of Health/ANVISA-MS. The developed and validated tests for the quality control of inhaled medications are proposed to compose the Brazilian Pharmacopoeia, in order to increase accessibility to specific instructions for Brazilian laboratories.

Keywords: .albuterol sulphate, inhalation, bronchodilator, Doehlert matrix, cascade impactor, aerodynamic particle diameter, liquid chromatography, quality control.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de sulfato de salbutamol (SS), 576,70 g/mol. ....	19
Figura 2 - Dispositivos do tipo (a) nebulizador e (b) inalador de pó seco. ....	21
Figura 3 - (a) Dispositivo inalatório pressurizado e dosimetrado (IPD) com (b) ilustração esquemática de seus componentes (recipiente, atuador, válvula, propelente e formulação). ....	22
Figura 4 - Espaçadores em diferentes modelos para serem acoplados ao IPD. ....	24
Figura 5 - Aparelhagem Dosage Unit Sampling Apparatus for Metered-Dose Inhaler (DUSA-MDI) utilizado para o teste de performance Uniformidade de Dose Liberada (UDL) para inalatório pressurizado dosimetrado (IPD). ....	26
Figura 6 - Representação esquemática do princípio de operação de um impactador em cascata. Partículas maiores depositam-se nos estágios iniciais em que os diâmetros dos poros do tamis são maiores e as partículas menores alcançam estágios finais do impactador. ....	27
Figura 7 - Impactador de Cascata Andersen (ACI) e sua relação entre o tamanho das partículas retidas em cada e o local de deposição no trato respiratório. Fonte: <a href="http://www.asthmadevices.com">www.asthmadevices.com</a> . ....	28
Figura 8 - Esquema do Impactador Duplo de Vidro (IVD/GTI) com apenas 2 estágios Fonte: British Pharmacopoeia, 2014. ....	288
Figura 9 - Exemplo de superfície de resposta (SR) gerada por planejamento experimental de segunda ordem a fim de aumentar o rendimento (R) de um método de extração de flavonoides provenientes de amostra vegetal (X1, concentração de etanol; X2, razão líquido-sólido. ....	32
Figura 10 - Tubo coletor de dose emitida do DUSA-MDI acoplado ao produto SS IPD Aerofrin ® pelo bocal. ....	45
Figura 11 - Esquema de montagem do aparelho DUSA-MDI para captação de dose emitida de IPD. ....	46
Figura 12 – (a) foto do ACI montado com estágios crescentes de cima para baixo e (b) foto de um estágio com tamis e seu prato coletor. ....	48
Figura 13 - Aparelhagem para avaliação de DAP por meio do GTI com o produto Aerofrin ® IPD acoplado ao bocal e na sequência, as câmaras superior e inferior. ....	49
Figura 14 - Cromatograma de salbutamol (10 µg/mL, t <sub>r</sub> 0,63 min, k < 0,5) obtido com as condições cromatográficas correspondentes ao método da monografia de SS IPD da BP 2014. ....	51
Figura 15 - Espectro de absorção de radiação na região do UV de SS obtido por detector UV/DAD do cromatógrafo. Condições cromatográficas como descrito na Figura 17. ....	53



Figura 16 - Superfícies de resposta obtidas em função da resposta (N) por planejamento Doehlert para avaliação das interações entre as variáveis (a) proporção de orgânico e fluxo, (b) tipo de orgânico e fluxo e (c) tipo de orgânico e proporção de orgânico , para fins de determinação de SS por CLAE.....	56
Figura 17 – Cromatograma de salbutamol (10,0 µg/mL) obtido com as condições cromatográficas do ponto ótimo calculado por meio da superfície de resposta obtida por planejamento Doehlert. Condições: eluição isocrática, FM: metanol e acetato de amônio 0,1% p/v (22:78), fluxo 0,6 mL/min, temperatura 25 °C, detecção UV/DAD λ 225 nm, volume de injeção 20 µL. ....	58
Figura 18 - Cromatogramas da solução placebo (linha contínua) sobreposto ao cromatograma da solução amostra de SS (linha pontilhada).....	59
Figura 19 - Estrutura química de 2-tert-butilamino-1-(4-hidróxi-3-metilfenil)etanol.....	59
Figura 20 - Cromatograma correspondente à solução de SS contaminada pela impureza 2-tert-butilamino-1-(4-hidróxi-3-metilfenil)etanol. ....	60
Figura 21 - Curva analítica do teste de linearidade do método de determinação de SS por CLAE.....	61
Figura 22 – Espectros de absorção de radiação região do IV do padrão de SS (inferior) sobreposto ao da amostra (superior) com indicação das ligações química responsáveis pelas bandas mais intensas. ...	66
Figura 23 – Cromatogramas correspondentes à solução 2 (linha contínua) sobreposto ao da solução 3 (linha pontilhada) obtido no teste de substâncias relacionada descrito no item 4.2.4. ....	67
Figura 24 – Reação química de hidrogenação de salbutamol cetona em salbutamol.....	68
Figura 25 - Esquema que representa a montagem do tubo DUSA-MDI. Fonte: Farmacopeia Americana 2014.....	70
Figura 26 – Histograma de teor de SS IPD para o produto Aerofrin® sem e com o enxague do atuador do dispositivo IPD.....	71
Figura 27 - Histograma representativo da recuperação de de SS em função do volume de diluente utilizado no enxágue do tubo DUSA-MDI previamente ao teste UDL, evidenciando adequação de volume de diluente a 40 mL. ....	74
Figura 28 – Fotografia do orifício do atuador do dispositivo IPD do produto Aerofrin®. ....	75
Figura 29 – Esquema de montagem do aparelho ACI com indicação das regiões porta de indução e os respectivos estágios. ....	78
Figura 30 - Histograma representativo do teor de SS obtido em cada estágio do teste DAP por ACI do produto Aerofrin® por CLAE. Condições cromatográficas como descrito na Figura 17. Nota: observa-se maior deposição de fármaco na porta de indução (PI). ....	79
Figura 31 - Histograma representativo da comparação entre os percentuais de tamanho de partículas finas obtidos no teste DAP por ACI e por GTI para o produto Aerofrin®. Condições cromatográficas como descrito na Figura 17.....	83

Figura 32 - Desenho esquemático para comparação (a) do ângulo reto da porta de indução do ACI e (b) do abaulamento da porção inicial do GTI.....	84
Figura 33 - Distribuição de tamanho de partículas (em triplicata) da suspensão em éter etílico do produto de SS IPD Aerofrin® por difração a laser. ....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas de métodos por CLAE para a quantificação de SS de acordo com a literatura.....	30
Tabela 2.1 – Valor de cada nível assumido pelas respectivas variáveis $X_1$ , $X_2$ e $X_3$ para desenvolvimento e validação de analítico por CLAE para a determinação de sulfato de salbutamol por meio de planejamento experimental Doehlert utilizando o software Statistica <sup>®</sup> versão 7 (Stat soft).....	37
Tabela 2.2 - Preparo das soluções de SS em fase móvel para construção da curva analítica e avaliação da linearidade.....	39
Tabela 3 - Esquema de eluição cromatográfica em gradiente para determinação da impureza salbutamol cetona em SS IPD.....	44
Tabela 4 - Tabela de contraste com as condições cromatográficas e repostas de cada experimento do planejamento Doehlert.....	54
Tabela 5 – Resultados do ponto ótimo calculado por meio da superfície de resposta obtida por planejamento Doehlert.....	57
Tabela 6 - Resultados de avaliação da linearidade do método de determinação de SS por CLAE.....	60
Tabela 7 - Resultados de avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método de determinação de SS por CLAE para amostras correspondentes aos testes de UDL (25%), DAP (50%) e doseamento (100%).....	62
Tabela 8 - Resultados de avaliação da exatidão do método de determinação de SS por CLAE pela recuperação de ativo adicionado ao placebo.....	63
Tabela 9 - Resultados de avaliação da robustez do método de determinação de SS por CLAE.....	64
Tabela 10 - Atribuições das principais bandas de absorção de radiação IV no espectro de SS.....	66
Tabela 11 - Resultados de avaliação de substâncias relacionadas da amostra SS IPD.....	68
Tabela 12 - Resultados de avaliação de SC da amostra SS IPD por CLAE.....	69
Tabela 13 - Resultados do doseamento da amostra SS IPD por CLAE. Condições cromatográficas como descrito na Figura 17.....	72
Tabela 14 - Resultados do teste exploratório para UDL sem a lavagem do atuador após o descarte das doses para determinação de SS IPD por CLAE.....	75
Tabela 15 - Resultados do teste de UDL com a lavagem do atuador após o descarte das doses para determinação de SS IPD por CLAE.....	76

Tabela 16 – Resultados do teste DAP por ACI apos passagem pelos orifícios dos tamises referente a cada estágio do ACI para o produto SS IPD Aerofrin®. Condições cromatográficas como descrito na Figura 17. ....	78
Tabela 17 - Diâmetro aerodinâmico de corte dos orifícios dos tamises referente a cada estágio do ACI para partículas do produto SS IPD.....	80
Tabela 18 - Resultados da medição do tamanho de partículas (diâmetro médio e percentis 50, 75 e 90) da suspensão em eter etilico do produto Aerofrin® por difração a laser. ....	86

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1 Fármacos beta 2 adrenérgicos e o salbutamol .....	18
2.2 Medicamentos de administração via inalatória.....	19
2.3 Testes para medicamentos inalatórios pressurizados dosimetrados (IPD) .....	24
2.4 Métodos analíticos para quantificação de salbutamol.....	29
2.5 Planejamento Doehlert como ferramenta para desenvolvimento de métodos analíticos .....	30
3 OBJETIVOS .....	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos .....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Materiais .....	34
4.1.1 Padrões e amostras .....	34
4.1.2 Reagentes e vidrarias.....	35
4.1.3 Aparelhos, equipamentos e acessórios .....	35
4.2 Métodos.....	36
4.2.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE para a determinação de sulfato de salbutamol por meio de planejamento experimental Doehlert.....	36
4.2.2 Validação de método analítico por CLAE para a determinação de sulfato de salbutamol.....	38
4.2.3 Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação de sulfato de salbutamol em dispositivo IPD.....	42
4.2.4 Avaliação de substâncias relacionadas.....	42
4.2.5 Avaliação da impureza salbutamol cetona .....	43
4.2.6 Doseamento de sulfato de salbutamol IPD .....	44
4.2.7 Uniformidade de dose liberada (UDL) de sulfato de salbutamol IPD.....	46

4.2.8 Distribuição aerodinâmica de partículas (DAP) de sulfato de salbutamol IPD.....	47
4.2.9 Medição do tamanho de partículas da suspensão de sulfato de salbutamol por difração a laser .....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE para a determinação de sulfato de salbutamol por meio de planejamento experimental Doehlert.....	50
5.2 Validação de método analítico por CLAE para a determinação de sulfato de salbutamol.....	58
5.2.1 Seletividade .....	58
5.2.2 Linearidade.....	60
5.2.3 Repetitividade e precisão intermediária .....	62
5.2.4 Exatidão.....	63
5.2.5 Robustez.....	64
5.2.6 Adequação do sistema .....	65
5.3 Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação de sulfato de salbutamol em dispositivo IPD.....	65
5.3.1 Identificação por espectrofotometria de absorção de radiação na região do infravermelho (IV).....	65
5.3.2 Identificação por CLAE.....	67
5.4 Avaliação de substâncias relacionadas.....	67
5.5 Avaliação de salbutamol cetona.....	68
5.6 Doseamento de sulfato de salbutamol IPD .....	69
5.7 Uniformidade de dose liberada (UDL) de sulfato de salbutamol IPD.....	72
5.8 Distribuição aerodinâmica de partículas (DAP) de sulfato de salbutamol IPD.....	77
5.8.1 Avaliação de DAP de sulfato de salbutamol IPD por Impactador em Cascata Andersen (ACI) .....	77
5.8.2 Avaliação de DAP de sulfato de salbutamol IPD por Impactador Duplo de Vidro (GTI).....	81
5.9 Medição do tamanho de partículas da suspensão de sulfato de salbutamol por difração a laser .....	85
6 CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA .....	90
APÊNDICE A - Resumos de trabalhos publicados em eventos.....	99
APÊNDICE B - Resumo de artigo elaborado.....	101

## 1 INTRODUÇÃO

A asma, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a rinite alérgica são as doenças respiratórias crônicas mais comuns no mundo que acometem centenas de milhares de pessoas, o que as caracterizam como um dos maiores problemas de saúde mundiais (BRASIL, 2012). Dentre elas, a asma e a DPOC acometem as vias aéreas inferiores e causam obstrução brônquica.

A asma é muito comum em países industrializados. Esta desordem respiratória caracteriza-se por broncoespasmos devido a reações acentuadas das vias aéreas inferiores contra estímulos de diversas origens. Em 1962, a Sociedade Torácica Americana foi a primeira a definir a asma como sendo uma doença ocasionada pela resposta de brônquios e traqueia a vários estímulos, manifestada pelo estreitamento generalizado das vias aéreas (TANG, 2003). Em 1975, a Organização Mundial de Saúde (OMS) descreveu a asma como uma condição crônica caracterizada por broncoespasmos recorrentes que estreitam as vias aéreas de maneira reversível a partir de estímulos, que por sua vez, não geram malefício na saúde da maioria dos indivíduos (KROUSE, 2007). Finalmente, em 1991, o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos e o Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue dos Estados Unidos da América (EUA) definiram a asma como uma reação inflamatória crônica das vias aéreas em que muitas células e elementos celulares atuam nesse processo (KROUSE, 2007).

Um estudo realizado para avaliar o índice de DPOC em grandes cidades da América Latina - Estudo Platino revela que 15,8% das pessoas com mais de 40 anos na cidade de São Paulo sofrem de DOPC (MENEZES, 2005). De acordo com o DATASUS de 2008, cerca de 180.000 hospitalizações ocorreram por DPOC entre os anos de 2006 e 2007 no Brasil. Em 2011, o Ministério da Saúde do Brasil gastou em torno de 87,1 milhões de reais com 116.707 internações de pacientes acometidos com essa doença (BRASIL, 2012).

Diante desse cenário, políticas mundiais e nacionais reúnem esforços para diminuir o número de casos de pacientes acometidos por doenças respiratórias

crônicas. Para esse fim, há programas que buscam conhecer melhor a epidemiologia dessas doenças para otimizar tratamentos preventivos e curativos à população.

De acordo com o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas de asma descrito na Portaria SAS/MS nº 709, de 17 de dezembro de 2010 publicada pelo Ministério da Saúde do Brasil, cerca de 10% da população nacional sofre de asma. Esta doença respiratória foi a terceira causa de internações hospitalares pelo SUS no ano 2008, o que corresponde a aproximadamente 300 mil pessoas (DATASUS, 2008). Cerca de 300 milhões de pessoas no mundo eram acometidas por asma no ano 2012 e estima-se que em 2025 este número aumentará para 400 milhões (MASOLI, 2004; LIMA, 2012)

A classe de fármacos mais usada no tratamento dos sintomas da asma e também de outras doenças respiratórias que causam broncoespasmos como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são os agonistas beta 2-adrenérgicos. Estes fármacos atuam seletivamente nos receptores beta 2 da musculatura lisa das vias aéreas causando broncodilatação. Quando inalados, os fármacos atuam mais diretamente no local de ação desejada de maneira rápida e com menos efeitos sistêmicos (GOODMAN; GILMAN, 2012). O broncodilatador sulfato de salbutamol (SS) é amplamente prescrito para o tratamento de doenças respiratórias no mundo e também no Brasil, inclusive o medicamento sob a forma farmacêutica inalatória pressurizada e dosimetrada (IPD) está presente na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais/RENAME (BRASIL, 2015).

Os métodos usados na análise de qualidade físico-química dos medicamentos inalatórios apresentam procedimentos de difícil execução devido à dificuldade de captação da dose de fármaco emitida. Para este fim, as técnicas de Doseamento, Uniformidade de Dose Liberada (UDL) e Distribuição Aerodinâmica de Partículas (DAP) do fármaco, que são testes específicos para esses medicamentos, requerem instrumentos importados específicos e de alto custo. No mundo, os Estados Unidos da América (EUA) e o Reino Unido são os países que mais desenvolvem medicamentos inalatórios e conseqüentemente onde mais há centros qualificados para realizar análises de controle de qualidade desses medicamentos. No Brasil há poucos centros



analíticos aptos a realizarem os testes de controle de qualidade em inalatórios e também é escassa a mão de obra capaz de executar tais procedimentos.

As farmacopeias dos Estados Unidos/USP ou Americana (THE UNITED, 2014) e Britânica/BP (BRITISH, 2014) são os compêndios que apresentam as instruções mais completas para a avaliação da qualidade de medicamentos inalatórios nos capítulos para métodos gerais. Na Farmacopeia Brasileira, entretanto, não há instruções no capítulo para métodos gerais, tampouco há monografias para a análise de medicamentos inalatórios na forma farmacêutica inalatória pó seco (IPS) para inalação em cápsulas ou na forma pressurizada e dosimetrada (IPD). Diante disso, verifica-se a necessidade de testar e/ou desenvolver métodos propostos pelos compêndios estrangeiros oficiais no Brasil, para estabelecer um método padronizado de fácil entendimento que possibilite a avaliação da qualidade físico-química de medicamentos inalatórios de maneira uniforme por um ou mais centros analíticos. Desta forma, as instruções de testes para a avaliação da qualidade de medicamentos inalatórios podem estar ampla e igualmente acessíveis aos laboratórios de controle de qualidade de medicamentos, tanto nacionais quanto multinacionais e estrangeiros.

Uma vez desenvolvidos os métodos analíticos, os pontos críticos serão avaliados para salientar os cuidados necessários em cada teste específico para os medicamentos IPD, pois as instruções presentes nas farmacopeias Americana e Britânica são de difícil entendimento e compreensão ou não são detalhadas (THE UNITED, 2014; BRITISH, 2014).

Visando o desenvolvimento de método para quantificação do ativo SS por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pretende-se utilizar um planejamento experimental do tipo matriz Doehlert, como ferramenta para chegar ao método final otimizado com um número reduzido de tentativas, para posterior validação. Além disso, os resultados do teste DAP executados em diferentes aparelhagens, o Impactador de Cascata Andersen (ICA/ACI) e o Impactador Duplo de Vidro (IDV/GTI), serão comparados a fim de avaliar a intercambialidade, vantagens e desvantagens de cada um. Pretende-se também com este trabalho evidenciar as etapas mais passíveis de erro durante a execução do doseamento e dos testes UDL e DAP.

Com a proposta de um desenvolvimento baseado nas instruções presentes em renomados compêndios farmacêuticos espera-se chegar a uma monografia constituída por todos os testes gerais e específicos para medicamentos IPD. Este trabalho também tem a finalidade de disponibilizar as instruções procedimentais para a execução dos testes utilizando linguagem técnica simples e detalhada, como sugestão de inclusão de monografia de SS IPD e dos testes comuns a inalatórios no capítulo métodos gerais na Farmacopeia Brasileira.

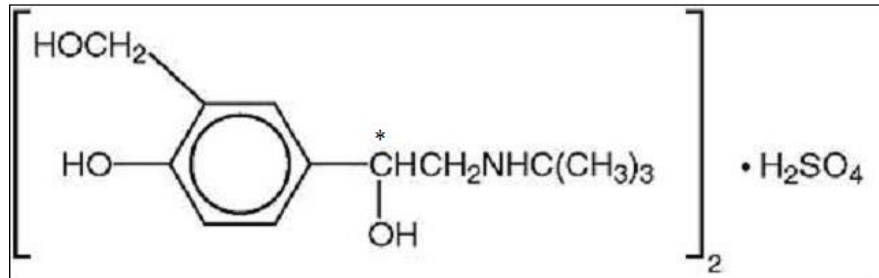
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fármacos beta 2 adrenérgicos e o salbutamol

Para atenuar e até inibir os sintomas das crises de broncoespasmos, frequentemente são administrados medicamentos antiasmáticos broncodilatadores que contenham fármacos agonistas beta 2-adrenérgicos, uma vez que relaxam a musculatura lisa das vias respiratórias (HAAHTELA, 1999) e levam à broncodilatação subsequente, sem que haja uma ação cardíaca significativa (GOODMAN; GILMAN, 2012). Apesar de a musculatura lisa dos brônquios humanos apresentarem pouca ou nenhuma inervação simpática, eles contêm grande quantidade de receptores beta-2-adrenérgicos. A estimulação desses receptores ativa a adenosina monofosfato ciclase – AMP cíclico, por meio do estímulo de proteína G, inibindo a liberação de cálcio oriundo do meio intracelular, o que diminui o tônus do músculo liso (ROBINSON, 1967). Há duas classes de agonistas beta 2-adrenérgicos, os de curta ação e os de longa ação. Na primeira classe, os fármacos quando administrados por via inalatória; apresentam efeito máximo dentro de 30 min e a duração de efeito entre 4 e 6 h. São utilizados para alívio dos sintomas, em que o salbutamol é o exemplo típico dessa classe. Também conhecido como albuterol e salbutamolium, o salbutamol pode ser usado como um sal de sulfato (**Figura 1**). A dose usual desse fármaco em casos de asma é de quatro a seis inalações de 100 µg por 2 vezes ao dia, não sendo recomendadas inalações diárias superiores a 1600 µg. Agentes de ação mais longa são fármacos que quando administrados por via inalatória apresentam ação de 12 h,

são administrados de forma regular, como terapia adjuvante em pacientes cuja asma é inadequadamente controlada, a exemplo do fenoterol (RANG e DALE, 2005).

**Figura 1 - Estrutura química de sulfato de salbutamol (SS), 576,70 g/mol evidenciando o carbono assimétrico.**



O SS apresenta-se como um pó branco ou quase branco facilmente solúvel em água, pouco solúvel em etanol, éter etílico e clorofórmio, com caráter ácido fraco ( $pK_a = 9,8$ ) e alta polaridade ( $\text{Log } P = 0,34$ ). A sua faixa de fusão está entre 157 e 158 °C. O salbutamol é uma molécula quiral que possui apenas um carbono assimétrico. (SOLINÍS, 1998; FARMACOPEIA, 2010).

O salbutamol não é metabolizado nos pulmões, porém a porção inalada que se deposita na orofaringe pode ser deglutida ou absorvida e assim ser metabolizado. A metabolização do salbutamol ocorre por conjugação a éster e forma salbutamol 4-o-sulfato, então excretado pela urina (DUJUAN, 2012).

## 2.2 Medicamentos de administração via inalatória

Dentre as vias de administração disponíveis para o uso de antiasmáticos, destaca-se a inalatória. Por meio da inalação, o efeito local de medicamentos nas vias aéreas é substancialmente mais pronunciado em relação a outras vias (BELLARY, 2006). O objetivo da terapia com medicamentos inalatórios é atingir concentrações mais elevadas de fármaco no tecido alvo, o que maximiza a eficácia local. Com isso, doses mais baixas do medicamento podem ser administradas, o que limita o efeito sistêmico diminuindo a toxicidade sem comprometer a eficácia. Além de a via inalatória aumentar a seletividade do medicamento para o tecido alvo e oferecer mais segurança

terapêutica, há também uma maior rapidez da resposta em relação à administração oral pelo trato gastrointestinal (FRANCIS, 1980; BELLARY, 2006). A via inalatória sustenta por mais tempo a concentração do fármaco nos pulmões, além de eliminar o efeito hepático de primeira passagem (HOCHHAUS, 2004).

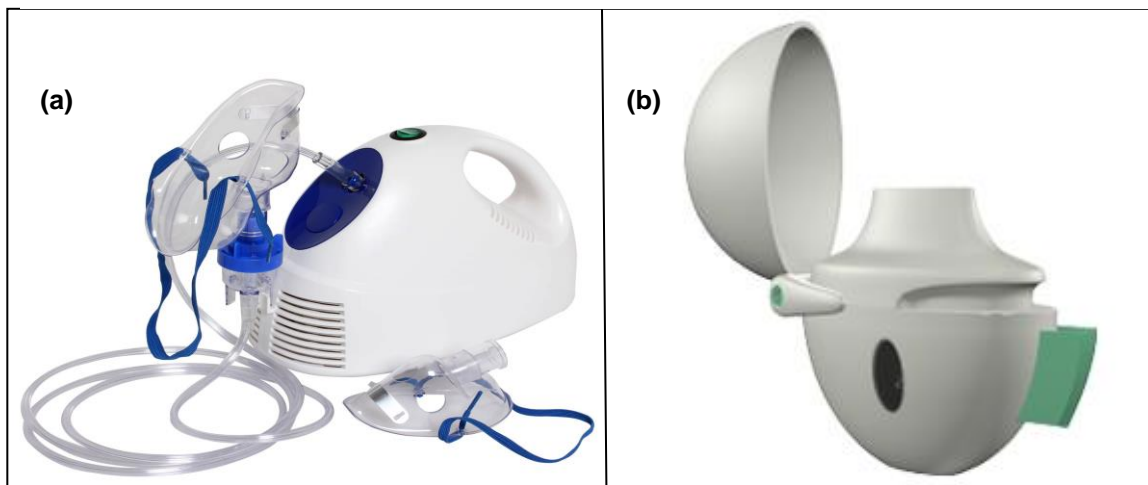
O tamanho de partícula do fármaco administrado pela via inalatória implica em ação local ou sistêmica. Partículas com diâmetro entre 2 e 5  $\mu\text{m}$  chegam até os brônquios e bronquíolos e exercem um efeito local nos pulmões. As partículas cujo diâmetro está entre 0,5 e 2  $\mu\text{m}$  chegam até aos alvéolos pulmonares e são absorvidas, uma vez que são muito irrigados pela corrente sanguínea. Já as partículas com diâmetro menor que 0,5  $\mu\text{m}$  são exaladas. Partículas inaladas com diâmetro menor que 5  $\mu\text{m}$  são consideradas partículas finas, e as maiores que 5  $\mu\text{m}$  ficam depositadas na orofaringe e não chegam às vias aéreas inferiores. (SWARBRICK, 2007; ZANEN, 1994; ZANEN, 1995, ZANEN, 1996; TELKO, HICKEY, 2005).

A via inalatória divide-se entre nasal e oral. A via nasal é mais limitada para tratamento de desordens que se restringem à região nasal, como alergias, inflamações e congestões (GRONEBERG, 2006). Já a via inalatória oral é escolhida quando se deseja uma ação do fármaco nas vias aéreas entre a orofaringe e o pulmão, ou até mesmo sistêmica (DEHAAN, 2001; MAC INTYRE, 2002). Dentre os inalatórios orais, há os medicamentos que geram aerossóis que são dispersões de partículas sólidas ou líquidas em gás. Preparações inalatórias que formam aerossol são administradas pelos seguintes dispositivos: nebulizador, inalador de pó seco (IPS) e inalador pressurizado dosimetrado (IPD) (BRITISH, 2014).

Os nebulizadores (**Figura 2a**) são os dispositivos mais antigos utilizados para inalação de medicamentos. Dependem de energia elétrica para vaporizar o medicamento que pode ser solução ou suspensão. Usualmente são utilizados por crianças ou idosos devido à facilidade de inalação do medicamento por meio de uma máscara, uma vez que não é necessário sincronizar a inspiração com a atuação do dispositivo. Por ser de grande volume, necessita estar ligado a uma fonte de energia externa. O nebulizador vem perdendo espaço no mercado para os dispositivos portáteis como IPS e IPD (MALCOLMSON, 1998; BISGAARD, 2001).

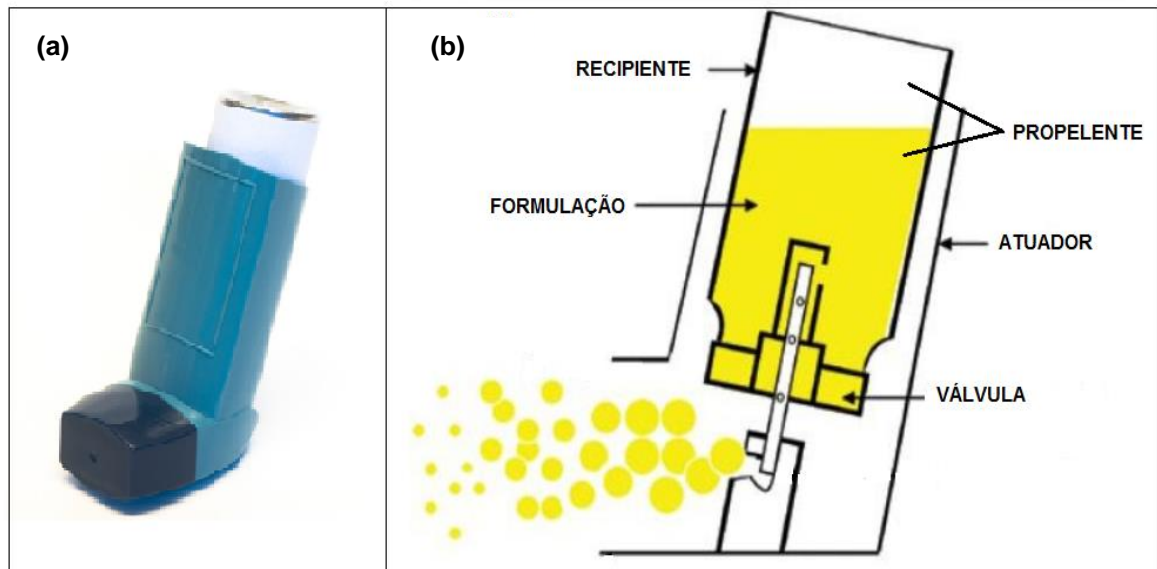
Os inaladores de pó seco (**Figura 2b**) são dispositivos portáteis que liberam quantidades dosimetradas do medicamento com a atuação do paciente. O medicamento deve estar micronizado para que o fármaco chegue aos brônquios e bronquíolos ou alvéolos. Após o disparo do dispositivo, o paciente deve realizar o movimento de inspiração de maneira sincronizada para que se forme o aerossol na cavidade da orofaringe para o medicamento ser inalado. (MALCOLMSON, 1998; KENDRICK, 1997; TELKO, HICKEY, 2005; ANSEL, 2007; ISLAM, 2008; SILVA, 2014).

**Figura 2 - Dispositivos do tipo (a) nebulizador e (b) inalador de pó seco.**



Os dispositivos inalatórios pressurizados e dosimetrados (IPD) (**Figura 3**) apresentam os seguintes componentes: recipiente de material inerte (usualmente vidro ou alumínio), atuador, válvula dosificadora, propelente e a formulação. Criado na década de 1950 por Charles G. Thiel no Hiker Laboratórios nos Estados Unidos da America/EUA, o IPD é atualmente o dispositivo inalatório mais utilizado no mundo devido às vantagens que apresenta como: o reduzido tamanho, a desnecessidade de uma fonte de energia externa, o fato de conter várias doses em um só dispositivo e o efeito rápido no caso de broncodilatadores (THIEL, 1996; NEWMAN, 2004). Os primeiros IPD produzidos continham medicamentos para o tratamento de asma e DPOC, com ação local nas vias aéreas inferiores e pulmões. Atualmente, também são veiculados medicamentos para efeito sistêmico, devido à alta absorção na região alveolar dos pulmões (CLARK, 1995; COURRIER, 2002)

**Figura 3 - (a) Dispositivo inalatório pressurizado e dosimetrado (IPD) com (b) ilustração esquemática de seus componentes (recipiente, atuador, válvula, propelente e formulação).**



Os dispositivos IPD podem conter soluções ou suspensões cujo veículo é o próprio propelente que se encontra líquido no interior dos recipientes por estarem pressurizados. No caso de soluções, pode haver adjuvantes que promovem a solubilização, ou a estabilização no caso de suspensões (LIU, 2012). Os primeiros gases propelentes utilizados foram os clorofluorcarbonos (CFC), mais comumente o diclorodifluorometano (CFC-12) como componente majoritário, e outros que modulavam a pressão de vapor da formulação como o triclorofluorometano (CFC-11) e o diclorotetrafluoroetano (CFC-114). Entretanto, em 1987, um programa internacional, o Protocolo de Montreal, definiu a proibição do uso de CFC na indústria mundial devido à depleção na camada de ozônio. De acordo com o documento, a implementação da medida deveria ocorrer até o ano 2001 para os países desenvolvidos e até 2010 para aqueles em desenvolvimento. A proibição do uso de CFC afetou a indústria farmacêutica, visto que houve dificuldade em desenvolver formulações para IPD com outros gases, devido às diferentes propriedades físico-químicas, principalmente pressão de vapor. As formulações subsequentes ao Protocolo de Montreal passaram a apresentar hidrofluoroalcanos (HFA) como propelentes, prioritariamente o 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA-134) e o 1,1,1,2,3,3,3- heptafluoropropano (HFA- 227) devido a

sua inércia química, pressão de vapor e por não reagirem com o ozônio (BORGSTRÖM, 1999; UNITED NATIONS, 2000; HIRST, 2001; IBIAPINA, 2004)

Uma característica preponderante dos dispositivos IPD é a liberação precisa da dose por atuação, o que se deve ao funcionamento da válvula de medição. A válvula apresenta um reservatório com volume fixo (25  $\mu$ L a 100  $\mu$ L) que é totalmente preenchido pela formulação a cada atuação do dispositivo. Em seguida, o conteúdo que está contido no reservatório entra em contato com a atmosfera exterior por um orifício e, devido à diferença de pressão entre o ambiente interno à válvula e o meio externo, o propelente se evapora carreando a formulação. Quando a formulação passa pelo orifício do atuador forma-se uma nuvem de aerossol que se move em direção axial e com sentido contrário ao do dispositivo. O aerossol formado é composto por gotículas em suspensão no gás. A distância do orifício do atuador à válvula e ao bocal, o seu diâmetro, o design do próprio atuador e a formulação influenciam a velocidade e o tamanho das gotículas do aerossol formado, o que por sua vez, afetam o local aonde o fármaco irá se depositar no trato respiratório. (VERVAET; BYRON, 1999; NEWMAN, 2005; LIU, 2012; STEIN, 2014)

Quanto maior as gotículas do aerossol e quanto maior a velocidade de seu deslocamento, maior a quantidade de medicamento que se deposita na região da orofaringe, o que é indesejável uma vez que o local de ação dos fármacos inalados são as vias aéreas inferiores e os pulmões (CLARKE; NEWMAN, 1981; STEIN, 2014). A fim de alterar a aerodinâmica de voo dos medicamentos IPD, recomenda-se a utilização de espaçadores (**Figura 4**) por parte dos pacientes. Com diferentes modelos, os espaçadores retêm as gotículas de maior tamanho e reduzem drasticamente a velocidade do aerossol em aproximadamente 35 m/s para 10 m/s (THIEL, 1996), conseqüentemente, diminuindo a proporção de fármaco que ficará retido nas vias aéreas superiores (NEWMAN, 2004).

A proporção de fármaco que chega às vias aéreas inferiores na administração de medicamentos inalatórios é baixa, pois cerca de 80% da dose rotulada nos IPD ficam depositadas no atuador e na região da orofaringe (RAU, 2005). Newman e colaboradores realizaram um famoso estudo em que se avaliou a deposição de fármacos provenientes de IPD em voluntários com deficiência respiratória. Verificou-se

**Figura 4 - Espaçadores em diferentes modelos para serem acoplados ao IPD.**



que em relação à dose rotulada 80,8% do fármaco deposita-se na orofaringe; 9,8% fica retida no atuador; 1% é exalado e 8,8% chega às vias aéreas inferiores e alvéolos pulmonares (NEWMAN, 1986). A partir desse estudo, os pesquisadores foram desafiados a desenvolver novos modelos de dispositivos a fim de aumentar a proporção de fármaco que chega ao local de ação e conseqüentemente, melhorar a eficácia terapêutica de medicamentos inalatórios (HIRST, 2002).

### **2.3 Testes para medicamentos inalatórios pressurizados dosimetrados (IPD)**

Para realizar o controle de qualidade físico-químico de medicamentos inalatórios há testes específicos devido às singularidades destas formas farmacêuticas. Especificamente, para os medicamentos em dispositivos IPD, deve-se utilizar de aparelhagem específica para realizar a captação de dose emitida por atuação (THE UNITED, 2014; BRITISH, 2014). A Farmacopeia Brasileira ainda não apresenta instruções quanto ao controle de qualidade físico-químico de inalatórios, não há informações sobre os testes no capítulo Métodos Gerais e também não há monografias para estes medicamentos. As Farmacopeias Americana (USP) e Britânica (BP) são as pioneiras na apresentação de instruções para os testes de inalatórios tanto nos capítulos Métodos Gerais, quanto em monografias de medicamentos inalatórios.



Atualmente, estes dois compêndios apresentam as informações mais atualizadas sobre as análises para medicamentos nebulizadores, IPS e IPD, entretanto a redação das instruções é de difícil entendimento, provavelmente pela complexidade dos testes.

Os testes específicos para IPD são: número de doses por dispositivo, uniformidade de dose liberada (UDL) e distribuição aerodinâmica de partículas (DAP). No primeiro, avalia-se o número de disparos por cada dispositivo IPD que deve ser maior ou igual ao número presente no rótulo. Os testes UDL e DAP são utilizados para avaliar a performance dos medicamentos IPD com o uso de aparelhagem específica (THE UNITED, 2014; BRITISH, 2014).

O teste UDL tem o objetivo de demonstrar a uniformidade entre as doses de todo o conteúdo de um dispositivo IPD diante do número de doses rotulado. Para captar cada dose emitida a USP e a BP preconizam o uso do aparelho denominado *Dosage Unit Sampling Apparatus for Metered-Dose Inhaler* (DUSA-MDI) que é um cilindro (50 mL) em polipropileno que possui filtro de fibra de vidro em seu interior (**Figura 5**) para coletar a dose emitida pelo IPD. Um ponto crítico durante o desenvolvimento de um medicamento IPD é garantir a reprodutividade entre as doses inicialmente emitidas e as doses finais do conteúdo de um só dispositivo (STEIN, 2014), uma vez que à medida que ocorrem as atuações a quantidade de propelente no interior do recipiente diminui e, com isso, a pressão de vapor é reduzida, o que altera a velocidade com que se forma a nuvem de aerossol (ZIMILICH, 2000). Diante disso, é importante realizar o teste UDL de forma exata, precisa e padronizada, visto que se trata de uma análise complexa e imprescindível para avaliar a eficácia do produto (CALLAGHAN, 2002).

A distribuição aerodinâmica de partículas (DAP) é um teste de performance em que se avalia o diâmetro aerodinâmico ( $d_{ae}$ ) das partículas, quando em processo de voo no aerossol, de acordo com a lei de Stokes. O  $d_{ae}$  é influenciado pelo tamanho, densidade e formato da partícula e determina o local de deposição do fármaco no trato respiratório (NEWMAN; CLARKE, 1983; BATES, 1966; GONDA, 1992; DECHRAKSA, 2014). O aparelho para analisar a DAP são os impactadores, cujo princípio de operação é a promoção do voo das partículas do aerossol que sofrem impacto nas superfícies, devido à inércia. O impacto inercial é proporcional ao quadrado do diâmetro

**Figura 5 - Aparelho Dosage Unit Sampling Apparatus for Metered-Dose Inhaler (DUSA-MDI) utilizado para o teste de performance Uniformidade de Dose Liberada (UDL) para inalatório pressurizado dosimetrado (IPD).**



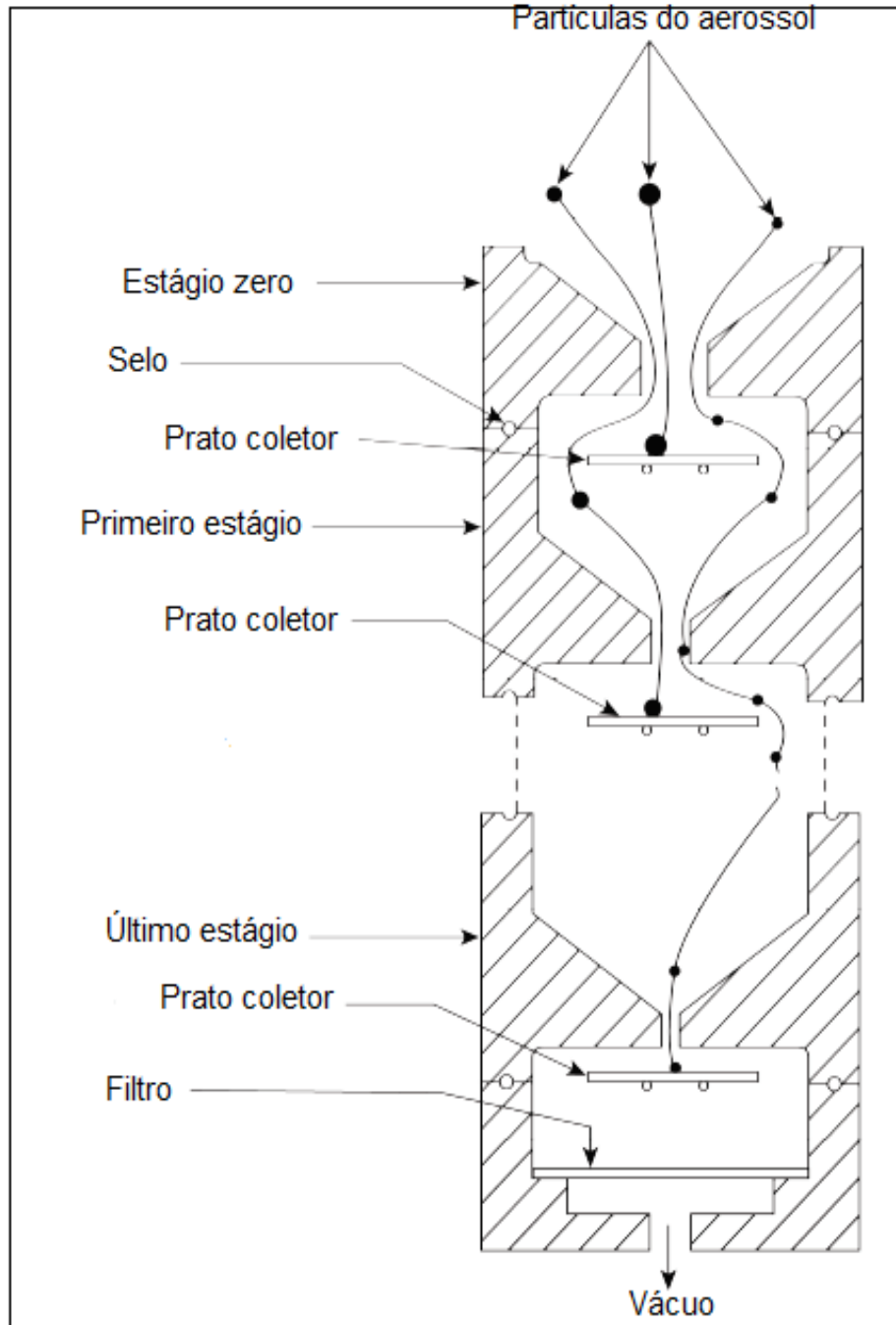
da partícula e linearmente proporcional à velocidade. Para isso, acopla-se o impactador a uma bomba de vácuo que promove um fluxo de ar compatível à corrente de inspiração do paciente durante a administração do medicamento. Logo, as partículas depositam-se nos estágios do impactador correspondentes ao seu  $d_{ae}$  (**Figura 6**). Os impactadores em cascata apresentam estágios sequenciais de coleta de partículas sobre a superfície, em que aquelas de maior inércia depositam-se nos estágios iniciais e as de menor tamanho, nos estágios finais (MITCHELL, 2003; THE UNITED, 2014; BRITISH, 2014).

Dentre os impactadores em cascata, o mais utilizado é o impactador em cascata Andersen (ICA/ACI), que apresenta 8 estágios (0,1,2,3,4,5,6,7) de coleta de partículas e tem um formato que possibilita correlacionar o local de deposição das partículas no trato respiratório em relação aos seus estágios como mostra a **Figura 7** (BATES, 1966; TAKI, 2010).

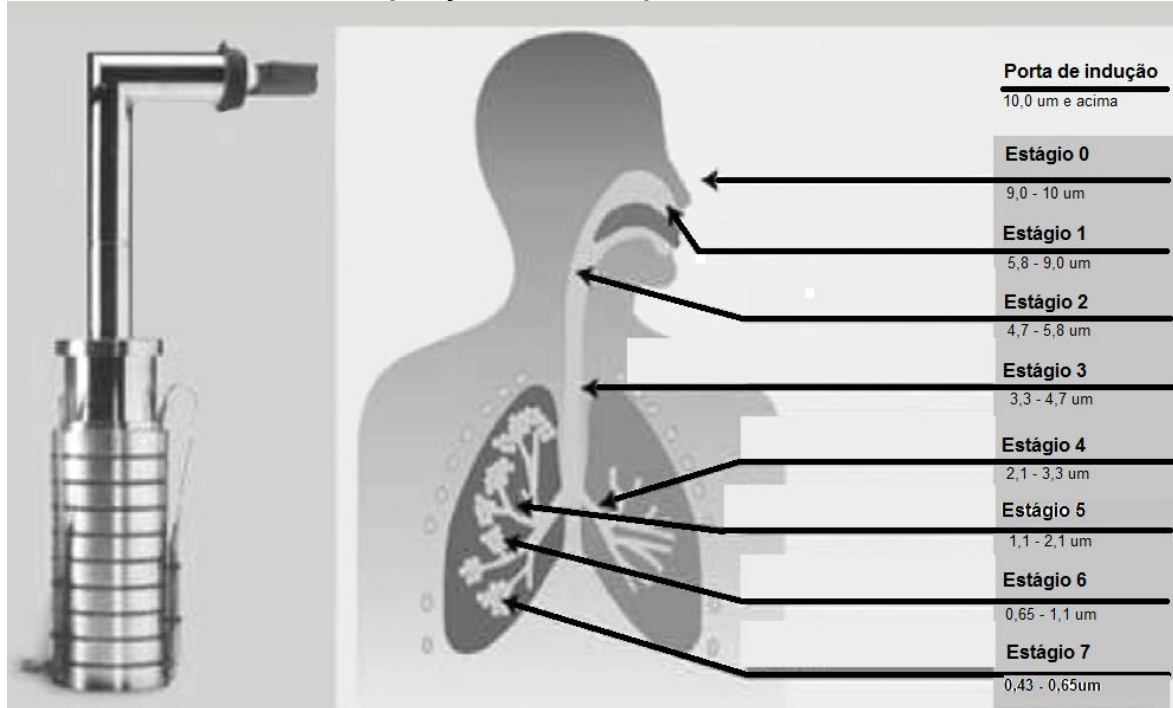
A avaliação do tamanho de partícula apenas por microscopia ou difração a laser da formulação não fornece dados conclusivos para prever a eficácia do medicamento inalatório, uma vez que a aerodinâmica de voo afeta significativamente o local de deposição no trato respiratório (THE UNITED, 2014; DECHARAKSA, 2014), logo o teste DAP não pode ser substituído por outro que apenas realiza a medida de partículas. Na avaliação dos resultados de um teste DAP deve se avaliar os seguintes parâmetros: diâmetro aerodinâmico mediano de massa (DAMM), que representa a medida da tendência central (50%) de  $d_{ae}$  das partículas do aerossol; o desvio padrão

geométrico (DPG) utilizado para medir a dispersão entre as partículas e a fração de partículas finas (FPF) que é a fração das partículas com  $d_{ae}$  menor igual a  $5 \mu\text{m}$ . (BYRON, 1990; THE UNITED, 2014)

**Figura 6** - Representação esquemática do princípio de operação de um impactador em cascata. Partículas maiores depositam-se nos estágios iniciais em que os diâmetros dos poros do tamis são maiores e as partículas menores alcançam estágios finais do impactador.

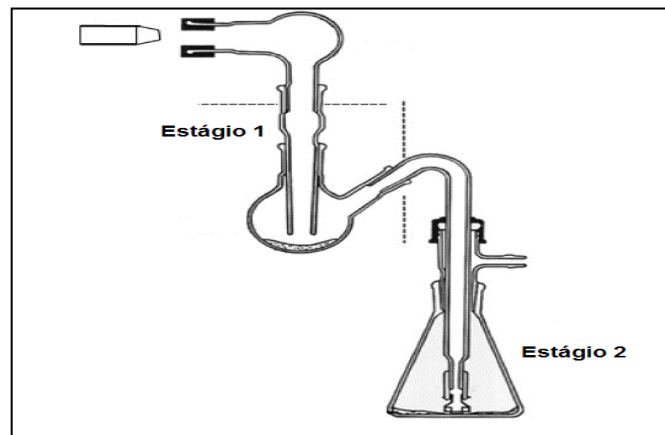


**Figura 7 - Impactador de Cascata Andersen (ACI) e sua relação entre o tamanho das partículas retidas em cada e o local de deposição no trato respiratório. Fonte: [www.asthmadevices.com](http://www.asthmadevices.com).**



Além dos impactadores em cascata, para a análise de DAP também pode-se utilizar os impactadores simples de dois estágios. Estes apresentam apenas os estágios que dividem (de corte) as partículas finas das que não chegam às vias aéreas inferiores. Dentre eles, há o aparelho Impactador de Vidro Duplo (*Glass Twin Impinger/ IVD/GTI*) que é uma vidraria que simula o trato respiratório em que se quantifica apenas as partículas finas que se depositaram no estágio 2 (último), como representado na **Figura 8** (SRISCHANA, 2000; QI, 2008).

**Figura 8 - Esquema do Impactador Duplo de Vidro (IVD/GTI) com apenas 2 estágios. Fonte: British Pharmacopoeia, 2014.**



## 2.4 Métodos analíticos para quantificação de salbutamol

Na USP 37, o método de doseamento descrito para o sulfato de salbutamol matéria prima é cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna cromatográfica de sílica ligada a octalsilano (C8, 200x4,6 mm, partículas de 5  $\mu$ m) fase móvel constituída por água, solução tampão de acetato de amônio 0,05 M e isopropanol, na proporção [65:30: (5  $\pm$  1)], com pH ajustado para 4,5  $\pm$  0,3 que deixa o salbutamol protonado, fluxo 2,0 mL/min, detecção na região ultravioleta (UV)  $\lambda$  276 nm.

Na monografia de sulfato de salbutamol da BP 2014, o método de doseamento é titulométrico ácido-base. O fármaco SS (0,4 g) é dissolvido em 5 mL de ácido fórmico anidro e ácido acético glacial. O titulante é uma solução de ácido perclórico 0,1 M em ácido acético glacial, com detecção potenciométrica do ponto final. Para avaliação de substâncias relacionadas o método por CLAE apresenta as seguintes condições: coluna cromatográfica de sílica ligada a octalsilano (C8, 150x4,6 mm, partículas de 3  $\mu$ m, 30 °C), detecção UV,  $\lambda$  273 nm. A eluição gradiente processou-se com fluxo 1,0 mL/min e fases móveis, A, metanol e acetonitrila na proporção 35:65, e B, 3,45 g fosfato monobásico de sódio monohidratado em 1000 mL de solução trietilamina 0,05% v/v, pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico diluído.

A Farmacopeia Britânica/BP é o único compêndio que apresenta monografias para a forma farmacêutica salbutamol IPD, com doseamento descrito por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna cromatográfica de sílica ligada a octadecilsilano (C18, 100x5,0 mm, partículas de 5  $\mu$ m) fase móvel constituída por solução aquosa de acetato de amônio 0,1% p/v e metanol na proporção de 22,5:80, fluxo 2,0 mL/min, detecção na região ultravioleta (UV)  $\lambda$  276 nm.

A Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5) também apresenta uma monografia para o sulfato de salbutamol, que é bem semelhante à proposta pela BP 2014. O doseamento também se baseia na titulação ácido-base em meio não aquoso por meio de titulante ácido perclórico 0,1 M, detecção potenciométrica do ponto final. A amostra (0,9 g) é diluída em 50 mL de ácido acético glacial e utiliza-se solução indicadora de azul de oracet B.

Além dos métodos compendiais de detecção e quantificação de SS, outros métodos cromatográficos (CLAE) descritos na literatura são apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1 - Condições cromatográficas de métodos por CLAE para a quantificação de SS de acordo com a literatura.**

Referência	Coluna (mm, $\mu$ m); T ( $^{\circ}$ C)	Fase móvel (v/v)	Fluxo (mL/min)	Deteção ( $\lambda$ , nm)
Rytting <i>et al.</i> , 2010	C18 (150x3,9, 5) 35	MeOH/Tampão fosfato + trietilamina pH 6,0, (10:90)	0,6	277
Kaialy <i>et al.</i> , 2010	C18 (250x4,6, 5) ND	MeOH/heptanossulfonato de sódio 0,25% p/v, (45:55)	2,0	200
Cope, Bautista-Parra, 2010	C8 (250x4,6, 5) 37	Fase móvel A: TFA 0,1% em água/ TFA 0,1% em ACN (95:5) Fase móvel B: TFA 0,1% em água/ TFA 0,1% em ACN (40:60)	1,0	ND <sup>a</sup>
Tuli <i>et al.</i> , 2012	C18 (300x3,9, ND <sup>a</sup> ) ND <sup>a</sup>	MeOH/Acetato de amônio 0,2% p/v, (40:60)	1,0	276
Weda <i>et al.</i> , 2004	C18 (125x4,0, 5) ND <sup>a</sup>	MeOH/Água	ND <sup>a</sup>	278
Larhrib <i>et al.</i> , 2003	C18 (300x4,6, 5) 60	MeOH/heptanossulfonato de sódio 0,25% p/v, (40:60)	0,9	238
Elhissi <i>et al.</i> , 2007	C18 (150x4,6, 5) 40	MeOH/hexanossulfonato de sódio 5mM + Ác.acético, (40:60)	1,0	276
Erram <i>et al.</i> , 2006	Fenil (250x4,6, 5) 25	MeOH/Tampão fosfato 25 mM pH 3,0, (5:95)	1,5	225

a: ND, não declarado

## 2.5 Planejamento Doehlert como ferramenta para desenvolvimento de métodos analíticos

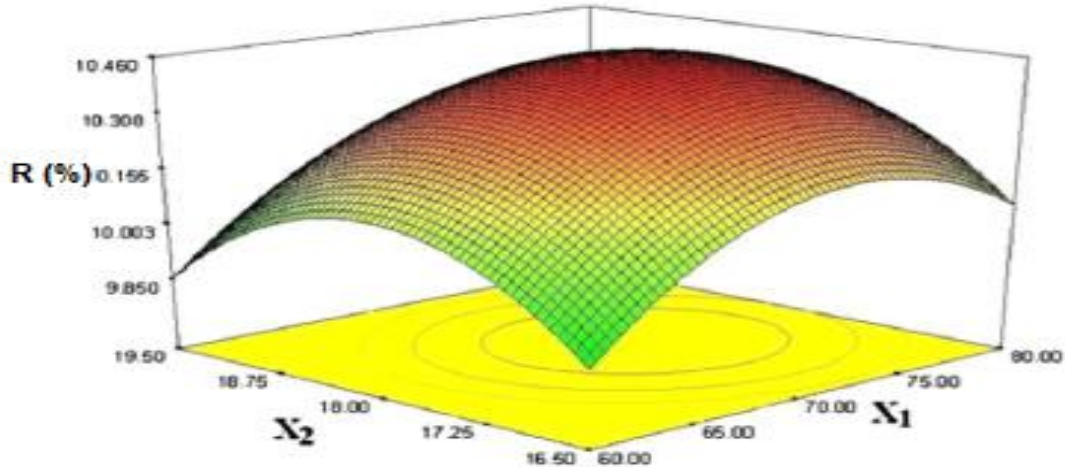
Técnicas estatísticas são cada vez mais utilizadas no planejamento experimental de métodos analíticos no campo da Química e outras ciências relacionadas. Para desenvolver um método que sofre influência de muitas variáveis, as análises estatísticas multivariadas tornam-se indispensáveis, uma vez que vários parâmetros podem ser avaliados simultaneamente considerando-se também as interações entre eles (BOX, 1978; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). A maioria das tentativas de desenvolvimento de métodos ou de otimização avaliam a influência de variáveis uma

por vez (univariada), sem considerar a interferência de suas interações na resposta (LEARDI, 2009). O planejamento experimental por análise multivariada diminui o número de tentativas para obter o método ótimo em relação à resposta que se deseja, com conseqüente economia de tempo, energia e reagentes (MONTGOMERY, 1997; SCARMINIO; BRUNS, 2001; FERREIRA, 2004).

Há diferentes tipos de modelos experimentais para reduzir o número de tentativas durante o desenvolvimento de um método analítico que são escolhidos de acordo com o objetivo do pesquisador (FERREIRA, 2004). Para avaliar a significância de cada variável na resposta que se deseja otimizar recomenda-se realizar planejamentos experimentais de primeira ordem, que são o planejamento fatorial completo ou o planejamento fatorial fracionário. Ambos podem ser utilizados para a triagem da influência das variáveis na resposta em estudo, porém o segundo é útil nos casos em que há um grande número de variáveis para não ocorrer um excesso de número de experimentos (BOX, 1978). Após realizar a triagem das variáveis significativas, pode-se realizar planejamentos de segunda ordem que geram desenhos experimentais específicos representados por matrizes matemáticas. Esses planejamentos, quando executados, geram empiricamente funções polinomiais lineares e quadráticas que esboçam o desenho de uma superfície de resposta (SR) (TEÓFILO, 2006). Pela inclinação da SR encontram-se as condições ótimas das variáveis do método testado para a obtenção da resposta de melhor valor, o ponto ótimo. Como exemplo, a **Figura 9** apresenta uma SR gerada em um planejamento experimental de segunda ordem. O objetivo deste estudo, realizado por Xu e colaboradores (2013) foi aumentar o rendimento (R) de um método de extração de flavonoides provenientes de uma amostra vegetal. As variáveis exploradas e expostas na **Figura 9** foram concentração de etanol ( $X_1$ ) e razão líquido-sólido durante o refluxo ( $X_2$ ).

Os principais planejamentos de segunda ordem que geram SR são o Desenho Composto Central (CCD- Composite Central Design), Box-Behnken e Doehlert, que se diferem pelos desenhos experimentais representados por suas respectivas matrizes matemáticas. O CCD foi criado na década de 50 por Box e Wilson e apresentou algumas vantagens frente aos planejamentos fatoriais, dentre elas um menor número

**Figura 9 - Exemplo de superfície de resposta (SR) gerada por planejamento experimental de segunda ordem a fim de aumentar o rendimento (R) de um método de extração de flavonoides provenientes de amostra vegetal ( $X_1$ , concentração de etanol;  $X_2$ , razão líquido-sólido).**



de experimentos, rotabilidade dos valores entre os pontos do desenho experimental e blocagem ortogonal (BOX; WILSON, 1951). O CCD é constituído por planejamento fatorial completo ou fracionário, um ponto central e pontos axiais. Os pontos provenientes do planejamento fatorial estão dispostos entre os eixos de coordenadas de maneira que formam um cubo, já os pontos axiais estão dispostos como estrela e o ponto central se localiza de maneira equidistante entre esses pontos de maneira concêntrica. O valor de distância entre os pontos que formam o cubo e o ponto central é de  $\pm 1$ , e dos pontos axiais é de  $\pm \alpha$ , em que  $\alpha = \sqrt{n}$  ( $n$  = número de variáveis). O número de experimentos de um CCD é dado pela expressão  $2^k + 2k + C$ , em que  $k$  é a quantidade de variáveis e  $C$  é o número de replicatas do ponto central (BOX; WILSON, 1951; FERREIRA, 2007).

Entre 1958 e 1960 Box e Behnken criaram um design experimental alternativo ao CCD, o planejamento Box-Behnken, que é baseado em um arranjo fatorial de três níveis que permite uma estimativa de modelos lineares e quadráticos bem ajustados (BEZERRA, 2008). O desenho que representa o planejamento é esférico, cujos pontos periféricos são equidistantes do central. Há diminuição substancial do número de experimentos em relação ao CCD e a expressão para esse cálculo é  $2k(k - 1) + C$ , em que  $k$  é a quantidade de variáveis e  $C$  é o número de replicatas do ponto central (BOX; BEHNKEN, 1960; NGUYEN, 2008).



O planejamento Doehlert foi publicado pela primeira vez em 1970 por David H. Doehlert e apresenta algumas vantagens em relação ao CCD e Box-Behnken. Esse tipo de design experimental requer um número inferior de experimentos em relação aos outros planejamentos de segunda ordem, a expressão para esse cálculo é  $k^2 + k + C$ , em que  $k$  é a quantidade de variáveis e  $C$  é o número de replicatas do ponto central (DOEHLERT, 1970). O desenho gerado pelos pontos experimentais é um hexágono dentro dos eixos das coordenadas. Uma característica atrativa desse planejamento é a obtenção do ponto ótimo com menor número de tentativas, isso ocorre porque os pontos experimentais já explorados podem ser aproveitados em uma nova série de tentativas que gera um novo hexágono a partir do primeiro (LUNDSTEDT, 1998; FERREIRA, 2007). Apesar de as matrizes não serem ortogonais e nem rotacionais, não apresentam erros significativos e não alteram o ajuste do modelo. Outra vantagem desse planejamento é o tratamento diferenciado para as variáveis, uma vez que cada uma pode ser explorada com níveis diferentes que são proporcionais a significância da variável no método testado (FERREIRA, 2004). Os níveis de uma variável são os diferentes valores que ela assume. Dentre os planejamentos existentes, a matriz Doehlert é a menos explorada e, portanto, requer mais desenvolvimentos que a utilizem para uma maior divulgação científica de sua aplicação.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Desenvolver métodos analíticos para a avaliação da qualidade físico-química do produto acabado SS IPD.

#### **3.2 Específicos**

- Desenvolver e validar método analítico para determinação quali e quantitativa de SS por CLAE por meio de planejamento experimental Doehlert;
- Desenvolver métodos de identificação para o produto acabado SS IPD;

- Testar/avaliar/otimizar métodos para pesquisa de impurezas/substâncias relacionadas para o produto SS IPD;
- Desenvolver/otimizar o teste para captação de dose emitida por meio de aparelhagem apropriada (DUSA) para fins de doseamento de SS IPD.
- Desenvolver/otimizar o teste de performance uniformidade de dose liberada por meio de aparelhagem apropriada (DUSA) para fins de verificação de homogeneidade e distribuição de SS IPD;
- Avaliar as aparelhagens ACI e GTI no teste de DAP para o produto SS IPD e correlacionar os resultados com os obtidos por meio da avaliação de tamanho de partícula por difração a laser;
- Propor a introdução de instruções para teste de performance para medicamentos inalatórios IPD no capítulo para métodos gerais na Farmacopeia Brasileira;
- Introduzir os métodos desenvolvidos na rotina de controle de qualidade do produto SS IPD Aerofrin<sup>®</sup> na indústria farmacêutica Pharmascience Laboratórios.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Padrões e amostras**

- Sulfato de salbutamol - substância química de referência de origem farmacopeica;
- Salbutamol - substância química de referência de origem farmacopeica;
- Impureza 2-tert-butilamino-1-(4-hidróxi-3-metilfenil)etanol de salbutamol - substância química de referência de origem farmacopeica;
- Impureza B de salbutamol - substância química de referência de origem farmacopeica;

- Impureza D de salbutamol - substância química de referência de origem farmacopeica;
- Impureza salbutamol cetona - substância química de referência de origem farmacopeica;
- Salbutamol 100 µg/dose IPD, 200 doses/dispositivo – Aerofrin<sup>®</sup> – medicamento teste (gentilmente cedido pela indústria Pharmascience Laboratórios para o qual esse desenvolvimento e validação de método foram direcionados) cuja fórmula qualitativa é uma suspensão de 120,5 µg de sulfato de salbutamol (correspondente a 100 µg de salbutamol), ácido oleico e álcool etílico anidro em propelente 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA-134).

#### 4.1.2 Reagentes e vidrarias

- Pipetas e balões volumétricos com certificado de calibração RBC;
- Kit de filtração e béqueres;
- Reagentes grau analítico (PA) e cromatográfico: acetonitrila, metanol, ácido oleico, álcool etílico anidro, fosfato de potássio monobásico, heptanossulfonato de sódio, ácido fosfórico, isopropanol, ácido acético glacial e acetato de amônio.
- Água destilada e desionizada.

#### 4.1.3 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Aparelho de ultrassom – Limp Sonic, São Paulo, Brasil;
- Aparelhagem para os testes doseamento e uniformidade de dose emitida de IPD – *Dosage Unit Sampling for MDI* (DUSA-MDI) – Erweka, Heusenstamm Alemanha;
- Aparelhagem para teste de distribuição aerodinâmica de partículas – Impactador de Cascata Andersen (ICA/ACI) – Westech, Salt Lake City, EUA.
- Aparelhagem para teste de distribuição aerodinâmica de – Impactador Duplo de Vidro (IDV/GTI) - Erweka, Heusenstamm Alemanha;
- Analisador de tamanho de partícula por difração a laser LS 13 320 (Beckman Coulter, California, EUA).

- Bomba de vácuo VP 1000 – Erweka, Heusenstamm, Alemanha;
- Fluxômetro – Erweka, Heusenstamm, Alemanha;
- Membrana de fibra de vidro com 25 mm de diâmetro Pall – Sigma-Aldrich, St Gallen, Suíça;
- Balança analítica – Sartorius, Madri, Espanha;
- Potenciômetro do tipo pHmetro – Digmed, Hamburg, Alemanha;
- Estufa a seco – Nova Ética, São Paulo, Brasil;
- Mufla – GP Científica, Belo Horizonte, Brasil;
- Coluna cromatográfica de fase reversa (Luna, 100x4,6 mm; 5 µm) empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18) (Phenomenex)
- Coluna cromatográfica de fase reversa (Luna, 150x3,9 mm; 5 µm) empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (C8) (Phenomenex)
- Coluna cromatográfica de fase reversa (Zorbax Eclipse Plus 100x4,6 mm; 3,5 µm) empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18) (Agilent)
- Coluna cromatográfica de fase reversa (Hypersil BDS 250x4,6 mm; 5 µm) empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18) (Thermo Scientific)
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) – LaChrom Elite, Merck
- Espectrofotômetro na região do infravermelho – PerkinElmer, Massachusetts, EUA;
- Sistema de purificação de água – Millipore, Darmstadt, Alemanha.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE para a determinação de sulfato de salbutamol por meio de planejamento experimental Doehlert**

Inicialmente, foram testadas as condições cromatográficas da análise de doseamento de salbutamol presente na monografia de salbutamol IPD BP 2014 que são: coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano C18, dimensões 100x4,6

mm, 5  $\mu$ m, fase móvel de eluição isocrática constituída por mistura de metanol e solução contendo 0,1% p/v de acetato de amônio (80:22,5), fluxo 2 mL/min, temperatura ambiente com detecção UV,  $\lambda$  276 nm e volume de injeção 20  $\mu$ L. Visto que o fator de retenção (k) do pico correspondente ao salbutamol foi menor que 0,5 (no volume morto), desenvolveu-se um novo método como descrito a seguir.

Para realizar o planejamento Doehlert utilizou-se o software Statistica<sup>®</sup> versão 7 (Statsoft), as variáveis escolhidas foram proporção de solvente orgânico na fase móvel ( $X_1$ ), fluxo ( $X_2$ ) e tipo de solvente orgânico na fase móvel ( $X_3$ ) e a resposta avaliada foi o número de pratos (N) do pico cromatográfico de salbutamol. Os níveis explorados para cada variável estudada seguem as determinações do planejamento que são 7, 5 e 3 para  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ , respectivamente, representados na **Tabela 2.1**, evidenciando os pontos centrais de cada nível que estão em negrito. A constituição da fase aquosa da fase móvel, a temperatura, o volume de injeção e  $\lambda$  de detecção foram definidos de acordo com pesquisa bibliográfica e análises experimentais prévias.

**Tabela 2.1 – Valor de cada nível assumido pelas respectivas variáveis  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  para desenvolvimento e validação de analítico por CLAE para a determinação de sulfato de salbutamol por meio de planejamento experimental Doehlert utilizando o software Statistica<sup>®</sup> versão 7 (Statsoft).**

Variável	Número de níveis	Nível						
		1	2	3	4	5	6	7
$X_1$ ; %Solvente orgânico	7	10	12	15	<b>18</b>	21	24	27
$X_2$ ; Fluxo, (mL/min)	5	0,6	0,8	<b>1,0</b>	1,2	1,4	— <sup>d</sup>	— <sup>d</sup>
$X_3$ ; Tipo de solvente orgânico	3	M <sup>a</sup>	<b>M:A</b> <sup>b</sup>	A <sup>c</sup>	— <sup>d</sup>	— <sup>d</sup>	— <sup>d</sup>	— <sup>d</sup>

a: metanol; b: mistura de metanol e acetonitrila na proporção 50:50; c: acetonitrila; d: -, não avaliado.

O ponto ótimo que representou a melhor resposta foi obtido com as seguintes condições cromatográficas: coluna de fase reversa C18, dimensões 100x4,6 mm, 3,5  $\mu$ m (Zorbax Eclipse Plus - Agilent), fase móvel constituída por mistura de metanol e solução contendo 0,1% p/v de acetato de amônio (22:78), fluxo 0,6 mL/min,

temperatura ambiente com detecção UV,  $\lambda$  225 nm e volume de injeção 20  $\mu$ L. Em seguida, o método desenvolvido passou por validação.

#### **4.2.2 Validação de método analítico por CLAE para a determinação de sulfato de salbutamol**

O método para a determinação de sulfato de salbutamol por CLAE foi validado de acordo com a Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003/ANVISA-MS. Visto que o método tem a finalidade de ser utilizado para o doseamento e testes UDL e DAP, os parâmetros de validação avaliados foram seletividade, linearidade, repetitividade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Os cálculos foram realizados com o auxílio do software Microsoft Excel<sup>®</sup> versão 2010.

##### **4.2.2.1 Seletividade**

Inicialmente a seletividade do método foi avaliada com duas injeções de solução placebo na concentração correspondente à da amostra no doseamento com a massa de ativo subtraída. O placebo foi constituído por todos os excipientes presentes na amostra exceto SS e o propelente, o qual evapora quando não está pressurizado. As proporções foram mantidas de acordo com a formulação. A solução placebo apresentou ácido oleico e etanol anidro em diluente do método (fase móvel). Em seguida, a seletividade foi finalmente avaliada com duas injeções de solução contendo SS enriquecida com padrão de sua impureza conhecida 2-tert-butilamino-1-(4-hidróxi-3-metilfenil)etanol. O ativo e sua impureza estavam na concentração correspondente à da amostra no doseamento (10  $\mu$ g/mL).

A seletividade foi demonstrada por meio da ausência/identificação de picos no mesmo tempo de retenção do pico correspondente ao salbutamol e por apresentar resolução,  $R_s > 2$  entre os picos da impureza e do salbutamol nos cromatogramas obtidos com as soluções placebo e enriquecida respectivamente. A pureza de pico foi

avaliada no cromatograma obtido com a solução enriquecida por meio do detector ultravioleta com arranjo de diodos (UV/DAD).

#### 4.2.2.2 Linearidade

Prepararam-se 12 soluções de concentrações crescentes de salbutamol com intervalos de concentração 0,5 µg/mL a partir de uma preparação estoque de concentração 100 µg/mL em fase móvel conforme descrito na **Tabela 2.2**. Os pontos da curva para avaliação da linearidade foram determinados para contemplar a ampla faixa de concentrações das amostras dos testes de UDL (2,5 µg/mL), DAP (5,0 µg/mL) e doseamento (10,0 µg/mL). O ponto de nível 100% escolhido foi o correspondente à concentração de trabalho do doseamento (10,0 µg/mL).

**Tabela 2. 2 - Preparo das soluções de SS em fase móvel para construção da curva analítica e avaliação da linearidade.**

Nível (%)	Volume da alíquota da solução estoque (mL)	Solução diluente q.s.p (mL)	Concentração (µg/mL)
15	1,5	100	1,5
20	2,0	100	2,0
25	2,5	100	2,5
30	3,0	100	3,0
35	3,5	100	3,5
50	5,0	100	5,0
65	6,5	100	6,5
80	8,0	100	8,0
90	9,0	100	9,0
100	10,0	100	10,0
110	11,0	100	11,0
120	12,0	100	12,0

Cada solução foi preparada em triplicata e todas foram injetadas ao cromatógrafo e as áreas correspondentes aos picos de salbutamol foram registradas para construção da curva analítica. A linearidade foi avaliada por meio do cálculo da

equação que representa a curva de regressão por meio da estimativa dos parâmetros coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e desvio padrão relativo (DPR) dos fatores de resposta (Fr). A significância da regressão foi avaliada por ANOVA, para a qual o valor de  $F_{\text{calculado}}$  deve ser superior ao  $F_{\text{crítico}}$  (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

#### **4.2.2.3 Repetitividade e precisão intermediária**

A repetitividade do método foi avaliada por meio de três preparos de amostra para UDL, três para DAP e três para doseamento, cada uma com concentrações de trabalho correspondentes a cada tipo de teste. Para isso, três amostras oriundas de SS IPD foram preparadas segundo a técnica do teste UDL (2,5 µg/mL), três segundo a técnica de DAP (5,0 µg/mL) e mais três de acordo com a técnica de doseamento (10,0 µg/mL). Após 48 h, o teste de precisão foi realizado conforme descrito anteriormente por outro analista para avaliar a precisão intermediária.

A avaliação da repetitividade do método foi estimada pelo cálculo de DPR das três primeiras amostras por quantificações de SS e a precisão intermediária foi avaliada pelo cálculo das seis amostras para cada uma das concentrações baixa, média e alta (2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL respectivamente) por quantificações de SS (BRUCE, 1998; KUTTATHARMMAKUL, 1999; BRASIL, 2003; SILVA, 2014).

#### **4.2.2.4 Exatidão**

A exatidão do método de quantificação de SS por CLAE foi avaliada em sete concentrações que foram 2,0 µg/mL, 2,5 µg/mL, 3,0 µg/mL, 5,0 µg/mL, 8,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 12,0 µg/mL para contemplar a ampla faixa de concentrações correspondentes os teste UDL, DAP e doseamento, cada uma em triplicata. As amostras foram preparadas por contaminação do placebo com padrão primário de salbutamol. O placebo foi manipulado conforme descrito em Seletividade (item 4.2.2.1).

Inicialmente, prepararam-se três soluções estoque de padrão primário de salbutamol de concentração 100 µg/mL em fase móvel como diluente. Em seguida,



foram transferidas alíquotas de 2,0; 2,5; 3,0; 5,0; 8,0; 10,0 e 12,0 mL da solução estoque para balões volumétricos de 100 mL que continham massa de placebo correspondente às tomadas de amostra de cada teste. Esses preparos foram realizados em triplicata com alíquotas provenientes das três soluções estoques respectivamente. Os resultados do teste de exatidão do método foram expressos em porcentagem de recuperação do fármaco adicionado ao placebo.

#### **4.2.2.5 Robustez**

As condições cromatográficas propositalmente alteradas foram: fluxos 0,5 e 0,7 mL/min, temperaturas 23 e 27 °C, proporções de solvente orgânico na fase móvel 20 e 24%. Também avaliou-se a estabilidade da amostra depois de 24 h do preparo e outro lote de coluna cromatográfica. Para esse teste três amostras foram preparadas (triplicata) conforme o doseamento de SS IPD (10,0 µg/mL).

A robustez foi estimada pelo cálculo de DPR dos resultados médios de salbutamol encontrados da triplicata do teste (10,0 µg/mL) em relação à média obtida no teste de precisão intermediária das seis amostras preparadas segundo o doseamento (10,0 µg/mL).

#### **4.2.2.6 Adequação do sistema**

A adequação do sistema cromatográfico do método de determinação de SS por CLAE foi avaliada com a injeção de uma solução de salbutamol a 10,0 µg/mL e 2-tertilamino-1-(4-hidróxi-3-metilfenil)etanol a 12,0 µg/mL em fase móvel. Os testes só são válidos caso o pico cromatográfico correspondente ao salbutamol apresente número de pratos (N) maior que 1000, assimetria (T) entre 0,8 e 2,0 e fator de retenção (k) maior que 1,0; além de a resolução (R) entre os picos principais maior que 10,0.

### **4.2.3 Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação de sulfato de salbutamol em dispositivo IPD.**

#### **4.2.3.1 Identificação por espectrofotometria de absorção de radiação na região do infravermelho**

Para obtenção da amostra realizaram-se 50 atuações do dispositivo IPD de SS, sem atuador, em béquer de vidro de 50 mL. Entre cada atuação o dispositivo foi agitado verticalmente por cinco segundos. O pó recolhido no béquer foi levado à superfície do espectrofotômetro para análise por reflectância total atenuada (*Total Reflectance Attenuation/ATR*) e submetido à varredura espectral na faixa 1650 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas espectrais da amostra foram comparadas com as bandas obtidas do padrão primário de SS na mesma faixa. A semelhança espectral foi mensurada pelo fator de semelhança por meio do software Perkin Elmer Sepectrum ES.

#### **4.2.3.2 Identificação por CLAE**

No teste substâncias relacionadas (item 4.2.4), o pico principal do cromatograma obtido com a Solução 2 foi comparado ao pico do salbutamol do cromatograma obtido com a Solução 3 em relação ao tempo de retenção.

#### **4.2.4 Avaliação de substâncias relacionadas**

O teste para avaliação de substâncias relacionadas foi baseado na monografia de salbutamol IPD BP 2014 (BRITISH, 2014). As condições cromatográficas foram coluna cromatográfica de fase reversa octasilano C8, 150x3,9 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Luna - Phenomenex), fase móvel de eluição isocrática constituída por mistura de acetonitrila e solução 0,287% p/v de heptanossulfonato de sódio e 0,25% p/v de fosfato de potássio monobásico ajustada para o pH 2,9 ( $\pm 0,1$ ) com ácido fosfórico 2 M (22:78), fluxo 1,0 mL/min, temperatura ambiente com detecção UV,  $\lambda$  220 nm, volume de injeção 20  $\mu\text{L}$  e tempo de corrida 25 vezes o tempo de retenção do pico de salbutamol.

Foram feitas cinco soluções da seguinte maneira, realizaram-se 50 atuações do dispositivo IPD de SS sem atuador em béquer de vidro de 50 mL e dissolveu-se o resíduo em 10,0 mL de fase móvel (Solução 1). Em seguida, transferiu-se 1,0 mL da Solução 1 para balão volumétrico de 100 mL cujo volume foi completado (Solução 2). Para fazer a solução 3, dissolveram-se 12,0 mg de padrão primário de impureza B de salbutamol e 12,5 mg de padrão primário de SS em 25 mL de fase móvel, em seguida transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 100 mL cujo volume foi completado também com fase móvel (Solução 3). Para a próxima solução, 12,5 mg de padrão primário de impureza D de salbutamol foram diluídos em 50 mL de fase móvel e, em seguida 1,0 mL dessa solução foi diluído para 100,0 mL de fase móvel (Solução 4). Finalmente, uma alíquota de 1,0 mL foi diluída para 10,0 mL de fase móvel (Solução 5).

Cada solução foi injetada em triplicata no cromatógrafo e a análise somente foi válida se a resolução entre os picos principais da Solução 3 fosse maior que  $R_s > 3,0$ . Para a amostra ser aprovada, segundo a especificação da monografia, a área de qualquer pico correspondente à impureza D do salbutamol não pôde ser maior que a área do pico principal do cromatograma obtido com a Solução 4 (0,5%); a área de qualquer outro pico secundário não pôde ser maior que 0,5 vezes a área de do pico principal do cromatograma obtido com a Solução 2 (0,5%) e o conteúdo de impurezas totais não pôde ultrapassar 1,0%. Foram desconsiderados qualquer pico com área menor que a área do pico principal do cromatograma obtido com a Solução 5 (0,1%).

#### **4.2.5 Avaliação da impureza salbutamol cetona**

O teste seguiu a monografia de salbutamol IPD da BP21014 (BRITISH, 2014), porém com otimização das condições cromatográficas, após a adição de um reequilíbrio da proporção inicial de solventes no gradiente de eluição a partir do tempo 30,1 min (**Tabela 3**). Logo, as condições cromatográficas foram coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano C18, 250x4,6 mm, 5  $\mu$ m (Hypersil BDS - Thermo Scientific), fluxo 1,0 mL/min, temperatura 30°C, com detecção UV,  $\lambda$  276 nm, volume de injeção 20  $\mu$ L e tempo de corrida de 20 min. As fases móveis constituídas por (A)

mistura de isopropanol e solução de acetato de amônio 0,1 M ajustada para pH 4,59 ( $\pm$  0,1) com ácido acético glacial nas proporções 1,5:98,5 e (B) isopropanol, eluíram em gradiente de acordo com a **Tabela 3**.

**Tabela 3 - Esquema de eluição cromatográfica em gradiente para determinação da impureza salbutamol cetona em SS IPD.**

Tempo (min)	%Eluente A	%Eluente B
0	100	0
5	100	0
20	86	14
30	86	14
30,1	100	0
35,0	100	0

A solução amostra foi preparada com 50 atuações do dispositivo IPD de SS sem atuador em béquer de vidro de 50 mL cujo resíduo foi dissolvido em 10,0 mL de água. Para o preparo da solução padrão, pesaram-se 12,5 mg de padrão primário de salbutamol cetona que foi dissolvido em 50,0 mL de água, em seguida, transferiu-se 1,0 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL cujo volume foi completado.

As soluções amostra e padrão foram separadamente injetadas em triplicata no cromatógrafo e as áreas dos picos obtidos foram registradas. Seguiram-se as especificações da monografia, em que a área de qualquer pico correspondente ao salbutamol cetona na solução amostra não pôde ser maior que a área do pico principal no cromatograma obtido com a solução padrão (0,5%).

#### 4.2.6 Doseamento de sulfato de salbutamol IPD

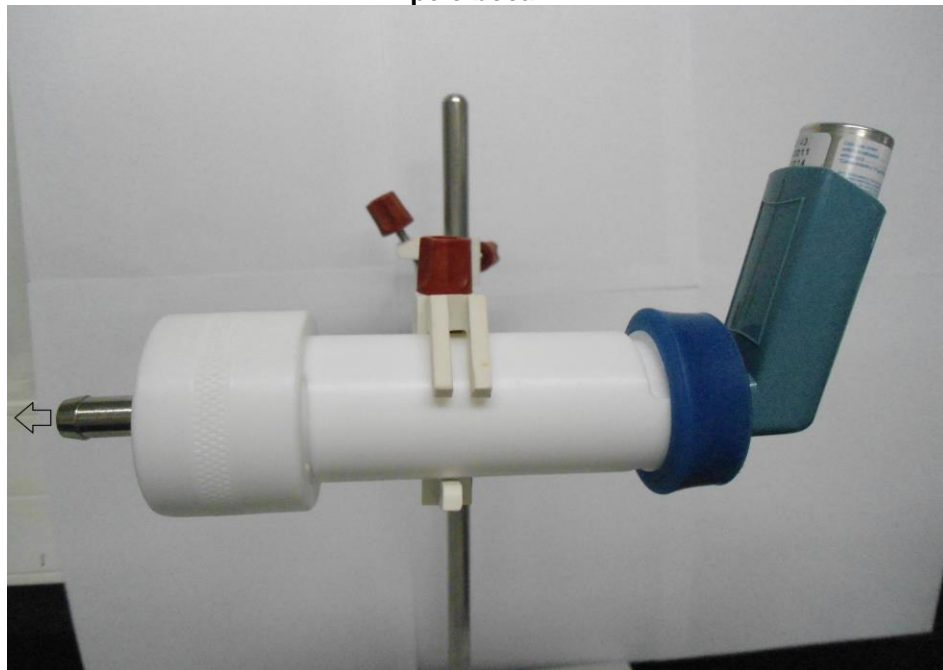
Para a avaliação do teor de SS oriundo de atuações do dispositivo IPD foi utilizado o tubo coletor de dose emitida *Dosage Unit Sampling Aparattus for MDI (DUSA-MDI)* preconizado pela USP e pela BP para as análises de UDL (**Figura 10.1**). Foi acoplado ao interior do DUSA-MDI um filtro de fibra de vidro de 25 mm de diâmetro posicionado bem justo às paredes do tubo. Sequencialmente foram acoplados um ao

outro, o bocal para o encaixe do dispositivo IPD, o DUSA-MDI, o fluxômetro e a bomba de vácuo, como representado na **Figura 10.2**.

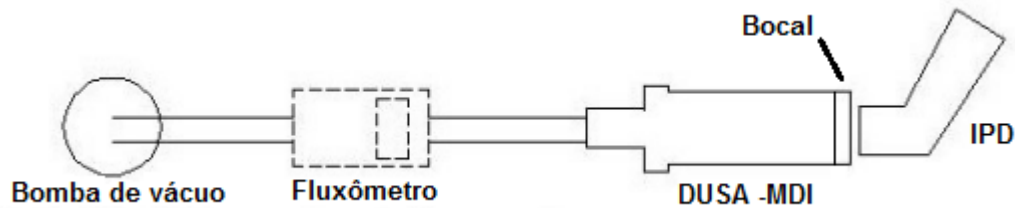
A primeira atuação foi descartada e o atuador foi lavado com água corrente e secado. Em seguida, a bomba foi ligada e o fluxo de ar no sistema foi ajustado para 28,3 L/min monitorado pelo fluxômetro. Foram coletadas as doses de 10 atuações sequenciais do dispositivo IPD. Entre cada atuação, o IPD foi agitado verticalmente por 5 s. Após a coleta das doses, a bomba foi desligada e o sistema, cuidadosamente desmontado. Ao tubo DUSA-MDI foram adicionados 100,0 mL de fase móvel como descrito no respectivo método (item 4.2.1) para solubilizar o fármaco que se aderiu ao interior do tubo e ao filtro; em seguida o atuador foi enxaguado pela mesma solução, o que resultou em uma solução amostra de concentração 10,0 µg/mL de salbutamol. As amostras foram preparadas em triplicata. Paralelamente, preparou-se a solução padrão de salbutamol na mesma concentração para cálculo do teor médio. As amostras foram quantificadas por CLAE pelo método descrito no item 4.2.1.

De acordo com especificação na monografia de SS IPD da BP 2014 (BRITISH, 2014) o teor médio deve estar entre 80,0 e 120,0% VR.

**Figura 10.1** - Tubo coletor de dose emitida do DUSA-MDI acoplado ao produto SS IPD Aerofrin® pelo bocal.



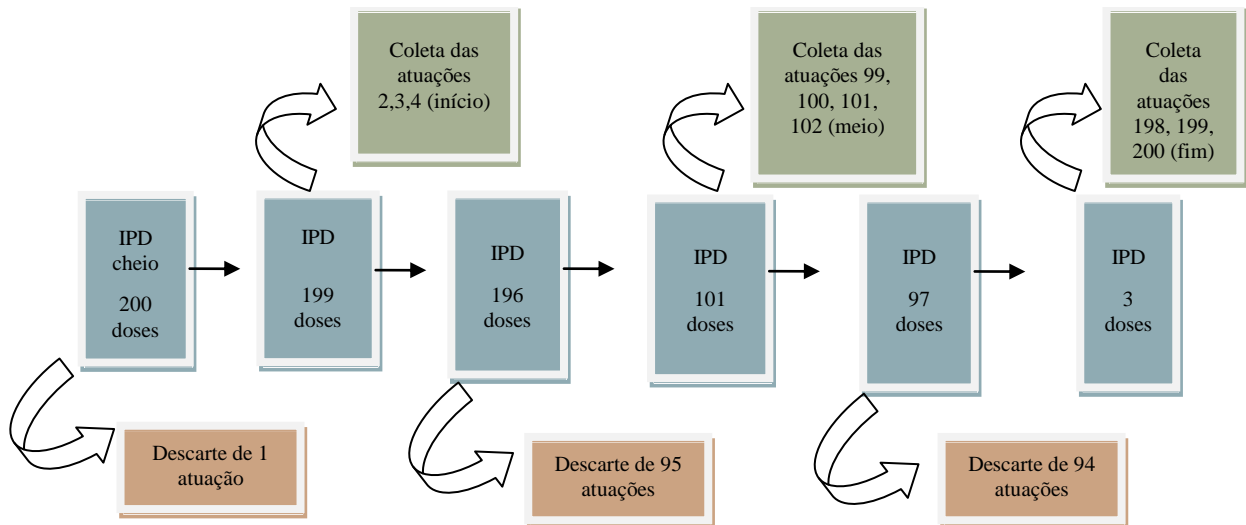
**Figura 110.2-** Esquema de montagem do aparelho DUSA-MDI para captação de dose emitida de IPD.



#### 4.2.7 Uniformidade de dose liberada (UDL) de sulfato de salbutamol IPD.

Utilizou-se o aparelho DUSA-MDI para a captação das doses emitidas pelo dispositivo IPD, conforme a montagem no doseamento (**Figura 10.2**). Entretanto, na UDL realizou-se a captação de apenas uma dose por vez proveniente de uma única atuação que foi diluída em 40,0 mL de fase móvel, logo a solução amostra teve concentração de 2,5 µg/mL. Assim, como no doseamento a primeira atuação foi descartada e o atuador lavado com água corrente e secado. Em seguida, foram coletadas as atuações iniciais (de número 2, 3 e 4), separadamente. Após as três primeiras amostras, foram descartadas mais 95 atuações sob exaustão para coletar as doses medianas correspondentes à metade do número de doses rotulado (200 doses). As sucessivas quatro atuações foram coletadas separadamente (de número 99, 100, 101 e 102) e na sequência foram descartadas mais 94 atuações sob exaustão para a coleta das três últimas emissões (de número 198, 199 e 200) como apresentado na **Figura 11**. O atuador foi lavado e secado após cada coleta e também depois dos sucessivos descartes. Do total das 10 amostras coletadas, três eram de início, quatro de meio e três do final do total de atuações rotulado. Paralelamente, preparou-se solução padrão de salbutamol na mesma concentração para cálculo do teor de cada dose coletada. As amostras foram quantificadas por CLAE como previamente descrito (item 4.2.1). De acordo com especificação contida no capítulo Métodos Gerais da BP 2014 (BRITISH, 2014), o teor de cada dose deve estar entre 75,0-125,0% VR.

**Figura 11 - Esquema representativo da ordem de atuações para coleta das doses de SS IPD para execução do teste UDL.**



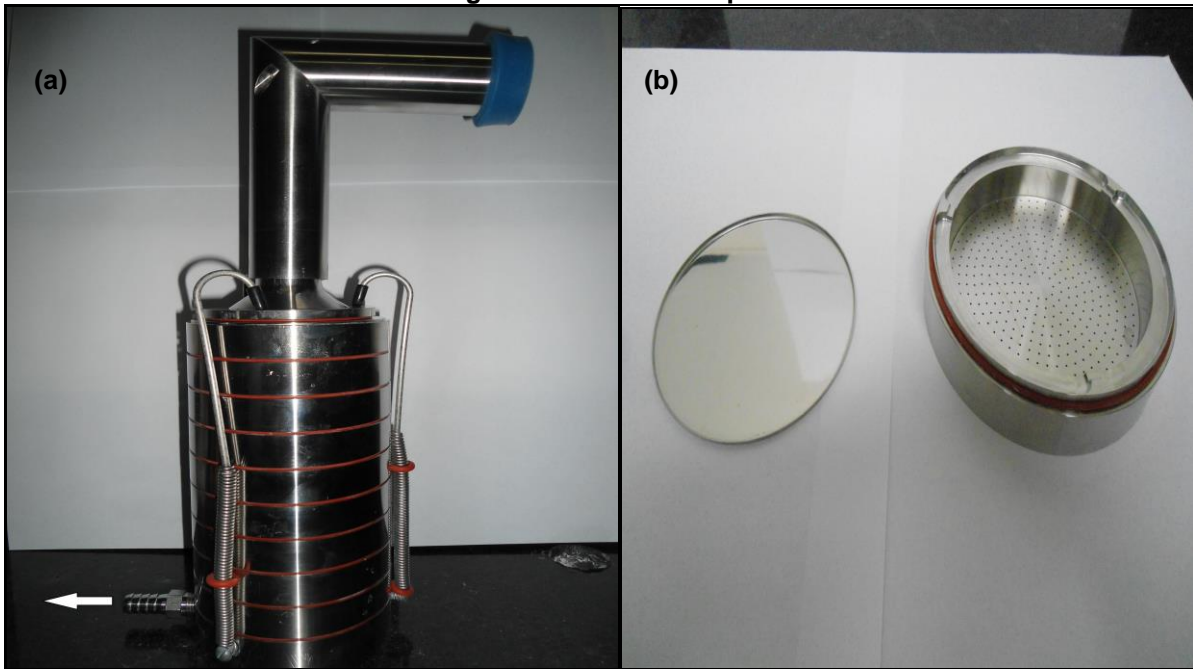
#### 4.2.8 Distribuição aerodinâmica de partículas (DAP) de sulfato de salbutamol IPD

##### 4.2.8.1 Avaliação de DAP de sulfato de salbutamol IPD por Impactador em Cascata Andersen (ICA/ACI)

O aparelho ACI foi montado conforme preconizado no capítulo Métodos Gerais da USP 37 e BP 2014 (THE UNITED, 2014; BRITISH, 2014) de modo sobreposto para cada estágio. O ACI é composto por oito estágios de coleta e cada estágio possui um tamis seguido de prato coletor. À medida que o número do estágio aumenta, diminui-se o diâmetro dos orifícios que compõem o tamis (**Figura 12**). Apenas o último estágio (F) não tem um prato coletor, mas sim um filtro de celulose para coletar as partículas finas que porventura chegaram. Depois de montado, adicionou-se um bocal para o encaixe do dispositivo IPD ao ACI que então foi conectado a um fluxômetro e esse a uma bomba de vácuo que foi ligada para gerar um fluxo de ar de 28,3 L/min.

A primeira atuação foi descartada e o atuador lavado com água corrente e secado. Em seguida, foram realizadas 10 atuações sucessivas no ACI, sendo que entre cada uma o dispositivo foi agitado verticalmente por cinco segundos.

**Figura 12 – (a) foto do ACI montado com estágios crescentes de cima para baixo e (b) foto de um estágio com tamis e seu prato coletor.**



A bomba então foi desligada e o ACI foi desmontado, o conteúdo depositado em cada estágio foi solubilizado em 20,0 mL. O SS coletado em cada estágio foi quantificado frente ao padrão do ativo na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  por CLAE pelo método descrito no item 4.2.1.

Os parâmetros fração de partículas finas (FPF,%), diâmetro aerodinâmico mediano de massa (DAMM,  $\mu\text{g}$ ) e desvio padrão geométrico (DPG) (THE UNITED, 2014) foram calculados pelo software Copley Inhaler Testing Data Analysis (CITDAS) versão 3.10 Wibu. Partículas que apresentaram diâmetro aerodinâmico inferior a 5  $\mu\text{m}$  foram consideradas como finas.

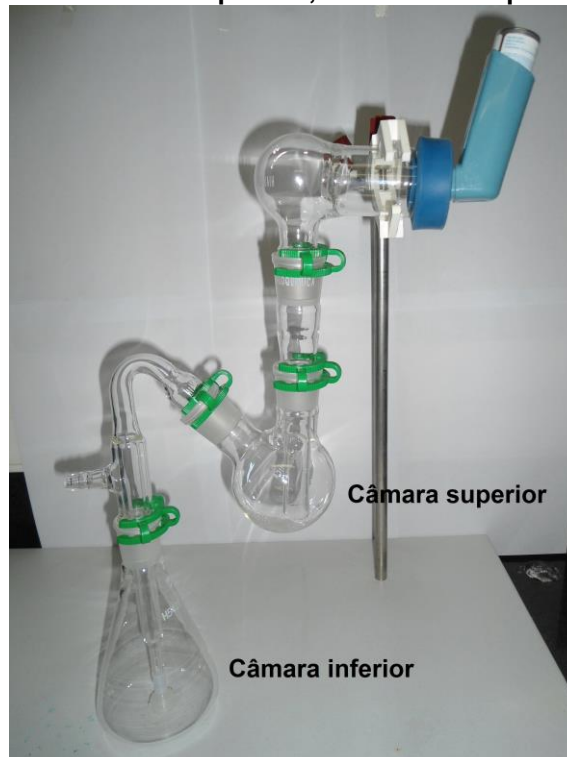
#### **4.2.8.2 Avaliação de DAP de sulfato de salbutamol IPD por Impactador Duplo de Vidro (IDV/GTI)**

O GTI foi montado segundo as instruções no capítulo Métodos Gerais da BP 2014 (BRITISH, 2014) e foram adicionados respectivamente 7 e 30 mL de água nas câmaras superior (estágio 1) e inferior (estágio 2) como representado na **Figura 13**. O impactador foi ligado à bomba de vácuo que foi ajustada para gerar um fluxo de ar de



60  $\pm$ 5 L/min monitorado pelo fluxômetro. Após o descarte de 5 atuações sob exaustão, o atuador do dispositivo IPD foi lavado e secado. O IPD foi conectado ao impactador por meio de um bocal e foram coletadas 5 atuações consecutivas, sendo que entre cada uma o dispositivo foi agitado verticalmente por cinco segundos. Após a bomba ser desligada, o impactador foi desmontado e o conteúdo presente no estágio 2 foi diluído para 100,0 mL de solução aquosa de metanol 50% v/v que gerou uma solução amostra de concentração igual a 5  $\mu$ g/mL de salbutamol.

**Figura 13 - Aparelhagem para avaliação de DAP por meio do GTI com o produto Aerofrin<sup>®</sup> IPD acoplado ao bocal e na sequencia, as câmaras superior e inferior.**



A quantificação de SS foi realizada frente a uma solução padrão de concentração 5,0  $\mu$ g/mL em solução aquosa de metanol 50% v/v por CLAE pelo método descrito no item 4.2.1. A quantidade de fármaco que chegou ao segundo estágio corresponde às partículas de diâmetro aerodinâmico menor que 6,4  $\mu$ m (LEBELLE, 1997).

#### **4.2.9 Medição do tamanho de partículas da suspensão de sulfato de salbutamol por difração a laser**

Visto que a formulação dentro do recipiente do Aerofrin® IPD está em forma de suspensão, avaliou-se o tamanho das partículas do SS suspensas no propelente. Para coletar a suspensão, o recipiente de alumínio da amostra foi resfriado a -10 °C por uma hora e em seguida aberto. O dispositivo permaneceu em temperatura ambiente até que o propelente evaporasse e então a suspensão foi recolhida de acordo com as instruções para avaliação microbiológica na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010).

A avaliação da distribuição de tamanho de partícula de SS foi realizada via modo líquido em analisador de tamanho de partícula por difração a laser cuja faixa de detecção é 0,017 a 2000 µm. O modelo óptico utilizado foi a aproximação de Fraunhofer. As amostras foram dispersas em éter etílico por agitação mecânica e ultrassom. A quantidade utilizada para análise foi aquela suficiente para causar aproximadamente 15% de obscurecimento de luz no detector em relação ao solvente. Os resultados da análise, realizada em triplicata, foram expressos em termos de média (diâmetro médio), e de distribuição de tamanho de partículas.

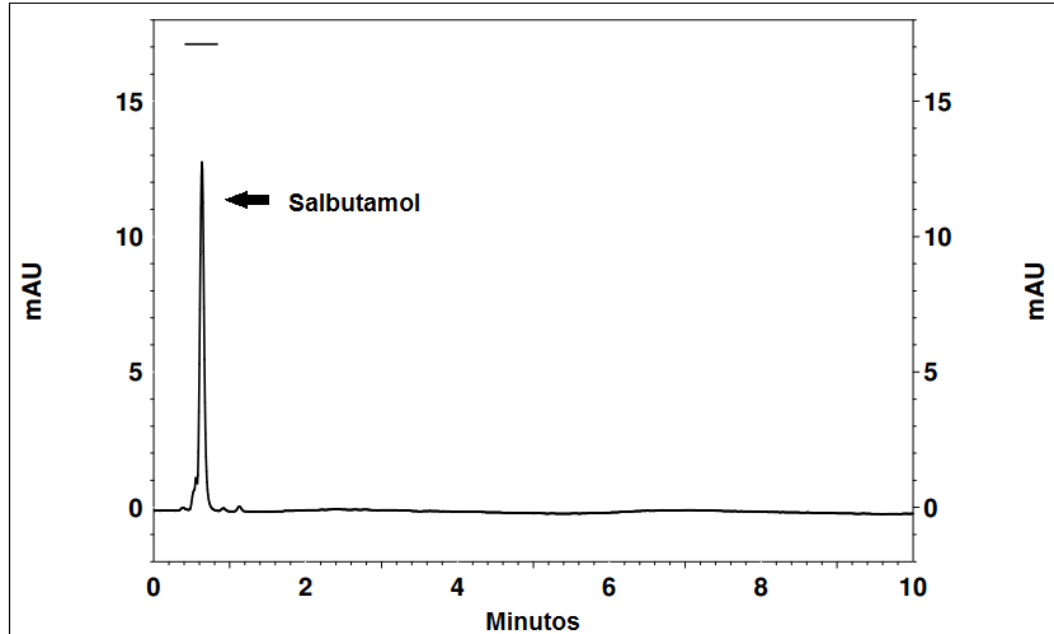
## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE para a determinação de sulfato de salbutamol por meio de planejamento experimental Doehlert**

Há vários métodos por CLAE para quantificação de SS descritos na literatura, entretanto, nem sempre apresentam as condições cromatográficas que geram resultados ótimos de parâmetros, como número de pratos (N), fator de retenção (k) e assimetria (T). Como exemplo, o método descrito na monografia de salbutamol IPD para doseamento presente na BP 2014, quando reproduzido gera um pico com tempo de retenção igual a 0,63 minutos, e fator de retenção, k menor que 0,5 (**Figura 14**),

logo o salbutamol elui próximo ao volume morto. As condições cromatográficas do método testado foram coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano C18, dimensões 100x4,6 mm, partícula de 5  $\mu\text{m}$  (Luna - Phenomenex), fase móvel de eluição isocrática constituída por mistura de metanol e solução contendo 0,1% p/v de acetato de amônio (80:22,5), fluxo 2 mL/min, temperatura ambiente com detecção por ultravioleta (UV) em  $\lambda$  276 nm e volume de injeção 20  $\mu\text{L}$  (BRITISH, 2014).

**Figura 14 - Cromatograma de salbutamol (10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $t_R$  0,63 min,  $k < 0,5$ ) obtido com as condições cromatográficas correspondentes ao método da monografia de SS IPD da BP 2014.**



A fim de desenvolver um método de determinação de SS por CLAE e obter parâmetros cromatográficos ótimos, buscou-se utilizar o planejamento Doehlert, uma ferramenta que extrapola os dados de testes experimentais por meio de cálculos de interação que resultam em valores ótimos de cada variável do método testado (DOEHLERT, 1970; FERREIRA, 2007).

As variáveis avaliadas para o desenvolvimento do método foram coluna cromatográfica, fluxo, temperatura de forno da coluna,  $\lambda$  de detecção, volume de injeção e fase móvel (eluição isocrática). Não foram realizados planejamentos fatoriais para a pesquisa de quais variáveis seriam críticas para a resposta a ser estudada, uma

vez que foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre métodos de detecção de SS por CLAE e por já se ter experiência prévia das variáveis que mais influenciam na resposta ao testar o método proposto pela BP. Visto que a variável fase móvel é muito abrangente, ela foi dividida em três subvariáveis: tipo de solvente orgânico na fase móvel, tipo de solvente aquoso na fase móvel e proporção de solvente orgânico na fase móvel. As variáveis escolhidas para compor o planejamento Doehlert foram proporção de solvente orgânico na fase móvel ( $X_1$ ), fluxo ( $X_2$ ) e tipo de solvente orgânico na fase móvel ( $X_3$ ) por influenciarem a resposta com alterações sutis em seus valores. A resposta escolhida para avaliar a eficiência do método foi número de pratos ( $N$ ) do pico de salbutamol, pois os pontos críticos de sua eluição são retenção e relação sinal/ruído. Apesar da molécula de salbutamol ser pouco apolar ( $\text{Log } P = 0,34$ ) e apresentar retenção reduzida na fase estacionária, o que faz com que  $k$  seja um parâmetro crítico, optou-se por trabalhar com a fase reversa pelo fato de ser a fase mais usual e de permitir a retenção e avaliação para possíveis impurezas. Além disso, como o método será empregado para amostras em pequenas concentrações, na ordem de  $2,5 \mu\text{g/mL}$ , há necessidade de se avaliar a altura ou amplitude de sinal do pico de salbutamol. Logo, a altura do pico torna-se um parâmetro importante no desenvolvimento do método. Visto que  $N$  é proporcional ao tempo de retenção e à altura do pico (Equação 1.1) é importante avaliar este parâmetro cromatográfico para avaliar a qualidade do método a ser desenvolvido.

$$\text{Número de pratos, } N = 2\pi \left( \frac{t_r h}{A} \right)^2 \quad (1.1)$$

em que,

$t_r$ , tempo de retenção do pico cromatográfico;

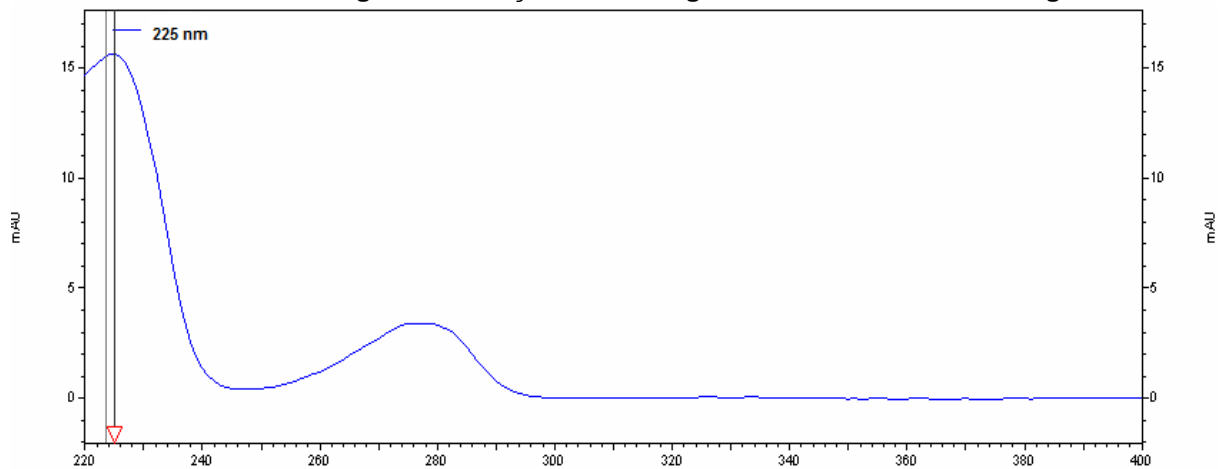
$h$ , altura do pico cromatográfico;

$A$ , área do pico cromatográfico.

As demais variáveis que não foram escolhidas para compor o planejamento Doehlert tiveram seus valores fixados. A coluna escolhida foi a Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent) de dimensões  $100 \times 4,6 \text{ mm}$  e tamanho de partícula  $3,5 \mu\text{m}$ , pois o tamanho de partícula menor que  $5 \mu\text{m}$ , nas dimensões citadas, contribui para aumentar o valor de

N, além de ser facilmente encontrada no mercado. A temperatura de forno da coluna foi 25 °C. O  $\lambda$  de detecção foi escolhido ao analisar o espectro de absorção de radiação na região do UV, por varredura de 400 a 220 nm realizada pelo detector UV/DAD do cromatógrafo (**Figura 15**). O  $\lambda$  escolhido foi 225 nm, por ser o ponto de absorção máxima, o que contribui para aumentar a amplitude de sinal. O volume de injeção menor que 25  $\mu$ L foi fixado em 20  $\mu$ L, o que contribui para não haver grande difusão de massa de ativo na coluna (SNYDER, 1997)

**Figura 15 - Espectro de absorção de radiação de SS na região do UV obtido pelo detector UV/DAD do cromatógrafo. Condições cromatográficas como descrito na Figura 17.**



Uma das vantagens do planejamento Doehlert em relação a outros é a possibilidade de explorar cada variável em diferentes níveis, de acordo com a sua influência na resposta (FERREIRA, 2004). Diante disso, a variável  $X_1$  foi explorada em sete níveis expressos como valores de porcentagem de solvente orgânico na fase móvel;  $X_2$  apresentou cinco níveis de valores de fluxo em mL/min e  $X_3$  foi explorada em três níveis. Apesar da variável tipo de solvente orgânico da fase móvel ( $X_3$ ) ser qualitativa, cada nível foi expresso quantitativamente, em que metanol = 0, acetonitrila = 1 e metanol:acetonitrila (50:50) = 0,5. Os valores de cada nível das variáveis estão expostos na **Tabela 2.1**. Cada variável apresenta um ponto central que é o valor intermediário de cada nível, logo o ponto central de  $X_1$  é 18% de solvente orgânico, de  $X_2$  é fluxo de 1,0 mL/min e de  $X_3$  é acetonitrila:metanol como solvente orgânico que estão em negrito na **Tabela 2.1**. Os pontos centrais foram testados em cinco replicatas,

para calcular o erro puro. A quantidade de experimentos (Q) para construir a matriz Doehlert é calculada pela Equação 1.2.

$$\text{Quantidade de experimentos } Q = k^2 + k + C \quad (1.2)$$

em que:

k, número de variáveis;

C, número de replicatas do ponto central

Visto que o número de variáveis foi três e o número de replicatas do ponto central cinco, a quantidade de experimentos necessária para compor o planejamento Doehlert foi de 17, sendo que dessas, cinco são repetições do ponto central. Cada experimento foi constituído por uma injeção de solução padrão de salbutamol (10,0 µg/mL) do doseamento descrito no item 4.2.6 no cromatógrafo com as condições cromatográficas já estabelecidas em que apenas as variáveis  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  variam seus valores. Cada uma das condições testadas nos 17 experimentos estão representadas na **Tabela 4** e realizadas seguindo o planejamento Doehlert composto por três variáveis com sete, cinco e três níveis (FERREIRA, 2008). As repostas expressas em número de pratos (N) obtidas em cada experimento também estão expostas na **Tabela 4**.

**Tabela 4 - Tabela de contraste com as condições cromatograficas e repostas de cada experimento de acordo com o planejamento Doehlert**

Experimento	Porcentagem de orgânico (%)	Fluxo (mL/min)	Tipo de orgânico	Resposta (N)
1	18	1,0	0,5	2435
	18	1,0	0,5	2416
	18	1,0	0,5	2422
	18	1,0	0,5	2405
	18	1,0	0,5	2416
2	18	1,4	0,5	1886
3	27	1,2	0,5	1889
4	21	1,2	0,0	1091

5	18	0,6	0,5	2837
6	10	0,8	0,5	4306
7	15	0,8	1,0	3375
8	10	1,2	0,5	3943
9	15	1,2	1,0	3615
10	27	0,8	0,5	2739
11	24	1,0	1,0	4130
12	21	0,8	0,0	1442
13	12	1,0	0,0	2504

Observa-se que houve uma grande variação (mínimo 1442 e máximo 4306) nos valores de N entre os experimentos. Entretanto, não se pode afirmar que as condições ótimas que levaram ao maior valor de N já tenham sido avaliadas em um dos 17 experimentos. Logo, a fim de extrapolar os resultados já obtidos, pela matriz Doehlert pode-se calcular o ponto ótimo que representa os valores que as variáveis  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  assumem para gerar a melhor resposta. Pelos valores de respostas do ponto central calculou-se um erro puro de 119,7. Por meio da combinação entre os valores das variáveis e de N obtidos, calcularam-se os coeficientes da equação que representa o modelo do planejamento Doehlert (Equação 1.3). Essa equação foi obtida pelos efeitos das interações lineares e quadráticas primárias, as secundárias foram excluídas por gerarem resultados de ponto ótimo incoerentes experimentalmente.

(1.3)

$$Y = 7224,23 + 1243,01X_1 - 557,31X_2 + 1771,98X_3 - 1125,57X_1^2 + 12,81X_2^2 + 255,68X_3^2$$

em que:

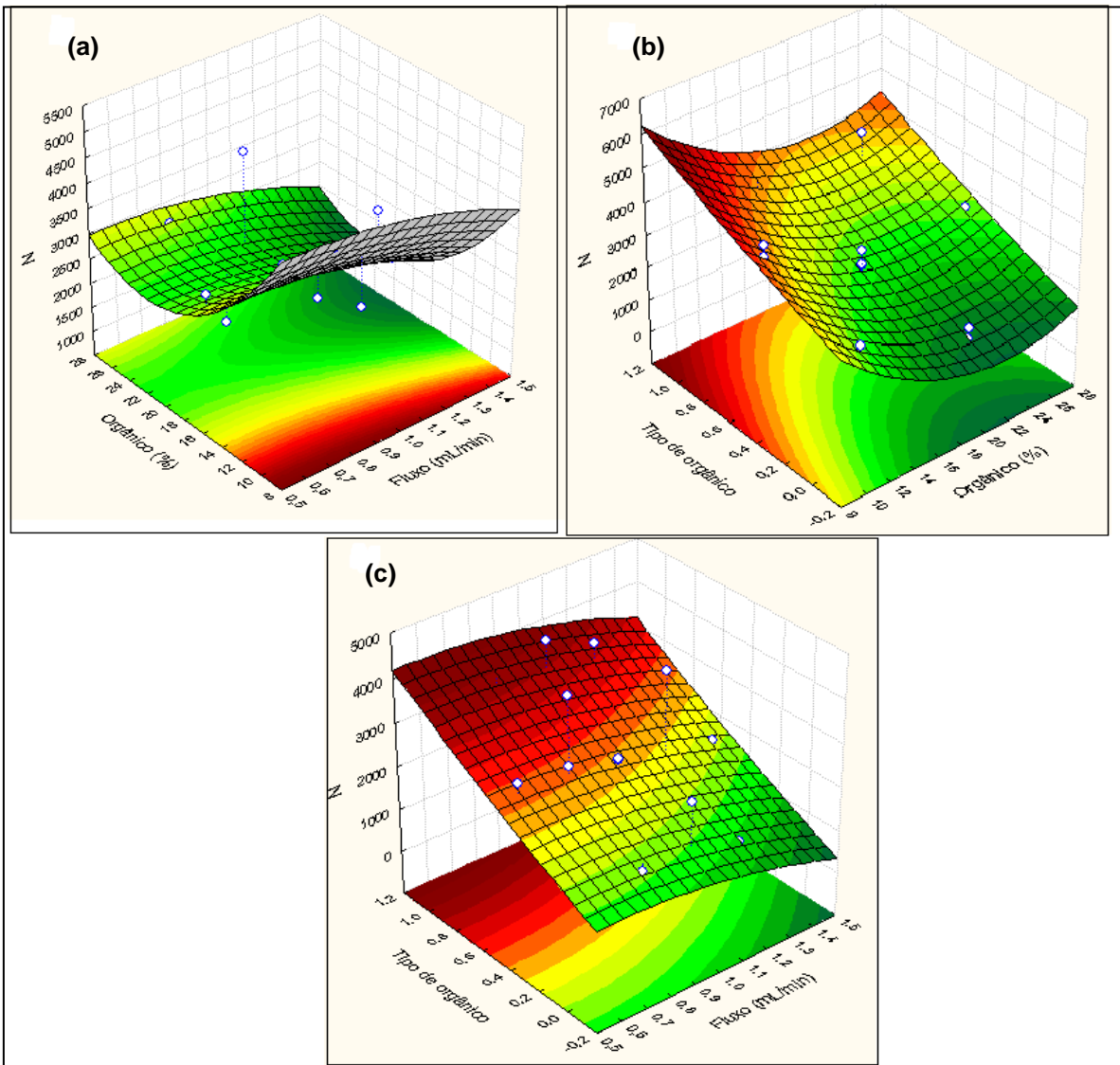
Y, variável dependente

$X_{(n)}$ , variáveis independentes

As superfícies de resposta obtidas estão expostas na **Figura 16**, em que as variáveis estudadas no planejamento Doehlert foram agrupadas duas a duas para se

avaliar a interação entre elas na resposta N. Pela avaliação da aparência das três superfícies de resposta formadas observam-se uma indicação favorável devido à clara inclinação positiva para o metanol como tipo de orgânico, uma leve tendência para fluxos menores e uma inclinação dupla tanto para porcentagens de orgânico maiores, quanto menores. O ponto ótimo foi calculado pela primeira derivada da equação que representa o modelo (Equação 2.3) para cada variável e os valores encontrados estão expostos na **Tabela 5**. Os valores correspondentes ao ponto ótimo estão em acordo com as inclinações das superfícies de resposta.

**Figura 16 - Superfícies de resposta obtidas em função da resposta (N) por planejamento Doehlert para avaliação das interações entre as variáveis (a) proporção de orgânico e fluxo, (b) tipo de orgânico e fluxo e (c) tipo de orgânico e proporção de orgânico, para fins determinação de SS por CLAE.**





**Tabela 5 – Resultados do ponto ótimo calculado por meio da superfície de resposta obtida por planejamento Doehlert para fins determinação de SS por CLAE.**

Variável	Valor do ponto ótimo
X <sub>1</sub> ; %Solvente orgânico	22%
X <sub>2</sub> , Fluxo (mL/min)	0,6 mL/min
X <sub>3</sub> , Tipo de solvente orgânico	Metanol

A fim de verificar se as condições do ponto ótimo geram um valor de resposta (N) satisfatório para o pico cromatográfico referente ao salbutamol, o último experimento, considerado ótimo, foi realizado com a mesma solução padrão referente ao doseamento (descrito no item 4.2.6) para confirmação das condições resultantes, ou seja, com 22% de metanol na fase móvel e fluxo 0,6 mL/min. O cromatograma obtido está representado na **Figura 17**.

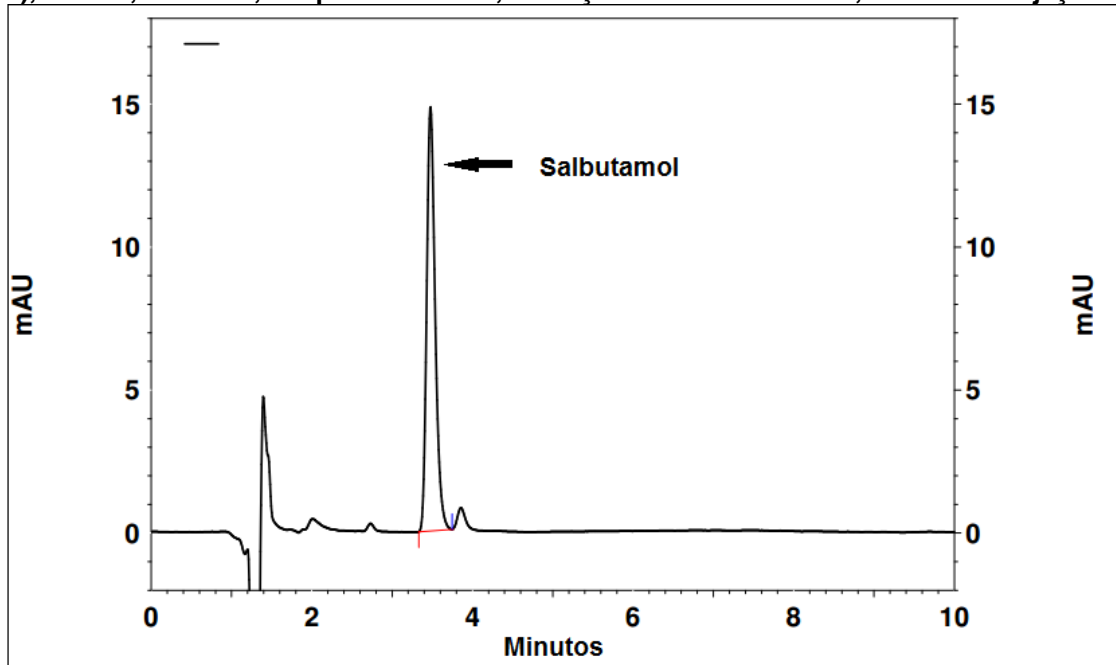
O valor de número de pratos (N) do pico correspondente ao salbutamol nas condições do ponto ótimo foi de 5269, que é significativamente superior à maior resposta obtida entre os experimentos já testados. Isso endossa as condições ótimas para gerar a melhor resposta (N) que foram obtidas pelo planejamento Doehlert, e extrapola os resultados obtidos com apenas 17 experimentos. Além disso, o valor do fator de retenção (k) foi 1,85, que é satisfatório por ser maior que 1,0, o que reduz a possibilidade de coeluição de interferentes que eluem no volume morto. A assimetria (T) do pico também foi calculada e seu valor foi T=1,3.

O método desenvolvido com planejamento Doehlert como ferramenta de otimização para determinação de SS por CLAE apresentou as seguintes condições cromatográficas: coluna cromatográfica de fase reversa C18, dimensões 100x4,6 mm, partícula de 3,5 µm (Zorbax Eclipse Plus - Agilent), fase móvel constituída por mistura de metanol e solução contendo 0,1% p/v de acetato de amônio (22:78), fluxo 0,6 mL/min, temperatura de ambiente com detecção por ultravioleta (UV) em  $\lambda$  225 nm e volume de injeção 20 µL.

De fato, os parâmetros cromatográficos do pico correspondente ao salbutamol com as condições referentes ao ponto ótimo apresentaram os melhores resultados até então obtidos. O desenvolvimento de método analítico por planejamento Doehlert mostrou-se prático e eficaz, uma vez que foram necessárias apenas 17 injeções no

cromatógrafo para que as condições cromatográficas fossem definidas para gerar um resultado ótimo, que provavelmente não teria sido alcançado empiricamente.

**Figura 17 – Cromatograma de salbutamol (10,0 µg/mL) obtido com as condições cromatográficas do ponto ótimo calculado por meio da superfície de resposta obtida por planejamento Doehlert. Condições: eluição isocrática, FM: metanol e acetato de amônio 0,1% p/v (22:78), fluxo 0,6 mL/min, temperatura 25 °C, detecção UV/DAD  $\lambda$  225 nm, volume de injeção 20 µL.**

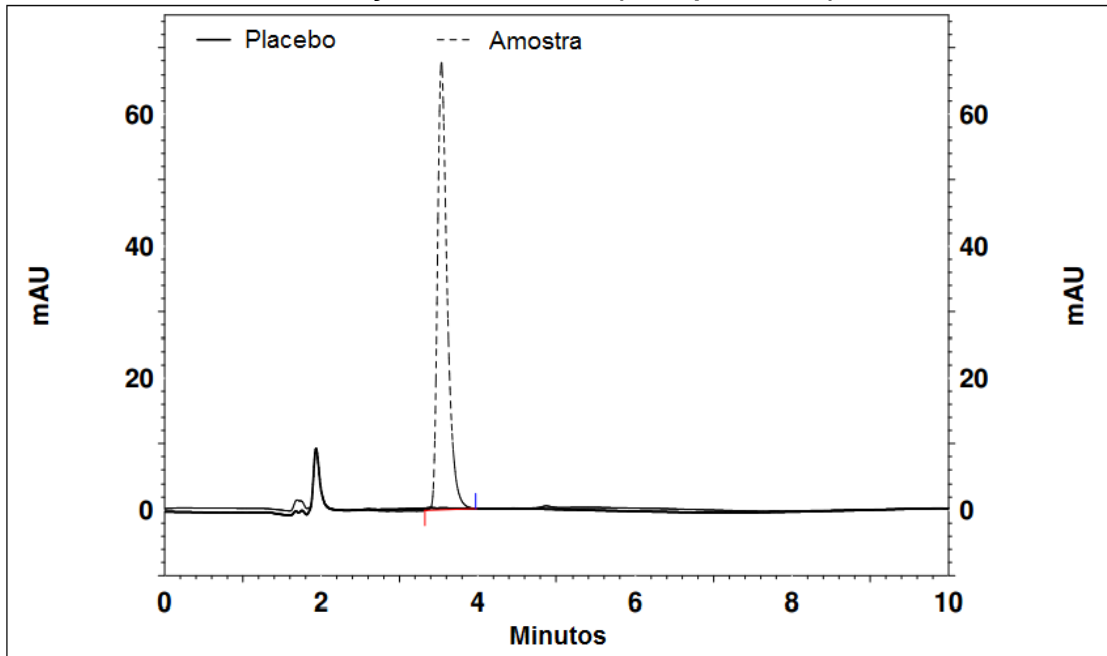


## 5.2 Validação de método analítico por CLAE para a determinação de sulfato de salbutamol

### 5.2.1 Seletividade

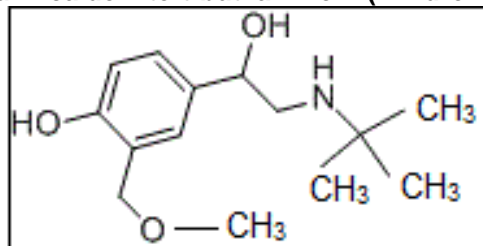
A solução de placebo injetada no cromatógrafo sob as condições do método de determinação de SS por CLAE desenvolvido gerou um cromatograma que não apresentou pico algum, inclusive no tempo de retenção do pico de salbutamol (**Figura 18**). Logo, não há excipientes na formulação da amostra que coeluem junto ao salbutamol.

**Figura 18 - Cromatogramas da solução placebo (linha contínua) sobreposto ao cromatograma da solução amostra de SS (linha pontilhada).**

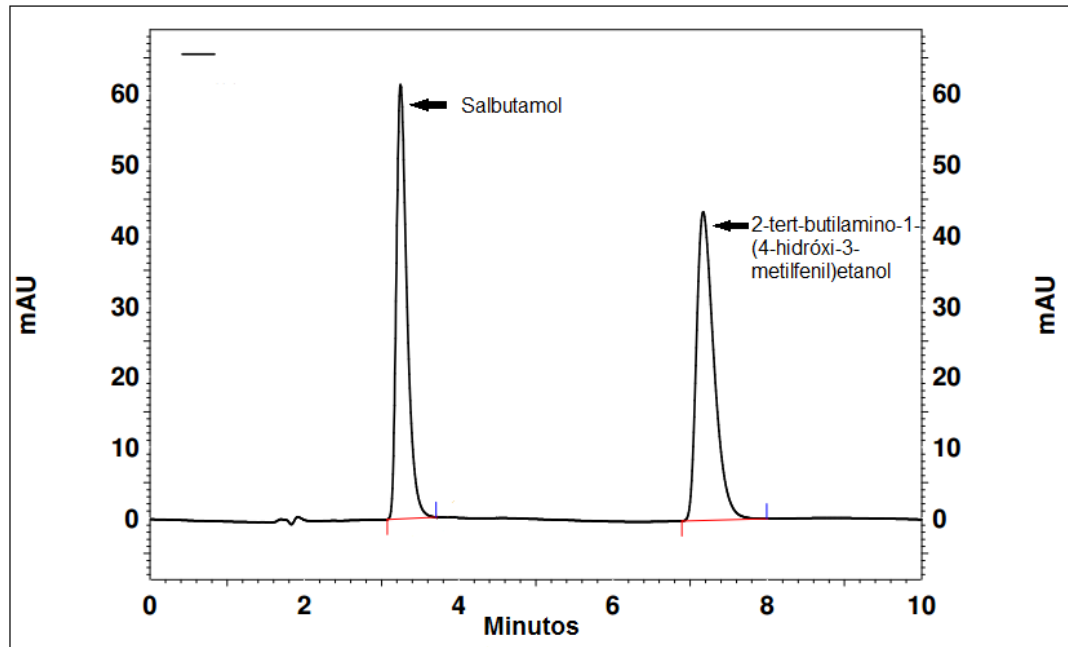


Também foi injetada a solução contendo SS enriquecida com padrão de sua impureza conhecida 2-tert-butilamino-1-(4-hidróxi-3-metilfenil)etanol (**Figura 19**). O pico cromatográfico correspondente à impureza apresentou separação adequada em relação ao pico do salbutamol, cuja resolução,  $R_s$  foi 11,7 (**Figura 20**). A pureza cromatográfica do pico de salbutamol apresentou índice de similaridade igual a 1,0, o que significa que não há interferência de substâncias de espectro diferente ao do SS que elua junto ao ativo.

**Figura 19 - Estrutura química de 2-tert-butilamino-1-(4-hidróxi-3-metilfenil)etanol.**



**Figura 20 - Cromatograma correspondente à solução de SS contaminada pela impureza 2-tert-butilamino-1-(4-hidróxi-3-metilfenil)etanol.**



O método de determinação de SS por CLAE mostrou-se seletivo para quantificação do ativo sem a interferência de outras substâncias.

### 5.2.2 Linearidade

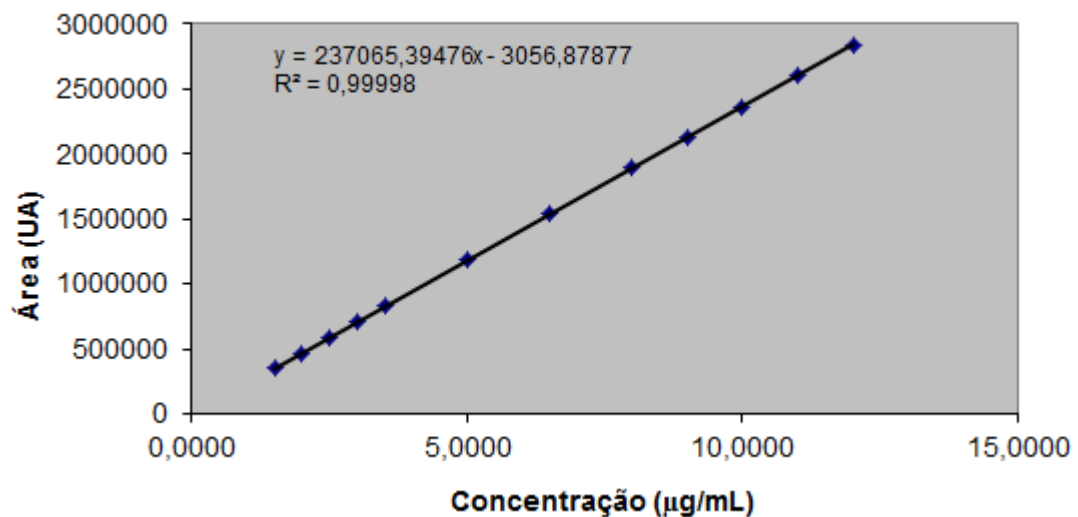
A linearidade do método foi avaliada pela injeção de 12 soluções, em triplicata no cromatógrafo, cujos preparos foram apresentados na Tabela 2.2 Os resultados do teste estão expostos na **Tabela 6** e a curva analítica construída a partir da regressão linear desses dados está apresentada na **Figura 21**.

**Tabela 6 - Resultados de avaliação da linearidade do método para determinação de SS por CLAE.**

Nível (%)	Concentração (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	Fator de resposta, Fr ( $10^6$ ) (Y/X)
15	1,5	346275	2,3085
		347202	2,3147
		351728	2,3449
20	2,0	465088	2,3254
		469194	2,3460
		465289	2,3264

25	2,5	589058	2,3562
		591864	2,3675
		594029	2,3761
30	3,0	708559	2,3619
		708302	2,3610
		706172	2,3539
35	3,5	831833	2,3767
		829974	2,3714
		826196	2,3606
50	5,0	1183030	2,3661
		1187224	2,3744
		1186857	2,3737
65	6,5	1534527	2,3608
		1539408	2,3683
		1538611	2,3671
80	8,0	1899690	2,3746
		1898741	2,3734
		1897170	2,3715
90	9,0	2134589	2,3717
		2140037	2,3778
		2131621	2,3685
100	10,0	2366978	2,3670
		2360703	2,3607
		2360929	2,3609
110	11,0	2609451	2,3722
		2609271	2,3721
		2607612	2,3706
120	12,0	2833491	2,3612
		2831722	2,3598
		2836945	2,3641
Média (DPR%)			2,3608 (0,7264)

**Figura 21 - Curva analítica para avaliação da linearidade do método para determinação de SS por CLAE.**



A linearidade do método de determinação de SS por CLAE na faixa de concentração de 1,5 a 12,0 µg/mL foi comprovada. O coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,99998$ ) foi superior a 0,99 e a regressão foi significativa, uma vez que o valor de  $F_{\text{calculado}}$  ( $4,1024 \times 10^5$ ) é maior que o  $F_{\text{crítico}}$  ( $2,1177 \times 10^{-24}$ ) para  $p < 0,05$  (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Os fatores de resposta (Fr) mantiveram-se constantes com baixa dispersão (DPR=0,7264%), com variação menor que 2,5% da média dos valores de Fr obtidos (GREEN, 1996; BRASIL, 2003). A faixa da curva analítica contemplou as concentrações de SS correspondentes aos testes UDL, DAP e doseamento em que o método por CLAE será utilizado para a quantificação do ativo.

### 5.2.3 Repetitividade e precisão intermediária

Para avaliar a repetitividade do método de determinação de SS por CLAE foram preparadas três replicatas das amostras correspondentes a cada um dos testes de UDL, DAP e doseamento, que representam respectivamente as concentrações baixa (2,5 µg/mL, 25%), média (5,0 µg/mL, 50%) e alta (10 µg/mL, 100%). Para a precisão intermediária, foram preparadas mais três amostras de cada teste, totalizando seis preparações de cada concentração. Os resultados da avaliação da repetitividade para cada um dos testes estão apresentados na **Tabela 7**.

**Tabela 7 - Resultados de avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método de determinação de SS por CLAE para amostras correspondentes aos testes de UDL (25%), DAP (50%) e doseamento (100%).**

Parâmetro	Nível de concentração	25%	50%	100%
Repetitividade (n=3)	Média da área	617605	669466	2297945
	%DPR	2,15	1,04	1,13
Precisão intermediária (n=6)	Média da área	621786	686610	2299052
	%DPR	4,02	3,12	3,77

Os valores de DPR da repetitividade e da precisão intermediária foram inferiores a 5% para todas as três concentrações testadas, o que significa que o método de determinação de SS por CLAE avaliado é preciso (BRASIL, 2003).

### 5.2.4 Exatidão

A avaliação da exatidão do método de determinação de SS por CLAE foi realizada com placebo enriquecido com quantidades conhecidas de padrão primário de salbutamol que geraram soluções cujas concentrações contemplam a ampla faixa correspondente aos testes de UDL, DAP e doseamento. A porcentagem de recuperação foi calculada pela razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica de salbutamol. Os resultados estão expostos na **Tabela 8**.

**Tabela 8 - Resultados de avaliação da exatidão do método de determinação de SS por CLAE pela recuperação de ativo adicionado ao placebo.**

Nível (%)	Concentração teórica de SS (µg/mL)	Concentração real de SS (µg/mL)	Recuperação (%)	Média/DPR (%)
20	2,00	1,98	98,99	99,76/ 1,64
		1,97	98,65	
		2,03	101,63	
25	2,50	2,50	100,13	99,55/ 0,51
		2,48	99,16	
		2,48	99,37	
30	3,00	2,96	98,65	98,69/ 0,22
		2,96	98,50	
		2,97	98,93	
50	5,00	5,01	100,16	100,23/ 0,53
		4,99	99,74	
		5,04	100,80	
80	8,00	8,10	101,26	100,67/ 0,74
		7,99	99,83	
		8,07	100,91	
100	10,00	10,10	101,03	100,97/ 0,21
		10,07	100,74	
		10,12	101,15	
120	12,0	12,12	100,98	100,77/ 101,00

	12,41	100,34	0,37
Média/ DPR (%)			100,09/ 0,82

Os resultados de recuperação para cada nível de concentração permaneceram na faixa 98,0-102,0% e os valores de DPR foram menores que 2%; isso comprova a exatidão do método (GREEN, 1996).

### 5.2.5 Robustez

Para avaliar se o método é capaz de resistir a eventuais ou premeditadas alterações durante as análises de rotina, algumas condições cromatográficas foram modificadas. Os fluxos testados foram 0,5 e 0,7 mL/min, as temperaturas 23 e 27 °C, as proporções de solvente orgânico na fase móvel 20 e 24%. A estabilidade da amostra depois de 24 h de preparo e outro lote da coluna cromatográfica também foram avaliados. Utilizaram-se amostras do doseamento em triplicata oriundas do ensaio de precisão. Os teores encontrados na avaliação da robustez foram comparados aos teores obtidos no teste de precisão (nominal) por meio do DPR entre as médias (**Tabela 9**).

**Tabela 9 - Resultados de avaliação da robustez do método de determinação de SS por CLAE.**

Condição	Média / DPR (%)	DPR em relação à média nominal (%)
Nominal*	95,54 / 1,13	—
Fluxo 0,5 mL/min	95,07 / 1,11	0,35
Fluxo 0,7 mL/min	95,80 / 1,48	0,20
Temperatura 23°C	95,80 / 1,32	0,20
Temperatura 27°C	96,17 / 1,37	0,46
Metanol 20%	96,42 / 1,48	0,65
Metanol 24%	96,46 / 1,37	0,68
Após 24h	96,39 / 1,15	0,63
Coluna 2° lote	95,74 / 1,56	0,15

\* Condições cromatográficas referentes ao teste de precisão.



Visto que os valores de DPR entre as médias dos teores obtidos nas condições alteradas em relação à média na condição nominal foram menores que 1% (especificação 5%, GREEN.1996), o método foi considerado robusto diante das alterações testadas.

### **5.2.6 Adequação do sistema**

Para avaliar se os parâmetros cromatográficos estão adequados para gerar resultados confiáveis, a solução adequação do sistema, que contém salbutamol a 10,0 µg/mL e 2-tert-butilamino-1-(4-hidróxi-3-metilfenil)etanol a 12,0 µg/mL em fase móvel foram injetadas no cromatógrafo. Os valores dos parâmetros cromatográficos referentes ao pico de salbutamol foram  $N=4679$ ,  $T=1,4$ ,  $k=1,06$  e  $R_s=13,2$  entre os picos principais. Diante desses resultados, os testes de quantificação de SS por este método validado serão válidos apenas se o cromatograma da solução adequação apresentar  $N > 1000$ ,  $T$  entre 0,8 e 2,0,  $k > 1,0$  para o pico de salbutamol e  $R > 2,0$  entre os picos principais (THE UNITED, 2014).

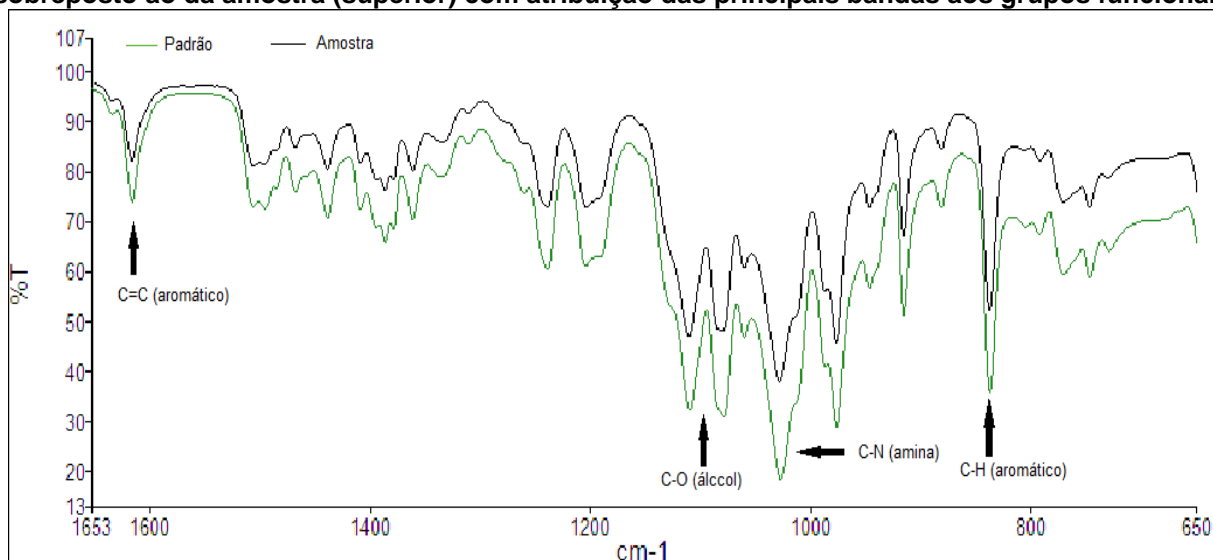
## **5.3 Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação de sulfato de salbutamol em dispositivo IPD.**

### **5.3.1 Identificação por espectrofotometria de absorção de radiação na região do infravermelho (IV)**

Com o intuito de comprovar a autenticidade de sulfato de salbutamol na amostra oriunda do dispositivo IPD, o método de identificação por espectrometria de absorção na radiação IV foi desenvolvido. A amostra foi obtida por 50 atuações do dispositivo IPD em béquer de vidro de 50 mL. Visto que o propelente evapora assim que sai do dispositivo, depositou-se na superfície do béquer apenas um pó de coloração branca constituído por sulfato de salbutamol e apenas uma ínfima quantidade do excipiente ácido oléico, considerando que a pequena quantidade de álcool etílico anidro presente tenha evaporado devido a sua alta pressão de vapor (9,95 kPa). A amostra sólida foi

preparada por meio da técnica de reflectância total atenuada (ATR) submetida à varredura espectral na faixa 1650 a 650  $\text{cm}^{-1}$  no espectrofotômetro IV e comparada ao espectro do padrão primário de sulfato de salbutamol (**Figura 22**).

**Figura 22 – Espectros de absorção de radiação na região do IV para o padrão de SS (inferior) sobreposto ao da amostra (superior) com atribuição das principais bandas aos grupos funcionais.**



As bandas espectrais de amostra e padrão foram correspondentes e apresentaram máximos de absorção próximos aos seguintes comprimentos de onda ( $\lambda$ ): 1600, 1100, 1030 e 820  $\text{cm}^{-1}$ . As atribuições das bandas mais intensas estão apresentadas na **Tabela 10**. O fator de semelhança espectral mensurado com a utilização do software Perkin Elmer Spectrum ES, foi igual a 0,9889 e, por ser maior que 0,98 os espectros são considerados semelhantes, o que comprova a identificação de SS.

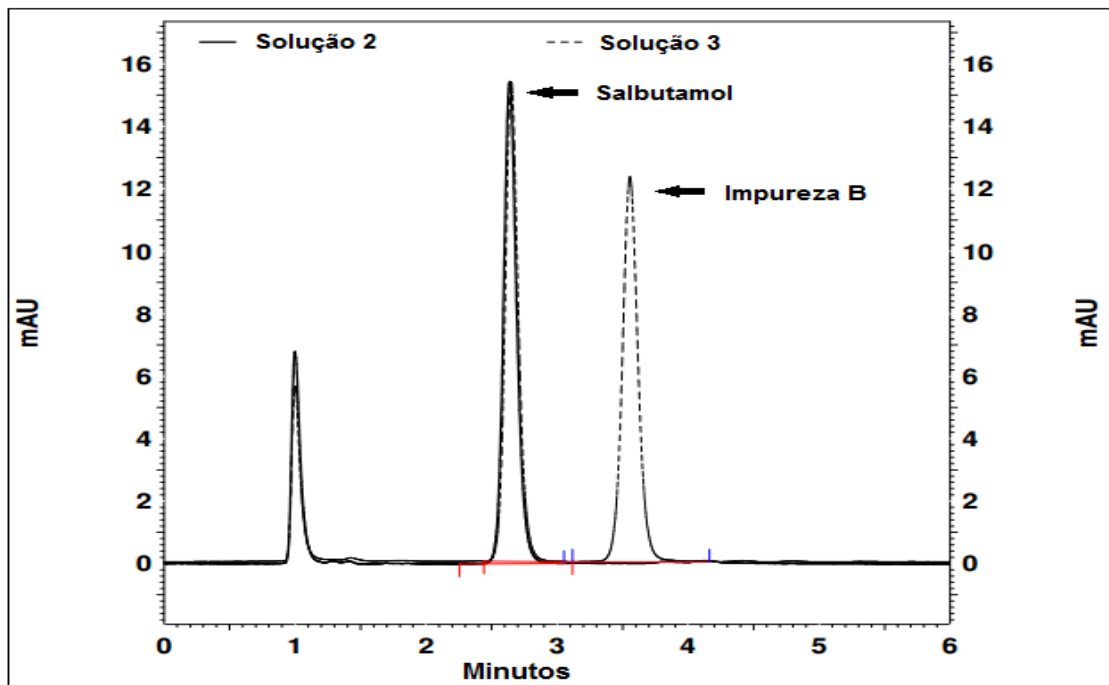
**Tabela 10 - Atribuições das principais bandas de absorção de radiação na região do IV para o padrão de SS.**

$\lambda$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Ligação química responsável pela banda
1600	C=C de anel aromático
1100	C-O de álcool
1030	C-N de amina
820	C-H de anel aromático (dobramento fora do plano)

### 5.3.2 Identificação por CLAE

O picos principais presentes nos cromatogramas das soluções 2 (amostra) e 3 (padrão) apresentaram o mesmo tempo de retenção no teste substâncias relacionadas, descrito no item 4.2.4 (**Figura 23**). O fato de moléculas idênticas terem retenções coincidentes em colunas de fase reversa sob as mesmas condições cromatográficas (SNYDER, 1997) endossa a identificação de SS na amostra.

**Figura 23** – Cromatogramas correspondentes à solução 2 (linha contínua) sobreposto ao da solução 3 (linha pontilhada) obtido no teste substâncias relacionadas, descrito no item 4.2.4.



### 5.4 Avaliação de substâncias relacionadas

Na avaliação de substâncias relacionadas de SS IPD, foram injetadas as soluções 1, 2, 3, 4 e 5 no cromatógrafo. Foram desconsiderados quaisquer picos com área menor que a área do pico principal do cromatograma obtido com a solução 5 (50299 mAU . min). A área sob o pico da impureza D da solução 4 foi 103857 mAU .

min e a área do pico da solução 2 foi de 311754 mAU . min. Os resultados relacionados às possíveis impurezas na amostra (solução 1) estão apresentados na **Tabela 11**.

**Tabela 11 - Resultados da avaliação de substâncias relacionadas na amostra SS IPD.**

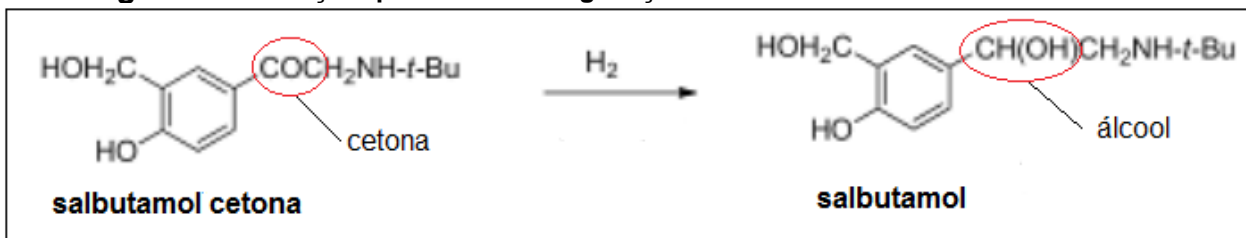
Pico na amostra	Área média (mAU . min);%DPR; (%quantificação)
Impureza D	81619; 1,12%; (< 0,5%)
Picos secundários	0; 0%; (< 0,5%)
Impurezas totais	81619; 1,12%; (< 1,0%)

A única impureza presente na amostra foi a impureza D, porém em quantidade menor do que o limite máximo permitido 0,5%, o que aprova a amostra de SS IPS (Aerofrin<sup>®</sup>) no teste de substâncias relacionadas de acordo com as especificações presentes monografia de salbutamol IPD da BP (BRITISH, 2014). O método foi de simples execução e de resultados facilmente interpretados, logo, não foram necessárias alterações para uma possível otimização.

### 5.5 Avaliação de salbutamol cetona

O salbutamol cetona (SC) é uma impureza oriunda da síntese do salbutamol que pode coexistir com o ativo se, porventura não ocorrer a hidrogenação total do intermediário SC no álcool salbutamol, como exposto na **Figura 24** (GARCÍA, 2010). Diante disso, a monografia de salbutamol IPD presente na BP 2014 apresenta o teste de avaliação de salbutamol cetona.

**Figura 24 – Reação química de hidrogenação de salbutamol cetona em salbutamol.**



Inicialmente testou-se o método presente na monografia, porém os tempos de retenção dos picos correspondentes ao salbutamol e salbutamol cetona variavam a cada injeção. Visto que o método cromatográfico recomendado pela BP 2014 é de eluição gradiente e que não havia reequilíbrio para a condição inicial indicado, ocorreu a adição desta etapa, como mostrado na **Tabela 3**, na eluição em gradiente a partir do tempo 30,1 min. Após esta alteração, os tempos de retenção dos picos deixaram de variar.

Com o método modificado, as soluções amostra e padrão de salbutamol cetona foram injetadas no cromatógrafo e os resultados estão apresentados na **Tabela 12**.

**Tabela 12 - Resultados de avaliação de SC na amostra SS IPD, por CLAE.**

Replicata	Área do pico de SC da amostra (mAU . min)	Área do pico de SC do padrão (mAU . min)
1	48032	526407
2	49067	543549
3	48786	534356
Média / DPR(%)	48628 / 1,10	534771 / 1,60

Como a média das áreas sob o pico correspondente ao SC da amostra (48628 mAU . min) é menor que a área do pico principal da solução padrão de SC (534771 mAu . min), comprova-se que não há SC na amostra a mais que o limite especificado (0,5%) pela monografia de SS IPD da BP 2014. Logo, o produto Aerofrin<sup>®</sup> foi aprovado neste teste.

## 5.6 Doseamento de sulfato de salbutamol IPD

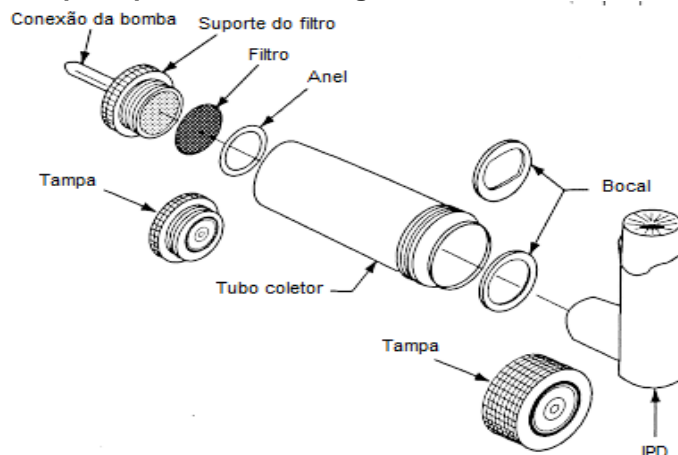
As técnicas para o doseamento de medicamentos inalatórios são pouco divulgadas na literatura. A Farmacopeia Americana USP não apresenta instruções para a realização de doseamento de inalatórios, apenas apresenta no capítulo Métodos Gerais o aparelho DUSA para o teste de uniformidade de dose liberada (UDL) (THE UNITED, 2014). Na Farmacopeia Britânica 2014 (BP) há a técnica para doseamento de medicamentos inalatórios no capítulo Métodos Gerais, inclusive a monografia de SS

IPD o referencia (BRITISH, 2014). Entretanto, as instruções descritas na BP 2014 são de difícil entendimento e execução devido à forma de captação das doses emitidas. A técnica consiste em retirar o recipiente de alumínio do dispositivo IPD e acopla-lo a uma placa circular de aço inoxidável de 25 mm de diâmetro com um orifício de 1,5 mm e que contenha três hastes para se encaixar em um recipiente com solvente apropriado. Em seguida, agitar toda a estrutura montada e realizar as atuações do IPD no solvente (BRITISH, 2014). Trata-se de uma técnica rudimentar e pouco padronizada, uma vez que não há essa placa de aço inoxidável a venda no mercado, o que impossibilita muitos laboratórios em realizar o doseamento de medicamentos inalatórios.

Logo, buscou-se desenvolver um método de doseamento de medicamento inalatório IPD de maneira padronizada utilizando-se o SS IPD como modelo. Foi utilizado o tubo coletor de dose emitida *Dosage Unit Sampling Apparatus* for MDI (DUSA-MDI) preconizado pela USP e BP para o teste UDL, pois trata-se de um aparelho compendial apropriado para a captação de doses emitidas por inalatórios.

O tubo coletor DUSA-MDI foi montado seguindo-se as instruções da BP, em que um filtro circular de fibra e vidro de 25 mm de diâmetro é colocado no seu interior de forma rente às paredes internas do tubo (**Figura 25**), com a função de reter as partículas do fármaco do aerossol. O DUSA-MDI é acoplado a uma bomba de vácuo, ajustada para gerar um fluxo de ar de 28,3 L/min monitorado pelo fluxômetro (BRITISH, 2014; THE UNITED, 2014).

**Figura 25** - Esquema que representa a montagem do tubo DUSA-MDI. Fonte: THE UNITED 2014.



Para o preparo da amostra, dez atuações sequenciais foram coletadas no DUSA-MDI, após o descarte do primeiro jato. Entre cada atuação o dispositivo foi agitado por cinco segundos para ocorrer a homogeneização da suspensão de SS no propelente. O conteúdo depositado no filtro e na parede dos DUSA-MDI foi solubilizado em 100.0 mL de fase móvel como no método descrito no item 4.2.1.

Para a verificação da exatidão do método de coleta de doses pelo DUSA-MDI, a quantificação da solução amostra (amostra teste) obtida foi comparada a uma solução de igual concentração teórica obtida pela coleta direta da suspensão imediatamente após a abertura do recipiente de alumínio com abridor de lata após adequado resfriamento (amostra referência). O resultado do teor de SS foi 90,70% VR para a amostra teste e 104,70% VR para a amostra referência, o que significa ter havido perda com a técnica inicialmente desenvolvida.

Uma possível causa desta perda no doseamento de SS pode ser explicada pela deposição do pó no atuador e no bocal. Assim, a técnica foi reavaliada no DUSA-MDI, porém, após enxágue do atuador e do bocal com o diluente da solução amostra (amostra teste 2). O resultado do teor de SS na solução amostra teste 2 foi 108,10% VR (**Figura 26**). Este valor comprova que aproximadamente 17,4% de dose emitida de SS ficou retida no atuador e no bocal, deposição essa que é usual e já foi relatada na literatura (NEWMAN, 2002; NEWMAN, 2004) e ocorre devido ao ângulo do cone de areossol formado assim a dispersão sai do orifício do aplicador (WARREN, 1995).

**Figura 26 – Histograma de teor de SS IPD para o produto Aerofrin ® sem e com enxague do atuador do dispositivo.**



Após definir a técnica de doseamento de SS IPD, o produto Aerofrin<sup>®</sup> foi então analisado em triplicata, sendo que a primeira replicata correspondeu às 10 doses iniciais do IPD (total de 200 doses por IPD), a segunda às 10 doses do meio e a terceira correspondeu às 10 últimas doses (**Tabela 13**). A quantificação de SS ocorreu pelo método descrito no item 4.2.1.

**Tabela 13 - Resultados do doseamento da amostra SS IPD por CLAE. Condições cromatográficas como descrito na Figura 16.**

Replicata	Teor (%)
1	116,44
2	112,79
3	105,80
Média / DPR (%)	111,69 / 4,48

De acordo com a especificação da monografia de salbutamol IPD da BP 2014 (80,0-120,0%) o produto foi aprovado para o teste de doseamento. O DPR 4,48% entre as replicatas foi maior que o convencional limite de aproximadamente 2% em testes de doseamento de formas farmacêuticas como comprimidos, cápsulas e soluções de uso oral. Isto se deve ao fato de que o IPD apresenta uma variação maior entre suas doses em relação a outras formas farmacêuticas (DE YOUNG, 1998), o que justifica a sua ampla faixa de especificação de teor.

O método de doseamento desenvolvido com a utilização do DUSA-MDI para a captação de doses de SS IPD gerou resultados coerentes com a faixa de especificação da monografia presente na BP 2014 e foi de execução mais simples em relação ao descrito no mesmo compêndio. Pelo fato de o DUSA-MDI ser um aparelho compendial e disponível à venda no mercado mundial, a padronização é facilitada, o que leva a resultados confiáveis e mais reprodutíveis intra e inter laboratorialmente. Diante disso, a divulgação desta técnica torna-se importante para a evolução das análises de medicamentos inalatórios.

## 5.7 Uniformidade de dose liberada (UDL) de sulfato de salbutamol IPD



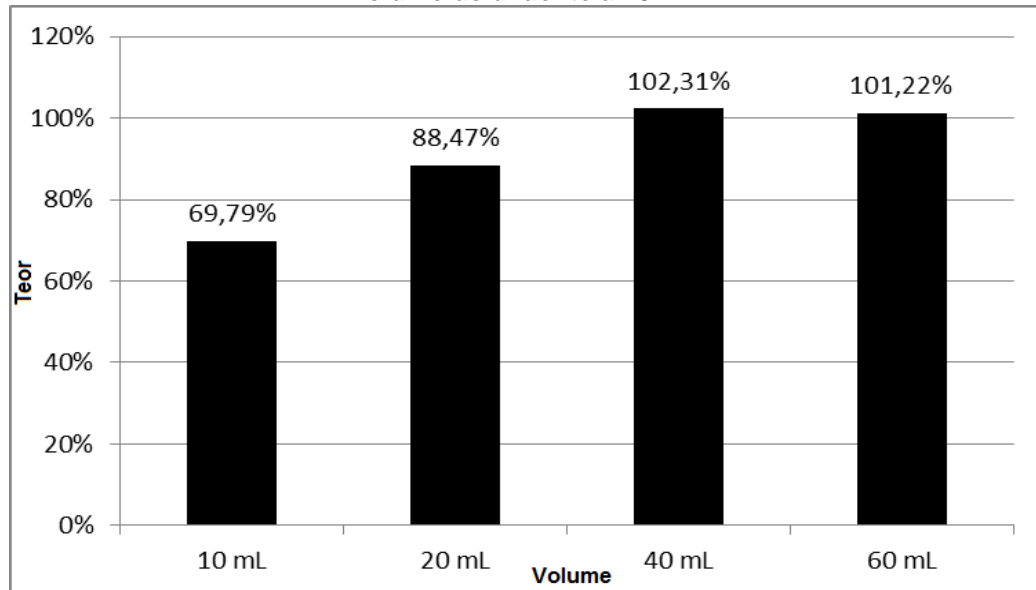
Diferentemente da técnica de doseamento para medicamentos IPD para a qual não há procedimento detalhado, para o teste UDL há um aparelho preconizado para a captação de dose emitida, o DUSA-MDI, pela USP 37 e BP 2014 (**Figura 10.1**). As instruções para a execução da captação de dose são aquelas já citadas no doseamento descrito no item 4.2.6 (BRITISH, 2014; THE UNITED, 2014). A técnica para UDL está presente no capítulo Métodos Gerais, contudo, não há instruções específicas quanto ao preparo das soluções amostras, como diluente adequado e concentração do ativo.

O diluente escolhido foi a solução acetato de amônio 0,1% p/v, presente na fase móvel do método cromatográfico descrito no item 4.2.6., devido à alta solubilidade do ativo em soluções aquosas. Além disso, a solução acetato é o constituinte mais fraco da fase móvel, o que evita uma alteração brusca do condicionamento da coluna cromatográfica no momento da injeção da amostra (SNYDER, 1997).

O volume de diluente inicialmente testado para lavar a parede interna do DUSA-MDI e o filtro contendo SS depositado foi de apenas 10,0 mL. Este volume foi testado para que a concentração da amostra da UDL se aproximasse ao máximo daquela do doseamento (10 µg/mL), além de permitir uma boa amplitude de sinal cromatográfico, já que a massa de SS depositado corresponde apenas a uma dose (100 µg de salbutamol). Entretanto, este volume não foi suficiente para lavar e recuperar toda a quantidade de ativo no DUSA, pois o teor médio encontrado para três doses individualmente coletadas foi apenas 69,79% VR. Como este valor está bastante inferior ao teor obtido no doseamento do mesmo produto (111,69%), testou-se o volume 20,0 mL de diluente. O valor médio de três coletas individuais subiu para 88,47% VR, o que sugere que o aumento do volume de diluente aumenta a recuperação de SS depositado no tubo DUSA-MDI. Logo, foi testado um volume de 40,0 mL de diluente e o teor médio obtido para três doses individuais foi de 102,31% VR. O volume 60,0 mL de diluente também foi testado, resultando em 101,22% VR de SS recuperado, o que sugere que a recuperação total e máxima de SS na lavagem do DUSA-MDI foi alcançada com 40,0 mL. Visto que o intuito é a obtenção de uma recuperação de aproximadamente 100% com a maior concentração possível de SS,

definiu-se como diluente do método a solução acetato - 40,0 mL, que resulta em concentração 2,5 µg/mL de salbutamol UDL (**Figura 27**).

**Figura 27 - Histograma representativo da recuperação de SS em função do volume de diluente utilizado no enxágue do tubo DUSA-MDI previamente ao teste UDL, evidenciando adequação de volume de diluente a 40 mL.**



Com a técnica de UDL definida, foram realizadas análises por completo (10 amostras) com o produto Aerofrin<sup>®</sup>. Inicialmente, o atuador não foi lavado após as atuações e os resultados obtidos após cada sequência de descarte, correspondentes às doses de número 99 e 198 foram muito altos, em torno de 200% VR. Os valores discrepantes de teor acima de 150% VR foram sistemáticos nas demais repetições de análise, que sempre se concentravam nas doses de número 99 e 198 (**Tabela 14**). A partir de uma análise visual do atuador após os descartes das 95 e das 94 atuações sequenciais, observou-se um depósito de pó branco no orifício do atuador (**Figura 28**). Diante disso, foi levantada a hipótese de que o aglomerado de pó correspondia ao SS que se desprendia quando a dose sequencial era coletada pela DUSA-MDI por sucção devido ao fluxo de ar 28,3/minuto. Logo, após cada sequência de descarte o atuador foi lavado e secado para a coleta da dose posterior, assim os resultados das doses de número 99 e 198 não extrapolaram 125% VR, o que endossa a hipótese de deposição de cristal de SS no atuador (**Tabela 15**). Os resultados estão dentro das especificações

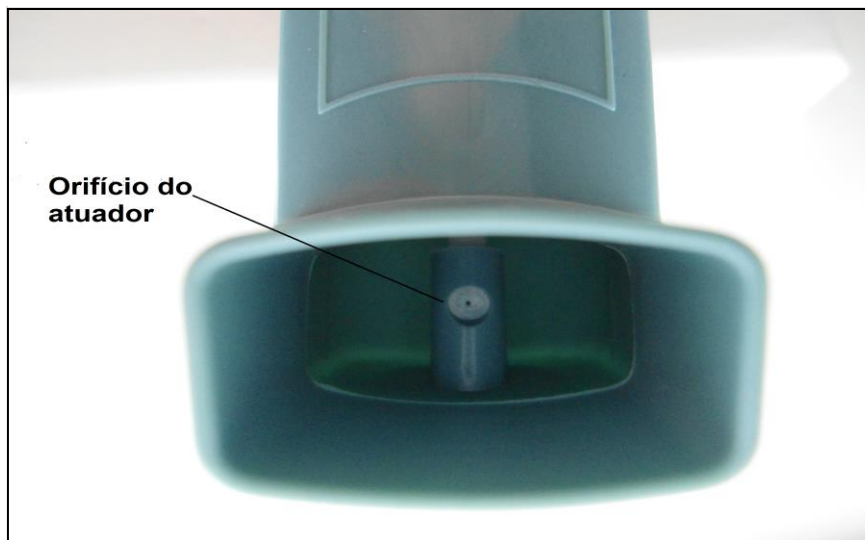
presente nos Métodos Gerais da USP 37 e BP 2014 (75,0-125,0%), o que aprova o produto no teste de UDL.

**Tabela 14 - Resultados de teste exploratório para UDL sem a lavagem do atuador após o descarte das doses para determinação de SS IPD por CLAE.**

Ordem das atuações	Teor SS (%)
1 <sup>a</sup>	—
2	107,07
3	95,93
4	82,10
Descarte de 95 atuações	—
99	170,77
100	115,46
101	98,23
102	101,13
Descarte de 94 atuações	—
198	203,17
199	121,68
200	103,25

a: primeira atuação descartada para desobstrução do orifício do atuador.

**Figura 28 – Fotografia do orifício do atuador do dispositivo IPD do produto Aerofrin®.**



**Tabela 15 - Resultados do teste UDL com a lavagem do atuador após o descarte das doses para determinação de SS IPD por CLAE.**

Ordem das atuações	Teor SS (%)
1 <sup>a</sup>	—
2	97,47
3	105,02
4	92,19
Descarte de 95 atuações	—
99	96,00
100	81,52
101	98,23
102	98,68
Descarte de 94 atuações	—
198	88,23
199	96,86
200	92,64

a: primeira atuação descartada para desobstrução do orifício do atuador.

Uma justificativa para a deposição ou cristalização de SS no orifício do atuador pode ser o resfriamento do dispositivo IPD após várias atuações consecutivas. Com a atuação, o aerossol é formado após o propelente passar pelo orifício do atuador e passar de líquido para gás, logo, durante esta transição de fases as moléculas do propelente ganham energia cinética e resfriam o ambiente em seu entorno, inclusive a válvula e o orifício do dispositivo IPD. Com as atuações sequenciais, o resfriamento torna-se mais intenso e ocorre cristalização da formulação no orifício do atuador. Dificilmente essa cristalização ocorre no uso do medicamento IPD pelo paciente, pois o mesmo não realiza várias atuações consecutivas, não gerando o resfriamento intenso no dispositivo IPD. Todavia, a divulgação deste fenômeno se faz necessária para a perfeita condução de análises de controle de qualidade de medicamentos IPD.

Como foi relatado no item 6.6 (doseamento), há um conhecido depósito de SS em outros locais do atuador além do orifício não ocasionado por cristalização devido ao ângulo do cone de aerossol formado (NAIKWADE, 2011). Dessa maneira, ocorre acúmulo de ativo nas paredes do atuador no decorrer do uso por parte do paciente,

entretanto, isso não gera um aglomerado de cristal que se desprende no ato da inspiração. Para evitar acúmulo de micro-organismos no atuador, há recomendações de lavagem na bula de medicamentos IPD.

## **5.8 Distribuição aerodinâmica de partículas (DAP) de sulfato de salbutamol IPD**

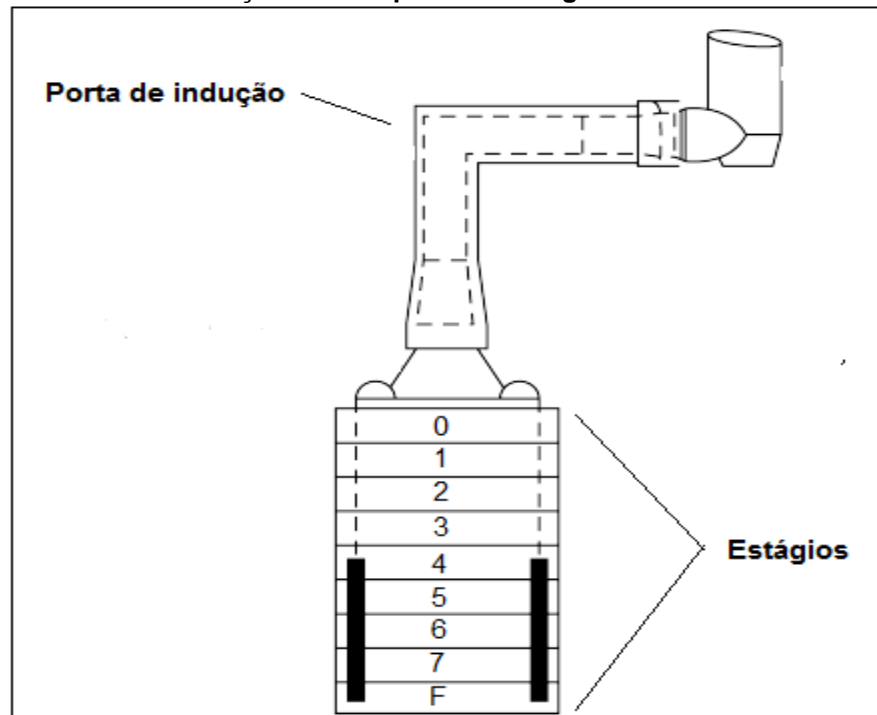
### **5.8.1 Avaliação de DAP de sulfato de salbutamol IPD por Impactador em Cascata Andersen (ACI)**

O aparelho mais comum para se realizar o teste DAP é o ACI, devido ao alto detalhamento de faixas de diâmetro aerodinâmico ( $d_{ae}$ ) das partículas de um medicamento inalatório. O ACI apresenta oito estágios de coleta de fármaco relacionados ao diâmetro aerodinâmico de suas partículas. Cada estágio é composto por um tamis e um prato ou um filtro coletor que recebe o fármaco cujas partículas apresentam  $d_{ae}$  correspondentes ao diâmetro dos orifícios do respectivo tamis. De acordo com as instruções descritas em Métodos Gerais da USP 37 e BP 2014, os estágios do ACI devem estar dispostos um abaixo do outro em ordem decrescente de diâmetro dos orifícios do tamis (**Figura 29**). A porta de indução é outra região do ACI, além dos estágios, com um ângulo de  $90^\circ$  e representa a região da orofaringe no trato respiratório.

O conteúdo de fármaco depositado em cada prato ou filtro coletor e na porta de indução deve ser solubilizado em quantidade suficiente de diluente apropriado para então ser quantificado e o balanço de massas de cada região do ACI deve estar entre 75,0-125,0% VR (THE UNITED, 2014). Diante disso, foi realizado o teste com o diluente 20,0 mL de fase móvel, como descrito no item 4.2.8.1 para o enxágue de cada região do ACI (oito estágios mais a porta de indução) e também para o enxágue do atuador. Realizou-se o teste para um conjunto de 10 atuações do dispositivo SS IPD sob fluxo de ar monitorado de 28,3 L/min. As soluções correspondentes as suas respectivas regiões do ACI e ao atuador foram quantificadas quanto ao teor de salbutamol pelo método descrito no item 4.2.1 em triplicata. A soma dos teores de cada

solução foi de 117,14% VR de salbutamol da amostra (**Tabela 16**), valor que ficou dentro da faixa de balanço de massas preconizado pela USP 37 (75,0-125,0% VR) (THE UNITED, 2014), além de estar coerente com o valor encontrado no doseamento (111,69% VR) descrito no item 5.5 Os resultados do teste DAP realizados com as amostras de Aerofrin® em triplicata estão expostos na **Tabela 16** e na **Figura 30**.

**Figura 29** – Esquema de montagem do aparelho ACI com indicação das regiões porta de indução e os respectivos estágios.



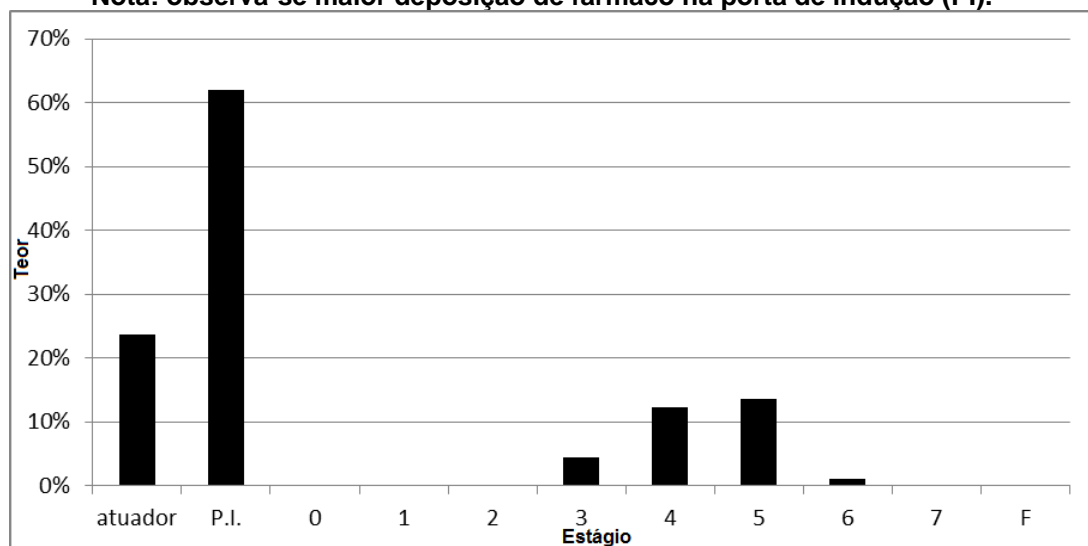
**Tabela 16** – Resultados do teste DAP por ACI após passagem pelos orifícios dos tamises referente a cada estágio do ACI para o produto SS IPD Aerofrin®. Condições cromatográficas como descrito na Figura 17.

Estágio do ACI	Média do teor;%DPR
Atuador	23,76 / 5,33
Porta de indução	61,99 / 7,59
0	ND; ND <sup>a</sup>
1	0 / 0
2	0 / 0
3	4,41 / 1,20
4	12,29 / 2,44

5	13,58 / 1,34
6	1,11 / 0,45
7	0
Filtro	0
Total	117,14

a: ND, não determinado

**Figura 30** - Histograma representativo do teor de SS obtido em cada estágio do teste DAP por ACI do produto Aerofrin® . por CLAE. Condições cromatográficas como descrito na Figura 17. Nota: observa-se maior deposição de fármaco na porta de indução (PI).



Pode-se observar que a região do ACI em que houve maior deposição de fármaco foi a porta de indução (61,99% VR), o que indica um alto acúmulo de SS na região da boca e garganta do paciente. Essa elevada proporção de fármaco nas vias aéreas superiores é bastante conhecida no meio científico (DOLOVICH, 1998; HIRST, 2001). Em 1986, Newman e colaboradores publicaram um estudo em que 10 voluntários, com doença respiratória causada por broncoespasmo, foram submetidos à avaliação da deposição de partículas de teflon radioativas administradas por IPD. O trato respiratório de cada voluntário foi avaliado pela técnica de radiomarcador em que as partículas radioativas inaladas ficam evidenciadas por imagem. A deposição na região da orofaringe em pacientes que administraram teflon IPD foi de aproximadamente 80% (NEWMAN, 1986).

Os resultados obtidos também evidenciaram uma deposição de 23,5% de salbutamol no atuador, valor que ficou próximo do valor de ativo encontrado no atuador, no desenvolvimento do doseamento (item 6.6). Em outro estudo publicado em 2002 por Newman e colaboradores, avaliou-se a deposição de duas diferentes formulações de sulfato de salbutamol IPD em nove voluntários sadios e foi verificada uma deposição de SS no atuador de 28,6% e de 12,6% para cada formulação testada (NEWMAN, 2002). Enfim, a deposição de até 30% de ativo no atuador de medicamentos IPD é comumente relatada na literatura.

Cada estágio do ICA possui o seu valor de diâmetro aerodinâmico de corte ( $d_{ae,cutoff}$ ), logo, as partículas de fármaco coletadas em cada estágio estão dentro da faixa de  $d_{ae}$ , apresentada na **Tabela 17** (THE UNITED, 2014). Dentre os estágios, pode-se observar pelos resultados na **Tabela 14** que houve deposição de SS apenas nos estágios entre 3 e 6, o que totalizou um a deposição de 31,4%. Isso indica que 31,39% de SS da dose rotulada apresenta um  $d_{ae}$  entre 4,7 e 1,1  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 17 - Diâmetro aerodinâmico de corte dos orifícios dos tamises referente a cada estágio do ACI para partículas do produto SS IPD.**

Estágio	$d_{ae}$ de corte ( $\mu\text{m}$ )
0	—
1	9,0
2	5,8
3	4,7
4	3,3
5	2,1
6	1,1
7	0,7
Filtro (F)	0,4

Com os resultados apresentados na **Tabela 16** foram calculados os parâmetros fração de partícula fina (FPF), diâmetro aerodinâmico mediano de massa (DAMM) e desvio padrão geométrico (DPG) por meio do software CITDAS (Copley Scientific) e os valores encontrados foram 24,3%, 2,3  $\mu\text{m}$  e 1,6, respectivamente. O parâmetro FPF



representa a proporção de partículas do fármaco que são menores que  $5,8 \mu\text{m}$  em relação à massa total depositada no ACI e é essencial para a avaliação da proporção de ativo que alcança os pulmões. Os valores de FPF de medicamentos IPD são muito variados e não há um limite de aceitação estabelecido, no entanto esse é um parâmetro avaliado para provar a equivalência farmacêutica entre medicamentos inalatórios. As agências regulatórias americana (FDA) e europeia (EMA) indicam que as especificações devem ser sugeridas pelos fabricantes de medicamentos inalatórios (UNITED, 1998; EUROPEAN, 2006).

Pelos valores de DAMM e o DPG avalia-se a distribuição dos resultados obtidos. O DAMM é o diâmetro mediano em que 50% das partículas são maiores e 50% menores que determinado valor, ou seja, divide a distribuição dos resultados em duas metades iguais. Pelo teste DPG avalia-se o grau de dispersão dos resultados em torno de uma média em uma distribuição log-normal. Valores de DPG maiores que 1,2 apresentam distribuição de tamanho polidispersa ou polimodal (GONDA, 2004; TELKO, HICKEY, 2004; HICKEY, 2005; ANDRADE-LIMA, 2012; THE UNITED, 2014).

O valor obtido de  $2,3 \mu\text{m}$  para DAMM é satisfatório por ser menor que  $5,8 \mu\text{m}$ , porém o DPG de 1,6 ( $>1,2$ ) indica que os valores não estão agrupados em torno de  $2,3 \mu\text{m}$  devido à dispersão dos resultados. Isso se deve a alta taxa de partículas que se depositaram na porta de indução, região em que se encontram partículas de diâmetro maior que  $9,0 \mu\text{m}$ .

### **5.8.2 Avaliação de DAP de sulfato de salbutamol IPD por Impactador Duplo de Vidro (GTI)**

O GTI é conhecido como um impactador abreviado por apresentar apenas dois estágios de coleta (HALLWORTH, 1987). A execução do teste DAP pelo GTI é mais simples e requer menos tempo, o que o torna útil para triagens rápidas apesar de não fornecer alta resolução para a avaliação do tamanho de partículas (SRICHANA, 2000). Este aparelho separa as partículas grosseiras das partículas mais finas por meio de um *cutoff* de  $6,4 \mu\text{m}$  de  $d_{ae}$  entre os seus dois estágios. O primeiro estágio representa a

região da orofaringe, enquanto que o segundo estágio representa as vias aéreas inferiores. Neste teste preconizado apenas pela BP 2014, somente as partículas que chegam ao segundo estágio são quantificadas e representa a proporção de fármaco disponível para causar o efeito nos pulmões (SWARBRICK, 2007; ZANEN, 1994; ZANEN, 1995, ZANEN, 1996; TELKO, HICKEY, 2005). Entretanto, durante o seu desenvolvimento quantificou-se também o fármaco que foi depositado no primeiro estágio para cálculo do balanço de massas.

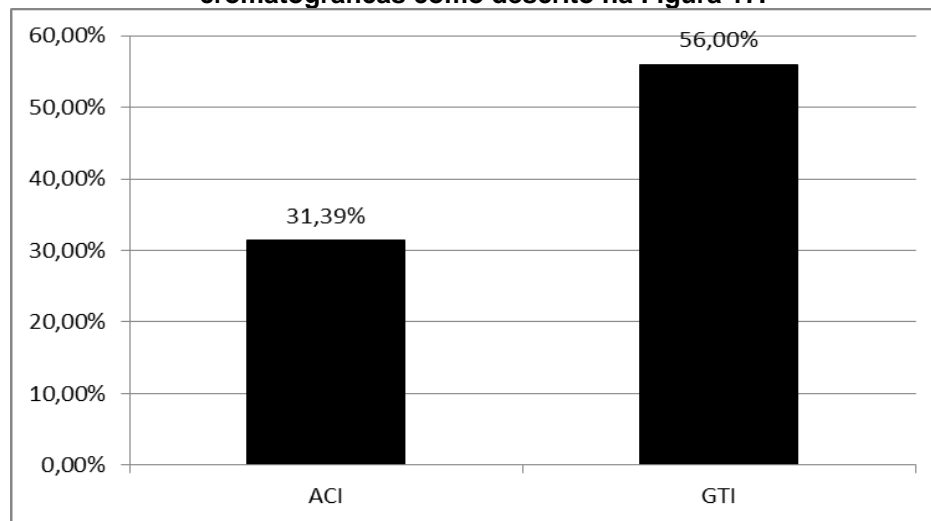
Inicialmente cinco atuações foram descartadas e o atuador lavado e secado para não acumular SS no orifício. Em seguida, as próximas cinco atuações foram realizadas no GTI sob fluxo de ar monitorado de 60,0 L/min. O teste foi realizado em triplicata. O SS depositado no estágio 1 junto à quantidade retida no atuador foram quantificados e resultou em 48,31% ( $\pm 3,6\%$ ) VR e a proporção de SS depositado no estágio 2 foi de 56,00% ( $\pm 3,2\%$ ) VR. Logo, o balanço de massa de 104,31% VR encontra-se dentro da faixa 75,0-125,0% preconizada para o teste DAP pela USP 37.

O resultado de 56,00% VR está acima do limite mínimo de 35% VR, estabelecido na monografia de salbutamol IPD da BP (BRITISH, 2014), o que aprova o produto Aerofrin<sup>®</sup> também para este teste.

Os resultados obtidos entre os testes de DAP por ACI e GTI não foram condizentes com os valores da proporção de partículas finas. Para comparar os resultados, selecionaram-se os estágios do ACI correspondentes ao estágio 2 do GTI por meio do *cutoff* de cada estágio do ACI. Os estágios do ACI que receberam as partículas com  $d_{ae}$  menor que 6,4  $\mu\text{m}$  foram 2,3,4,5,6,7 e F, assim todos os teores de ativo depositado em cada um desses estágios foram somados (31,39% VR) e comparados ao teor 56,00% VR, correspondente ao estágio 2 de GTI (**Figura 31**). As partículas depositadas no ACI de  $d_{ae}$  entre 5,8 e 6,4  $\mu\text{m}$  não foram contempladas na comparação, visto que os valores de corte do estágio 1 é de 9,0  $\mu\text{m}$  e do estágio 2 de 5,8  $\mu\text{m}$  (**Tabela 17**).

Sugere-se neste trabalho que a alta diferença entre os valores de teor de partículas finas obtidos pelo ACI (31,39% VR) e pelo IVD (56,00% VR) se deve aos distintos desenhos dos aparelhos e às diferentes condições de execução como fluxo e presença de umidade, além do material de cada um dos impactadores.

**Figura 31 - Histograma representativo da comparação entre os percentuais de tamanho de partículas finas obtidos no teste DAP por ACI e por GTI para o produto Aerofrin®. Condições cromatográficas como descrito na Figura 17.**

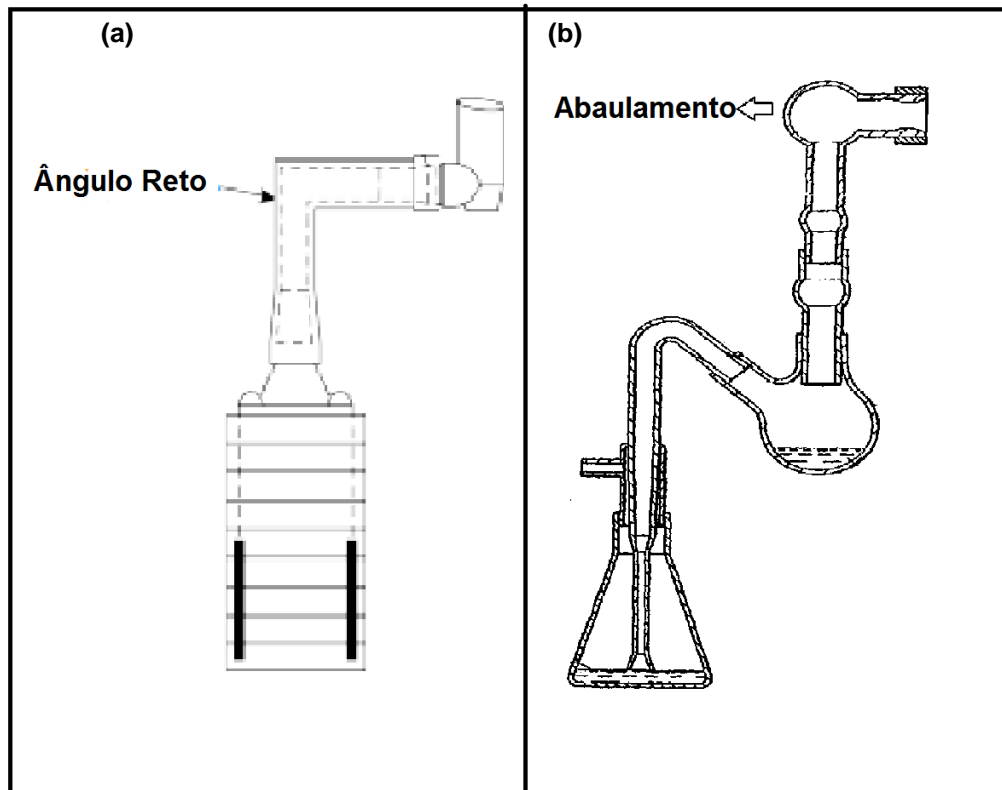


A quantidade de SS depositado na região correspondente à orofaringe no ACI (porta de indução) foi superior (71,58% VR) a obtida no estágio 1 do GTI (48,31% VR). Sugere-se que isso se deve ao *design* da porta de indução do ACI que apresenta um ângulo reto de 90°, enquanto que o vértice de entrada do GTI é arredondado e abaulado diminuindo a velocidade de impacto das partículas do fármaco provenientes do aerossol (**Figura 32**).

Com isso, o impacto das partículas de SS na porta de indução do ACI foi mais intenso o que levou a uma maior deposição de fármaco nessa região. Alguns pesquisadores sugerem novos *designs* de porta de indução que simulam a anatomia da orofaringe para diminuir a retenção de fármaco nessa região do ACI (ZHOU, 2011). Os diferentes fluxos entre os testes de DAP em ACI (28,3 L/min) e em GTI (60,0 L/min) contribuem para a alteração da aerodinâmica de voo das partículas do aerossol, o que também pode ter sido uma das causas dos resultados distintos observados. Por causa do maior fluxo requerido para a análise de DAP por GTI, a evaporação do propelente no aerossol é mais intensa e contribui para as partículas sólidas de SS ficarem menos agregadas durante o voo alcançando o estágio 2 do aparelho. Por último, a diferença entre os materiais dos impactadores também podem ter alterado o voo do SS, uma vez que o ACI é de aço inoxidável e o GTI de vidro, e as forças eletrostáticas entre a

parede do aparelho e o SS sofrem influência do material do impactador e altera a aerodinâmica de voo do ativo.

**Figura 32 - Desenho esquemático para comparação (a) do ângulo reto da porta de indução do ACI e (b) do abaulamento da porção inicial do GTI.**



A diferença da quantidade de partículas finas de SS entre ACI e GTI já foi relatada na literatura. Le-Belle e colaboradores realizaram um estudo em que quatro diferentes formulações de SS IPD 100  $\mu\text{g}/\text{dose}$  foram testadas em diferentes impactadores para a avaliação de DAP, a média de partículas finas das formulações foi de 22,8% em ACI e de 49,3% em GTI. No mesmo estudo, também foi evidenciado que os testes em ambos os impactadores foram capazes de detectar diferenças nas formulações de SS IPS (LE-BELLE, 1997).

A correlação *in vitro-in vivo* (IV-IV) entre os testes de performance da distribuição aerodinâmica de partículas (DAP) por impactadores e o local de deposição no trato respiratório é questionada por alguns autores na literatura. São muitas variáveis no

trato respiratório humano que não são contempladas nos testes de performance, como pex. a umidade das vias respiratórias, o fluxo de ar variável e a geometria das vias aéreas (DEHAAN, 2001; MACINTYRE, 2002). Alguns autores defendem que a relação entre a deposição de partículas nos estágios da ACI no trato respiratório depende da densidade, da forma e da força de interação das partículas do medicamento (TARARA, 2000; HIRST, 2002). Logo, a relação entre os resultados de ACI e a deposição no trato respiratório demonstrada na **Figura 7** não é válida para a maioria dos inalatórios (BOER, 2002). Diante disso, a importância dos testes DAP se deve à monitoração da reprodutibilidade entre lotes para equivalência farmacêutica, sendo útil para a avaliação da qualidade físico-química do medicamento inalatório. Uma vez que a eficácia terapêutica foi provada, o teste DAP torna-se essencial para garantir que os demais medicamentos inalatórios produzidos reproduzam o efeito terapêutico do medicamento utilizado no teste clínico.

A partir da avaliação de DAP do produto SS IPD Aerofrin<sup>®</sup> pode-se constatar que o teste por ACI oferece resultados mais detalhados em várias faixas de  $d_{ae}$  que se faz útil para análises de desenvolvimento de formulações e para equivalência farmacêutica. Inclusive, a ANVISA exige que os estudos de DAP para comprovação de equivalência farmacêutica de inalatórios sejam realizados em ACI (BRASIL, 2013). Entretanto, a execução do teste em ACI é complexa e trabalhosa, mais sujeita a erros analíticos individuais e, portanto, requer mão-de-obra bem treinada. Já o teste DAP por GTI mostrou-se de simples execução com a obtenção rápida dos resultados, porém com resultados de baixa resolução em relação ao ACI, mas que consegue detectar diferenças de formulações e até de processo (LE-BELLE, 1997), o que o torna ideal para análises de liberação de rotina em laboratórios de controle de qualidade.

### **5.9 Medição do tamanho de partículas da suspensão de sulfato de salbutamol por difração a laser**

A técnica de medição de partícula por difração a laser é baseada na difração que um feixe de luz monocromático sofre ao incidir na partícula. A intensidade da difração é proporcional ao tamanho da partícula e é convertida matematicamente em volume. A

aproximação de Fraunhofer é um modelo óptico de difração a laser que assume que as partículas são esféricas e opacas e considera os índices de refração da partícula e do meio para o cálculo da distribuição volumétrica de tamanho de partícula (THE UNITED, 2014).

Visto que a formulação do produto é uma suspensão de SS em propelente HFA-134, as partículas de ativo foram medidas por difração a laser. O teste foi realizado em triplicata por aproximação de Fraunhofer e as amostras foram obtidas pela coleta da suspensão no interior do dispositivo de alumínio que foi devidamente aberto conforme técnica de análise microbiológica de aerossóis preconizada pela FB 5 (FARMACOPEIA, 2010).

Os resultados estão apresentados na **Tabela 18** e na **Figura 33** e expressos em diâmetro médio, percentil 50 (p50), percentil 75 (p75) e percentil 90 (p90). Os valores de p50, p75 e p90 representam aos diâmetros em relação aos quais 50, 75 e 90%, respectivamente, do total de partículas são menores que o referido.

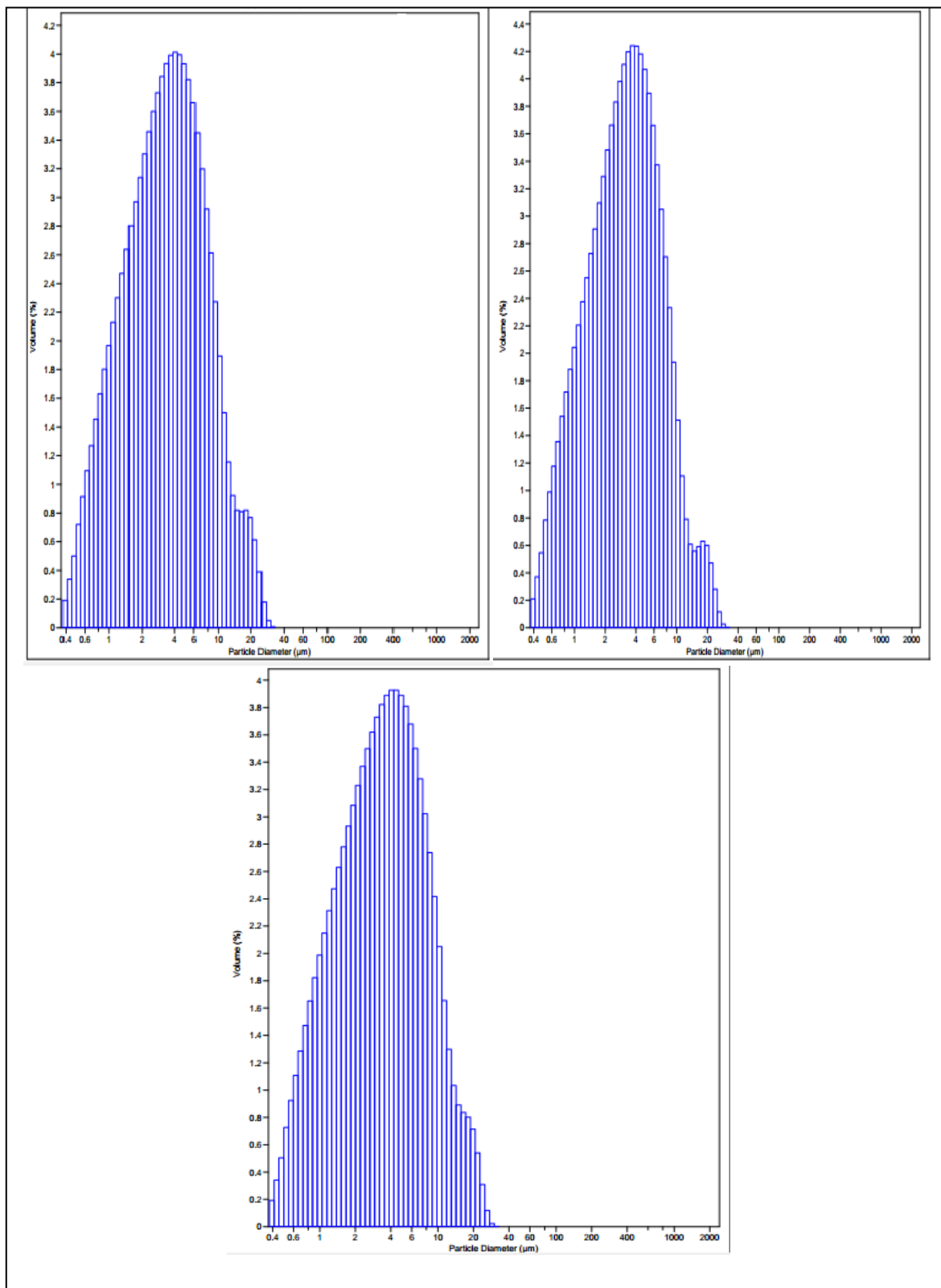
**Tabela 18 - Resultados da medição do tamanho de partículas (diâmetro médio e percentis 50, 75 e 90) da suspensão em eter etílico do produto SS IPD Aerofrin® por difração a laser.**

Parâmetro	Média de diâmetro ( $\mu\text{m}$ );%DPR
Diâmetro médio	4,56; 5,78
p50	3,29; 3,84
p75	5,93; 5,99
p90	9,47; 7,29

Os valores de DPR dos parâmetros diâmetro médio, p50, p75 e p90 estão dentro da especificação de até 20% preconizada pela USP 37 (THE UNITED, 2014).

O diâmetro médio obtido de 4,56  $\mu\text{m}$  foi satisfatório por estar dentro da faixa de partículas que chegam aos pulmões (menor que 5  $\mu\text{m}$ ). A distribuição concentra-se próximo à média de forma unimodal que indica uniformidade de tamanho de partícula comprovada pelos valores de p50 (3,29  $\mu\text{m}$ ), p75 (5,93  $\mu\text{m}$ ) e de p90 (9,47  $\mu\text{m}$ ). A distribuição homogênea indica a ausência de aglomerados na suspensão da formulação do Aerofrin®.

**Figura 33 - Distribuição de tamanho de partículas (em triplicata) da suspensão em éter etílico do produto de SS IPD Aerofrin® por difração a laser.**



Ao comparar os resultados do teste de difração a laser com os obtidos pela avaliação de DAP por ACI (mais informativo que por GTI), observa-se que não foram coincidentes. Pelo teste de difração a laser, aproximadamente 75% das partículas de SS da suspensão apresentaram diâmetro menor que 5  $\mu\text{m}$  (**Tabela 18**), já pelo ACI apenas 31,4% das partículas emitidas pelo IPD alcançaram os estágios cujos poros dos tamises eram menores que 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (**Tabela 16**). Diante disso, comprova-se a intensa influência da aerodinâmica de voo na deposição das partículas, uma vez que não basta apenas o fármaco apresentar diâmetro de partícula menor que 5  $\mu\text{m}$  para alcançar as vias aéreas inferiores. Logo, é de extrema importância avaliar o  $d_{ae}$  das partículas do ativo, pois esse parâmetro considera a influencia da aerodinâmica de voo além do diâmetro da partícula (VERVAET; BYRON, 1999; NEWMAN, 2005; LIU, 2012; STEIN, 2014; DECHARAKSA, 2014)

Uma possível explicação para o fenômeno de partículas menores que 5  $\mu\text{m}$  depositarem-se nas porções iniciais do ACI e também do GTI está no processo de aerolização da suspensão de SS. Sugere-se que durante a formação do aerossol de SS, assim que a válvula do dispositivo IPD é aberta a suspensão é expulsa para o ambiente externo por diferença de pressão. Ao passar pelo orifício do atuador, gotículas da formulação são formadas e ficam suspensas no ar, formando o aerossol. A medida que as gotículas voam, o propelente evapora-se e apenas as partículas sólidas permanecem no aerossol. Provavelmente, algumas partículas de SS que ficam em uma mesma gota aglomeram-se e continuam o voo. Esses aglomerados por apresentarem massa e diâmetros maiores não alcançam os estágios referentes às partículas finas do ACI e do GTI, o que leva a uma proporção reduzida de partículas finas de SS no teste de DAP.

Essa hipótese endossa a informação de que a eficácia terapêutica de medicamentos IPD não é garantida apenas pela formulação, mas também pelo dispositivo pressurizado dosimetrado que atua na formação do aerossol. A criação de medicamentos IPD mais eficientes na distribuição de partículas que alcançam os pulmões é um desafio para os pesquisadores, uma vez que grande parte desses inalatórios apresenta uma baixa proporção de fármaco que chega às vias aéreas inferiores.



## 7 CONCLUSÃO

O planejamento experimental Doehlert como ferramenta de desenvolvimento de métodos analíticos por CLAE proporcionou delinear o método com um número reduzido de injeções o que permitiu otimizar as condições cromatográficas rapidamente visando o controle de qualidade em rotina.

O método analítico para o produto SS IPD foi implantado com sucesso no laboratório de controle de qualidade da indústria de medicamentos Pharmascience Laboratórios (Betim, MG) e foi utilizado para a liberação de dezenas de lotes de Aerofrin<sup>®</sup> em análises de rotina e para o estudo de equivalência farmacêutica.

A proposta de doseamento com a utilização do tubo DUSA-MDI para a captação da dose liberada pelo dispositivo IPD é útil para a padronização da técnica que não é harmonizada entre os compêndios internacionais. A observação da obtenção de altos teores de SS no teste de UDL proveniente da cristalização de SS no orifício do atuador da amostra também se faz relevante e necessária de divulgação para o apontamento desse ponto crítico no teste.

Ressalta-se que o teste de DAP por ACI apresentou maior resolução dos resultados sendo útil para análises de desenvolvimento de produtos e equivalência farmacêutica, enquanto que o teste GTI mostrou-se mais simples, rápido e útil para análises de rotina. A constatação da falta de reprodutividade entre os resultados de DAP e os de medição de tamanho de partículas por difração a laser endossa a significativa influência da aerodinâmica de voo das partículas do fármaco, bem como o processo de formação do aerossol na deposição do ativo no trato respiratório.

As discussões a respeito dos resultados obtidos nas técnicas de doseamento, UDL e DAP contribuíram para o esclarecimento e simplificação de execução, bem como para o levantamento de pontos críticos durante as análises. Diante da escassez de instruções analíticas para medicamentos inalatórios no cenário brasileiro, este trabalho contribuirá com a introdução de monografia específica para SS IPD e de item no capítulo de métodos gerais, referente a testes para inalatórios em futura versão da Farmacopeia Brasileira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-LIMA, M.; PEREIRA, L. F. F.; FERNANDES, A. L. G. Equivalência farmacêutica da formulação combinada de budesonida e formoterol em cápsula única com dispositivo inalador de pó. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. 6, p. 748-756, 2012.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. São Paulo: Artmed Editora, 2007.

BATES, D. V. et al. Deposition and retention models for internal dosimetry of the human respiratory tract. **Health Physical**. v. 12, p.173-207, 1966.

BELLARY, S.; BARNETT, A. AH. Inhaled insulin: new technology, new possibilities. **International Journal of Clinical Practice**. v.60, p. 728-734, 2006.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**. v. 76, p. 965- 977, 2008.

BISGAARD, H; O'CALLANGHAN, C; SMALDONE, G. C. **Drug Delivery to the Lung**. 4ed. London: Marcel Dekker, 2001.

BOER, A. H. et al. Characterisation of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor analysis and laser diffraction technique. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 249, p. 219–231, 2002.

BORGSTRÖM, L. The pharmacokinetics of inhaled hydrofluoroalkane formulations. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 104, p. 246-249, 1999.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics** . v. 2, p. 455-475, 1960.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. 2 ed. New York: Wiley, 1978.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the Experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**. v. 13, p. 1-45, 1951.

BRASIL, 2012. Apresenta pacientes que sofrem com doença pulmonar receberão remédios pelo SUS. Disponível em <[www.brasil.gov.br/saude](http://www.brasil.gov.br/saude)> Acesso em: 29 dez 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE no. 899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, de 2 Jun. 2003.

BRASIL. Coordenação de Equivalência Farmacêutica (CEFAR). Gerência de Tecnologia Farmacêutica (GTFAR). Gerência Geral de Medicamentos (GGMED). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota técnica no. 001/2013/CEFAR/GTFAR/GGMED/ANVISA. Dispõem sobre os ensaios e seus respectivos procedimentos para condução de estudos de equivalência farmacêutica de sprays nasais, aerossóis nasais, MDIs orais e DPIs orais, bem como das análises estatísticas de bioequivalência populacional aplicáveis a determinados 124 ensaios. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, 25 de março de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1, de 02 de janeiro de 2015. Estabelece a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME 2014 no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) por meio da atualização do elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME 2012. **Diário Oficial da União**, s. 1, p. 132, Brasília, 05 jan 2015.

**BRITISH** pharmacopoeia. London: Bristish Pharmacopoeia Comission Office, 2014.

BRUCE, B.; MINKKINEM, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation suficiente for analysis method. *Mikrochimica Acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.

BYRON, P. R. Aerosol formulation, generation, and delivery using non-metered and metered systems. **Respiratory drug delivery**, p. 143-205, 1990.

BYRON, P.R. et al. In vivo-in vitro correlations: predicting pulmonary drug deposition from pharmaceutical aerosols. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**. v. 23, p. S59-S69, 2010.

CALLAGHAN, C.; WRIGHT, P. The metered-dose inhaler. **Drug delivery to the lung**. v. 162, p.337-370, 2002.

CLARK, A. R. Medical aerosol inhalers: past, present, and future. **Aerosol Science Technology**. v. 22, p.374-391, 1995.

COPE, M.; BAUTISTA-PARRA, F. The degradation of salbutamol in ethanolic solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 52, p. 210-215, 2010.

COURRIER, H. M.; BUTZ, N.; VANDAMME, F. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. **Terapeutic Drug Carrier Systems**. v. 19, p. 425-498, 2002.

DATASUS, 2008. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>,. Acesso em: 14 jan 2013.

DE YOUNG, L.R. et al. The aerodose multidose inhaler device design and delivery characteristics. **Respiratory Drug Delivery**. v, 6. p, 91-95, 1998.

DECHARAKSA, J. et al. The comparison of fluid dynamics parameters in an Andersen cascade impactor equipped with and without a preseparator. **AAPS PharmSciTech**. v. 15, p. 792-801, 2014.

DECHRAKSA, J. et al. The comparison of fluid dynamics parameters in an Andersen cascade impactor equipped with and without a preseparator. **AAPS PharmSciTech**. v. 15, p. 792-801, 2014.

DECRAMER, M., JANSSENS, W., MIRAVITLLES, M. Chronic obstructive pulmonary disease. **The Lancet**, v. 379, p. 1341-1351, 2012.

DEHAAN, W. H; FINLAY, W. H. In-vitro monodisperse aerosol deposition in a mouth and throat with six different inhalation devices. **Journal of Aerosol Medicines**. v. 14, p. 361-367, 2001.

DEHAAN, W.H.; FINLAY, W.H. In-vitro monodisperse aerosol deposition in a mouth and throat with six different inhalation devices. **Journal of Aerosol Medicine**. (14), p. 361-367, 2001.

DOEHLERT, D. H. Uniform Shell Designs. **Journal of the Royal Statistical Society**. v. 19, p. 231-239, 1970.

DOLOVICH, M; RHEM, R. Impact of oropharyngeal deposition on inhaled dose. **Journal of Aerosol Medicines**. v. 11, p. 112-115, 1998.

DUJUAN, M. et al. Determination of salbutamol in human plasma and urine using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 26, p.1176-1182, 2012.

ELHISSI, A. M. A. et al. Physical stability and aerosol properties of liposomes delivered using an air-jet nebulizer and a novel micropump device with large mesh apertures. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 343, p. 62-70, 2007.

ERRAM, S. V. et al. Determination of albuterol sulfate and its related substances in albuterol sulfate inhalation solution, 0.5% by RP-HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. (40), p. 864-874, 2006.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY INSPECTIONS (EMA). Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation end nasal products. 7 Westferry Circus, Canary Wharf, London, 2006.

FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. São Paulo: Editora fiocruz, 2010.

FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta**. v. 63, p. 1061-1067, 2004.

FERREIRA, S. L. C. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**. v. 1158, p 2-14, 2007.

FRANCIS, P. W., et al. Oral and inhaled salbutamol in the prevention of exercise induced bronchospasm. **Pediatrics**. (66), P. 103–108, 1980.

GARCÍA, P.C.; CRUZ, S. V; MIRÓN, C.E. **Química Farmacéutica I**. 1 ed. Barcelona: Publicacions i Edicions Universitat de Barcelona, 2010.

GONDA, I. Targeting by deposition. **Pharmaceutical Inhalation Aerosol**. P. 61-82, 1992.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GRONEBERG, D. A. et al. Novel strategies of aerosolic pharmacotherapy. **Experimental and Toxicology Pathology**. (57), p. 49-53, 2006.

HAAHTELA, T. Advances in Pharmacotherapy of asthma. **Current Problem in Dermatology**. p. 135-152, 1999.

HACKMANN, E. R.; BENETTON, S. A.; SANTORO, M. I. First-derivative spectrophotometric determination of salbutamol in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. (43), p. 285-287, 1991.

HALLWORTH, G. W; WESTMORELAND, D. G. The twin impinger: A simple device for assessing the delivery of drugs from metered dose pressurized inhalers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 39, p. 966-972, 1987.

HFA-formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 186, p.13-30, 1999.

HIRST, P. H. et al. Deposition and pharmacokinetics of an hfa formulation of triamcinolone acetonide delivered by pressurized metered dose inhaler. **Journal of Aerosol Medicine**. v. 14, p.155-165, 2001.

HIRST, P. H. et al. *In Vivo* lung deposition of hollow porous particles from a pressurized metered dose inhaler. **Pharmaceutical Research**. v. 19, p. 258-264, 2002.

HOCHHAUS, G. New developments in corticosteroids. Proceedings of the **American Thoracic Society**. v. 1, p. 269–274, 2004.

IBIAPINA, C. C., CRUZ, A. A., CAMARGOS, A. M. Hydrofluoroalkane as a propellant for pressurized metered-dose inhalers: history, pulmonary deposition, pharmacokinetics, efficacy and safety. **Jornal de pediatria**. v. 80, p. 441-446, 2004.

ISLAM, N.; GLADKI, E. Dry powder inhalers (DPIs) - A review of device reliability and innovation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 360, p. 1-11, 2008.

KAIALLY, W. et al. The enhanced aerosol performance of salbutamol from dry powders containing engineered mannitol as excipient. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 392, p. 178-188, 2010.

KENDRICK, A. H., SMITH, E. C., WILSON, R. S. E. Selecting and using nebuliser equipment. **Thorax**, v. 52, p.92-101, 1997.

KROUSE, J. H., et al. Asthma and the unified airway. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**. v. 136, p. S75-S106, 2007.

KUTTATHARMMAKUL, S.; MASSART, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Comparison of alternative measurement methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 203-225, 1999.

LARHRIB, H. et al. Characterisation and deposition studies of engineered lactose crystals with potential for use as a carrier for aerosolised salbutamol sulfate from dry powder inhalers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 19, p. 211-221, 2003.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**. v. 652, p. 161-172, 2009.

LE-BELLE, M. J. et al. Metered-dose inhalers II. Particle size measurement variation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 151, p. 209-221, 1997.

LIMA, W. L. et al. Asma e fatores associados em adolescentes de 13 e 14 anos em São Luís, Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 28, p. 1046-1056, 2012,

LIU, X.; DOUB, W. H; GUO, C. Evaluation of metered dose inhaler spray velocities using phase doppler anemometry (PDA). **Journal of Pharmaceutics**. v. 423, p.235-239, 2012.

LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometry**. v. 42, p. 3-49, 1998.

MACINTYRE, N. R. Aerosol delivery through an artificial airway. **Respiratory Care**. v. 47, p. 1279-1289, 2002.

MALCOLMSON, R. J.; EMBLETON, J. K. Dry powder formulation for pulmonary delivery. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, p. 394-398, 1998.

MASOLI, M. et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA dissemination committee report. **Allergy**, v. 59, p. 469-478, 2004.

MENEZES, A.M.B. et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. **The Lancet**, v. 366, p. 1875-1881, 2005.

MITCHELL, J. P.; NAGEL, M. W. Cascade impactors for the size characterization of aerosols from medical inhalers: their uses and limitations. **Journal of Aerosol Medicines**. v. 16, p. 341-377, 2003.

MITCHELL, J.P. et al. Aerodynamic Particle Size Analysis of Aerosols from Pressurized Metered- Dose Inhalers: Comparison of Andersen 8-Stage Cascade Impactor, Next Generation Pharmaceutical Impactor, and Model 3321 Aerodynamic Particle Sizer Aerosol Spectrometer. **AAPS PharmSciTech**. v.4, p. 425-433, 2003.

MONTEGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 4 ed. New York: Wiley, 1997

MOREIRA, M. A. C. et al. Doença pulmonar obstrutiva crônica em mulheres expostas à fumaça de fogão à lenha. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 6, p. 607-613, 2013.

NAIKWADE, S. R; BALAKRISHNAN, S; BAJA, A. N. Inhaler aerosols - a comparative assessment of quality control parameters. **Practica Farmaceutică**. v. 4, p. 19-22, 2011.

NETO, B. B; SCARMINIO, I. S.; BRUNS R., E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2 ed. Campinas: Editora Unicamp, 2001.

NEWMAN, S. P. et al. Effect of InspirEase on the deposition of metered-dose aerosols in the human respiratory tract. **Chest**. v. 89, p. 551-556, 1986.

NEWMAN, S. P. et al. In vivo lung deposition of hollow porous particles from a pressurized metered dose inhaler. **Pharmaceutical Research**. v. 19, p. 258-264, 2002.

NEWMAN, S. P. Spacer devices for metered dose inhalers. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 43, p.349-360, 2004.

NEWMAN, S. P.; CLARKE, S. W. Therapeutic aerosols 1—physical and practical considerations. **Thorax**. v. 38, p. 881-886, 1983.

NGUYEN, N. K.; BORKOWSKI, J. J. New 3-level response surface designs constructed from incomplete block designs. **Journal of Statistical Planning and Inference**. v. 138, p. 294-305, 2008.

PASCUAL, R. M.; PETERS, S. P. Asthma. **Medical Clinics of North America**. v. 95, p. 1115-1124, 2011.

QI, A.; FRIEND, J.; YEO, L. SAW atomization application on inhaled pulmonary drug delivery. **Conference on Biomedical Applications of Micro- and Nanoengineering IV and Complex Systems**. v. 7270- p. 1-10, 2008.

RANG, H.P.; DALE M.M. et al. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.

RAU, J. L. The inhalation of drugs: advantages and problems. **Respiratory Care**. v. 50, p. 367-382, 2005.

ROBINSON, G. A.; BUTCHER, R. W.; SUTHERLAND, E. W. Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. **Annals of the New York Academy of Science**. v. 319, p. 703-723, 1967.

RYTTING, E. et al. In vitro and in vivo performance of biocompatible negatively-charged salbutamol-loaded nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. v. 141, p. 101-107, 2010.

SILVA, Taízia Dutra. Desenvolvimento de método analítico para determinação de sildenafil de formulação pó seco para inalação. Orientadora: Cristina Duarte Vianna Soares. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SOLINÍS, M. A. et al. Release of salbutamol sulfate enantiomers from hydroxypropylmethylcellulose matrices. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 161, p. 37-43, 1998.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

SRICHANA, T.; MARTIN, G. P.; MARRIOT, C. A human oral-throat cast integrated with a twin-stage impinger for evaluation of dry powder inhalers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 52, p. 771-778, 2000.



SRICHANA, T; MARTIN, G. P; MERRIOTT, C. A human oral-throat cast investigated with a Twin-stage impinger for evaluation of dry powder inhalers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 52, p. 771-778, 2000.

STEIN, S. W. et al. Advances in metered dose inhaler technology: hardware development. **AAPS PharmSciTech**. v. 15, p.326-338, 2014.

SWARBRICK, J. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 3. ed. North Carolina: Informa Healthcare, 2007.

TAKI, M. et al. Aerodynamic deposition of combination dry powder inhaler formulations in vitro: A comparison of three impactors. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 388, p. 40-51, 2010.

TANG, E.; WIESCH, D.; SAMENT, J. Epidemiology of asthma and allergic disease. **Middleton's allergy: principles and practice**. 6 ed, Philadelphia: Mosby 2003. p. 1127-44.

TARARA, T.E; WEERS, J; DELLAMARY, L. Engineered powders for inhalation. **Respiratory drug delivery**. v. 7, p. 413-416, 2000.

TELKO, M. J.; HICKEY, A. J. Dry powder inhaler formulation. *Respiratory Care*, v. 50, n. 9, p. 1209-1227, 2005.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*. v. 29, p. 338-350, 2006.

THE UNITED STATES pharmacopeia. 37. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

THIEL, C. G. From Susie's question to CFC free: an inventor's perspective. **Respiratory drug delivery**. v. 1, p. 115-123, 1996.

TULI, R. A. et al. Studies on the Effect of the size of polycaprolactone microspheres for the dispersion of salbutamol sulfate from dry powder inhaler formulations. **Pharmaceutical Research**. v. 29, p. 2445-2455, 2012.

United Nations Environment Programme. **The Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer**, 2000. 47 p.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US/FDA). Guidance for industry metered dose inhaler (MDI) and dry powder inhaler (DPI) drug products. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, MD, 1998.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US/FDA). Reviewer guidance validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, MD, 1994.

VERVAET, C. V.; BYRON, P. R. Drug–surfactant–propellant interactions in HFA-formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 186, p.13-30, 1999.

WARREN, S. J; FARR, S. J. Formulation of solution metered dose inhalers and comparison with aerosols emitted from conventional suspension systems. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 124, p. 195–203, 1995.

WEDA, M. et al. An investigation into the predictive value of cascade impactor results for side effects of inhaled salbutamol. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 287, p. 278-287, 2004.

WEDA, M. et al. Equivalence testing of salbutamol dry powder inhalers: in vitro impaction results versus in vivo efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 249, p. 247-255, 2002

XU, Q. et al. Application of response surface methodology to optimise extraction of flavonoids from fructus sophorae. **Food Chemistry**. v. 138, p. 2122-2129, 2013.

ZANEN, P.; GO, L. T.; LAMMERS, J. W. Optimal particle size for beta 2 agonist and anticholinergic aerosols in patients with severe airflow obstruction. **Thorax**, v. 51, n. 7, p. 977-980, 1996.

ZANEN, P.; GO, L. T.; LAMMERS, J. W. The optimal particle-size for beta-adrenergic aerosols in mild asthmatics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 107, p. 211-217, 1994.

ZANEN, P.; GO, L. T.; LAMMERS, J. W. The optimal particle-size for parasympatholytic aerosols in mild asthmatics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 114, p. 111-115, 1995.

ZHOU, Y; SUN, J; CHENG, Y. S. Comparison of deposition in the USP and physical mouth–throat models with solid and liquid particles. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**. v. 24, p. 277-284, 2011.

ZIMILICH, W. C. et al. The development of a novel electrohydrodynamic pulmonary drug delivery device. **Respiratory Drug Delivery**. p.241-246, 2000.

## **APÊNDICE A – Resumos de trabalhos publicados em eventos**

(Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins - 2014)

### **DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE SALBUTAMOL EM AEROSSOL**

**Ana Carolina Guimarães Ribeiro, Taízia Dutra Silva, Cristina Duarte Vianna Soares**

*Laboratório de Controle de Qualidade, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG*

Os procedimentos analíticos para avaliação da qualidade físico-química de medicamentos aerossóis são pouco difundidos no cenário farmacêutico de controle de qualidade, diante da peculiaridade de alguns testes como a distribuição aerodinâmica de partículas, o doseamento e a uniformidade de dose liberada. A baixa concentração de fármaco por dose em medicamentos aerossóis (em torno de 100 µg) dificulta sua quantificação sobretudo em testes de uniformidade, uma vez que a tomada de amostra do ativo corresponde a uma única dose. Diante disso, nesse trabalho desenvolveu-se e otimizou-se um método analítico por CLAE em fase reversa com detecção suficiente para a quantificação de salbutamol aerossol. Como ferramenta para acelerar esse desenvolvimento realizou-se um planejamento experimental do tipo matriz Doehlert utilizando as variáveis mais significativas que foram fluxo, composição da fase móvel e proporção de solvente orgânico na fase móvel em níveis de variação 5, 7 e 3, respectivamente. Visto que os pontos críticos do método cromatográfico são o baixo sinal de resposta, devido à baixa concentração e o baixo tempo de retenção (tr) do analito, devido à sua baixa hidrofobicidade, o objetivo com a otimização foi alcançar uma maior retenção e um maior número de pratos teóricos (N) do pico correspondente ao salbutamol. Para isso, construiu-se uma superfície de resposta das variáveis em função do N do pico cromatográfico correspondente ao salbutamol para a obtenção do ponto ótimo. O valor de N otimizado (4306) para o pico correspondente ao salbutamol foi alcançado com uma coluna C18 de dimensões 100x4,6 mm, tamanho de partícula 3,5 µm, temperatura do forno 25 °C, fase móvel constituída por Solução de acetato de amônio 0,1% (p/v):Acetonitrila (78:22) e fluxo 0,6 mL/min.

## APÊNDICE A – Resumos de trabalhos publicados em eventos

(Simpósio de Ciências Farmacêuticas 2014)

### DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE SALBUTAMOL EM AEROSSOL

**Ribeiro, A.C.G.1,2\*; Silva, T.D.1; Ribeiro, I.F.R.2; Vianna-Soares, C.D.1**

<sup>1</sup> *Laboratório de Controle de Qualidade, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG*

<sup>2</sup> *Pharmascience Laboratórios, Betim, Minas Gerais*

Os agonistas  $\beta$ -2, fármacos de primeira escolha no tratamento de doenças respiratórias caracterizadas por broncoespasmos, causam menos efeitos sistêmicos e atuam diretamente no alvo terapêutico, quando inalados. O sulfato de salbutamol (SS) é amplamente utilizado, está listado na RENAME e por isso é importante estabelecer métodos para avaliar o perfil de qualidade de inalatórios a fim de assegurar sua eficácia terapêutica. Não há monografia para o SS aerossol nem métodos gerais avaliativos de performance na Farmacopeia Brasileira (FB), os quais estão presentes na Farmacopeia Britânica. O objetivo deste trabalho é desenvolver e otimizar métodos para compor a monografia de SS aerossol e permitir a avaliação da qualidade físico-química de medicamentos aerossóis. O medicamento Aerofrin<sup>®</sup> (Pharmascience Lab.) foi utilizado no desenvolvimento dos métodos. Para o Doseamento, a Distribuição Aerodinâmica de Partículas (DAP) e a Uniformidade de Dose Liberada (UDL) desenvolveu-se método por CLAE (C18, 100x4,6 mm, 3,5  $\mu$ m, 25°C) fase móvel acetato de amônio 0,1% (p/v):ACN (78:22), fluxo 0,6 mL/min,  $\lambda$  225 nm. Na otimização dos testes de pureza cromatográfica, detectaram-se o pico de salbutamol cetona, o pico da impureza B como substância relacionada, e outros de impurezas desconhecidas, cujo total foi abaixo do máximo especificado (<0,5%). A identificação por espectrofotometria na região do infravermelho e por CLAE (3,48 min, k 1,85), foi positiva e de acordo com o padrão. O Doseamento e a UDL foram desenvolvidos com o dispositivo DUSA, que capta a dose emitida. O teor de SS encontrado no medicamento foi 111,69% do valor rotulado e o DPR foi 13,95%, respectivamente. Para o teste DAP, em que avalia-se o tamanho e a aerodinâmica de voo das partículas, dois métodos foram desenvolvidos utilizando os dispositivos Glass Twim Impinger (GT) e o Impactador de Cascata Andersen (AC), que separam as partículas de sulfato de salbutamol em dois e oito estágios, respectivamente. A avaliação por difração a laser mostrou valor médio de 3,48  $\mu$ m. Os métodos desenvolvidos foram otimizados com sucesso para a determinação de SS aerossol para fins de elaboração de monografia SS aerossol para a FB. Os testes específicos (Doseamento, UDL, DAP) para a forma farmacêutica (f.f.) também são comuns para f.f. inalatórias de uso oral. Apesar de pouco conhecidos, podem ter grande visibilidade se inseridos como Métodos Gerais na FB. No teste DAP, o método por GTI mostrou-se mais rápido e prático. O método por ACI mostrou-se mais discriminativo, opção mais apropriada na avaliação de equivalência farmacêutica. Salienta-se que o método desenvolvido foi implantado com êxito na Pharmascience Laboratórios.

## APÊNDICE B – Resumo de artigo elaborado

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SIMPLE AND FAST RP-HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF SILDENAFIL IN SOLID DOSAGE FORMS AND DRUG SUBSTANCE

Taízia Dutra Silva\*, Ana Carolina Guimarães Ribeiro, Cristina Duarte Vianna-Soares

*Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil*

**Abstract** The popular drug used erectile dysfunction, sildenafil citrate (SILC), a potent phosphodiesterase-5 inhibitor is a second choice drug for the treatment of pulmonary arterial hypertension. A fast and simple analytical method by reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) for determination of SILC in raw material and solid dosage forms was developed. The RP-HPLC method was developed using a C<sub>8</sub> column, isocratic mobile phase with acetonitrile, methanol and 1% triethylamine solution pH 7.0 (45:25:30) at 1.0 mL/min, detection at  $\lambda$  292 nm and column temperature 30 °C. The method was validated in the linear concentration range 10 to 110 µg/mL of SILC, in mobile phase. A stress degradation study for SILC was performed in different drastic conditions in order to verify the selectivity of method. The RP-HPLC method shows appropriate linearity ( $R^2$  0.9997) in the range 10 to 110 µg/mL, trueness (recovery range 98.15–100.14%), precision (relative standard deviation, RSD 0.78-1.54%) and selectivity toward placebo and/or oxidative degradation products. No matrix effects were detected with the presence of excipients. The retention time and retention factor achieved were 4.25 min and 1.26, respectively. The simple and fast method reliable and can be performed for the quality control of SILC tablets, once a dosage form largely contrabanded and counterfeit.