



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO:
ESTUDO COMPARATIVO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO DAS CÁPSULAS
DE ÁCIDO LIPÓICO**

FERNANDA ÍLARY COSTA DUARTE

**CAMPINA GRANDE - PB
2016**

FERNANDA ÍLARY COSTA DUARTE

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO:
ESTUDO COMPARATIVO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO DAS CÁPSULAS DE
ÁCIDO LIPÓICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas PPGCF/CCBS/UEPB, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual da Paraíba.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Oliveira da Silva Simões

CAMPINA GRANDE-PB
2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

D812d Duarte, Fernanda Ílary Costa.

Desenvolvimento e validação de métodos de quantificação [manuscrito] : estudo comparativo dos perfis de dissolução das cápsulas de ácido lipóico / Fernanda Ílary Costa Duarte. - 2016. 97 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Mônica Oliveira da Silva Simões, Departamento de Farmácia".

"Co-Orientação: Profa. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia".

1. Ácido lipóico. 2. Dissolução. 3. Métodos analíticos. 4. Validação. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

FERNANDA ÍLARY COSTA DUARTE

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO:
ESTUDO COMPARATIVO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO DAS CÁPSULAS DE
ÁCIDO LIPÓICO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas PPGCF/CCBS/UEPB,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas pela
Universidade Estadual da Paraíba.

Aprovada em: 17/03/2016.



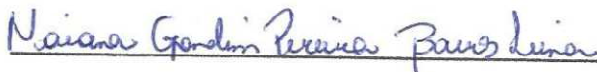
Prof^ª Dr^ª. Mônica Oliveira da Silva Simões /UEPB/DF

Orientadora



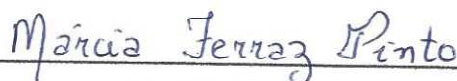
Prof^ª. Dr^ª. Francinalva Dantas de Medeiros/UEPB/DF

Coorientadora



Prof^ª Dr^ª. Naiana Gondim Pereira Barros Lima/UEPB

Examinadora interna



Prof^ª Dr^ª. Márcia Ferraz Pinto/ UFPB

Examinadora externa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela concretização desta etapa, pela força divina que me encoraja todos os dias a ir sempre em frente, na busca pelos meus sonhos.

Aos meus pais por todo o amor, dedicação, esforço e apoio em todos os âmbitos da minha vida, essa vitória é nossa. A minhas irmãs, Mairla e Maria Luiza que tornam meus dias mais divertidos.

Aos meus familiares que sempre torceram por mim.

A professora Júlia Beatriz, por ter me inserido no universo da pesquisa durante a graduação e por todo o apoio fornecido para a concretização deste sonho.

A Verônica Nunes e família, pela oportunidade concedida, compreensão e apoio nos momentos de tribulação. Muito obrigada por tudo.

A professora Mônica Simões pela orientação concedida e confiança depositada.

A professora Francinalva Dantas pela calma, tranquilidade, otimismo e todo o auxílio para a concretização deste trabalho. “Já deu tudo certo”.

A professora Ana Cláudia pelos conselhos e ensinamentos que levarei para todo sempre.

A Paulo Henrique, Paulo Dantas e Cleildo Santana pela ajuda concedida na interpretação e realização dos experimentos.

A Neto, Ana Thayse e principalmente a Lucas, meu sincero agradecimento pelo auxílio na execução dos ensaios, disposição e companheirismo.

As minhas amigas Jessica, Kaly, Daniele e Jo’a’ma por ser fazerem presente em tantos momentos da minha vida.

A Sabrina, Maria Luiza e Marcela por terem sido minha família fora de casa durante minha moradia em Campina Grande-PB.

Aos meus amigos da graduação, principalmente Maiala, Iana, Rayla e Andréia que me incentivaram para o ingresso no mestrado.

Aos colegas do LABDEM - LQAQ por tornarem os dias de análises mais divertidos e menos estressantes.

Meus sinceros agradecimentos a cada um de vocês.

*"O choro pode durar uma noite, mas a alegria vem pela manhã."
(Salmo 30:5)*

RESUMO

DUARTE, F.I.C. Desenvolvimento e validação de métodos de quantificação: estudo comparativo dos perfis de dissolução das cápsulas de ácido lipóico. Dissertação de Mestrado. Campina Grande: UEPB, 2016.

O ácido lipóico funciona como um cofator para complexos multienzimáticos mitocondriais, com intensa capacidade de inibir radicais livres em meio aquoso e lipídico, sendo apontado como uma substância promissora na defesa antioxidante. No Brasil é comumente comercializado na forma de cápsulas por farmácias magistrais. Formas farmacêuticas sólidas tendem a apresentar problemas relacionados à biodisponibilidade, tornando-se necessário realizar o ensaio de dissolução. A Farmacopeia Brasileira não apresenta percentual de cedência no ensaio de dissolução para o ácido lipóico na forma de cápsulas, enquanto que a Farmacopeia Americana apresenta apenas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como método dosador na dissolução deste ingrediente farmacêutico ativo (IFA). Tendo em vista a ausência de condições no código oficial brasileiro para estes ensaios e a busca por técnicas menos onerosas, objetivou-se o desenvolvimento e a validação de metodologia para quantificação do ácido lipóico no estudo de sua dissolução *in vitro* em cápsulas, por meio da espectrofotometria UV/Vis e da cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE). Para isso, realizou-se caracterização físico-química do IFA, ácido lipóico, através de sua recristalização, a fim de avaliar pureza e presença de polimorfismo, utilizando TG/DTG, DSC, FTIR e DRX. Para avaliar a capacidade de encapsulamento da formulação proposta foi realizado estudo das propriedades microméricas, a partir de análise do ângulo de repouso, Fator de Hausner (FH), Índice de Carr (IC) e velocidade de escoamento. O método de dissolução empregado seguiu os parâmetros preconizados pela Farmacopeia Americana, e para a análise dos perfis de dissolução foi desenvolvido e validado métodos de quantificação do fármaco por espectrofotometria UV/Vis e por CLUE, seguindo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, robustez. Foi observado, a partir dos resultados de TG/DTG-DSC, FTIR e DRX, que o IFA utilizado apresentou pureza considerável e não possui polimorfismo. O estudo micromérico demonstrou que a formulação apresentou um bom fluxo. As metodologias para quantificação das amostras de dissolução por espectrofotometria UV/Vis e CLUE se enquadraram em todos os parâmetros de validação estabelecidos, a formulação desenvolvida apresentou percentual de teor dissolvido acima de 70% , estando de acordo com os compêndios oficiais. Não se verificou diferença estatística significativa entre os métodos estudados, demonstrando a viabilidade do uso do método espectrofotométrico para avaliação da dissolução *in vitro*, por sua maior acessibilidade e menor custo. Com isto, conclui-se que os métodos desenvolvidos são seguros e eficazes para o objetivo pretendido e que a formulação desenvolvida com ácido lipóico permitiu a dissolução considerável do princípio ativo.

Palavras-chaves: Ácido Lipóico. Cápsulas. Caracterização. Dissolução. Métodos analíticos.

Validação

ABSTRACT

DUARTE, F.I.C. Development and validation of methods for quantification: comparative study of the dissolution profiles of lipoic acid capsules. Master's thesis. Campina Grande: UEPB, 2016.

The lipoic acid acts as a cofactor for mitochondrial multienzyme complex, with intense ability to inhibit free radicals in aqueous and lipid being touted as a promising substance in antioxidant defense. In Brazil it is commonly marketed in capsule form for master pharmacies. Solid pharmaceutical forms tend to have problems related to bioavailability, making it necessary to perform the test of dissolution. The Brazilian Pharmacopeia does not show us in the percentage dissolution for the lipoic acid in the form of capsules, while the American Pharmacopoeia presents only the liquid chromatography (HPLC) method feeder on dissolution of this active pharmaceutical ingredient (IFA). In view of the absence of conditions in the Brazilian official code for these tests and the search for less costly techniques the goal is the development and validation of a methodology for quantification of lipoic acid on its dissolution in vitro study in capsules by UV/Vis spectrophotometry and high performance liquid chromatography ultraeficiência (CLUE). For that, physical and chemical characterization of the IFA, lipoic acid, through your recrystallization to assess purity and presence of polymorphism using TG/DTG, DSC, FTIR and DRX. To evaluate the ability of encapsulation of the wording proposed was conducted study of micromériticas properties, from analysis of the angle of repose, Hausner factor (FH), Carr index (CI) and flow rate. The method of dissolution employee followed the parameters recommended by the American Pharmacopoeia, and for the analysis of dissolution profiles was developed and validated methods of quantification of the drug by UV/Vis spectrophotometry and by CLUE, following the parameters of specificity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification, robustness. It was observed, from the results of TG/DTG-DSC, FTIR and XRD, the IFA used presented considerable purity and lacks polymorphism. The microméritico study has shown that the formulation presented a good flow. The methodologies for the quantification of samples of dissolution by UV/Vis spectrophotometry and CLUE fit in all validation parameters established, the developed formulation presented dissolved content percentage above 70%, in accordance with the official textbooks. There was a statistically significant difference between the methods studied, demonstrating the feasibility of using the Spectrophotometric method for evaluation of the in vitro dissolution, for their greater accessibility and lower cost. With this, it is concluded that the methods developed are safe and effective for the purpose intended and that the wording developed with lipoic acid led to the dissolution of the active ingredient.

Keywords: Lipoic Acid. Capsules Characterization. Dissolution Test. Analytical methods. Validation

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Faixas de comprimento de onda utilizados na espectrofotometria.....	35
TABELA 2 - Componentes utilizados na formulação de ácido lipóico em cápsulas.....	39
TABELA 3 - Descrição das cápsulas de ácido lipóico 300 mg adquiridas para realização dos perfis de dissolução.....	40
TABELA 4 - Parâmetros para avaliação do ângulo de repouso.....	44
TABELA 5 - Parâmetros para avaliação do fluxo do pó.....	45
TABELA 6 - Especificações para a determinação do perfil de dissolução do ácido lipóico.....	50
TABELA 7 – Ordem/modelos de cinética de dissolução usados na avaliação do perfil de dissolução de cápsulas de ácido lipóico.....	53
TABELA 8 – Dados termoanalíticos das Curvas TG/DTG e DSC.....	56
TABELA 9– Volumes obtidos na determinação da densidade bruta e de compactação das amostras de AL.....	60
TABELA 10 – Parâmetros obtidos no ensaio micromerítico das amostras de AL.....	60
TABELA 11– Valores de absorvância obtidos na construção da curva analítica de AL.....	61
TABELA 12 – Valores da exatidão em três níveis de concentração de AL.....	64
TABELA 13 – Valores obtidos do ensaio de precisão intra-dia em soluções de 300 µg.mL ⁻¹ de AL.....	65
TABELA 14– Valores obtidos no ensaio de precisão inter-dia em soluções de 300 µg.mL ⁻¹ de AL.....	65
TABELA 15 – Valores estatísticos do teste Anova do ensaio de precisão intra-dia e inter-dia....	66
TABELA 16 – Limites de detecção e quantificação, em três níveis de confiança, para o método desenvolvido.....	66
TABELA 17 – Valores de absorvâncias e estatísticos do teste Anova para robustez.....	67
TABELA 18 - Valores das áreas obtidas na construção da curva analítica de AL por CLUE.....	68
TABELA 19 – Valores da exatidão em três níveis de concentração de AL por CLUE.....	69
TABELA 20 – Valores obtidos do ensaio de precisão intra-dia em soluções de 300 µg.mL ⁻¹ de AL por CLUE.....	70
TABELA 21- Valores obtidos no ensaio de precisão inter-dia em soluções de 300 µg.mL ⁻¹ de AL por CLUE.....	70
TABELA 22 – Valores estatísticos do teste Anova do ensaio de precisão intra-dia e inter-dia por CLUE.....	71

TABELA 23 – Limites de detecção e quantificação, em três níveis de confiança, para o método desenvolvido em CLUE.....	71
TABELA 24 – Valores de absorbâncias e estatísticos do teste Anova para robustez.....	72
TABELA 25 - Valores obtidos na determinação de peso de cápsulas de AL.....	72
TABELA 26 – Parâmetros estatísticos obtidos na análise de variância dos perfis obtidos pela metodologia validada.....	77
TABELA 27- Coeficiente de correlação de Pearson (r), aplicando cinética de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell nos perfis de dissolução pela espectrofotometria UV/Vis e CLUE.....	79
TABELA 28 – Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo cinético selecionado por UV/Vis.....	80
TABELA 29 – Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo cinético selecionado por CLUE.....	80
TABELA 30 – Parâmetros de diferença e similaridade entre os perfis por UV/Vis.....	82
TABELA 31 – Parâmetros de diferença e similaridade entre os perfis por CLUE.....	82
TABELA 32 – Eficiência de Dissolução (ED%) das cápsulas de ácido lipóico (300 mg).....	83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1– Estrutura química do ácido lipóico e da sua forma reduzida	18
FIGURA 2 – Atuações do ácido lipóico no organismo.....	20
FIGURA 3 – Curva TG/DTG ácido acetilsalicílico.....	24
FIGURA 4– Representação esquemática do equipamento de DSC e tipos de DSC: a) DSC com fluxo de calor, b) DSC com compensação de potência.....	25
FIGURA 5 – Curva típica de DSC, caracterizando os principais eventos térmicos.....	26
FIGURA 6 – Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro.....	36
FIGURA 7 – Representação esquemática do funcionamento de um cromatógrafo líquido.....	38
FIGURA 8 – Aparato para determinação do ângulo de repouso.....	43
FIGURA 9 – Formação dos cristais em solução de 0,10 mol L ⁻¹ do ácido lipóico em metanol a 4°C.....	54
FIGURA 10 – Formação dos cristais em solução de 0,10 mol L ⁻¹ do ácido lipóico em metanol a 4°C.....	55
FIGURA 11 – Perfil térmico do AL (a) e AL recristalizado (b).....	55
FIGURA 12 - Espectros na região do infravermelho (4000 cm ⁻¹ - 400 cm ⁻¹) para AL e AL recristalizado.....	57
FIGURA 13 - Difratogramas de AL e AL rescrystalizado.....	58
FIGURA 14 - Gráfico representando os resultados da determinação da velocidade de escoamento da mistura de pós.....	59
FIGURA 15 – Espectro de absorção do ácido lipóico na região UV.....	62
FIGURA 16 – Espectro na região UV do ácido lipóico e dos excipientes que constituem a formulação.....	62
FIGURA 17 – Curva analítica do AL nas concentrações de 30, 75, 150, 300, 450, 600 µg.mL ⁻¹ obtida por espectrofotômetro UV/Vis.....	64
FIGURA 18 – Cromatograma obtido por CLUE para o ácido lipóico e os excipientes.....	68
FIGURA 19 – Curva analítica do AL nas concentrações de 30, 75, 150, 300, 450, 600 µg.mL ⁻¹ obtida por CLUE.....	69
FIGURA 20 – Diagrama de dispersão dos pesos encontrados nas 20 cápsulas de AL.....	73
FIGURA 21– Perfis de dissolução a partir das cápsulas de ácido lipóico (300 mg) por espectrofotometria UV/Vis.....	76

FIGURA 22 – Perfis de dissolução a partir das cápsulas de ácido lipóico (300 mg) por CLUE...	76
FIGURA 23 – Diagrama de Youden (elipse de confiança) para os métodos analíticos desenvolvidos.....	78
FIGURA 24- Cápsula M ₄ não dissolvida ao término do teste de dissolução.....	81

LISTA DE SIGLAS

AL	Ácido Lipóico
ANOVA	Análise de Variância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
DHLA	Ácido dihidrolipóico
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRX	Difração de Raios- X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Derivada de Termogravimetria
ERO's	Espécies Reativas do Oxigênio
FH	Fator de Hausner
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier
IC	Índice de Carr
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1. ACIDO LIPÓICO.....	18
3.2. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	21
3.2.1. CARACTERÍSTICAS MICROMERÍTICAS.....	21
3.2.2. TECNICAS TERMOANALITICAS.....	23
3.2.2.1. TERMOGRAVIMETRIA.....	23
3.2.2.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	25
3.2.3. ESPECTROSCOPIA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	27
3.2.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	27
3.2.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS –X	28
3.2.6. DISSOLUÇÃO.....	29
3.2.6.1. PRINCIPAIS FATORES QUE AFETAM A DISSOLUÇÃO.....	30
3.2.6.1.1. FÁRMACO E FORMULAÇÃO	30
3.2.6.1.2. MEIO DE DISSOLUÇÃO	31
3.2.6.1.3. APARATO E ROTAÇÃO	31
3.2.6.1.4. MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO	32
3.2.6.2. PERFIL DE DISSOLUÇÃO	32
3.2.7. VALIDAÇÃO.....	33
3.2.8. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV/VIS.....	35
3.2.9. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-EFICIÊNCIA	37
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	39
4.1. MATERIAIS.....	39
4.1.1. INGREDIENTE FARMACÊUTICO ATIVO.....	39
4.1.2. EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS.....	39
4.1.3. FORMULAÇÃO.....	39
4.1.4. AMOSTRAS PARA OBTENÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO.....	40
4.2. MÉTODOS.....	40

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA – PRIMA.....	40
4.2.1.2. RECRISTALIZAÇÃO.....	41
4.2.1.3. ESTUDO TERMOANALÍTICO (TG/DTG-DSC).....	41
4.2.1.4. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	42
4.2.1.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS – X.....	42
4.2.2. MANIPULAÇÃO DAS CÁPSULAS.....	42
4.2.3. ESTUDOS MICROMERÍTICOS.....	43
4.2.3.1. AVALIAÇÃO DO ÂNGULO DE REPOUSO.....	43
4.2.3.2 VELOCIDADE DE ESCOAMENTO.....	43
4.2.3.3. DENSIDADE APARENTE E DE COMPACTAÇÃO.....	44
4.2.3.4 FATOR DE HAUSNER E ÍNDICE DE CARR.....	45
4.2.4. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO.....	45
4.2.4.1. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE.....	46
4.2.4.2. VARREDURAS ESPECTRAIS.....	46
4.2.4.3. ESPECIFICIDADE.....	47
4.2.4.4. LINEARIDADE.....	47
4.2.4.5. PRECISÃO.....	47
4.2.4.5.1 PRECISÃO INTRA-DIA (repetibilidade).....	47
4.2.4.5.2 PRECISÃO INTER-DIA (precisão intermediária).....	48
4.2.4.6. EXATIDÃO.....	48
4.2.4.7. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	48
4.2.4.8. ROBUSTEZ.....	49
4.2.5. MÉTODO DE DISSOLUÇÃO	48
4.2.6. AMOSTRAS PARA OBTENÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO.....	49
4.2.7. PERFIL DE DISSOLUÇÃO.....	50
4.2.7.1 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE A ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS E CLUE.....	50
4.2.7.2. AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO.....	51
4.2.7.2.1 EFICIÊNCIA DE DISSOLUÇÃO.....	51
4.2.7.2.2 FATORES DE DIFERENÇA E SIMILARIDADE.....	52
4.2.7.2.3 CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO.....	52
4.2.7.2.4 ESTATÍSTICA	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54

5.1.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA – PRIMA.....	54
5.1.1.2. RECRISTALIZAÇÃO	54
5.1.1.3. ESTUDO TERMOANALÍTICO (TG/DTG-DSC).....	55
5.1.1.4. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	57
5.1.1.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS – X.....	58
5.2. ESTUDO MICROMÉRITICO.....	59
5.3. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO.....	61
5.3.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS.....	61
5.3.1.1 VARREDURAS ESPECTRAIS.....	61
5.3.1.2 ESPECIFICIDADE.....	62
5.3.1.3. LINEARIDADE.....	63
5.3.1.4 EXATIDÃO.....	64
5.3.1.5 PRECISÃO.....	65
5.3.1.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	66
5.3.1.7 ROBUSTEZ.....	66
5.3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA.....	67
5.3.2.1 ESPECIFICIDADE.....	67
5.3.2.2 LINEARIDADE.....	68
5.3.2.3 EXATIDÃO.....	69
5.3.2.4 PRECISÃO.....	70
5.3.2.5 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	71
5.3.2.6 ROBUSTEZ.....	72
5.4. MANIPULAÇÃO DAS CÁPSULAS.....	73
5.5. MÉTODO DE DISSOLUÇÃO.....	74
5.6. PERFIS DE DISSOLUÇÃO.....	75
5.6.1 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS MÉTODOS VALIDADOS.....	77
5.6.2 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO.....	78
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	86
REFERÊNCIAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

O ácido lipóico, ou ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico, é de uma biomolécula da classe dos organosulfurados derivados do ácido octanóico, um ácido graxo de cadeia linear que vem sendo apontado como uma substância promissora na defesa antioxidante, denominado pela literatura como “antioxidante universal” (PACKER; WITT; TRITSCHLER; 2000).

A aplicabilidade terapêutica do ácido lipóico como antioxidante é promissora. No Brasil é normalmente encontrado em farmácias magistrais na forma de cápsulas. Tais estabelecimentos oferecem medicamentos mais acessíveis aos dos produtos industrializados e com singularidade de acordo com as necessidades do paciente, estes fatores contribuíram para a expansão deste mercado ao obterem vantagem competitiva em relação à indústria em determinados segmentos (BORBA et al, 2013).

Nos últimos anos as farmácias de manipulação funcionam como uma alternativa rotineira para a aquisição de medicamentos. A equivalência farmacêutica entre medicamentos está relacionada com a comprovação de que ambos, na mesma apresentação farmacêutica, contenham mesmo fármaco na mesma dosagem. Parâmetros estes, avaliados por meio de testes *in vitro*. Formas farmacêuticas sólidas tendem a apresentar maiores problemas em relação à biodisponibilidade. Por este motivo, torna-se necessária a quantificação do fármaco e a avaliação de sua dissolução a partir de sua apresentação (NUNES et al, 2009).

A quantificação do teor dissolvido de um fármaco é considerada um aspecto vital da garantia da qualidade de medicamentos. Segundo a USP 32 (2009) a determinação do teor da dissolução do ácido lipóico em cápsulas deve ser realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Contudo, trata-se de uma técnica onerosa que exige grande quantidade de reagentes e materiais, além de um maior tempo de execução. Como técnica alternativa, pode-se empregar a espectrofotometria UV/Vis, de caráter menos dispendioso e de rápida execução e a cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE), que se caracteriza pelo menor tempo de análise e menor consumo de solvente. Assim, para o desenvolvimento de uma nova metodologia analítica é necessária a validação da mesma, garantindo-lhe confiabilidade e segurança (MALDANER; JARDIM, 2009; USP 32, 2009).

O processo de validação é essencial para definir se uma metodologia desenvolvida está completamente adequada aos objetivos a que se destina, de modo a obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Ele envolve o desenvolvimento de um método analítico, de uma adaptação ou implementação de um método conhecido e um processo de avaliação que estime sua eficiência, a qual pode ser considerada um dos

principais instrumentos da garantia da qualidade, pois possibilita o conhecimento das limitações e da confiabilidade de uma metodologia analítica, da instalação de um equipamento ou de um processo produtivo (AZEVEDO; RIBEIRO; ARAÚJO, 2008).

A Farmacopeia Brasileira (2010) não apresenta uma monografia oficial para a determinação da percentagem de cedência no ensaio de dissolução para o ácido lipóico na forma de cápsulas o que vem reforçar a necessidade de desenvolvimento e validação deste experimento para que possamos prever o comportamento *in vitro* deste fármaco manipulado com frequência em farmácias magistrais. Segundo Chowdary e Rajyalakshimi (1987), os ensaios de dissolução *in vitro* são testes físicos de natureza destrutiva, no qual o fármaco passa para a forma solúvel a partir da sua forma farmacêutica, sendo utilizados para atestar a qualidade lote a lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar o desempenho do medicamento após determinadas alterações.

Há ausência de condições no compêndio oficial brasileiro para o ensaio de dissolução e quantificação do ácido lipóico em forma farmacêutica sólida. Além disto, no processo de manipulação das cápsulas, a tecnologia da fabricação e os diluentes empregados podem afetar a dissolução. Assim, propõe-se um estudo comparativo dos perfis de dissolução entre as cápsulas de ácido lipóico obtidas em farmácias de manipulação e industrialmente. Além disso, serão validados os métodos para análise quantitativa da dissolução de cápsulas deste IFA por meio da espectrofotometria UV/Vis e CLUE.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologias analíticas utilizando cromatografia líquida de ultraeficiência e espectrofotometria UV/Vis para quantificação do ácido lipóico (AL) em cápsulas no estudo do seu perfil de dissolução *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a recristalização do AL com diferentes solventes;
- Caracterizar o AL e os cristais obtidos empregando TG/DTG, DSC, FTIR e DRX;
- Realizar o estudo micromerítico da formulação proposta;
- Desenvolver e validar um método para análise quantitativa no ensaio de dissolução de AL em cápsulas através de espectrofotometria UV/Vis;
- Desenvolver e validar um método para análise quantitativa no ensaio de dissolução de AL em cápsulas através da cromatografia líquida de ultraeficiência;
- Realizar um estudo comparativo das técnicas validadas através dos perfis de dissolução obtidos;
- Realizar um estudo comparativo dos perfis de dissolução entre formulações de AL.

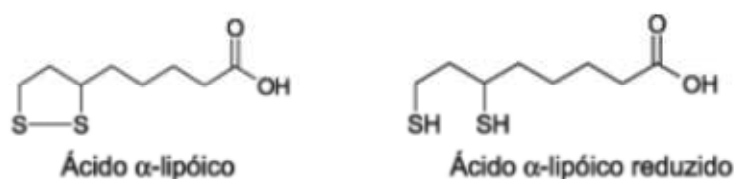
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. ÁCIDO LIPÓICO

Denominado de ácido lipóico, ácido alfa lipóico, ácido tióctico ou 1,2-ditiolano-3-pentanóico, foi evidenciado por Snell e colaboradores na década de 30 e isolado pela primeira vez em 1951 por L. Reed a partir de fígado bovino. Já as primeiras pesquisas envolvendo este fármaco, com relação a sua atividade antioxidante, foram conduzidas por Lester Packer na Universidade da Califórnia, em 1991 (PACKER; KRAEMER; RIMBACH, 2001; SHAY, et al., 2009; MORAES, 2011).

O ácido lipóico trata-se de um ácido graxo que apresenta uma cadeia linear de oito carbonos contendo numa extremidade da molécula um grupamento carboxila e em outra extremidade um anel ditiolano com uma ponte dissulfeto entre os carbonos C6 e C8 (Figura 1), sendo classificado como um organosulfurado derivado do ácido octanóico (MANTA; BATISTAVIEIRA; CARLSSON, 2009; BILLGREN, et al., 2010). A presença de um átomo de carbono assimétrico, confere a molécula atividade óptica, assim a mesma existe na forma de dois enantiômeros: R-(+)-ácido lipóico e S-(+)-ácido lipóico, geralmente comercializa-se a mistura racêmica R/S-ácido lipóico. No entanto, somente R-(+)-ácido lipóico apresenta atividade biológica relevante (CARLSON et al., 2007).

FIGURA 1– Estrutura química do ácido lipóico e da sua forma reduzida



Fonte: SCOTTI, et al., 2007.

As mitocôndrias desempenham o papel de síntese endógena e ligação do ácido lipóico a complexos de alfa-cetodesidrogenase. Uma vez ligado, passa a agir como um cofator de complexos enzimáticos mitocondriais e sua forma reduzida conhecida como o ácido dihidrolipóico (DHHLA) apresenta propriedade antioxidante ainda mais potente (SANTOS, et al., 2010; MORAES, 2011). Há uma pequena porcentagem de AL livre no organismo humano

sem suplementação, mas que possui a competência de reagir com ERO's (espécies reativas do oxigênio), tais como radicais superóxido, radicais hidroxila, ácido hipocloroso, radicais peroxila, oxigênio singlete. Além disto, pode regenerar outros antioxidantes, principalmente ácido ascórbico, vitamina E e glutatona (WOLLIN; JONES, 2003).

É uma molécula produzida, principalmente, no fígado e nos rins, sendo amplamente encontrada na maioria das espécies animais e vegetais, podendo ser obtida exogenamente através do germe de trigo, levedo de cerveja e da carne vermelha (MORIKAWA et al. 2001; TEICHERT et al., 2005). A atividade antioxidante do AL está concentrada no anel ditiolano, que interage diretamente com os radicais oxidantes. O anel ditiolano também é responsável pela coloração amarelada do pó, bem como o espectro de absorbância máxima a 333 nm (PEREZ & CASTANEDA, 2006; PACKER; CADENAS, 2010; BILLGREN, et al., 2010).

Em casos de aumento do estresse oxidativo, a dieta não provê quantidades suficientes de ácido lipóico para relevante atividade antioxidante. Recomenda-se a administração de 600 a 1.200 mg/dia por via oral, como uma suplementação, que permite alcançar de 3 a 5 dias níveis séricos considerados terapêuticos ($4-8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (MORIKAWA et. al., 2001; GONZÁLEZ; MOY; GUZAMÁN, 2008).

Diferenciando-se de outros antioxidantes, o AL é facilmente absorvido e transportado através das membranas celulares, devido ao seu comportamento anfipático. Cerca de 93% de uma dose administrada por via oral é absorvida pelo epitélio intestinal, entretanto, 20 a 30% não sofre metabolização hepática, pois estando no interior da célula é reduzido a dihidrolipóico, atravessando o espaço intersticial e desta forma pronto para desempenhar suas funções. Sua excreção do organismo ocorre majoritariamente pela urina na forma de metabólitos como o 4,6-bismetilmercapto-hexanóico que é o composto predominante (CREMER et. al., 2006; GONZÁLEZ; MOY; GUZAMÁN, 2008).

Em comparação a outros antioxidantes o ácido lipóico apresenta característica muito peculiares: distribuição pela mitocôndria; baixo potencial *redox*, tornando-o capaz de recuperar outros antioxidantes; regeneração pelo aumento da glicemia e por ação dos ácidos graxos plasmáticos não esterificados, indicando uma correlação entre a atividade antioxidante e o grau de aumento do fluxo metabólico (SENA; NUNES; LOURO, 2007).

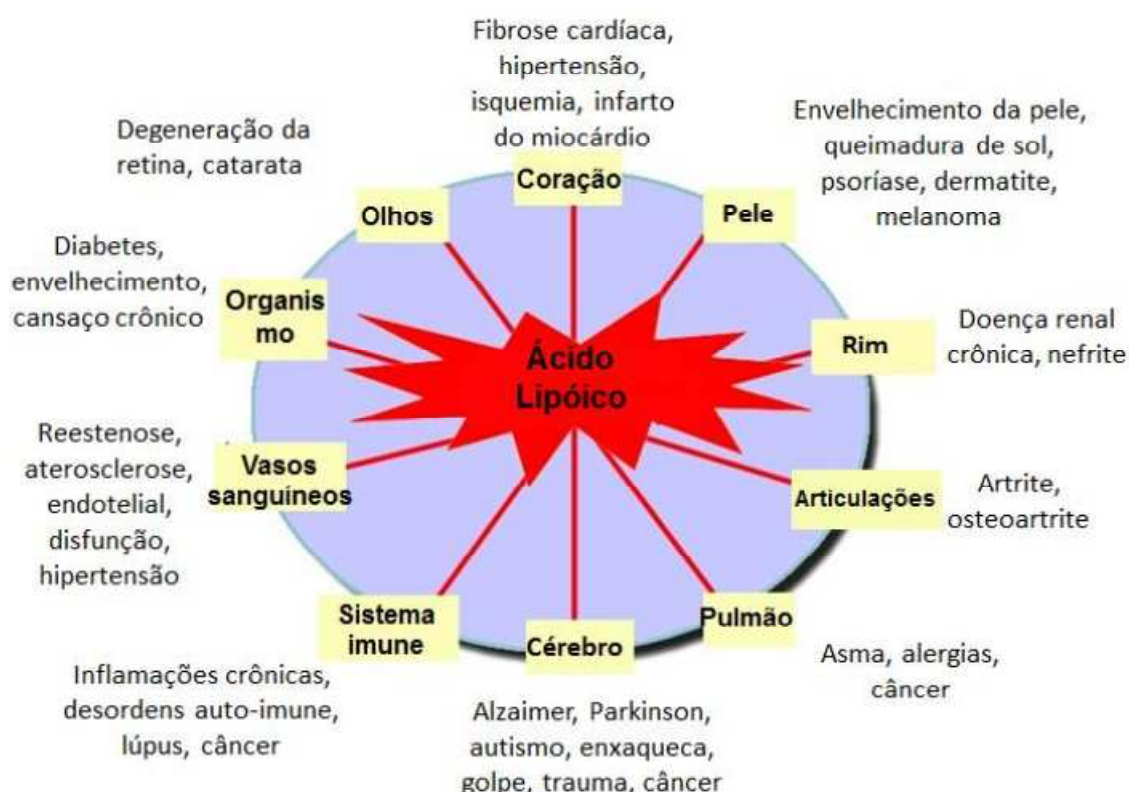
As principais atuações terapêuticas deste fármaco, comprovadas por meio de testes clínicos em humanos, concentram-se na diminuição dos níveis glicêmicos e colesterolêmicos; redução das linhas faciais na região periorbital e dos lábios, melhorando a cor e textura da pele; na melhoria da vasodilatação endotelial em pacientes com diabetes melitus tipo 2,

reduzindo o risco vascular (HEINISCH et al., 2010; ANSAR et al., 2011; PORASUPHATANA et al., 2012; ZHAO; HU, 2014; SHERIF; BENDAS; BADAWY, 2014)

A ação hipoglicemiante do ácido lipóico tem sido bem documentada e postula-se que esta propriedade se dá pela sua ação na absorção de glicose para os músculos e adipócitos, melhorando a sensibilidade e resposta destes a insulina. O efeito no antienvhecimento cutâneo, está associado à capacidade do ácido lipóico em induzir o aumento da produção de colágeno por saturação de fibroblastos (AL-ATTAR, 2010; SHERIF; BENDAS; BADAWY, 2014).

De acordo com Ansar et al. (2011) um tratamento de 4 semanas com AL em várias doses resultou em um aumento da sensibilidade à insulina em 15% com 600 mg, 14% com 1200 mg, e 22% com 1800 mg. Outras atuações do AL dispostas pela literatura estão resumidas na Figura 2.

FIGURA 2 – Atuações do ácido lipóico no organismo



Fonte: Adaptado de www.drbyma.com, 2014.

Koufaki (2014), afirma que a utilização do ácido lipóico é prejudicada pelos seus problemas de estabilidade físico-química, ocorrendo sua degradação na presença de luz e em temperaturas acima de 40 °C caracterizada por uma mudança física no composto e no seu espectro ultravioleta, o ponto de fusão ocorre a 62 °C. Além disto, é capaz de se polimerizar através da abertura do anel ditiolano, seguido da formação de ligações dissulfureto intermoleculares.

Assim, vários grupos de pesquisa têm-se centrado no desenvolvimento de métodos para a síntese eficiente. Bem como na veiculação deste fármaco em emulsões múltiplas, micelas, lipossomas, micropartículas, nanopartículas e partículas poliméricas. Estes recursos tem como foco a melhor estabilidade físico-química, até mesmo a maior permeabilidade no organismo (MITRI et.al., 2011; MENDOZA et.al., 2012).

3.2. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, o passo inicial se dá através dos ensaios de pré-formulação, que fornecem informações significativas sobre a viabilidade, eficácia e segurança de determinada formulação ou matéria-prima, compreendendo: estudo das propriedades físico-químicas (solubilidade, ponto de fusão, pKa, higroscopicidade, coeficiente de partição óleo/água, polimorfismo); avaliação da estabilidade do fármaco frente a diversas condições, inclusive com relação a outros componentes utilizados na formulação; estudo das características microscópicas (tamanho da partícula e cristalinidade); análise das propriedades de fluxo (ângulo de repouso, densidade aparente e densidade compactada); avaliação das propriedades de compressão; além da averiguação das características da dissolução *in vitro* da formulação proposta (WELLS; AULTON, 1998; LACHMAN; LIEBERUAN; KANIG, 2001; BHARATE; VISHWAKARMA, 2013). Vale ressaltar que a importância de cada propriedade, varia de acordo com o tipo de forma farmacêutica a qual se deseja veicular o fármaco.

3.2.1. CARACTERÍSTICAS MICROMERÍTICAS.

O fabrico com sucesso de uma forma farmacêutica sólida depende diretamente das características de fluxo da formulação. Pó de fluxo pobre pode afetar a produção de forma geral na uniformidade do conteúdo, taxa de dureza, friabilidade e dissolução. Assim, faz-se importante caracterizar e buscar a otimização desta propriedade para fins produtivos. Os métodos comumente utilizados para a caracterização do fluxo de pós incluem ângulo de

repouso, índice de Carr e fator de Hausner (CURY et. al, 2007; McCONVILLE et.al, 2013; OSORIO; MUZZIO, 2013).

O ângulo de repouso é usado para caracterizar as propriedades de fluidez do pó. Segundo ALLEN Jr; POPOVICH; ANSEL, 2007 este parâmetro é determinado pelo ângulo formado pelo pó que escorre por um funil, cujo diâmetro do orifício é previamente conhecido, numa superfície plana e lisa. O ângulo de repouso ($\tan \alpha$) é calculado a partir da razão entre a altura (h) e o raio (r) da base do cone resultante. Um pó é considerado de fluxo bom a excelente, desde que apresente ângulo de repouso entre 25° e 30° graus (USP 32, 2009; LAGO; PEREIRA; BERTOL, 2012).

O Fator de Hausner (F) e o Índice de Carr (IC%), são parâmetros simples que avaliam a capacidade de compactação ou compressão da amostra, por meio dos valores encontrados na densidade aparente e compactada do pó. São consideradas medidas indiretas, pois a densidade, área superficial, teor de umidade, tamanho, forma e coesão das partículas podem influenciar no resultado obtido (USP 32, 2009; GARCIA; PEREIRA; DIAS, 2012).

De acordo com o descrito pela Fiese e Hagen (2001); USP 32 (2009) o procedimento básico para a obtenção destes parâmetros compreende medir o volume ocupado pela amostra em uma proveta e o volume final após a proveta sofrer uma série de quedas, até que a redução do volume não ultrapasse 2%. Assim, determinam-se as densidades aparente (ρ_a) e compactada (ρ_c) pela razão entre o peso e o volume da amostra na proveta. A partir disto, calcula-se os Índice de Carr (equação 1) e Fator de Hausner (equação 2) utilizando as seguintes correlações:

$$IC\% = (\rho_c - \rho_a) * 100 / \rho_c \quad (1)$$

Onde, IC%: índice de carr percentual, ρ_c : densidade compactada (g.mL^{-1}) e ρ_a : densidade aparente (g.mL^{-1}).

$$F = \rho_c / \rho_a \quad (2)$$

Onde, F: fator de Hausner, ρ_c : densidade compactada (g/mL) e ρ_a : densidade aparente (g/mL).

Para o Índice de Carr e o Fator de Hausner, admite-se fluidez de caráter bom a excelente desde que se tenha valores, respectivamente, de 15% a 10% e de 1,18 a 1,00.

3.2.2. TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

Segundo a Associação Brasileira e Análise Térmica e Calorimetria (ABRATEC) a análise térmica é o estudo entre a relação das propriedades físicas ou químicas da amostra frente a temperatura, sendo amostra submetida tanto ao aquecimento ou arrefecimento de maneira controlada. De acordo com Seilerová et al. (2012) a análise térmica fornece informações essenciais para a formulação de fármacos de forma segura e satisfatória.

Dentre estas técnicas, em maior disseminação está a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TG), que se caracterizam como métodos simples, rápidos e sensíveis, que necessitam de pequena quantidade de amostra, fator este de grande relevância pela economia de amostra (KUSHNER et al., 2011).

Diante disto, é crescente o interesse das indústrias de medicamento por estas técnicas, pois estão diretamente relacionadas com qualidade do produto, em vários âmbitos, desde o controle da matéria-prima ao produto acabado (SHAMSIPUR, 2013). De acordo com Oliveira, Yoshida; Gomes (2011), os métodos termoanalíticos podem fornecer informações sobre umidade, identificação e análise de pureza, compatibilidade de formulações farmacêuticas, estabilidade, polimorfismo, cinética de degradação térmica. Também podem ser aplicados em vários tipos de materiais, como polímeros, substâncias sintéticas e naturais, alimentos, fármacos e produtos cosméticos em geral (OLIVEIRA; PAOLA; MATOS, 2004).

3.2.2.1. TERMOGRAVIMETRIA (TG)

A termogravimetria é um dos métodos básicos de análise térmica, fornecendo informações de variações de massa da amostra em função da temperatura e/ou tempo em condições atmosféricas controladas sob um programa de aquecimento. Derivado ao TG, têm-se o DTG (termogravimetria derivada), que consiste em um arranjo matemático em que a derivada da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt) é registrada em função da temperatura ou tempo (CASTELLÓ, 2009; OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011; KUSHNER, 2011; SEILEROVÁ, 2012).

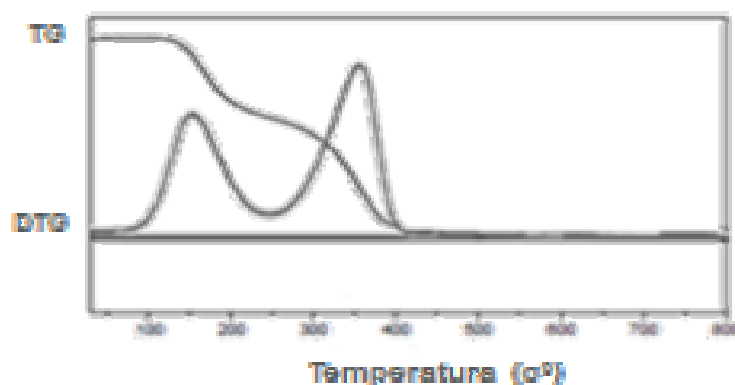
As análises termogravimétricas são realizadas com o auxílio de uma termobalança, que registram as alterações de massa, com sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez. Seus componentes principais são: balança registradora, forno, suporte de amostra, sensor de

temperatura, programador de temperatura, sistema registrador e controle da atmosfera do forno (DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

Os gráficos obtidos, comumente chamados de curvas TG, ao interpretá-los é possível extrair informações inerentes a composição, estabilidade térmica do analito, dos produtos intermediários e resíduos formados. De maneira geral, as curvas TG podem fornecer dados de grande valia para o estudo termodinâmico e cinético de transformações. A curva derivada, denominada curva DTG é muitas vezes utilizada para tornar mais evidente uma sucessão de reações que não podem ser claramente distinguidas na curva TG (GIRON, 1996; MACHADO; MATOS 2004; SILVA; PAOLA; MATOS, 2007). A Figura 3 demonstra um exemplo da relação entre as curvas TG/DTG do ácido acetilsalicílico

FIGURA 3 – Curva TG/DTG do ácido acetilsalicílico.

Fonte: Adaptado de IONASHIRO; GIOLITO, 2004.



As curvas TG, podem sofrer influências de diversos fatores tanto instrumentais quanto relacionados à natureza da amostra. Dentre estes fatores instrumentais podemos destacar a razão de aquecimento; atmosfera do forno, o tamanho e a composição do cadinho. Já com relação às características da amostra, podemos citar a massa, tamanho da partícula ou granulometria da amostra (STORPITIS et al., 2009).

A termogravimetria é classificada em três tipos: dinâmica ou convencional, quando a temperatura da análise varia de forma pré-estabelecida a uma razão de aquecimento linear, sendo a mais utilizada; isotérmica: a massa da amostra é registrada à temperatura constante; quase isotérmica: onde a razão de aquecimento é lenta e ao se iniciar uma transição com perda

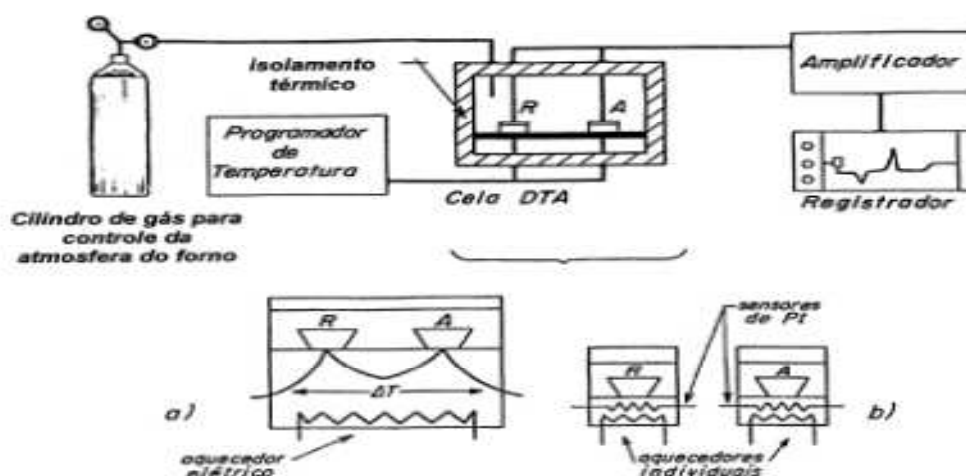
de massa, mantem-se a temperatura constante até a transição completar (BROWN; GALLAGHER, 2008).

3.2.2.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*) é uma técnica termoanalítica que mede a diferença de energia (entalpia) fornecida à substância e a um material de referência sob uma programação controlada de temperatura. Há duas modalidades, de acordo com o método de medição utilizado: calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência e calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor (IONASHIRO; GIOLITO, 2004).

No DSC com compensação de potência a amostra e o material de referência são posicionadas em fornos separados e mantidas na mesma temperatura, através de aquecedores elétricos individuais. A potência dissipada pelos aquecedores é relacionada com a energia envolvida no processo endotérmico ou exotérmico. Já o DSC com fluxo de calor apresenta um arranjo mais simples no qual a amostra e a referência, são colocadas em suportes idênticos, localizadas sobre um disco termoeletrico e aquecidas por uma única fonte de calor. O forno é aquecido de forma linear, enquanto termopares medem a variação de temperatura, calor e entropia (BERNAL et. al., 2002; GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010). A Figura 4 apresenta um modelo geral do equipamento de DSC e sua classificação.

FIGURA 4 – Representação esquemática do equipamento de DSC e tipos de DSC: a) DSC com fluxo de calor, b) DSC com compensação de potência



Fonte: Adaptado de BERNAL et.al., 2002.

Os eventos térmicos observados por DSC são classificados por sua origem, seja física ou química, bem como pela sua natureza endotérmica ou exotérmica. Assim, os principais eventos físicos endotérmicos são: a transição vítrea, fusão, vaporização, sublimação, já os exotérmicos são: transição cristalina e adsorção. Os químicos endotérmicos são: a desidratação, decomposição e reação de óxido-redução. Os químicos exotérmicos são: decomposição, degradação oxidativa, polimerização, combustão (FORD; MANN, 2012). A Figura 5 representa de maneira genérica como se comportam os picos endotérmicos e exotérmicos.

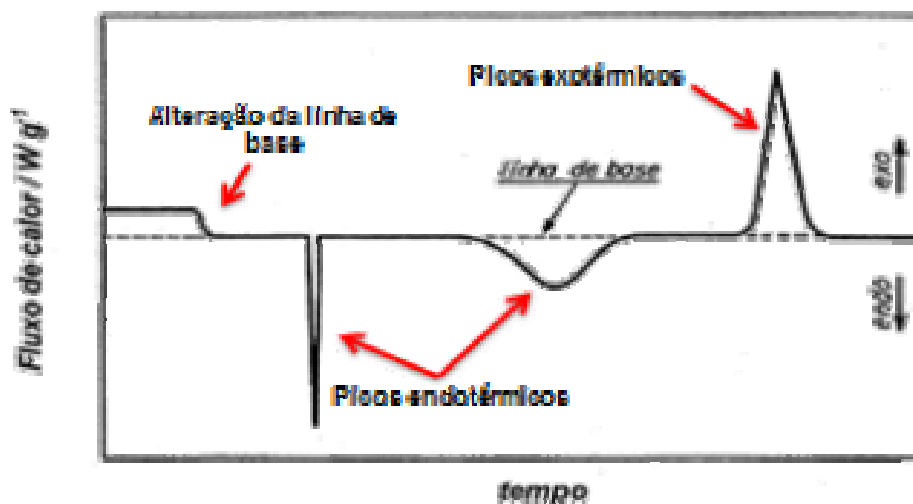


FIGURA 5 – Curva típica de DSC, caracterizando os principais eventos térmicos.

Fonte: Adaptado de BERNAL et.al., 2002.

No âmbito farmacêutico esta técnica termoanalítica é requisitada na caracterização térmica, determinação da pureza de fármacos, estudos de compatibilidade entre os constituintes da formulação e identificação de polimorfismo com determinação das entalpias de cada forma cristalina (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011). Loyd & Allen (2015) afirmam que apesar das diversas vantagens com relação ao uso deste método, deve-se considerar que a amostra analisada é submetida a tratamento térmico, que destrói ou pelo menos altera a amostra e pode induzir a formação de artefatos térmicos. Assim, é necessário cautela para a interpretação das curvas termoanalíticas de DSC para que se evitem interpretações enganosas.

3.2.3. ESPECTROSCOPIA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os métodos espectroscópicos se fundamentam na quantificação da radiação produzida ou absorvida pelas moléculas que constituem a amostra em análise. De modo que estes métodos espectroscópicos se classificam conforme a região do espectro eletromagnético utilizado para as medições, com isto tem-se: raios γ ; raios x; ultravioleta (UV); visível (VIS); infravermelho (IV); micro-ondas e rádio frequência (RF). A região espectral inerente ao infravermelho compreende radiação com número de ondas no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006).

Genericamente a radiação infravermelha é absorvida pela molécula e convertida a energia de vibração molecular, esta absorção é regida por movimentos rotacionais e vibracionais dos grupos moleculares e ligações químicas da molécula. Com isto, esta energia vibracional é decodificada através de um espectro que se apresenta como um conjunto de bandas de absorção. De maneira que, cada banda de absorção se refere a grupos funcionais presentes na estrutura molecular (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 2000; LOPES; FASCIO, 2004).

Quando o feixe de radiação IV incide sobre a amostra é direcionado a um detector fotossensível que ao captar o sinal luminoso, converte-o em um interferograma, que será submetido a um modelo matemático chamado Transformada de Fourier que analisa seus componentes de frequência com suas respectivas amplitudes. Esta associação da espectroscopia com Transformada de Fourier fornece maior precisão na medição, otimização na relação sinal/ruído, bem como maior praticidade na obtenção dos dados (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006). O FTIR é utilizado para fins de caracterização, identificação e quantificação da estrutura de uma amostra, diante disto é aplicado com técnica auxiliar para identificação de fármacos e excipientes, análise de pureza, investigação estrutural, cristalinidade, caracterização de polimorfismo (KALINKOV et al., 1999; SHAI, 2012).

3.2.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada em várias áreas do conhecimento, a demanda pelo uso desta técnica é frequente por fornecer informações da superfície da amostra com grande riqueza de detalhes, chegando a um aumento de até 300.000 vezes. De maneira que, este conhecimento detalhado da microestrutura de uma amostra fornece subsídio para o

estudo das propriedades físico-químicas do material em estudo (DUARTE et al., 2003; RIBEIRO et al., 2008; LYRA et al., 2010).

A alta resolução da MEV ocorre pelo uso de feixe de elétrons no lugar de fótons, comumente utilizado em microscópio óptico convencional. Assim, ao utilizar o feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas o sinal do detector é transmitido a uma tela catódica cuja varredura está sincronizada com aquela do feixe incidente. O sinal da imagem é gerado devido interação do feixe incidente com a superfície da amostra, o sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação tridimensional da imagem (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

No âmbito farmacêutico esta técnica é comumente aplicada para a obtenção de informações relacionadas aos cristais que compõem as matérias-primas utilizadas no desenvolvimento de formulações. Informações inerentes a tamanho, morfologia, homogeneidade dos cristais (GAO; LIN, 2010).

3.2.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS – X

A difração de raios X (DRX) é um dos métodos mais conhecidos e empregados para a caracterização de materiais, sendo rotineiramente utilizado na identificação de fases cristalinas. Este método se baseia no fato de cada substância cristalina tem apenas um diagrama de difração (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006; SILVA; IHA, 2010). A análise dos difratogramas obtidos nos experimentos de DRX permite distinguir, com exatidão, os diferentes arranjos dos átomos nos sólidos (STEPHENSON, 2000).

Quando um feixe de raios-X incide num cristal, ele é espalhado em um ângulo específico, uma vez que este ângulo de desvio da radiação é único para cada forma do cristal, denominado padrão de difração, assim podemos caracterizá-lo. As determinações de estruturas cristalinas desempenham um papel importante numa gama de aplicações científicas. Conhecendo-se a estrutura de um dado composto, é possível correlacionar estrutura com função e compreender certas propriedades físicas, químicas e biológicas (VENCATO, 1988).

Esta técnica na indústria farmacêutica é bem requisitada para a detecção e quantificação de transformações polimórficas em fármacos e determinação do estado cristalino, sendo a mais robusta técnica para a diferenciação de formas polimórficas de uma mesma amostra. Uma vez que o critério que define a existência do polimorfismo é a

demonstração de estruturas não equivalentes nas redes cristalinas (YU et.al., 2003; SILVA; IHA, 2010).

3.2.6. DISSOLUÇÃO

A Farmacopéia Brasileira (2010) define o teste de dissolução como um método que permite determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio dissolução quando o produto é submetido a ação de aparelhagem específica. Este ensaio constitui uma etapa muito importante para prever o desempenho *in vivo* de fármacos, representando uma alternativa para a avaliação de formas farmacêuticas sólidas, antes dos testes de biodisponibilidade, uma vez que absorção de uma fármaco oral é dependente da libertação e solubilização da substância ativa (OLIVEIRA et.al, 2009; MARTINS; PAIM; STEPPE, 2010; LU et.al., 2011; MARQUES-MARINHO, 2012; KASSAYE; GENETE, 2013; SANTOS et.al.; 2013).

Demonstra ser rápido, simples, viável e acessível, sendo necessário para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos para garantir a qualidade e atender as exigências regulamentares (LEE; RAW; YU, 2008). O teste de dissolução é normalmente utilizado para avaliar a qualidade lote a lote de um medicamento, orientar o desenvolvimento de novas formulações, assegurar de maneira contínua a qualidade do produto e o desempenho depois de algumas alterações tais como formulação, processo de fabrico, o local de produção e o aumento da escala de fabricação. O procedimento requer reprodutibilidade para as operações do dia-a-dia e robustez para que seja transferido entre laboratórios (USP 32, 2009; DIAS et.al., 2011).

A dissolução deve ter caráter discriminativo, sendo capaz de detectar mudanças na formulação, desde o fabrico às características físico-químicas do fármaco (polimorfismo, higroscopicidade, tamanho de partícula), pois estas alterações podem interferir na solubilidade e no desempenho do produto no organismo (PHARM. FORUM, 2004).

O ensaio é conduzido em um meio de volume que varia de 500 a 900 mL, de acordo com o especificado na monografia do produto, mantido à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante o período de ensaio. Para promover a agitação do meio a uma dada velocidade, o equipamento utiliza de uma haste de aço inoxidável, cuja extremidade se adapta uma cesta ou uma pá (USP 32, 2009; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Após o teste, a quantidade da substância dissolvida deve ser determinada por um método analítico adequado. Este método tem de ser suficientemente sensível, seletivo em presença de excipientes, robusto e rápido, pois os experimentos de dissolução geram um grande número de amostras

(POLONINI et.al., 2011). Para conferir credibilidade aos resultados é preciso uma seleção criteriosa das condições do ensaio, a fim de obter o máximo na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente pretendidos (MANADAS et al., 2002).

3.2.6.1 PRINCIPAIS FATORES QUE ALTERAM A DISSOLUÇÃO

Há inúmeros fatores que podem alterar os resultados de um ensaio de dissolução. Todos são relevantes, mas alguns devem ser rigorosamente monitorados para obtenção de resultados confiáveis (MARCOLONGO, 2003).

3.2.6.1.1. FÁRMACO E FORMULAÇÃO

As velocidades de dissolução e liberação do ativo podem ser afetadas por vários fatores, com destaque para as propriedades físico-químicas do fármaco (solubilidade, dimensão das partículas e o estado de cristalinização) e constituintes da formulação (FARINHA; PAIS; BICA, 1997).

As características de solubilidade dos fármacos os classificam através do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, segundo este sistema os fármacos são classificados em quatro classes. Classe I com alta solubilidade e permeabilidade, classe II com baixa solubilidade e alta permeabilidade, classe III com alta solubilidade e baixa permeabilidade e classe IV com baixas solubilidade e permeabilidade. Com isto é possível prever o comportamento do ingrediente farmacêutico ativo e planejar as melhores condições para veicula-lo em uma forma farmacêutica de forma a aumentar sua biodisponibilidade (MARCOLONGO, 2003).

O tamanho da partícula exerce influencia direta sobre a velocidade de dissolução, uma vez que, partículas de tamanhos reduzidos dispersam-se mais rapidamente pelos líquidos solventes. Entretanto, uma redução muito excessiva no tamanho da partícula de fármacos hidrofóbicos pode causar a formação de agregados que interferem na dissolução (VILA JATO, 2001). Quanto a cristalinidade, em geral substâncias amorfas e anidras são mais solúveis, respectivamente, que as cristalinas e hidratadas do mesmo fármaco (GIBALDI, 1991).

A formulação, assim como os processos tecnológicos para obtenção do medicamento podem modificar a liberação de fármacos, resultando em problemas de biodisponibilidade. Todos os excipientes contidos na formulação exercem alguma influencia na dissolução, seja

ela negativa ou positiva (MARCOLONGO, 2003). Como exemplo, podemos citar os lubrificantes insolúveis, como exemplo podemos citar o estearato de magnésio que retarda o processo de dissolução de maneira proporcional a concentração utilizada. Já o aumento da concentração de amido, diluente e desintegrante bastante utilizado, tende a facilitar a dissolução (ABDOU, 1989).

3.2.6.1.2. MEIO DE DISSOLUÇÃO

Os principais fatores relacionados ao meio de dissolução incluem o volume, a degaseificação, o pH e a temperatura. Os meios de dissolução preferíveis são o HCL (0,01 a 0,05 N), soluções tampão (fosfato ou acetato) de pH 1,2 a 6,8 e a água. Apesar de rejeitada por alguns autores, a utilização de água se justifica principalmente porque ela não exerce nenhuma ação corrosiva no equipamento e apresenta frequentemente resultados comparáveis aqueles obtidos quando se utiliza um meio ácido (ABDOU, 1989). O volume de meio a ser utilizado deve obedecer a condição *sink*, 5 a 10 vezes o necessário para saturação (MARQUES; BROWN, 2002).

A degaseificação do meio, quando necessário, contribui para evitar a formação de bolhas que possam interferir na velocidade de dissolução a ser medida (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A escolha do pH do meio deve considerar, principalmente, o tipo de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica (liberação imediata ou liberação controlada) e o sítio de absorção do mesmo (STORPIRTIS, 1999). É permitida uma variação de pH de $\pm 0,05$ em relação ao especificado na monografia do produto. A temperatura do meio deve ser monitorada para não permitir grandes variações, tendo em vista que normalmente temperaturas elevadas favorecem a dissolução e a solubilidade do fármaco (MARCOLONGO, 2003).

3.2.6.1.3. APARATO E ROTAÇÃO

O aparato é escolhido de acordo com o tipo de forma farmacêutica sólida a ser avaliada, normalmente utiliza-se o aparato pá para comprimidos e cesta para cápsulas. O aparato cesta é geralmente utilizado para formas não desintegrantes, com velocidade de agitação entre 50 a 150 rpm (USP 32, 2009). A utilização destes aparatos é simples, robusta, padronizada e utilizada a nível mundial, fundamentada numa ampla experimentação. Por este motivo são recomendados nos compêndios oficiais, como primeira escolha nos testes de

dissolução *in vitro* (MOLLER, SIEWERT, 1995; FARINHA et al., 1997).

A velocidade de rotação deve permitir a liberação adequada do fármaco, de maneira a não acelerar e retardar o processo de dissolução, admite-se uma variação de 4 a 5% na velocidade (MARQUES; BROWN, 2002; USP 32, 2009).

3.2.6.1.4. MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

Para a quantificação de fármaco dissolvido é imprescindível que não haja influência dos excipientes presentes na formulação. A espectrofotometria UV/VIS, devido a sua simplicidade e rapidez, é um método bastante utilizado. Outra alternativa muito utilizada atualmente é a cromatografia líquida, pois fornece versatilidade e possibilidade de automação (FORTUNATO, 2005).

3.2.6.2. PERFIL DE DISSOLUÇÃO

Para avaliar e comparar a cinética e eficiência de dissolução de um determinado produto, há três categorias de ensaios de dissolução: ensaio de dissolução em um único ponto; ensaio de dissolução de dois pontos e perfil de dissolução (maior ou igual a 5 pontos de coleta). A avaliação do perfil de dissolução permite visualizar como a dissolução ocorre em função do tempo e, desta forma, é mais conclusiva em relação a dissolução de um ou dois pontos (PHARM. FORUM, 2004; CHORILLI et. al., 2010).

Para a avaliação comparativa entre os perfis de dissolução empregam-se métodos, que podem ser classificados em: análise de variância (ANOVA); método modelo dependente; e método modelo independente (SERRA; STORPIRTIS, 2007). Os métodos baseados em ANOVA, calculam o grau de variância entre os perfis, demonstrando se há ou não diferença estatisticamente significativa. No modelo independente avalia-se o fato de diferença ($f1$) e o fator de similaridade ($f2$) da porcentagem de fármaco dissolvido entre um produto teste e um de referência. Já o modelo dependente abordam modelos matemáticos, em que seus parâmetros derivados se apliquem à comparação de perfis. Os modelos mais utilizados são o de cinética de ordem zero e de primeira ordem, Hixson-Crowell, Higushi, quadrático, Weibull, Gompertz, Baker-lonsdale e Korsmeyer-Peppas (POLLI; REKHI; SHAH, 1996).

3.2.7. VALIDAÇÃO

Validar significa reunir um conjunto de procedimentos que demonstrem que a metodologia em estudo é apropriada para a finalidade pretendida e capaz de gerar determinações confiáveis, sejam estas de caráter qualitativo, semi-quantitativo e quantitativo de fármacos ou outras substâncias. As instruções para a realização de uma validação estão especificadas em farmacopeias, resoluções, guias e se aplicam a técnicas analíticas, métodos não-cromatográficos, teste imunológicos ou microbiológicos (BRASIL, 2003; RIBANI et.al., 2004).

O processo de validação deve ser executado: nos casos em que há ampliação ou modificação no processo de fabricação; quando a qualidade final do produto apresentar caráter duvidoso; em equipamentos novos e na ocorrência de implantação de um processo ou método analítico novo (EMANUELLI; SCANDIUZZI, 2000; INMETRO, 2010).

Os ensaios submetidos à validação são classificados em quatro categorias (I, II, III, IV), de acordo com a sua finalidade. A categoria I se refere a testes quantitativos para a determinação do componente majoritário, a categoria II enquadra análises de elementos menores e traços, a categoria III está relacionada a teste de performance (dissolução, taxa de liberação) e na categoria IV estão os testes de identificação (INMETRO, 2010).

Para cada categoria há parâmetros que necessitam ser estimados durante a validação (BRASIL, 2003; ICH, 2005; MATIOLI; VALENTINI; SOMMER, 2007; INMETRO, 2010).

- Especificidade

Avalia a capacidade que o método possui de medir o analito de interesse em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Quando não se conhecem os interferentes, a especificidade pode ser investigada pela comparação dos resultados com outros métodos ou técnicas independentes.

- Linearidade

A linearidade de um método expressa a faixa na qual o sinal analítico, denominado variável dependente y , é linearmente proporcional à sua concentração, denominada variável independente x , e o modelo matemático que descreve esta dependência é conhecida como curva analítica ou curva de calibração (RIBEIRO et al., 2008). Deve ser determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir um

intervalo de 80% a 120 % da concentração teórica do teste. Sendo, obtida por expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + bx \quad (3)$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y , quando $x = 0$;

b = inclinação da curva analítica.

- Precisão/ Repetibilidade

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra. Comumente expressa pela precisão intra-dia (repetibilidade), precisão inter-dia (precisão intermediária). A precisão intra-dia é fundamentada na concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Já precisão inter-dia procura a convergência dos resultados no mesmo laboratório, com analistas e dias distintos. A interpretação deste parâmetro é feita em termos de desvio-padrão e desvio padrão relativo.

- Exatidão

A exatidão se expressa como a concordância entre os valores resultantes de um método analítico com os considerados verdadeiros. Esta propriedade pode ser estimada pela comparação dos resultados obtidos com material de referência ou com outro método validado cujo erro sistemático é reconhecido como não significativo.

- Limite de Quantificação

Corresponde a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob determinadas condições. Também denominado de Limite de Determinação, a concentração do analito corresponde ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão. Outra opção de cálculo baseia-se em nos limites de detecção e de

quantificação, pelo uso do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva de calibração construída em níveis próximos dos limites.

- Limite de Detecção

É a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Este critério é indicado para o tratamento de amostras em que os níveis do analito sejam baixos, como por exemplo, análise de traços, onde se faz importante estimar qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método.

- Robustez

Este critério visa averiguar se o método é capaz de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Verificando-se de maneira experimental a influência de fatores sobre a qualidade metrológica do resultado analítico. Uma vez confirmada a robustez de um método, isto indica que o mesmo pode ser desenvolvido por outros laboratórios e é propício a fornecer resultados confiáveis.

3.2.8. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV/VIS

As técnicas espectrofotométricas estão fundamentadas na absorção da energia eletromagnética por moléculas que depende tanto da concentração quanto da estrutura das mesmas. De acordo com o comprimento de onda da energia eletromagnética aplicada, a espectrofotometria de absorção pode ser dividida em ultravioleta, visível e infravermelho, podendo ser utilizada como técnica de identificação e quantificação de substâncias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

TABELA 1 – Faixas de comprimento de onda utilizados na espectrofotometria

Espectrofotometria	Faixa de comprimento de onda
Ultravioleta (UV)	190 – 380 nm
Visível (VIS)	380 – 780 nm
Infravermelho próximo (NIR)	780 – 2500 nm
Infravermelho médio (MIR)	4 – 25 μm
Infravermelho distante	25 – 300 μm

Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

Devido ao baixo custo, quando comparado a outras técnicas e ao grande número de aplicações desenvolvidas, é uma das mais utilizadas na rotina laboratorial. Tendo por base a medida de transmitância (T) e absorbância (A) de soluções que se encontram em cubetas transparentes que possuem um caminho óptico de L centímetros. Em geral esta técnica obedece a lei de Lambert-Beer, em que a luz incidente absorvida por uma solução num determinado comprimento de onda é relacionada linearmente com a espessura do caminho óptico e a concentração da amostra, tal como expresso na equação (TEIXEIRA et al., 2004; SKOOG; HOLLE; NIEMAN, 2006; ROCHA; FERREIRA et.al., 2013).

$$A = \epsilon cL \quad (4)$$

Onde:

A: absorbância;

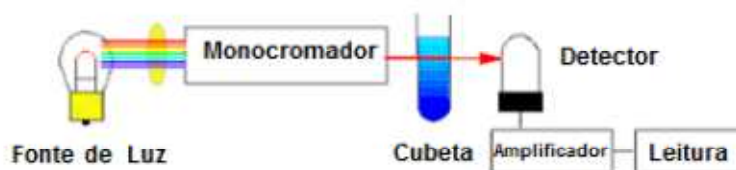
ϵ : absorvidade molar ($M^{-1} L^{-1} cm^{-1}$), próprio de cada substância a ser analisada;

c: concentração (M);

L: caminho óptico, espessura da cubeta (cm), geralmente 1 cm.

Com a aplicação de energia, os elétrons da amostra são excitados, com isto pode ocorrer à emissão de luz através de transições eletrônicas. A espectroscopia UV-Vis baseia-se em transições eletrônicas estimuladas por radiação luminosa na região ultravioleta e no visível (HARRIS, 2006). Genericamente os instrumentos espectroscópicos UV-Vis apresentam cinco componentes: (1) uma fonte de luz; (2) um monocromador que seleciona o comprimento de onda desejado; (3) cubeta para acondicionar a amostra; (4) um detector da radiação transmitida, que converte a energia radiante em um sinal elétrico mensurável; (5) unidade de para decodificação do sinal elétrico (Figura 6).

FIGURA 6 – Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro.



Fonte: adaptado de

https://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=espectrofotometria%20ultravioleta&lang=3

As principais variáveis capazes de influenciar no espectro de absorção compreendem o tipo de solvente, a temperatura, o pH da solução, os constituintes da amostra e a concentração destes. A análise de sistemas multicomponentes é uma limitação da técnica, A maioria dos métodos espectrofotométricos UV-Vis só podem ser aplicados com segurança na determinação de amostras contendo um único componente (SKOOG; HOLLE; NIEMAN, 2006).

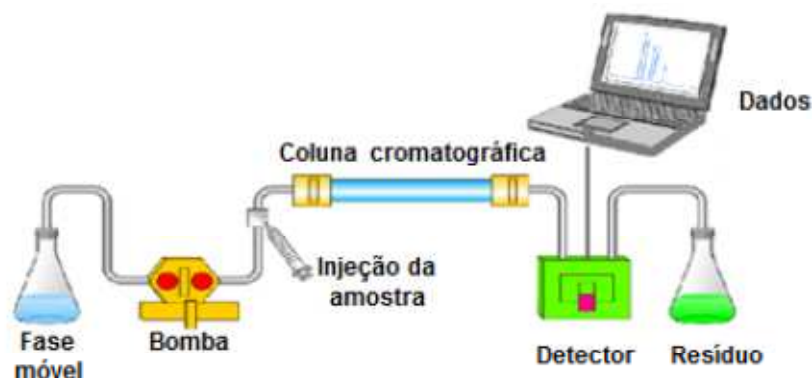
3.2.9. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida é uma técnica analítica de separação dos diversos constituintes de uma mistura, seja para identificação, quantificação ou obtenção de uma substância pura. Amplamente utilizada, a popularidade desta técnica é inerente a sua sensibilidade, acurácia nos resultados encontrados e acima de tudo sua aplicabilidade a substâncias que são de interesse primordial à indústria farmacêutica (SKOOG; HOLLE; NIEMAN, 2006).

Para a separação dos compostos de uma mistura, a CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) se fundamenta na migração da amostra conduzida por um fluido (fase móvel) através de um meio poroso e estático (fase estacionária). Assim, a diferença de interações entre os analito e o meio poroso resulta em diferentes tempos de migração de cada componente da amostra (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

O funcionamento de um sistema cromatográfico líquido é esquematizado na Figura 7. A bomba é o dispositivo que bombeia e controla o fluxo da fase móvel. O injetor tem a função de introduzir a amostra na porção inicial da coluna, por onde a fase móvel entra. A coluna está preenchida com a fase estacionária, que fornece a separação dos constituintes da amostra. O detector é responsável por identificar a presença dos compostos separados à medida que eluem da coluna cromatográfica e está ligado a um sistema computacional que registra e trata os dados gerando o cromatograma (SKOOG; HOLLE; NIEMAN, 2006; WATERS, 2013).

FIGURA 7 – Representação esquemática do funcionamento de um cromatógrafo líquido.



Fonte: adaptado de <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytical/hplc-analysis>

A técnica de CLUE (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência) é a principal ferramenta analítica aplicada em todos os estágios de desenvolvimento de medicamentos, entretanto, a CLUE surgiu consistindo da utilização da fase estacionária com partículas menores de 2 μm (enquanto colunas de CLAE são normalmente preenchidas com partículas de 3 a 5 μm), assim pressões cada vez maiores precisaram ser utilizadas para bombear a fase móvel pela coluna cromatográfica, empacotada com partículas cada vez menores (REDDY; BALAMMAL; KUMAR, 2012; KUMAR et.al., 2012).

O uso de partículas menores, acoplado a maior velocidade de fluxo da fase móvel confere a CLUE vantagens sob o CLAE: maior sensibilidade; rápido poder de resolução; redução no tempo de análise e a conseqüente diminuição do consumo de solvente; detectabilidade 2 a 3 vezes maior. Além disto, a transferência de um método já desenvolvido por CLAE para CLUE pode ser facilmente executada, deixando de ser um fator limitante (SWHARTZ, 2005; MALDANER; JARDIM, 2009).

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS

4.1.1. INGREDIENTE FARMACÊUTICO ATIVO

Ácido Lipóico; Lote 15042088B; Grau de pureza a 99%;

4.1.2. EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS

- Amido de milho: Henrifarma[®]/JKI023;
- Celulose microcristalina 101: Galeno[®]/6610103419;
- Dióxido de silício coloidal: Henrifarma[®]/ 3150091614;
- Talco: Sintetica[®]/ 43405143.

4.1.3. FORMULAÇÃO

As cápsulas foram produzidas, em uma farmácia de manipulação da cidade de João Pessoa – PB de acordo com o estudo de compatibilidade fármaco-excipientes realizado por Silva (2014), do presente grupo de pesquisa. Os componentes utilizados na produção das cápsulas estão dispostos na Tabela 2.

TABELA 2 - Componentes utilizados na formulação de ácido lipóico em cápsulas

Componentes	Concentração % (p/p)	Função
Acido lipóico	75,00	IFA
Amido de milho	18,25	Desintegrante
Celulose microcristalina 101	6,00	Diluyente
Dióxido de silício coloidal	0,25	Deslizante
Talco	0,50	Lubrificante

Fonte: SILVA, 2014.

4.1.4. AMOSTRAS PARA OBTENÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

Foram avaliadas amostras de cápsulas de liberação imediata contendo 300 mg de ácido lipóico provenientes de seis farmácias de manipulação e um laboratório farmacêutico, conforme descrito na tabela 3. A amostra do medicamento industrializado, foi adquirida em drogaria nos Estados Unidos da América (EUA), pois não há comercialização de cápsulas de ácido lipóico industrializadas fabricadas no Brasil. Já as cápsulas magistrais foram obtidas em farmácias de manipulação localizadas nas cidades de Campina Grande e João Pessoa no estado da Paraíba. Não tendo sido disponibilizados os excipientes, e suas proporções, utilizados na produção das amostras de cápsulas de AL obtidas.

TABELA 3– Descrição das cápsulas de ácido lipóico 300 mg adquiridas para realização dos perfis de dissolução.

Produto/Cápsulas	Sigla	Data de Fabricação	Data de Validade
Desenvolvidas na Pesquisa	DP	18-04-2015	15-10-2015
Industrializadas	I	15-07-2015	28-02-2018
Magistral 1	M1	11-09-2015	09-04-2016
Magistral 2	M2	11-09-2015	09-03-2016
Magistral 3	M3	11-09-2015	09-03-2016
Magistral 4	M4	11-09-2015	09-01-2016
Magistral 5	M5	11-09-2015	09-03-2016

4.2. MÉTODOS

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA – PRIMA

A caracterização da matéria-prima foi realizada utilizando o ácido lipóico na forma de pó puro e na sua forma recristalizada, através de métodos termoanalíticos, FTIR e DRX.

4.2.1.2. RECRISTALIZAÇÃO

O método de recristalização foi adaptado de Araújo (2009), onde avaliou-se inicialmente a solubilidade do fármaco nos solventes puros que foram: acetonitrila; etanol; metanol e acetona. Bem como na mistura destes solventes em acetonitrila:água; etanol:água; metanol: água; acetona:água, todos na proporção de 1:1 (v/v).

Com isto testou-se a utilidade do solvente na recristalização, através da solubilidade do soluto nos mesmos em temperatura ambiente, para isto pesou-se 25 mg do AL em balança analítica para cada solvente e adicionou-se de 5 a 10 gotas do solvente selecionado, bem como das misturas. O critério de exclusão utilizado foi que se o soluto se dissolvesse completamente, o solvente não era útil para a recristalização.

Após a seleção dos solventes e/ou misturas soluções de 0,10 mol L⁻¹ do ácido lipóico nos solventes e/ou misturas foram preparadas. Estas soluções foram agitadas por 15 min em agitador magnético ao abrigo da luz.

Uma vez concluída a agitação, transferiu-se as soluções de AL para tubos de ensaio e vedados com plástico filme, onde pequenas perfurações foram realizadas para evaporação do solvente. Com isto, as soluções foram mantidas em repouso em temperatura ambiente, em meio refrigerado a 4 °C e em estufa a 35 °C, todos armazenados ao abrigo da luz até a formação dos cristais. Após formação dos cristais, os mesmos foram retirados com o auxílio de uma pinça e postos para secagem a temperatura ambiente e armazenados em eppendorfs.

4.2.1.3. ESTUDO TERMOANALÍTICO (TG/DTG-DSC)

As curvas TG/DTG foram obtidas por meio do analisador termogravimétrico TG/DTA modelo SDT Q600 da TA Instruments[®]. Para caracterização do AL puro e seus cristais formado através do processo de recristalização, aproximadamente 4,00 mg das amostras foram pesadas em balança analítica sobre cadinho de alumina, onde outro cadinho foi utilizado como referência. As corridas foram realizadas em atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 50 mL.min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, em triplicata, com temperatura final de 900 °C. Os dados foram analisados, utilizando o software TA Universal Analysis 4.5A. Para o cálculo da DTG e análise das curvas obtidas foi utilizado o *software* TA Instruments Universal Analysis 2000[®].

As curvas DSC foram adquiridas através de analisador calorimétrico exploratório diferencial modelo DSC 8500 da PerkinElmer[®]. Utilizando-se cerca de 2,00 mg da amostra

em cadinho de alumínio hermeticamente fechado, sob atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 50 mL.min⁻¹, submeteu-se a amostra a um programa de temperatura de 10 °C.min⁻¹, com temperatura na faixa de 30 a 400 °C.

4.2.1.4. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para as análises espectroscópicas na região do infravermelho foram necessários cerca de 1 mg de cada amostra, as quais foram misturadas a 200 mg de brometo de potássio (KBr). Secou-se a mistura em estufa para retirada de umidade e em seguida pastilhas foram obtidas em prensa hidráulica e analisadas no equipamento. Os espectros das duas amostras foram obtidos em espectrofotômetro Hitachi, Modelo 1100, no número de onda entre 400 a 4.000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹. Identificando-se nos espectros os picos característicos dos grupamentos funcionais do fármaco.

4.2.1.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS – X

A caracterização cristalina e o perfil cristalino do AL foi obtido em difratômetro de raio-X Shimadzu modelo XRD-6000. Utilizando-se uma fonte de radiação de cobre CuK α = 1,5418 Å, corrente de 30 mA, tensão de 40 KV, velocidade de varredura de 2 θ /min e passo de 0,02 graus.

4.2.2. MANIPULAÇÃO DAS CÁPSULAS

As cápsulas foram manipuladas de acordo com a formulação proposta no item 4.1.3., envasada em cápsulas de tamanho 00 e o peso médio foi determinado seguindo os critérios da Farmacopéia Brasileira (2010). Vinte cápsulas foram pesadas individualmente e após remoção do conteúdo, foram novamente pesadas. Determinou-se o peso do conteúdo de cada cápsula cheia e a vazia, com os valores obtidos determinou-se o peso médio do conteúdo e os desvios individuais em relação ao peso médio. A variação permitida é de $\pm 7,5\%$ em relação ao peso médio. Foram toleradas não mais que duas unidades fora do limite especificado, mas nenhuma pode estar acima ou abaixo do dobro do percentual indicado.

4.2.3. ESTUDOS MICROMERÍTICOS

4.2.3.1. AVALIAÇÃO DO ÂNGULO DE REPOUSO (A)

A determinação do ângulo de repouso foi executada conforme método proposto por Prista, Alves e Morgado (1991) e Staniforth (2005), conforme a Figura 8. A mistura de pós, conforme a formulação descrita na Tabela 2 foi posta em um funil, deixando-o escoar e cair sobre uma superfície plana e livre de vibrações. Mediu-se a altura e o diâmetro do cone formado com o auxílio de um paquímetro. Calculou-se a média de três determinações e aplicou-se os dados a fórmula 5, em seguida caracterizou-se o pó de acordo com os critérios da Tabela 4.

$$\alpha = \frac{h}{D.2} \quad (5)$$

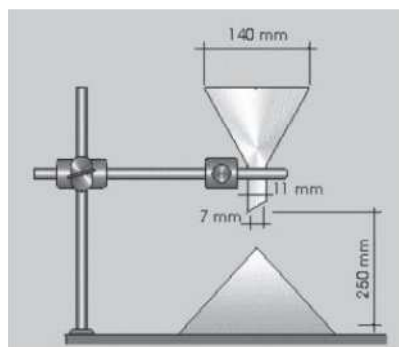
D.2

Onde: α : ângulo de repouso;

h: altura do cone;

D: diâmetro do cone.

FIGURA 8 – Aparato para determinação do ângulo de repouso.



Fonte: LAMOLHA; SERRA, 2007

TABELA 4 – Parâmetros para avaliação do ângulo de repouso

Ângulo	Características do fluxo
25-30°	Excelente
31-35°	Fluxo bom
36-40°	Aceitável
41-45°	Passável
46-45°	Pobre
56-45°	Muito Pobre
>65°	Extremamente Pobre

Fonte: USP 32, 2009.

4.2.3.2 VELOCIDADE DE ESCOAMENTO

Para avaliação deste parâmetro utilizou-se do mesmo aparato descrito no item 4.2.3.1., procedeu-se segundo as recomendações da Farmacopéia Americana (2009). Alíquotas de 10, 20, 30, 40 e 50 g da formulação foram submetidas a escoamento pelo funil, por meio de um cronômetro mediou-se o tempo em que a formulação levava para escoar totalmente através do funil.

4.2.3.3. DENSIDADE APARENTE E DE COMPACTAÇÃO

A metodologia para determinação das densidades foi adaptada da USP 32 (2009) e os experimentos foram realizados manualmente. Cerca de 10 g da amostra foram transferidas para proveta de 50 mL e observou-se o volume ocupado pela mistura de pós sem nenhuma compactação (volume inicial). Logo em seguida, a proveta contendo a formulação sofreu quedas numa altura em torno de 3 mm numa sequência de 10, 500 e 1250 impactos. A sequência de 1250 impactos foi repetida até que a diferença entre as leituras fosse inferior a 2% e observou-se. Estes ensaios foram conduzidos em triplicata e calculados pela razão entre o peso da amostra e o volume ocupado pelo pó na proveta, de acordo com as equações 6 e 7

$$\rho_a = m./V_{inicial} \quad (6)$$

$$\rho_c = m./V_{final} \quad (7)$$

Onde:

ρ_a : densidade aparente;

ρ_c : densidade de compactação;

m: massa da amostra;

$V_{inicial}$: volume do pó antes dos impactos;

V_{final} : volume do pó ao final sequência de impactos.

4.2.3.4 FATOR DE HAUSNER E ÍNDICE DE CARR

O Fator de Hausner (FH) e o Índice de Carr (IC) foram calculados, conforme as equações 1 e 2 apresentadas no item 4.2.3.3, a interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a Tabela 4.

TABELA 4 - Parâmetros para avaliação do fluxo do pó.

Fluxo	Índice de Carr (%)	Fator de Hausner
Excelente	< 10	1,00 – 1,11
Bom	11 – 15	1,12 – 1,18
Fraco	16 – 20	1,19 – 1,25
Mediano	21 – 25	1,26 – 1,34
Deficiente	26 – 31	1,35 – 1,45
Muito deficiente	32 – 37	1,46 – 1,59
Bastante deficiente	> 38	> 1,60

Fonte: USP 32 (2009)

4.2.4. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

A validação dos métodos de quantificação por espectrofotometria no UV/Vis e CLUE foi embasada em critérios estabelecidos pela Resolução nº 899, de 29 de Maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Official Methods of Analysis of AOAC International* (AOAC INTERNATIONAL, 2012) e *International Conference on*

Harmonization (ICH, 2005). Avaliando-se os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, especificidade/seletividade e robustez.

A validação por espectroscopia foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu® UVmini – 1240 , utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico e comprimento de onda de 333 nm. Já a validação pelo método cromatográfico foi realizada em cromatógrafo Shimadzu® equipado com duas bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20-AHT, forno para coluna CTO-20A, detector com comprimento de onda variável UV/Vis modelo SPD-20A, controlador CBM-20A, integrador automático computadorizado com software LC Solution®. Utilizando-se coluna C18 SHIM-PACK XR-ODS (d.i. 3,0mm x 50mm, 2,2 µm), a fase móvel que forneceu maior seletividade ao método foi constituída de uma mistura ACN:água acidificada com ácido fosfórico (70:30 v/v) a pH 2,5, no modo isocrático. As análises foram executadas em temperatura do forno a 30 °C, com fluxo da fase móvel a 0,2 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20,00 µL.

4.2.4.1. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE

A solução padrão contendo AL e matriz dos excipiente foi preparada solubilizando-se 300 mg de AL em água ultrapurificada, com a adição de 100 mg da mistura de excipientes (dióxido de sílicio coloidal, celulose microcristalina 101, talco farmacêutico e amido de milho), utilizados na formulação, cujas proporções estavam de acordo com os percentuais descritos na Tabela 2, em seguida, completou-se o volume do balão volumétrico para 500 mL com água.

A solução estoque de ácido lipóico na concentração de 600 µg. mL⁻¹, em água, foi usada para preparação da solução teste, na concentração de 300 µg. mL⁻¹, utilizando o mesmo veículo para diluição. Esta solução teste foi utilizada nos ensaios referente à precisão, exatidão e robustez do método.

4.2.4.2. VARREDURAS ESPECTRAIS.

Obtiveram-se os espectros de absorção e os cromatogramas na região do UV entre 200 e 400 nm da solução teste, para observação do comprimento de onda em que ocorre maior absorção espectral para o espectrofotômetro e pico de maior resolução e pureza cromatográfica na CLUE.

4.2.4.3. ESPECIFICIDADE

Realizaram-se duas varreduras entre 200 - 400 nm em espectrofotômetro e CLUE, sendo uma varredura com a solução composta apenas pelos excipientes utilizados na produção das cápsulas, e outra com uma solução de AL a $300 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

4.2.4.4. LINEARIDADE

A linearidade do método foi verificada pela construção da curva analítica, a partir de diluições da solução estoque de ácido lipóico a $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando-se 6 (seis) pontos na faixa de concentração de 30, 75, 150, 300, 450 e $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Estas concentrações seguiram um intervalo de 80 a 120% da concentração teórica do teste ($300 \mu\text{g.mL}^{-1}$), com três réplicas para cada nível de concentração.

As leituras das amostras, foram realizadas em espectrofotômetro e em CLUE na região UV a 333 nm e 215 nm, respectivamente. A curva analítica principal foi construída a partir dos valores médios de 3 (três) curvas analíticas, plotou-se os valores da concentração em função da absorbância para a espectrofotometria e os valores da concentração em função da área para a cromatografia. Com isto, o coeficiente angular da reta, o seu ponto de intersecção e o coeficiente de correlação (R^2) foram calculados pelo método dos mínimos quadrados, admitindo-se como critério de aceitação um R^2 maior ou igual a 0,99. Além disto, para cada nível de concentração estimou-se o desvio padrão relativo.

4.2.4.5. PRECISÃO

O parâmetro da precisão foi avaliado em dois níveis, a partir de soluções a 100% da concentração teórica admitida para a realização destes experimentos ($300 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As precisões foram determinadas pelo DPR (desvio padrão relativo) das absorbâncias encontradas e pelo teste estatístico ANOVA.

4.2.4.5.1 PRECISÃO INTRA-DIA (repetibilidade)

Foram preparadas 7 (sete) soluções de AL na concentração $300 \mu\text{g. mL}^{-1}$, as soluções foram analisadas logo após o preparo da amostra e ao final do dia, cerca de 8 (oito) horas depois, totalizando 14 (quartoze) determinações. Todo o experimento foi conduzido por um único analista, utilizando o mesmo equipamento em dois dias consecutivos.

4.2.4.5.2 PRECISÃO INTER-DIA (precisão intermediária)

Para este critério avaliou-se a concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório, mas em dias e analistas diferentes. Esta precisão foi verificada num total de 14 (quatorze) determinações de uma solução a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AL em 2 (dois) dias diferentes.

4.2.4.6. EXATIDÃO

A exatidão dos métodos foi determinada após o estabelecimento da linearidade e da especificidade, sendo verificada a partir de 9 (nove) determinações dentro da faixa linear, ou seja, 3 (três) concentrações, com 3 (três) réplicas cada. Assim, analisou-se soluções de concentração baixa ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$), média ($300 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e alta ($600 \mu\text{g.mL}^{-1}$), dentro dos limites da linearidade definidos anteriormente.

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$E (\%) = \frac{\text{CME} \times 100}{\text{CMT}} \quad (8)$$

Onde:

E (%): exatidão em porcentagem;

CME: concentração média experimental;

CMT: concentração média teórica.

4.2.4.7. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os valores dos limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram calculados em três níveis de confiança (95, 99 e 99,9%) utilizando-se de uma planilha disponibilizada *on line* por Ribeiro et.al. (2008), tendo como base os valores dos parâmetros obtidos da curva de calibração, que são o desvio padrão da resposta e o coeficiente angular da curva.

4.2.4.8. ROBUSTEZ

Determinou-se a robustez do método em triplicata em soluções de concentração de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o método espectrofotométrico variou-se a temperatura e o potencial hidrogênionico (pH) da solução, já para CLUE variou-se a proporção da fase móvel, temperatura e a vazão da fase móvel. Todas estas modificações foram variadas a $\pm 5\%$. Verificou-se estatisticamente o nível de significância destas alterações aplicando-se no tratamento de dados ANOVA.

4.2.5. MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

A dissolução para as cápsulas de ácido lipóico foi testada em diferentes meios e condições de análise a fim de se obter e sugerir outras possibilidades para avaliação da dissolução destas cápsulas.

Após definir as condições em que as análises seriam conduzidas, realizou-se a avaliação da robustez do método antes de iniciarmos o teste de dissolução propriamente dito, para avaliar a adaptação do método as condições do laboratório. Considerando-se variações de temperatura, pH do meio e rotação. Cada parâmetro foi variado em $\pm 5\%$ das condições padrões.

Em seguida as cápsulas manipuladas foram submetidas à dissolução com base nas especificações (Tabela 5) contidas na monografia do AL na USP 32 (2009).

TABELA 6 - Especificações para a determinação do perfil de dissolução do ácido lipóico.

Parâmetros	
Temperatura	37 ± 0,5 °C
Sistema de agitação	1 (cesta - 40 mesh)
Velocidade	100 rpm
Meio de dissolução	Água ultrapurificada
Volume do meio	900 mL
Alíquota amostrada	10 mL
Tempo de amostragem	60 min
Detecção	Espectrofotometria UV (333 nm) Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - UV (215 nm)

As alíquotas coletadas em 60 minutos foram filtradas adequadamente para a análise espectrofotométrica a 333 nm. Testou-se 6 (seis) cápsulas para avaliar se o método validado estava apto para quantificar o teor de fármaco dissolvido. O teor de ácido lipóico dissolvido no meio foi obtido empregando-se o valor da absorbância na equação da reta obtida na construção da curva de calibração mostrada anteriormente. Os valores obtidos foram expressos através de percentual dissolvido (Q%).

4.2.7. PERFIL DE DISSOLUÇÃO

O perfil de dissolução das cápsulas de ácido lipóico foi conduzido utilizando-se 12 unidades de cada amostra nas mesmas condições descritas na tabela 6, no item 4.2.5. Alíquotas de 10 ml foram retiradas nos intervalos de 10, 20, 30, 50, 60 e 90 minutos. Em seguida filtradas em filtros de seringa e analisadas em espectrofotômetro UV/Vis a 333 nm, utilizando água como branco, e em CLUE/UV-Vis a 215 nm. Os valores das porcentagens dissolvida em cada tempo de coleta foram corrigidos, considerando que não houve reposição do volume retirado do meio de dissolução.

4.2.7.1 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE A ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS E CLUE

Os métodos quantitativos desenvolvidos para determinação do teor dissolvido de ácido lipóico veiculado em cápsulas foram avaliados através de testes estatísticos, utilizando os valores de percentual dissolvido dos perfis de dissolução obtidos.

Os perfis de dissolução obtidos de cada metodologia analítica foram comparados por ANOVA e pela construção do diagrama de Youden (elipse de confiança). A elipse de confiança se baseia na elaboração de um diagrama de dispersão dos resultados, associados a uma região de confiança (elipse) a 95%, esta técnica permite visualizar de forma rápida e simples a semelhança ou diferença entre duas metodologias distintas que se propunham a um mesmo objetivo (INSTITUTO ADOLPHO LUTZ, 2016).

4.2.7.2. AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

4.2.7.2.1 EFICIÊNCIA DE DISSOLUÇÃO

A eficiência de dissolução (ED%) foi calculada de acordo com Khan (1975), por meio da razão entre a área sob a curva do tempo 0 a 90 min (ASC_{0-90}) e a área total do retângulo (ASC_{TR}) (eq. 9). De modo que ASC_{0-90} foi estimado pelo método dos trapézio e ASC_{TR} compreendeu o cálculo da área considerando-se 100% de dissolução no tempo de 90 min. Assim, utilizou-se a equação 9 descrita a seguir:

$$ED \% = \frac{ASC_{0-90}}{ASC_{TR}} \times 100\% \quad (9)$$

Os resultados obtidos foram submetidos a teste estatístico ANOVA, para averiguar possíveis diferenças significativas entre os perfis de dissolução das amostras, em seguida aplicou-se o teste de Tukey, para determinar em quais amostras se estabelece essa diferença, caso exista.

4.2.7.2.2 FATORES DE DIFERENÇA E SIMILARIDADE

A comparação dos perfis obtidos no presente estudo foi realizada através da determinação dos fatores de diferença (f_1) e similaridade (f_2) descritos por Moore; Flanner (1996).

O fator de diferença (f_1) indica a porcentagem de diferença entre os dois perfis de dissolução. Enquanto que o fator de similaridade (f_2) é um logaritmo recíproco da transformação da raiz quadrada da soma do erro quadrado e indica a média da similaridade da porcentagem de dissolução entre os dois perfis. Estes fatores foram calculados de acordo com as equações 10 e 11 abaixo:

$$F_1 = \left[\frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{i=1}^n R_t} \right] \times 100 \quad (10)$$

$$F_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (11)$$

Onde:

n = número do tempo;

R_t = valor de referência da dissolução do grupo de tempo t ;

T_t = valor do teste de dissolução do grupo de tempo t .

A semelhança ou equivalência entre dois perfis é observada quando os valores de f_1 se apresentarem entre 0 e 15 e os de f_2 , entre 50 e 100, segundo a Resolução n. 31 (BRASIL, 2010).

4.2.7.2.3 CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO

Os perfis de dissolução foram aplicados a quatro modelos cinéticos: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell, cujas equações estão descritas na Tabela 7, para determinação da cinética de dissolução.

TABELA 7 – Ordem/modelos de cinética de dissolução usados na avaliação do perfil de dissolução de cápsulas de ácido lipóico.

Ordem/modelo	Equação*
Ordem Zero	$Q_t = Q_0 - K_0 t$
Primeira Ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 - K_1 t$
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$
Hixson-Crowell	$Q_t^{1/3} = Q_0^{1/3} - K_C t$

* Q_t - quantidade de fármaco liberado no tempo t ; Q_0 - quantidade inicial de fármaco em solução; K_0 , K_1 , K_H , K_C , - constantes de liberação de ordem zero, de primeira ordem, de Higuchi e de Hixson-Crowell, respectivamente; t - tempo.
Fonte: MAHLE et.al., 2008.

Para seleção do modelo matemático que melhor representou cada perfil de dissolução, foram realizados estudos de regressão linear para cada modelo, determinando-se a equação da reta. Com isto, o modelo mais adequado foi selecionado a partir do coeficiente de correlação de Pearson (r) mais próximo de um.

Os parâmetros cinéticos dos perfis de dissolução foram estimados a partir das equações definidas pelo modelo matemático que apresentou reta de regressão com coeficiente de correlação de Pearson (r) mais próximo da perfeita linearização. Assim, através da equação da reta de regressão, calcularam-se as seguintes constantes:

- Constante de velocidade de dissolução (k): corresponde ao coeficiente angular da reta de regressão;
- Tempo de meia-vida de dissolução ($t_{50\%}$): tempo necessário para que 50% do ácido lipóico seja dissolvido;
- Quantidade de fármaco dissolvido após 60 min do teste de dissolução (Q_{60}): a monografia do ácido lipóico, contida na USP 32 (2010), afirma que o Q_{60} para cápsulas deve ser de pelo menos 70% da quantidade total declarada.

4.2.7.2.4 ESTATÍSTICA

Os valores referentes a ED% foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Em seguida, os resultados foram comparados pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram

considerados estatisticamente significativos (DOWNING; CLARK, 2006). Os métodos foram comparados estatisticamente aplicando-se o teste da região elíptica de confiança conjunta (EJCR, do inglês *Elliptical Joint Confidence Region*) aos resultados dos perfis obtidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO INGREDIENTE ATIVO FARMACÊUTICO

5.1.1.2. RECRISTALIZAÇÃO

O objetivo da recristalização é a obtenção de compostos sólidos com um alto grau de pureza, para que se observem com maior precisão os eventos físico-químicos relacionados à determinada substância (ZANG et al., 2004). Este método também é útil para a identificação de polimorfismo, de modo que muitas substâncias são capazes de adquirir formas cristalinas puras, identificáveis e definidas ou formas amorfas em meio a variações de temperatura, solventes, dentre outras (PETRUSEVSKI et al., 2013).

Após a avaliação dos solventes que seriam utilizados na recristalização, escolheu-se aqueles que não solubilizaram o AL completamente, sendo estes a acetonitrila, metanol e acetona. Onde a formação de cristais só ocorreu em solução de $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ do ácido lipóico em metanol sob refrigeração a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, de modo que a formação dos cristais cessou no terceiro dia após o preparo da solução. A Figura 9 mostra a formação de cristais em metanol.

FIGURA 9 – Formação dos cristais em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ do ácido lipóico em metanol a 4°C .



Fonte: Dados da pesquisa

Ao observar-se que a formação dos cristais havia cessado, os mesmos foram retirados cuidadosamente e postos para secagem em temperatura ambiente. A Figura 10 demonstra o aspecto dos cristais formados.

FIGURA 10 – Formação dos cristais em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ do ácido lipóico em metanol a 4°C .

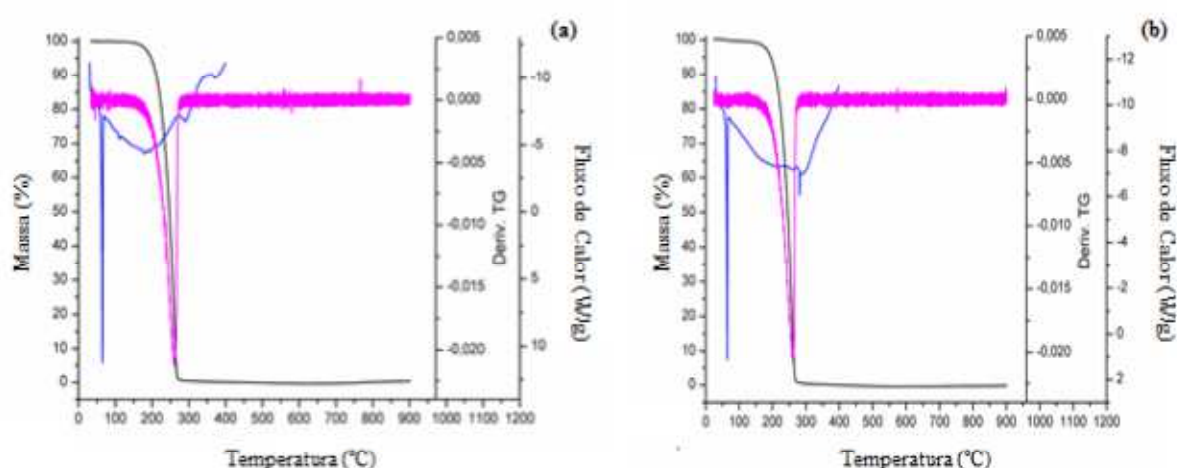


Fonte: Dados da pesquisa

5.1.1.3. ESTUDO TERMOANALÍTICO (TG/DTG-DSC)

O ácido lipóico e sua forma recristalizada foram submetidos à análise térmica. As curvas TG/DTG e DSC das amostras estão demonstradas na Figura 11.

FIGURA 11 – Perfil térmico do AL (a) e AL recristalizado (b)



As curvas TG do ácido lipóico e do ácido lipóico recristalizado apresentaram apenas uma etapa de perda de massa correspondente à decomposição e carbonização do produto

(Figura 11a). O ácido lipóico apresentou o evento de decomposição entre 232,34 e 266,35 °C, a perda de massa se deu em um percentual de 96,67%.

Já para a recristalizado (Figura 11b) observou-se que a decomposição ocorreu na faixa de temperatura de 232,63 °C a 266,19 °C e o percentual massa perdida foi de 96,07%.

Em estudos termogravimétricos realizados por Silva (2014) com o AL, encontraram-se valores similares aos encontrados para as amostras analisadas, com valores de decomposição entre 234- 268 °C com percentual perda de massa média a 97,98%. Já Portela et al. (2012), obteve valores entre 233,48 - 265,76 °C. Kacso et al. (2012), relatou um único estágio de perda de massa a 97,06% no intervalo de temperatura entre 150 - 300 °C. Diante disto, observa-se a convergência da maioria dos resultados encontrados com a literatura, tanto para o ácido lipóico e seu cristal.

As curvas de DSC de cada amostra de AL (Fig. 11a) e seu recristalizado (Fig. 11b), apresentaram um evento endotérmico inicial com pico máximo em 64,92 °C ($\Delta H_{\text{fus}} = 140,06 \text{ J.g}^{-1}$) e 64,67 °C ($\Delta H_{\text{fus}} = 146,71 \text{ J.g}^{-1}$), respectivamente, estes picos estão relacionados ao ponto de fusão das amostras. Estes valores não estão de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Britânica (2009), que estima para o ácido lipóico ponto de fusão entre 61 e 62 °C, entretanto, os pontos de fusão encontrados na literatura variam de 60 a 66 °C (RENTFROW et al., 2004; MOYANO; BROUSSALIS; SEGALL, 2010; IKUTA et al., 2013; PORTELA et al., 2013; RACZ et al., 2013; WANG et al., 2013).

Na faixa de temperatura dos pontos de fusão as curvas TG/DTG não mostraram qualquer variação de massa. O segundo evento observado na curva DSC do AL foi também endotérmico, o qual teve início após a completa fusão da substância e corresponde ao seu estágio de decomposição térmica. A tabela 8 resume as condições termoanalíticas encontradas.

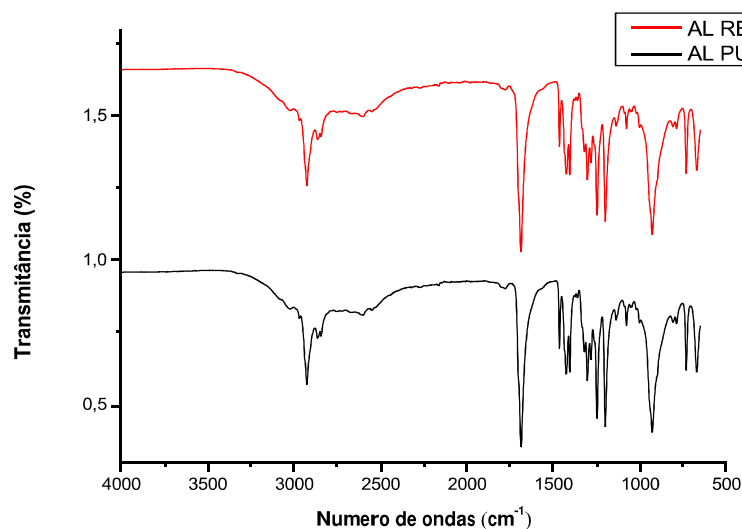
TABELA 8 – Dados termoanalíticos das Curvas TG/DTG e DSC

Amostra	TG/DTG			DSC		
	$T_{\text{onset decomposição}} / ^\circ\text{C}$	$T_{\text{endset decomposição}} / ^\circ\text{C}$	$\text{DTG}_{\text{pico}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_m / \%$	$T_{\text{pico}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{\text{fus}} / \text{J.g}^{-1}$
AL	232,63	266,19	261,09	96,07	64,92	146,71
Cristais	232,34	266,35	260,74	96,67	64,67	140,06

5.1.1.4. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para verificação de possíveis modificações químicas na estrutura molecular do AL após a recristalização, entretanto ao observar a Figura 12 nota-se que os espectros obtidos são iguais.

FIGURA 12 - Espectros na região do infravermelho (4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1}) para AL e AL recristalizado.



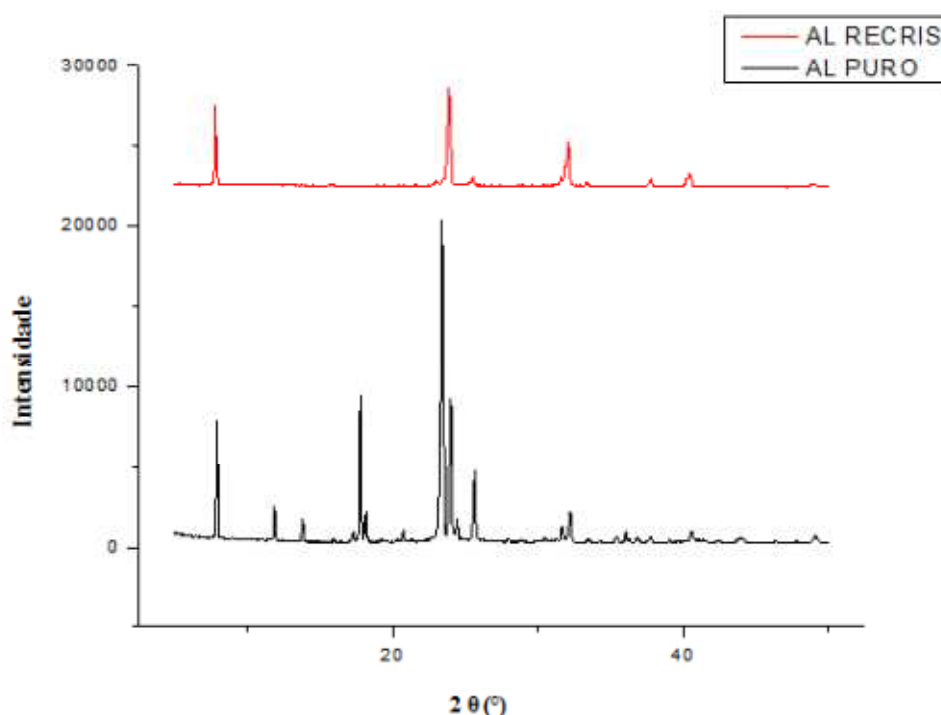
Os resultados destes espectros corroboraram com os obtidos por Trombino et al. (2012) e Silva et al. (2015). As características mais relevantes identificadas nestes espectros foram a banda de absorção em 2.927 cm^{-1} inerente ao alongamento do CH_2 e em 1.691 cm^{-1} observou-se um pico associado ao grupo ácido carboxílico, correspondente ao alongamento do grupo COOH (BALC; AKKAYA; AKYUS, 2010). As bandas de absorção que caracterizam a ponte dissulfeto (S-S) e a ligação C-S são bastante fracas e instáveis, entretanto foram identificadas em 671 cm^{-1} (IKUTA et al., 2014).

Assim constatam-se que as amostras apresentaram espectros idênticos e estão de acordo com o descrito pela literatura.

5.1.1.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS – X

A cristalização está relacionada à aglomeração das moléculas para formação de cristais, onde as interações com os solventes estimulam ou inibem este processo, os mecanismos que envolvem a formação destes cristais ainda não foi elucidado (LAHAV; LEISEROWITZ, 2001; BLADGEN et al., 2007) A Figura 13 apresenta o gráfico de difração de raios-x das amostras.

FIGURA 13 - Difratomogramas de AL e AL rescrystalizado.



O ácido lipóico puro apresentou vários picos associados à cristalinidade e bem definidos, sendo mais intensos os que ocorreram a 23,32°; 23,98°; 25,60° e 32,16° (ATSUSHI et al., 2010; BORBA et al., 2014). De forma que o gráfico de DRX para a recristalização apresenta os principais picos associados à cristalinidade, porém com menor intensidade.

Pornsak; Burapapadh (2015) relatam que em estudos de recristalizações feitas com itraconazol, constataram que os solventes orgânicos utilizados para o processo de obtenção dos cristais promoveram a diminuição da cristalinidade destes pela aglomeração das moléculas para a formação dos cristais. Uma vez que não houve alterações significativas nos demais testes de caracterização e desta forma não se considerou a presença de polimorfismo.

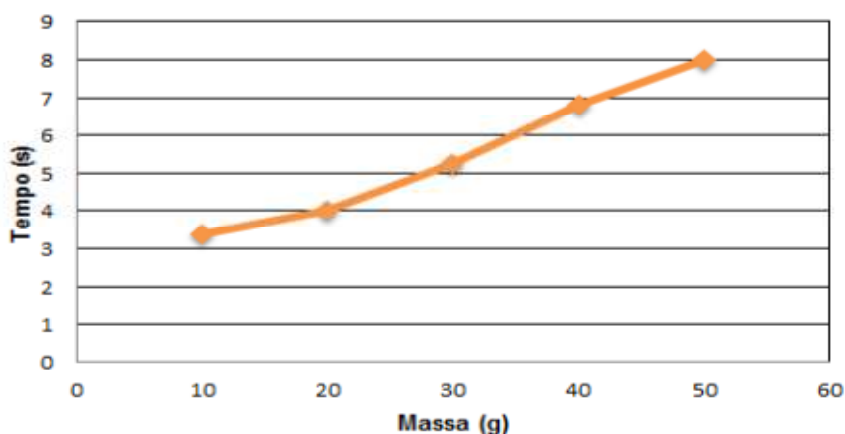
Diante de tais considerações, e dos resultados obtidos nos demais testes para caracterização, é possível constatar que o fármaco utilizado para a produção das cápsulas apresenta pureza considerável e não possui polimorfismo que possa vir a alterar os resultados das análises posteriores como, por exemplo, a dissolução *in vitro*.

5.2. ESTUDO MICROMÉRITICO

As propriedades de fluxo da formulação de ácido lipóico foram determinadas a partir do ângulo de repouso, Fator de Hausner (FH), Índice de Carr (IC) e velocidade de escoamento. O ângulo de repouso avalia diretamente a capacidade de um pó em fluir livremente através de um orifício para uma superfície livre e estar relacionado ao atrito interparticular ou resistência ao movimento entre as partículas (PRISTA, 2003; USP 32, 2009). De maneira que, quanto maior o ângulo de repouso pior é o fluxo do pó. Para Allen, Popovich e Ansel, 2007; Staniforth, 2005 e Emery et al., 2009 os principais fatores que influenciam este ensaio são formato da partícula, densidade, carga eletrostática e umidade. Averiguando-se o valor obtido, afirma-se que o ângulo de repouso encontrado foi de 34°, o qual segundo a USP 32 (2009), caracteriza o pó como sendo de fluxo bom.

Outra propriedade que caracteriza a resistência ao movimento das partículas é a velocidade de escoamento, sendo afetado pelos mesmos critérios do ângulo de repouso. A determinação da velocidade de escoamento está ilustrada na Figura 14 que correlaciona o tempo de escoamento pelo funil, em segundos, em função da quantidade de pó utilizada no experimento, em gramas.

FIGURA 14 - Gráfico representando os resultados da determinação da velocidade de escoamento da mistura de pós.



Pela análise visual do gráfico é possível constatar um escoamento rápido e com tendência linear, na medida em que se aumentou a massa.

As densidade aparente e de compactação foram determinadas para calcular o FH e IC. Aulton (2005) afirma que a densidade aparente é uma característica do pó como um todo e não das partículas individuais que o compõem, enquanto que a densidade aparente é estimada quando o pó atinge um arranjo de empacotamento invariável.

TABELA 9– Volumes obtidos na determinação da densidade bruta e de compactação das amostras de AL

Parâmetros	Amostra ± DPR (%)
Massa (g)	9,15± 1,73
V ₀ (mL)	25± 1,52
V ₁₀ (mL)	18± 1,15
V ₅₀₀ (mL)	17± 1,15
V ₁₂₅₀ (mL)	17± ,15

O FH e o IC estão relacionados, respectivamente, ao atrito entre as partículas e a capacidade de escoamento do pó (SILVA, 2009). Os valores obtidos de FH e IC (Tabela 10) atribuiu ao pó um fluxo de característica mediana.

TABELA 10 – Parâmetros obtidos no ensaio micromerítico das amostras de AL

Ensaio	Amostra ± DPR (%)
α (°)	34 ± 1,66
ρ_a (g.mL ⁻¹)	0,51 ± 1,24
ρ_c (g.mL ⁻¹)	0,38 ± 1,50
FH	1,34 ± 0,42
IC (%)	25 ± 0,23

Os excipientes selecionados para compor a formulação permitiram uma melhora significativa no fluxo de AL, visto que SILVA (2010) constatou em experimentos anteriores que o ácido lipóico não apresentava fluxo. Esta ausência de fluxo, frequentemente está

correlacionada à adesão das partículas de pó ao funil e a atração entre as partículas devido à elevada carga eletrostática característica do AL.

SILVA (2010) ainda afirma que o pó de AL é constituído por cristais lamelares, com tamanhos diversificados e formas irregulares. Divergindo da característica ideal abordada por Wells (2005), o qual retrata que quanto mais arredondada é uma partícula, menores serão os espaços de ar dentro das misturas de pós, facilitando assim o seu rolamento e consequentemente seu escoamento.

5.3. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

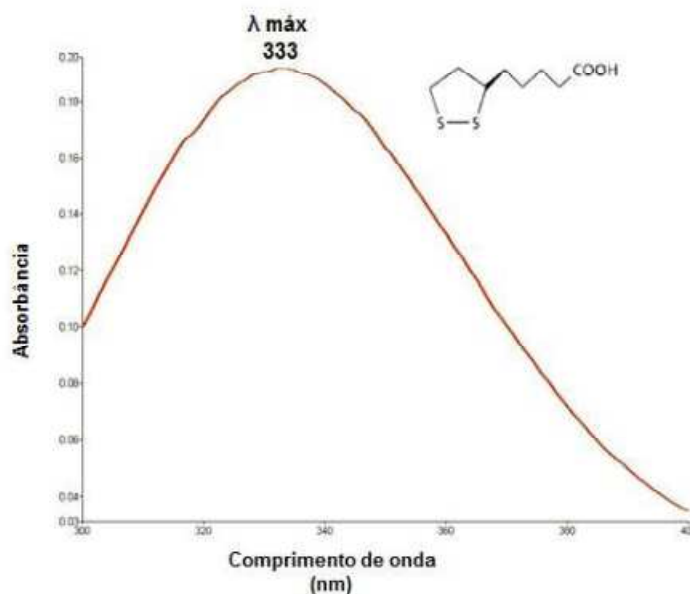
A validação é um mecanismo capaz de demonstrar, através de ensaios experimentais, que o método é apropriado e confiável para os fins que se destina. Sendo essencial que os resultados sejam representativos e conduzidos dentro de uma faixa de concentração adequada, evitando-se assim grandes variabilidades (RIBANI et.al., 2004; BORBA et.al., 2013). Deste modo, o processo de validação conduzido para determinação do percentual de dissolução do AL em espectrofotômetro UV/Vis e CLUE, teve como critérios a avaliação da especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

5.3.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS

5.3.1.1 VARREDURAS ESPECTRAIS

Antes de iniciar o processo de validação foi identificado o pico máximo de absorção do ácido lipóico, por meio de varreduras. Assim foi constatado um absorção máxima no comprimento de onda de 333 nm (Figura 15). Resultado semelhante com o descrito por Billgren et al., (2010), o qual afirma que este comprimento de onda está relacionado ao anel ditiolano presente na molécula.

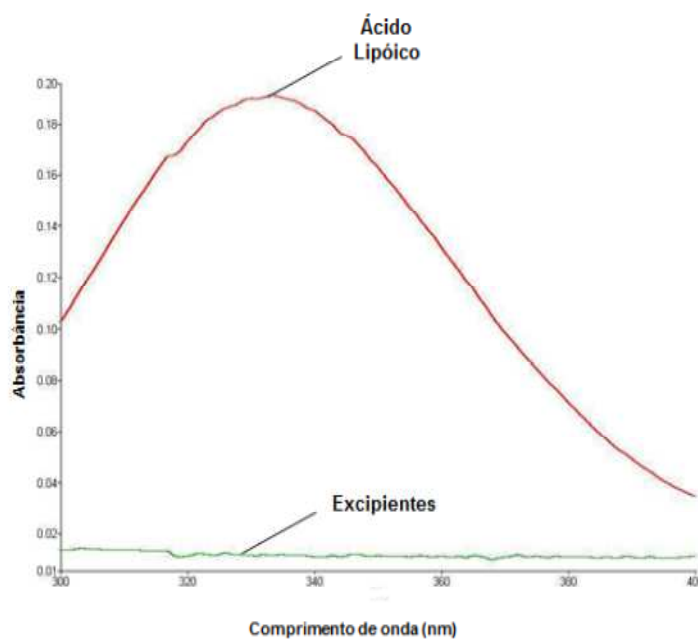
FIGURA 15 – Espectro de absorção do ácido lipóico na região UV.



5.3.1.2 ESPECIFICIDADE

Os espectros obtidos na faixa de 300 a 400 nm para uma solução de AL a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para uma solução composta apenas pelos excipientes presentes na formulação estão compilados e demonstrados na Figura 16.

FIGURA 16 – Espectro na região UV do ácido lipóico e dos excipientes que constituem a formulação.



Observando-se os espectros, é possível afirmar que o método é adequado em relação à especificidade, pois não há pico de absorção dos excipientes no comprimento de onda característico para o AL.

5.3.1.3. LINEARIDADE

Construiu-se uma curva analítica seguindo as recomendações da resolução e guias supracitados, com seis pontos de concentração, dentro do intervalo de 80 a 120% da concentração teórica do teste ($300 \mu\text{g. mL}^{-1}$). As médias dos valores das absorbâncias para cada concentração estão dispostas na Tabela 11, bem como seus desvios padrões relativos.

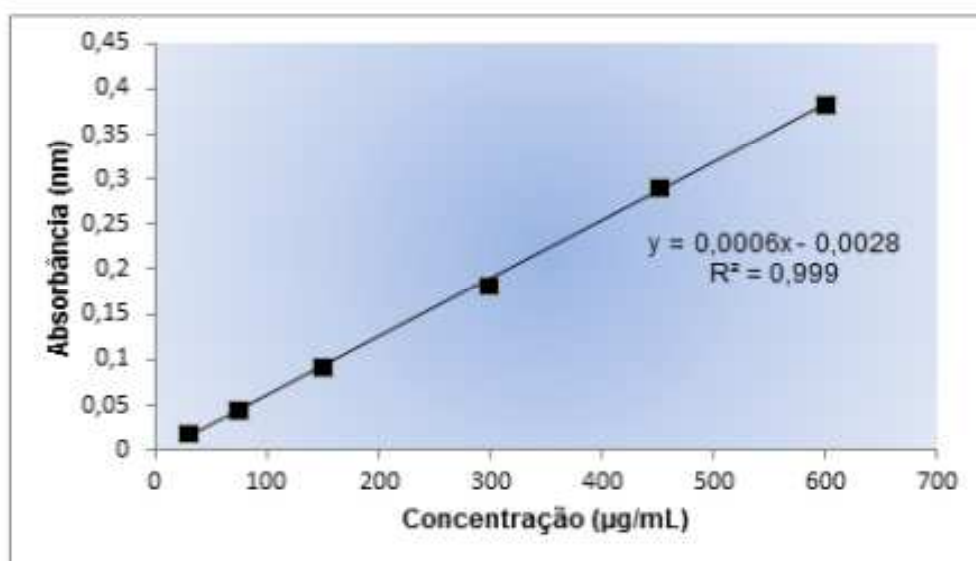
TABELA 11– Valores de absorbância obtidos na construção da curva analítica de AL.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	30	75	150	300	450	600
Absorbâncias médias	0,0192	0,0437	0,0922	0,1811	0,2732	0,3638
	0,0196	0,0432	0,0897	0,1815	0,2790	0,3620
	0,0199	0,0428	0,0925	0,1834	0,2748	0,3610
Média	0,0196	0,0432	0,0915	0,182	0,2757	0,3623
DPR (%)	1,03	1,04	1,68	0,55	1,09	0,39

Vale ressaltar que um dos menores desvio padrão observado foi para a concentração teórica admitida para o desenvolvimento dos ensaios de validação, assim possivelmente há menor probabilidade de resultados com valores fortemente dispersos.

A Figura 17 demonstra a curva de calibração e a equação da reta determinada pelo método dos mínimos quadrados. Este modelo matemático é utilizado para determinar os parâmetros de uma relação entre duas ou mais grandezas de um fenômeno ou o valor mais provável de uma grandeza medida várias vezes.

FIGURA 17 – Curva analítica do AL nas concentrações de 30, 75, 150, 300, 450, 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ obtida por espectrofotômetro UV/Vis.



Com base na RDC 899/03, o coeficiente de correlação apresentou-se dentro do especificado $R^2 = 0,99$, ou seja, há correlação linear entre as concentrações e as absorbâncias na faixa de concentração estabelecida.

5.3.1.4 EXATIDÃO

A exatidão permite comprovar a proximidades dos resultados obtidos pelo método, em relação ao resultado admitido como verdadeiro. Desta forma, determinou-se a exatidão dos resultados em três concentrações diferentes, eleitas como baixa, média e alta. Assim, obtiveram-se exatidões que variaram de 101,40 a 102,66% em concordância ao valor verdadeiro. O intervalo aceitável é 95-105% (BRASIL, 2003).

TABELA 12 – Valores da exatidão em três níveis de concentração de AL.

Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média da Concentração Real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão (%) \pm DPR
75	76,72	102,33 \pm 1,00
300	308,00	102,66 \pm 0,68
600	608,44	101,40 \pm 0,39

5.3.1.5 PRECISÃO

Os valores das absorvâncias e dos desvios padrões relativos da precisão intra-dia e inter-dia obtida estão dispostos na Tabela 13 e 14, respectivamente. A avaliação dos dados foi feita em termos de desvio padrão e por meio de método estatístico ANOVA, cujos resultados estão designados na Tabela 15.

TABELA 13 – Valores obtidos na precisão intra-dia em soluções de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AL.

Período	Manhã	Tarde
Concentrações Médias ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	310,83	310,00
	312,00	312,50
	311,33	311,50
	313,00	314,00
	311,66	309,16
	325,33	309,50
	321,50	310,83
DPR médio (%)		1,48

TABELA 14– Valores obtidos na precisão inter-dia em soluções de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AL.

Analista	Analista 1	Analista 2
Concentrações Médias ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	310,50	319,33
	312,16	320,66
	311,50	319,00
	313,50	318,66
	310,50	316,00
	317,50	310,33
	316,16	307,16
DPR médio (%)		1,34

De acordo com a RDC 899/03 para produtos farmacêuticos admite-se um desvio padrão relativo inferior a 5%, por meio deste critério constatou-se que o método foi preciso e não sofreu influência do período em que foi realizado e pela mudança de analista

TABELA 15 – Valores estatísticos do teste ANOVA com os resultados das precisões intra-dia e inter-dia.

Parâmetros estatísticos	Precisão intra-dia	Precisão inter-dia
F_{tabelado}	4,75	4,75
$F_{\text{calculado}}$	3,06	1,56
Valor- p	0,11	0,23

Para confiabilizar estes resultados aplicou-se também, o teste ANOVA, capaz de informar se há ou não diferenças estatisticamente significativas entre os períodos de realização dos ensaios e os analistas. Deste modo, verificou-se que para ambas as precisões os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram menores que os de F_{tabelado} ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$), como também o valor- p menor que o nível de significância selecionado ($p > 0,05$). Assim, conclui-se que não há diferenças significativas nas precisões e isso confirma a precisão do método.

5.3.1.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através de planilha eletrônica de Ribeiro et.al. (2008) que considera os parâmetros da curva analítica para a estimativa dos limites em três níveis de confiança. Os valores encontrados estão descritos na Tabela 16 e representam as menores concentrações que o método desenvolvido pode detectar e quantificar.

TABELA 16 – Limites de detecção e quantificação, em três níveis de confiança, para o método desenvolvido

Nível de confiança (%)	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
95	14,25	21,16
99	19,21	23,65
99,9	25,18	26,82

5.3.1.7 ROBUSTEZ

Os experimentos para avaliação da robustez foram conduzidos variando-se $\pm 5\%$ do pH e temperatura da solução $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores das absorbâncias e do tratamento estatístico por ANOVA estão expressos na Tabela 17.

TABELA 17 – Valores de absorvâncias e estatísticos do teste ANOVA para robustez

Alterações	DPR (%)	Valor-p	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
pH	4.3	1,79	0,33	1,32
	4.1			
	3.9			
Temperatura	20	0,71	0,79	0,23
	25			
	30			

Verificou-se que para as alterações realizadas os valores de $F_{\text{calculado}}$ ($F = 1,32$; $F = 0,23$) foram menores que os de F_{tabelado} ($F = 5,14$), assim como o valor-p foi maior que o nível de significância selecionado ($p > 0,05$). Diante disto, é possível inferir que não há diferenças significativas nas alterações realizadas, caracterizando o método como robusto.

5.3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

5.3.2.1 ESPECIFICIDADE

Após a realização de varreduras, estimou-se o melhor comprimento de onda em 215 nm. Com isto a especificidade do método foi determinada frente aos excipientes empregados na formulação. A Figura 18 apresenta os cromatogramas sobrepostos das soluções de AL a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e dos excipientes utilizados na formulação. O cromatograma referente aos excipientes da formulação demonstra ausência de pico interferente no tempo de retenção do AL em aproximadamente 1,90 min.

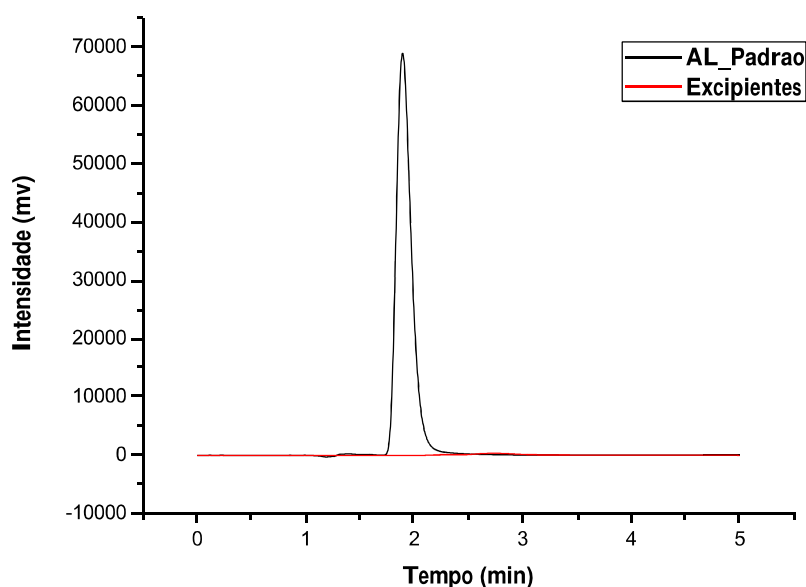


FIGURA 18 – Cromatograma obtido por CLUE para o ácido lipóico e os excipientes.

5.3.2.2. LINEARIDADE

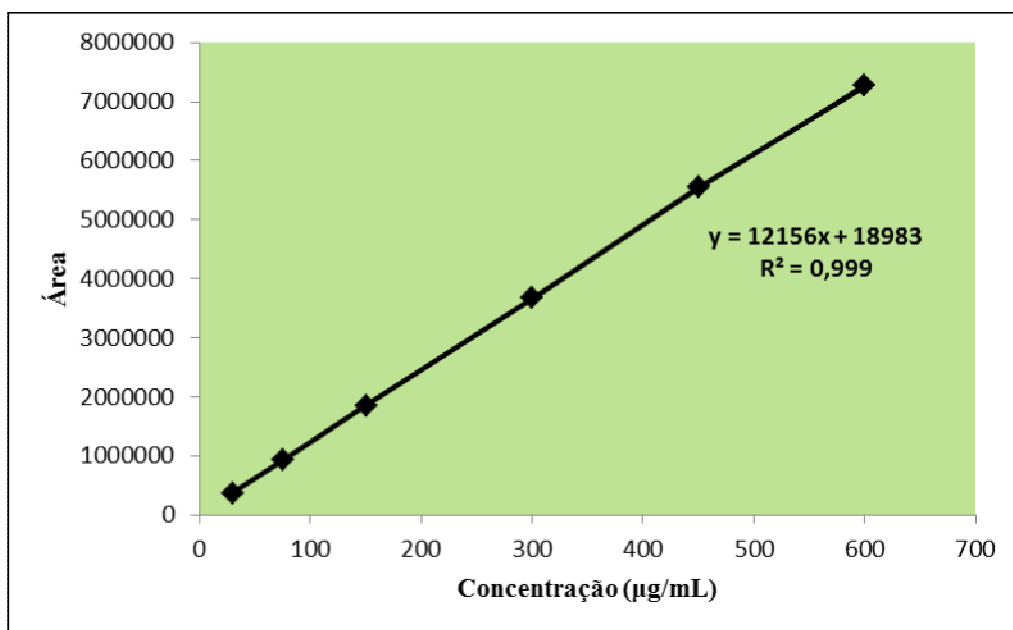
Construiu-se a curva analítica com seis pontos nas concentrações de 30 a 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizando os mesmos critérios estabelecidos para a curva analítica do método de quantificação por espectrofotometria UV/Vis. Os valores das áreas para cada concentração estão dispostos na tabela 18, com seus desvios padrões relativos.

TABELA 18 - Valores das áreas obtidas na construção da curva analítica de AL por CLUE.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	30	75	150	300	450	600
Área	365479,0	922569,3	1843781,3	3661397,5	5548162,8	7276765,9
	372366,6	923737,6	1850417,6	3665121,0	5546954,4	7265767,7
	371981,9	923825,0	1856469,7	3672705,5	5543976,7	7264053,7
Média	368730,5	923377,3	1850222,8	3666408,0	5546364,6	7268862,4
DPR (%)	1,25	0,08	0,34	0,16	0,04	0,09

A curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação para o método CLUE foram estimados a partir das áreas obtidas, por meio do método dos mínimos quadrados e estão representados na Figura 19.

FIGURA 19 – Curva analítica do AL nas concentrações de 30, 75, 150, 300, 450, 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtida por CLUE.



O coeficiente de correlação (R^2) está de acordo com as especificações e demonstra forte correlação entre as áreas e concentração do fármaco em estudo.

5.3.2.3 EXATIDÃO

A exatidão foi avaliada em três níveis de concentração, variando-se de 99,20 a 100,02% com relação ao valor assumido como verdadeiro. Estes valores estão de acordo com os limites de exatidão aceitáveis segundo a RDC 899/03.

TABELA 19 – Valores da exatidão em três níveis de concentração de AL por CLUE

Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média da Concentração Real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão (%) \pm DPR
75	74,40	99,20 \pm 0,07
300	300,05	100,02 \pm 0,15
600	596,40	99,40 \pm 0,09

5.3.2.4 PRECISÃO

Os valores de precisão intra-dia e inter-dia para a CLUE, bem como seus desvios padrão, estão designados na tabela 20 e 21, respectivamente. Assim como aplicado ao método espectrofotométrico, utilizou-se os desvios padrão e ANOVA para interpretação dos resultados.

TABELA 20 – Valores obtidos na precisão intra-dia em soluções de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AL por CLUE.

Período	Manhã	Tarde
Concentrações Médias ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	293,06	293,72
	291,99	291,27
	291,61	293,98
	293,09	292,61
	293,14	293,3
	293,46	292,99
	292,73	291,98
DPR médio (%)	0,27	

TABELA 21- Valores obtidos na precisão inter-dia em soluções de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AL por CLUE.

Analista	Analista 1	Analista 2
Concentrações Médias ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	281,19	284,52
	283,51	285,17
	281,44	284,80
	284,62	284,24
	282,92	284,25
	283,51	283,25
	284,62	284,49
DPR médio (%)		0,43

De acordo com os desvios padrão o método é preciso à mudança de analista e quando realizado em períodos diferente do dia, pois ocorreram DPR em valores abaixo de 5%, como disposto anteriormente. Entretanto, aplicou-se análise estatística para melhor averiguar estes resultados, cujos valores estão apresentados na tabela 22.

TABELA 22 – Valores estatísticos do teste ANOVA do ensaio de precisão intra-dia e inter-dia por CLUE.

Parâmetros estatísticos	Precisão intra-dia	Precisão inter-dia
F_{tabelado}	3,70	3,70
$F_{\text{calculado}}$	0,017	1,39
Valor-p	0,99	0,30

Constatou-se que o método é preciso, pois não há diferenças significativas nas precisões a nível estatístico. Uma vez que, verificou-se que ambas apresentaram valor de $F_{\text{calculado}}$ menor que F_{tabelado} ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$), assim como o valor- p foi menor que o nível de significância admitido ($p > 0,05$).

5.3.2.5 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção e quantificação estão descritos na tabela 23 e foram obtidos pela planilha eletrônica de Ribeiro et.al. (2008) em três níveis de confiança.

TABELA 23 – Limites de detecção e quantificação, em três níveis de confiança, para o método desenvolvido em CLUE

Nível de confiança (%)	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
95	12,54	18,61
99	16,91	20,80
99,9	22,04	23,59

5.3.2.6 ROBUSTEZ

Na avaliação da robustez variou-se $\pm 5\%$ a proporção da fase móvel, temperatura e vazão utilizando solução a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AL, cada alteração foi testada separadamente. Observou-se um desvio padrão relativo inferior a 1%. O tratamento estatístico empregado foi Anova e os resultados estão dispostos na Tabela 24.

TABELA 24 – Valores de absorvâncias e estatísticos do teste ANOVA para robustez.

Alterações	DPR (%)	Valor-p	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Fase móvel	68:32	0,5	0,07	4,72
	70:30			
	72:28			
Temperatura (°C)	28	0,3	0,23	1,85
	30			
	32			
Vazão (mL)	0,18	0,3	0,64	0,47
	0,20			
	0,22			

Em todas as modificações o perfil cromatográfico não sofreu alterações significativas, onde os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram menores que os de F_{tabelado} , enquanto que o valor-p foi maior que o nível de significância selecionado ($p > 0,05$). Diante destas considerações o método pode ser admitido como robusto.

5.4. MANIPULAÇÃO DAS CÁPSULAS

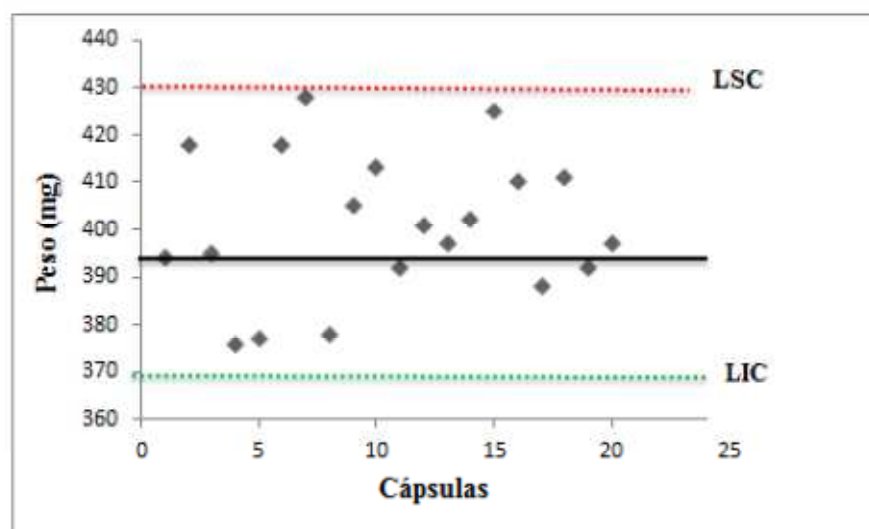
Os resultados do peso médio das cápsulas de AL, correspondentes a formulação desenvolvida pelo grupo de pesquisa estão apresentados na Tabela 25.

TABELA 25 - Valores obtidos na determinação de peso de cápsulas de AL.

Parâmetros	Valores
Peso Médio (mg)	400
DPR (%)	3,8
Desvio individual (mg)	376 a 425

O desvio individual do conteúdo pesado de cada cápsula pode ser visto de forma ilustrativa no diagrama de dispersão, em que nenhuma amostra ultrapassou o limite superior calculado (LSC) ou o limite inferior calculado (LIC).

FIGURA 20 – Diagrama de dispersão dos pesos encontrados nas 20 cápsulas de AL.



Assim observando os valores frente ao recomendando e dispersão dos resultados através do gráfico, constatou-se que nenhuma cápsula analisada ficou fora dos limites especificados demonstrando homogeneidade de peso.

5.5. MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

Para avaliação do comportamento da dissolução em diferentes condições variou-se o aparato, o meio e a rotação aplicada ao teste. O quadro 1 apresenta as condições, o percentual dissolvido ao final de 60 min de dissolução e alguns fatores observados durante a execução dos ensaios.

QUADRO 1 - Métodos de dissolução testados para as cápsulas de ácido lipóico.

Condições de Dissolução	Percentual Dissolvido (%)	Observações
Aparato: pá Meio: água Rpm: 100	Resultado desconsiderado	Cápsula aderiu-se a haste, boiando na superfície do meio de dissolução.
Aparato: pá + sinker Meio: água Rpm: 100	55,15%	Partículas do princípio ativo aderidas ao sinker.
Aparato: pá + sinker Meio: água Rpm: 110	79,96 %	Partículas do princípio ativo aderidas ao sinker.
Aparato: cesta Meio: solução gástrica pH 2 Rpm: 100	89,98%	Baixa precipitação de ácido lipóico
Aparato: pá Meio: solução tampão pH 5,8 Rpm: 75	Resultado desconsiderado	Observou-se intensa precipitação do ácido lipóico no fundo da cuba
Aparato: cesta Meio: água Rpm: 100	84,32%	Baixa precipitação de ácido lipóico

Nota-se o melhor desempenho para os métodos que utilizaram aparato tipo cesta, com rotação de 100 rpm e o meio que simulava as condições gástricas e o meio água. Optou-se por conduzir na pesquisa o ensaio de dissolução que utiliza água, por ser um método bem difundido e referenciado pela USP 32 (2009). De modo que o teste o qual empregou-se uma solução gástrica demonstra uma alternativa viável, mais próxima das condições orgânicas, para a realização do método de dissolução em cápsulas de ácido lipóico.

Após definir as condições em que as análises seriam conduzidas, a robustez do método foi definida frente a variações de temperatura, pH do meio e rotação com variações de $\pm 5\%$

do critérios utilizados no teste e as leituras das amostras foram feita em espectrofotômetro UV/Vis devido a rapidez e agilidade para execução da quantificação.

Com isto após aplicação do teste ANOVA verificou-se variância dos resultados com relação a temperatura, mais precisamente alterações significativas no processo de dissolução pelo aumento da temperatura de 37 °C para 39 °C. Demonstrando assim que a solubilização do ácido lipóico é alterada por elevações na temperatura.

A USP 32 (2009) afirma que o percentual de fármaco dissolvido (Q) determinado no experimento deve ser maior ou igual ao percentual, especificado na monografia individual. Com isto, a monografia do ácido lipóico expressa que o Q para cápsulas deve ser de pelo menos 70%. Após avaliação de 6 (seis) amostras das cápsulas manipuladas de AL e a determinação do valor de Q, obteve-se uma média de 89,02% de AL dissolvido com relação a quantidade declarada na cápsula (300 mg), estando de acordo com o especificado pelo compêndio oficial.

As formas farmacêuticas sólidas de uso oral estão entre as mais prescritas, devido a facilidade e maior estabilidade fornecida aos componentes da fórmula. Assim, para que o fármaco ou seu grupamento terapêutico seja absorvido e torne-se disponível ao sítio de ação é necessário que este se dissolva a partir da forma farmacêutica. Uma vez que o parâmetro de absorção depende da quantidade de fármaco solúvel no meio, considera-se importante o conhecimento das características de dissolução para que se consiga prever o comportamento *in vivo* do fármaco. (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; FERREIRA, 2008).

5.6. PERFIS DE DISSOLUÇÃO

As formas farmacêuticas sólidas de uso oral são as que sofrem maiores problemas em relação à biodisponibilidade, tornando-se indispensável avaliar a existência desse problema por meio de teste *in vitro* que possibilite a visualização de como o processo de dissolução do medicamento ocorre ao longo do tempo (MAHLE et.al., 2007). Os perfis de dissolução que foram obtidos possibilitam a determinação de vários parâmetros, permitindo uma análise comparativa com maior precisão em relação ao comportamento *in vitro* dos medicamentos. As Figuras 21 e 22 apresentam os perfis de dissolução das mesmas amostras obtidos por espectrofotometria UV/Vis e por CLUE, respectivamente.

FIGURA 21– Perfis de dissolução das cápsulas de ácido lipóico (300 mg) por espectrofotometria UV/Vis.

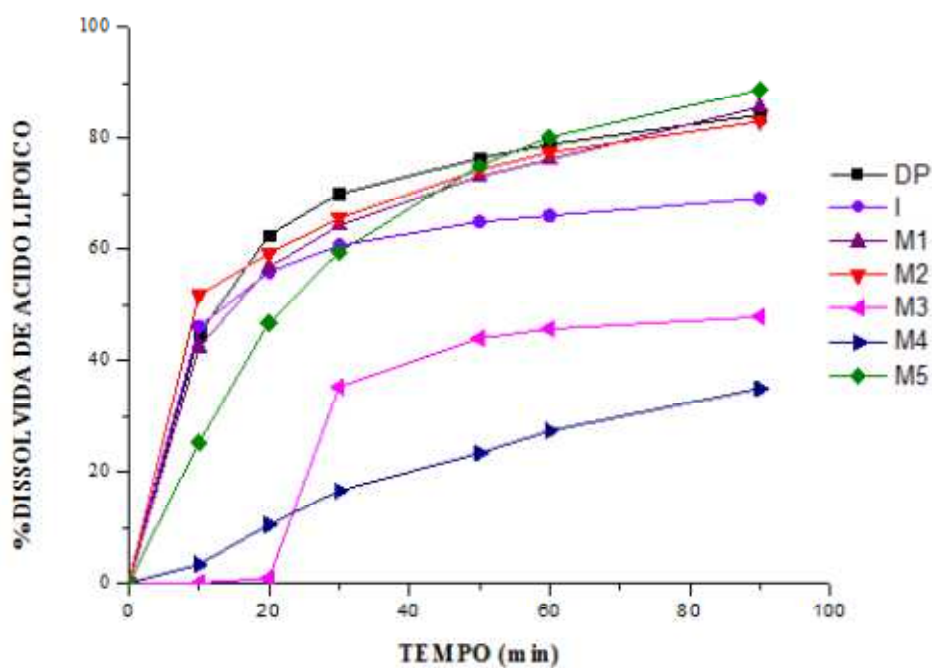
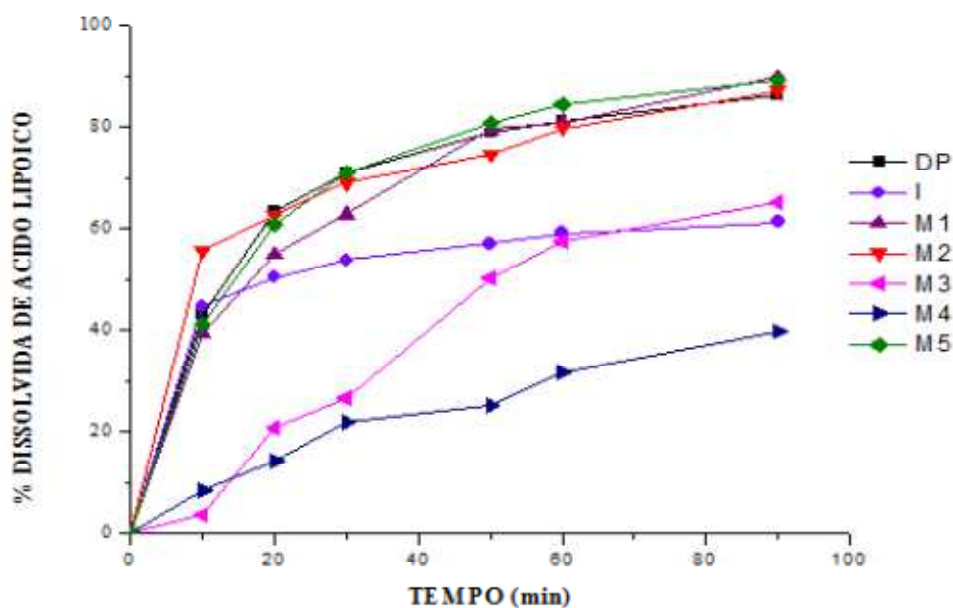


FIGURA 22 – Perfis de dissolução das cápsulas de ácido lipóico (300 mg) por CLUE.



5.6.1. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS MÉTODOS VALIDADOS

No presente estudo desenvolveu-se e validaram-se dois métodos analíticos: cromatografia líquida de ultraeficiência e espectrofotometria na região do ultravioleta. A partir dos perfis de dissoluções obtidos pelas duas técnicas, estimou-se a diferença e similaridade das mesmas, por meio de testes estatísticos.

A tabela 26 apresenta os valores estatísticos de variância de cada amostra com relação às metodologias, desta forma pela correlação dos valores de F e observação dos valores de p maiores que o nível de confiança a 0,05 é possível constatar que não há diferença entre os perfis obtidos das metodologias validadas.

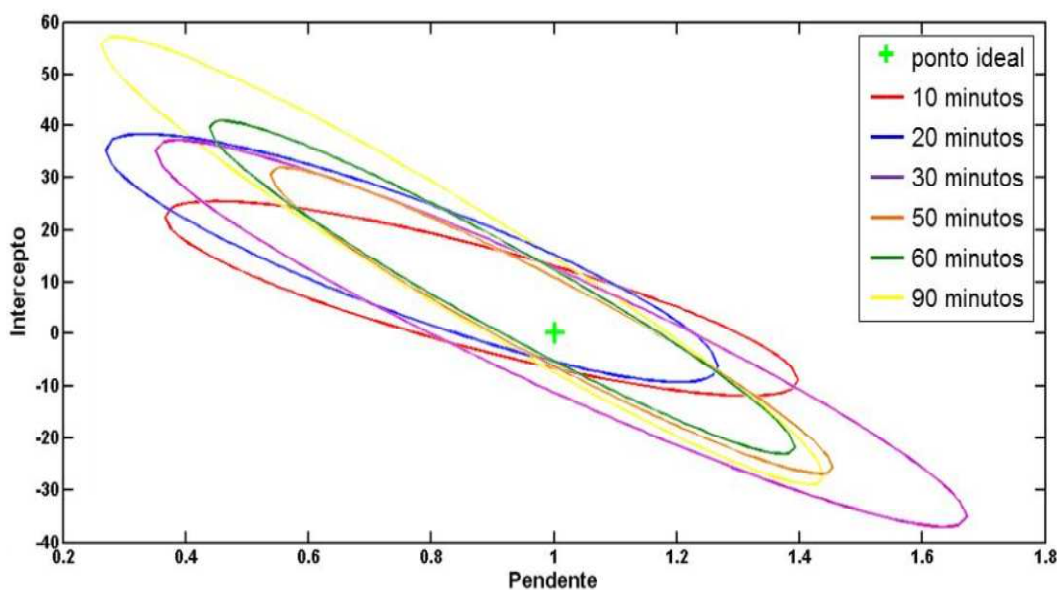
TABELA 26 – Parâmetros estatísticos obtidos na análise de variância dos perfis obtidos pela metodologia validada.

Amostras	Parâmetros estatísticos		
	F_{tabelado}	$F_{\text{calculado}}$	Valor- p
DP		0,30	0,87
I		1,93	0,19
M₁		0,03	0,87
M₂	4,96	0,22	0,65
M₃		0,40	0,54
M₄		0,43	0,52
M₅		0,52	0,49

Para melhor visualização desta correlação entre a diferença ou similaridade entre as técnicas de quantificação do teor de fármaco dissolvido, segue na Figura 23 o resultado do teste EJCR. Para este propósito, uma modelagem pelo método dos mínimos quadrados ordinários foi obtida, na qual o intercepto e a inclinação foram comparados usando o teste EJCR, cujos valores ideais são 0 e 1, respectivamente, representado na Figura 23 pela cruz verde. As elipses de confiança foram construídas individualmente para cada tempo de coleta do meio de dissolução. Todas as elipses de confiança obtidas continham o ponto teórico (0,1), com $\alpha = 0.05$, 2 , $n - 2 = 5$. Portanto, todos os valores percentuais de dissolução das amostras estudadas apresentaram uma boa concordância entre os métodos desenvolvidos e validados.

Desta forma, apesar de haver diferenças visuais nos perfis de dissolução constatou-se que os mesmos não apresentam diferenças estatísticas significativas a um nível de confiança de 95%.

FIGURA 23 – Elipses de confiança conjunta para cada tempo de coleta do meio de dissolução.



Apesar dos métodos serem estatisticamente significativos, outros fatores também devem ser considerados durante a escolha do método analítico para a quantificação de uma substância ativa. Os parâmetros de validação são requisitos de extrema importância para a escolha de um método, com destaque para a precisão e exatidão. Diante destes parâmetros a cromatografia líquida de ultraeficiência se destaca como mais precisa e mais exata com relação ao método espectrofotométrico. Contudo, a CLUE é um método oneroso, requerendo reagentes e equipamentos de alto custo e analista capacitado, tornando-se uma limitação para análises de rotina em farmácias magistrais. Já o método espectrofotométrico apresenta vantagens intrínsecas, tais como menor custo, fácil e rápida execução quando comparado a CLUE.

5.6.2. AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

A partir dos perfis de dissolução que relacionam percentual dissolvido de ácido lipóico *versus* tempo (Figuras 21 e 22) foi possível calcular a constante de velocidade da dissolução

(k), a meia vida de dissolução ($t_{50\%}$), a quantidade máxima dissolvida em 60 minutos do início do teste (Q_{60}), os fatores de diferença e similaridade e a eficiência de dissolução (ED%)

Inicialmente, determinou-se o modelo matemático que melhor se enquadrara no processo de dissolução, onde quatro modelos foram averiguados conforme disposto na tabela 7. Para isto, a reta de regressão linear dos resultados dos perfis foi obtida empregando-se estes quatro modelos. Assim, o coeficiente de correlação de Pearson (r) foi utilizado para seleção do melhor modelo que caracteriza a dissolução de uma amostra, pois expressa em valor o nível de ajuste entre o perfil de dissolução e o modelo cinético.

A tabela 28 apresenta os valores de r das amostras em relação às funções matemáticas obtidas com os perfis de cada método validado, de modo que selecionou-se aquele com valor de r mais próximo de 1, assim apenas a dissolução da amostra I se enquadrou na cinética de Higuchi, as demais configuraram-se como de primeira ordem. De forma que os métodos convergiram com relação ao coeficiente de correlação, fornecendo o mesmo modelo cinético para cada amostra.

TABELA 27 - Coeficiente de correlação de Pearson (r), aplicando cinética de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell nos perfis de dissolução pela espectrofotometria UV/Vis e CLUE.

Amostra	Ordem/modelo matemático							
	Ordem zero		Primeira Ordem		Higuchi		Hixson-Crowell	
	UV/Vis	CLUE	UV/Vis	CLUE	UV/Vis	CLUE	UV/Vis	CLUE
DP	0,8151	0,8050	0,9783	0,9669	0,8902	0,9430	0,9567	0,9483
I	0,7120	0,7367	0,8410	0,8858	0,8902	0,9082	0,8125	0,8564
M ₁	0,8837	0,8522	0,9939	0,9767	0,9845	0,9717	0,9837	0,9577
M ₂	0,7872	0,7973	0,9422	0,9460	0,9347	0,9426	0,9142	0,9213
M ₃	0,9677	0,8815	0,9871	0,9092	0,9556	0,8783	0,9850	0,9027
M ₄	0,9744	0,9845	0,9861	0,9930	0,9865	0,9718	0,9830	0,9908
M ₅	0,8438	0,9219	0,9927	0,9963	0,9674	0,9893	0,9771	0,9844

Na cinética de primeira ordem a quantidade de fármaco liberada em função do tempo é dependente da quantidade de fármaco remanescente na formulação, este modelo se aplica às formulações de liberação imediata (PINHO et al., 2011; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; SCHESHOWITSCH et al., 2007). Já o modelo de Higuchi, afirma que a porcentagem de fármaco dissolvida é dependente da raiz quadrada do tempo, sendo característico de

formulações com liberação prolongada (SCHESHOWITSCH et al., 2007). Entretanto, apesar de ser uma formulação de liberação imediata, a cápsula identificada com I no decorrer do teste de dissolução apresentou lenta liberação do fármaco, justificando assim sua forte correlação ao modelo cinético de Higuchi. Segundo Manadas; Pina; Veiga (2002) e Costa; Lobo; Lopes (2005), é importante ressaltar que os modelos matemáticos aplicados são voltados principalmente para comprimidos, ocorrendo limitações quando aplicados a cápsulas.

As tabelas 28 e 29 descrevem os parâmetros cinéticos (k , $t_{50\%}$ e Q_{60}) de cada amostra nos dois métodos analíticos, calculados de acordo com o modelo cinético apropriado.

TABELA 28 – Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo cinético selecionado por UV/Vis.

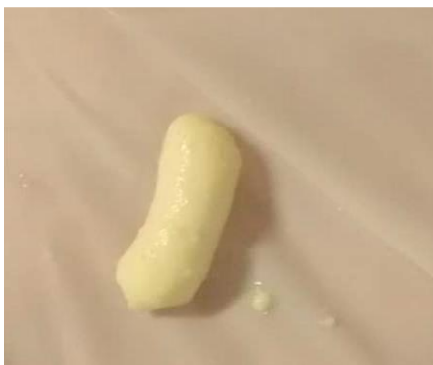
Amostras	K	$t_{50\%}$ (min)	Q_{60} (%)
DP	$0,04 \text{ min}^{-1}$	17,11	78,40
I	$0,008 \text{ mg/ L min}^{-1}$	38,07	62,76
M ₁	$0,04 \text{ min}^{-1}$	16,49	77,99
M ₂	$0,04 \text{ min}^{-1}$	17,42	76,48
M ₃	0,01 min	55,21	52,91
M ₄	$0,006 \text{ min}^{-1}$	113,98	30,57
M ₅	$0,04 \text{ min}^{-1}$	15,78	80,92

TABELA 29 – Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo cinético selecionado por CLUE.

Amostras	k	$t_{50\%}$ (min)	Q_{60} (%)
DP	$0,04 \text{ min}^{-1}$	19,30	78,81
I	$0,009 \text{ mg/ L min}^{-1}$	30,59	65,91
M ₁	$0,04 \text{ min}^{-1}$	19,02	76,07
M ₂	$0,04 \text{ min}^{-1}$	19,30	77,36
M ₃	0,01 min	78,86	45,62
M ₄	$0,005 \text{ min}^{-1}$	136,91	27,29
M ₅	$0,04 \text{ min}^{-1}$	18,36	80,11

Ao se analisar os valores percebe-se que a maioria das amostras apresenta a mesma velocidade de dissolução, com exceção para as amostras I e M₄ que apresentaram os menores valores de k. Esta variação na velocidade de dissolução de acordo com Abdou (1989) pode estar relacionada as características físico-químicas do fármaco, excipientes farmacêuticos utilizados na formulação, método de fabricação, embalagem e até mesmo armazenamento. De maneira que durante a realização dos ensaios com amostra M₄, em todas as repetições realizadas foi possível observar que ao final do teste o involucro gelatinoso da cápsula não se dissolvia, sendo assim o conteúdo contido na mesma não conseguiu libertar-se efetivamente (Figura 24).

FIGURA 24- Cápsula M₄ não dissolvida ao término do teste de dissolução.



Fonte: Dados da pesquisa

Os melhores tempos de meia vida ($t_{50\%}$) se deram nas amostras que apresentaram maior velocidade de dissolução. Com relação ao percentual de fármaco dissolvido em 60 minutos (Q_{60}), tomando-se como referência a especificação da USP 32 (2010), que afirma que neste tempo o percentual de dissolução para o ácido lipóico deve ser de pelo menos 70%, constatou-se que as amostras DP, M₁, M₂ e M₅ demonstraram resultados satisfatórios, com melhor desempenho para amostra M₅ que apresentou menor tempo de meia vida e maior percentual de dissolução em 60 minutos do início do teste.

Com relação as amostras M₃ e M₄ observou-se intensa divergência do valor de Q_{60} (%) entre os métodos, este fato pode estar atribuído a ausência de uniformidade de conteúdo das cápsulas de ácido lipóico destas amostras. De acordo com Pinheiro (2008) a uniformidade de dose na manipulação de cápsulas duras depende do método utilizado na mistura dos pós, método de encapsulação, as características de fluxo do pó, bem como o involucro escolhido.

Os fatores de diferença (f_1) e similaridade (f_2) foram outros parâmetros utilizados para comparar os perfis de dissolução.

Em geral estes fatores são determinados com relação aos medicamentos de referência, entretanto, não há medicamento cujo ingrediente farmacêutico ativo seja o ácido lipóico oficialmente reconhecido como de referência, sendo assim optou-se por analisar a diferença e a similaridade entre as próprias amostras. As tabelas 30 e 31 apresentam perfis semelhantes, de acordo com as metodologias aplicadas.

TABELA 30 – Parâmetros de diferença e similaridade entre os perfis por UV/Vis.

	DP		M ₁		M ₂		M ₅	
	f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2
DP	—	—	6,16	64,92	5,09	63,91	3,00	81,03
M₁	5,92	64,92	—	—	9,13	55,73	4,97	68,72
M₂	5,15	63,91	9,62	55,73	—	—	7,27	59,49
M₅	3,03	81,03	5,21	68,72	7,23	59,49	—	—

TABELA 31 – Parâmetros de diferença e similaridade entre os perfis por CLUE.

	DP		M ₁		M ₂		M ₅	
	f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2
DP	—	—	5,35	69,66	4,76	70,03	14,09	57,35
M₁	5,12	69,66	—	—	4,46	68,14	10,90	53,11
M₂	4,70	70,03	4,60	68,14	—	—	14,47	55,09
M₅	12,69	57,35	0,10	53,11	13,21	55,09	—	—

De acordo com a Resolução nº 31/10, os perfis são considerados semelhantes quando os valores de f_1 se apresentarem entre 0 e 15 e os de f_2 entre 50 e 100. Diante deste contexto as seguintes amostras apresentam semelhança e equivalência entre si, tanto no método por UV/Vis, como por CLUE: DP; M₁; M₂; M₅.

A maioria dos autores consideram a Eficiência de Dissolução (ED%) como o parâmetro mais confiável para a avaliação da equivalência farmacêutica, sendo capaz de detectar diferenças entre formulações que não podem ser detectadas pelo fatores f_1 e f_2

(SERRA; STORPIRTIS, 2007). A ED consiste na avaliação integral comparativa da área sob a curva (ASC) do perfil de dissolução em relação à área representada pelo tempo total do ensaio. A tabela 32 aborda o valor de ED das amostras analisadas.

TABELA 32 – Eficiência de Dissolução (ED%) das cápsulas de ácido lipóico (300 mg).

Amostra	ED%± DPR	
	UV/Vis	CLUE
DP ^a	73,43± 3,75	67,81± 0,07
I ^b	53,50± 5,90	58,35± 0,06
M ₁ ^{a,b,c}	67,23± 1,59	65,04±0,11
M ₂ ^{a,c,e}	69,47± 5,03	66,63 ±0,13
M ₃ ^{b,d}	39,23± 7,89	31,38 ±0,05
M ₄ ^d	24,15± 9,87	20,05 ±0,16
M ₅ ^{a,c,e}	70,30± 6,76	62,97 ±0,05

*As amostras que apresentam letras iguais não apresentam diferença estatística quanto a ED%

Após o cálculo da Eficiência de Dissolução tratou-se os resultados estatisticamente utilizando-se ANOVA e em seguida teste de Tukey, para a averiguação das amostras que apresentavam diferenças com nível de significância a 0,05. Assim, observou-se que entre os métodos não há diferença quanto à eficiência de dissolução. Já equivalência entre perfis, não detectado pelos fatores de diferença e similaridade, ocorreram com os seguintes grupos: (I, M₁ e M₃); (M₃ e M₄); (M₅ e M₂).

O alto desvio padrão da amostra M₄ em ambos os métodos, além de estar associado a ausência de uniformidade de dose relatada anteriormente, também pode está associado a desintegração incompleta da cápsula, fato constatado por Pinho et al. (2011) que observou esta correlação no teste de dissolução em cápsulas de carbamazepina. A melhor eficiência de dissolução em ambos os métodos ocorreu para as cápsulas desenvolvidas por meio de um estudo de pré-formulação desenvolvido pelo presente grupo de pesquisa (SILVA, 2014). Este parâmetro pode vir a ser correlacionado a dados *in vivo*, após estudo de correlação *in vivo* – *in vitro*, uma vez que expressa a quantidade de fármaco que se encontra dissolvida no meio e está disponível para que ocorra o processo de absorção do mesmo (OFOEFULE; UDEOGARANYA; OKONTA, 2001). Assim, é possível prever o comportamento *in vivo* se partirmos do princípio que o processo de absorção é proporcional à concentração do fármaco

dissolvido e ao tempo que este permanece em contato com as regiões do trato gastrointestinal onde ocorre a absorção (KHAN, 1975; FARINHA; PAIS; BICA, 1997).

Ao final desta análise dos perfis de dissolução foi possível definir que as amostras DP, M₁, M₂ e M₅ foram semelhantes em todos os parâmetros estudados, entretanto para concluir se essas formulações comportam-se como bioequivalentes, são necessários estudos *in vivo*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados obtidos a partir das análises de caracterização revelaram a pureza adequada do ingrediente ativo farmacêutico e a ausência de polimorfismo;
- O estudo das características microméricas, demonstrou que a formulação apresentou um fluxo bom, visto que estudos realizados anteriormente, com o ácido lipóico constataram não haver fluxo. Diante disto, é explícito a contribuição dos excipientes farmacêuticos utilizados para a melhoria do fluxo.
- O desenvolvimento do método de validação para quantificação do teor de ácido lipóico em cápsulas no ensaio de dissolução, utilizando a espectrofotometria UV/Vis e a cromatografia líquida de ultra eficiência como métodos quantificadores, demonstraram especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez dentro dos critérios estabelecidos pelas resoluções e guias de validação. Com isto, as metodologias apresentam-se seguras e eficazes para os objetivos a que se destinam.
- Os métodos analíticos desenvolvidos e validados na pesquisa, demonstraram-se estatisticamente significativos. Entretanto, devido a maior acessibilidade e menor custo envolvido na realização dos ensaios por espectrofotometria UV/Vis, este pode ser indicado como método alternativo ao estabelecido pela Farmacopeia Americana (CLUE).
- O método de dissolução mostrou-se discriminativo para a avaliação do ácido lipóico veiculado em cápsulas, sendo a formulação desenvolvida pelo grupo de pesquisa a de melhor comportamento diante dos critérios de dissolução. Sendo este um parâmetro de grande importância para o controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas, tendo em vista que seus resultados podem ser correlacionáveis as condições *in vivo*.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Serão realizadas análises em microscópio eletrônico de varredura para averiguação visual das características fármaco e sua recristalização, de forma complementar as análises termoanalíticas, em FTIR e DRX;
- Pretende-se realizar a publicação destes resultados em revistas de alto impacto;
- Propõem-se a realização de estudos para avaliação da formulação desenvolvida pelo grupo de pesquisa, quanto a correlação *in vivo* – *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABDOU, H. M. **Dissolution, bioavailability & bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company, 1989.
- AL-ATTAR, A.M. Physiological and histopatological investigations on the effects of lipoic acid in rats exposed to malathion. **J Biomed Biotechnol**. 2010.
- ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**; 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ANSAR, H. et al.. Effect of alpha-lipoic acid on blood glucose, insulin resistance, and glutathione peroxidase of type 2 diabetic patients. **Saudi Med J**. v.32, n.6, 2011.
- AOAC. International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 19. ed., 2012.
- ARAÚJO, G.L.B. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona**. 2009. 202f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2009.
- ATSUSHI, K.. Ring-opening polymerization of lipoic acid and characterization of the polymer. **J Pol Sci Part A**. v. 48, p. 5247–53, 2010
- AZEVEDO, R.C.P; RIBEIRO, G.P; ARAÚJO, M.B. Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para captopril em cápsulas magistrais por CLAE. **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n.2, 2008.
- BALC, K; AKKAYA, Y.; AKYUZ, S. An experimental and theoretical vibrational spectroscopic study on niflumic acid, a non-steroidal anti-inflammatory drug, **Vib. Spectrosc.** v. 53, p. 239–247, 2010.
- BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Quím. Nova**. v.25, n.5, 2002.
- BHARATE, S.S.; VISHWAKARMA, R.A. Impact of preformulation on drug development. **Expert Opin Drug Deliv**. Índia, 2013.
- BILLGREN, ES et al. Lipoic Acid Biosynthesis and Enzymology. In: **Comprehensive natural Products Chemistry**. 7. ed., 2010.
- BLAGDEN, N. et al. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Adv Drug Del Rev**. v. 59, 2007.
- BORBA, P.A.A. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria UV para quantificação de carvedilol. **Quím. Nova**. v.36, n.4, 2013.
- BORBA, P.A.A. et al. Pharmaceutical approaches involving carvedilol characterization, compatibility with different excipients and kinetic studies. **J Therm Anal Calorim**. v. 115, p. 2507–15, 2015.

- BORSATO, D. et al. Kinetics of oxidation of biodiesel from soybean oil mixed with TBHQ: determination of storage time. **Quím. Nova**. São Paulo, v. 35, n. 4, 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 12 de ago de 2010b.
- BRASIL. Resolução n.899, de 29 de maio de 2003. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 2 jun 2003.
- BRITISH PHARMACOPEIA. LONDON: **Her Majesty's Stationery Office**, 2008.
- BROWN, M.E.; GALLAGHER, P.K. Introduction to recent advances, techniques and applications of thermal analysis and calorimetry In: **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry**. 5.ed. 2008.
- CARLSON, D.A. et al. The plasma pharmacokinetics of R-(+)-Lipoic Acid Administered as Sodium R-(+)-Lipoate to Healthy Human Subjects. **Alternative Medicine Review**. v. 12, n.4, 2007.
- CASTELLÓ, M. L. **Estudo da glicerina por Análises Térmicas**. 2009. 99f. Rio de Janeiro, 2009. 99p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- CHOWDARY, K.P.R; RAJYALAKSHIMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharm**. v. 30, n.350, 1987.
- CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise Instrumental. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2000.
- COSTA, P., LOBO, J. M. S.; LOPES, C. M. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, 2005.
- CREMER, D.R. et al. Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 46, 2006.
- CURY, B.S.F. et al. Influência das propriedades de granulados de lactose nas características físicas dos comprimidos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**. São Paulo, v. 28, n.1, 2007.
- DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostra: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.
- DENARI, G.B.; CAVALHEIRO, E.T.G. **Princípios e aplicações de análise térmica**. São Carlos: IQSC, 2012.
- DIAS, C.L. et al. Dissolution method for milnacipran hydrochloride capsules: development, validation, and study of changes in dissolution rate after storage. **Dissolution Technologies**. Porto Alegre, 2011.

DINIZ, P.H.G.D. Eco-friendly sonoluminescent determination of free glycerol in biodiesel samples. **Talanta**. v.114, p.38-42, 2013.

DOWNING, D.; CLARK, J. Estatística Aplicada. 2ª ed. Brasil: Saraiva; 2006.

DRESSMAN, J.B.; VERTZONI, M.; GOUMAS, K.; REPPAS, C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, p.591–602, 2007.

DUARTE, L.D.A.C. et al. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. Pesquisas em Geociências. Porto Alegre, v.30, n.2, 2003.

EMANUELLI, T; SCANDIUZZI, M. Validação de processos na indústria farmacêutica. In: CONGRESSO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E COSMÉTICOS, 2000, Rio Grande do Sul. **Anais**. Rio Grande do Sul: Universidade do Rio Grande do Sul, 2000. p. 57.

EMERY, E. et al. Flowability of moist pharmaceutical powders. **Powder Technol.** n. 189, 2009.

FARINHA, A.; PAIS, J. P.; BICA, A. O ensaio de dissolução in vitro na avaliação da qualidade biofarmacêutica. **LEF – Boletim**. Lisboa, v. 4, n. 15, 1997.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2010.

FERREIRA, A.O. **Guia Prático de Farmácia Magistral**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008.

FERREIRA, N.P. et al. Determinação quantitativa da dipirona sódica pelo método de volumetria e espectroscopia de absorção na região UV-Vis. **Interdisciplinar: Revista Eletrônica da Univar**, v.1, n.9, 2013.

FIGESE, E.F.; HAGENS, T.A. Pré-formulação. In: LACHMAN, L.; LIBERMAN, H.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

FORD, J.L.; MANN, T.E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 5, 2012.

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

GAO, G; LIN, S. Thermodynamic investigations of nitroxoline sublimation by simultaneous DSC-FTIR method and isothermal TG analysis. *J Pharm Sci*. v. 99, n. 1, 2010.

GARCIA, A.Q.R.; PEREIRA, T.C.B; DIAS, I.L.T. Estudo das propriedades de fluxo no desenvolvimento de paracetamol pó veiculado em sachê. **Rev. Bras. Farm.** São Paulo, v. 93, n. 4, 2012.

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

GILL, P.; MOGHADAM, T.T.; RANJBAR, B. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. **J Biomol Tech.** v. 21, n. 4, 2010.

GIRON, D. Applications of thermal analysis in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical of Biomedical Analysis.** Switzerland, v. 4, n.6, 1996.

GONZÁLEZ, O.P.; MOY, A.N.L.; GUZAMÁN, J.M. El alfa-tocoferol y el ácido alfa-lipoico. Una sinergia antioxidante com potencial em medicina preventiva. **Rev Invest Clin,** v. 60, n.1, 2008.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa.** New York: LTC, 2006.

HEINISCH, B.B. et al. Alpha-lipoic acid improves vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized trial. **Eur J Clin Invest.** v.40, n.2, 2010.

ICH, International Conference on Harmonization. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, Q2(R1). 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

IKUTA, N. et al. Analysis of the Enhanced Stability of R(+)-Alpha Lipoic Acid by the Complex Formation with Cyclodextrins. **Int J Mol.** v. 14, n. 2, 2013

IKUTA, N. et al. Spectroscopic Studies of R(?) -a-lipoic acid—cyclodextrin complexes. **Int J Mol Sci.** v. 15, p. 20469–85, 2014.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Brasil, 2010.

INSTITUTO ADOLPHO LUTZ. **Estatística Aplicada à Análise de Resultados de Ensaios de Proficiência na Avaliação de Laboratórios.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10f6aa8047458b919543d53fbc4c6735/apostila_estatistica.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 13 de Jan. de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE METODOLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO), **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGRE-008, 2007.

IONASHIRO, M.; GIOLITO. **Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial.** São Paulo: Giz Editorial, 2004.

KACSO et al., Ambazone-lipoic acid salt: Structural and thermal characterization. **Thermochimica Acta.** v. 550, p. 13-18, 2012

KALINKOVA, G. N. et al. Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics.* v.187, 1999.

KASSAYE, L.; GENETE, G. Evaluation and comparison of in vitro dissolution profiles diferente brands of amoxicillin capsules. **Afr Health Sci.** v. 12, n.2, 2013.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

KHAN, K.A. The concept of dissolution efficiency. **J. Pharm. Pharmac.**, v.27, n.48, 1975.
KOUFAKI, M. Therapeutic applications of lipoic acid: a patent review (2011-2014). **Expert Opin Ther Pat**. v.24, n.9, 2014.

KUMAR, A. et al. UPLC: A preeminent technique in pharmaceutical analysis. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. Índia, v.69, n.3, 2012.

KUSHNER, JT et al. Examining the impact of excipient material property variation on drug product quality attributes: a quality-by-design study for a roller compacted, immediate release tablet **J Pharm Sci**, v. 100, n.6, 2011.

LACHMAN, L. LIEBERUAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouse Gulben Kian, 2001.

LAGO, V.V; PEREIRA, R.N.; BERTOL, C.D. Propriedades micromeríticas e análise físico-química de matérias-primas de alopurinol. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. Passo Fundo, n. 33, v. 3, 2012.

LAHAV, M; LEISEROWITZ, L. The effect of solvent on crystal growth and morphology. **Chem Eng Sci**. v. 56, 2001.

LAMOLHA, M.A; SERRA, C.H.R. Avaliação das propriedades de fluxo dos granulados e dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida 50 mg obtidos por granulação úmida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v.43, n.3, 2007.

LEE, S. L.; RAW, A. S.; YU, L. **Dissolution Testing. In Biopharmaceutics Applications in Drug Development**. Springer: New York, 2008.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 2004.

LOYD, V.; ALLEN Jr. Introdução à Farmácia de Remington. **São Paulo: Artmed Editora, 2015**.

LU, X. et al. Of a two-step tier-2 dissolution method for blinded overencapsulated erlotinib tablets using UV fiber optic detection. **J. Pharm. Biomed Anal**. v.56, n.1, 2011.

LYRA, M.A.M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. Recife, v.31, n.2, 2010.

MACHADO, L.D.B.; MATOS, J.R.. **Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. In: CANEVAROLO JUNIOR., S.V., (Ed.). Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: Artliber, 2004.

MAHLE, F. et.al. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida comercializados no Brasil. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.28, n.3, p. 265-271, 2007.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quim. Nova**. Campinas, v.32, n.1, 2009.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4,2002.

MANTA, C; BATISTA-VIEIRA, F; CARLSSON, J. Development of lipoic acid activated agarose. **Chemistry Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n.1, 2009.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 127f. São Paulo, 2003. 127p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M.R.C.; BROWN, E. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. *Revista Analítica*. v.1, 2002.

MARQUES-MARINHO, F.D. et al. Simvastatin assay and dissolution studies by feasible RP-HPLC in tablets. **Quím. Nova**. Minas Gerais, v.35, n.6, 2012.

MARTINS, M.T.; PAIM, C.S.; STEPPE, M. Development of a dissolution test for lamotrigine in tablet form using an ultraviolet method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Rio Grande do Sul, v.46, n.2, 2010.

MATIOLI, G.; VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A. Validação de métodos analíticos. **Arq Mundi**. Paraná, v.11, n.2, 2007.

MATOS, J.R.; MACHADO, L.D.B. Análise térmica – termogravimetria. In: CANEVAROLO JUNIOR., S.V.. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004.

McCONVILLE, C. et al. Preformulation and development of a once-daily sustained-release tenofovir vaginal tablet containing a single excipient. *J Pharm Sci*. Inglaterra, n. 102, v. 6, 2013.

MENDOZA, A.E.H. et al. Comparison of pharmacokinetic profiles of PM02734 loaded lipid nanoparticles and cyclodextrins: in vitro and in vivo characterization. **J Biomed Nanotechnol**. v.8, 2012.

MITRI, K. et al. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. **Int J Pharm**. v. 75, 2011.

MOLLER, H., SIEWERT, M. FIP guidelines for dissolution testing of solid oral products. **Pharm. Ind., Aulendorf**, v. 57, n. 5, 1995.

MOORE, J.W.; FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharm. Technol.**, v.20, n.6, 1996.

- MORAES, J.D.D. **Desenvolvimento de cosmético contendo ácido alfa-lipóico para a prevenção de alterações da pele e do envelhecimento cutâneo.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- MORIKAWA, T.; YASUNO, R.; WADA, H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria. **FEBS Lett.** v. 498, 2001.
- MOYANO, M.A.; BROUSSALIS, A.M. SEGALL, A.I. Thermal analysis of lipoic acid and evaluation of the compatibility with excipients. **J. Therm. Anal. Calorim.** v. 99, p. 631–637, 2010
- NUNES, RS et al. Thermal behavior of verapamil hydrochloride and its association with excipients. **J. Therm Anal Calorim.** v. 97, n. 1, 2009.
- OFOEFULE, S.I.; UDEOGARANYA P.O.; OKONTA J.M. Prediction of in vivo bioavailability of six brands of ciprofloxacin film coated tablets using the concept dissolution efficiency (DE). **Bollettino chimico farmaceutico.**, v.140, n.3, 2001.
- OLIVEIR, M.A.; YOSHIDA, M.I., GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quím. Nova.** Espirito santo, v.34, n.7, 2011.
- OLIVEIRA, E.F.S. et al. Dissolution test optimization for meloxicam in the tablet pharmaceutical form. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** Alfenas, v.45, n.1, 2009.
- OLIVEIRA, F.F.; PAOLA, M.V.R.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada aos produtos cosméticos. **Cosmet. Toiletries**, v.16, n.3, p.52-54, 2004.
- OSORIO, J.G.; MUZZIO, F.J. Effects of powder flow properties on capsule filling weight uniformity. **Drug Development and Industrial Pharmacy.** Nova Jersey, v. 39, n. 9, 2013.
- PACKER, I.; CADENAS, E. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. **J Clin Biochem Nutr.** v. 48, n. 1, 2011.
- PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 27, p. 356-362, 2000.
- PACKER, L; KRAEMER, K; RIMBACH, G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. **Nutrition.** Vol. 17, 2001.
- PEREZ, O.G; CASTANEDA, R. E. G Therapeutic perspectives on the combination of α -lipoic acid and vitamin E. **Nutrition Research.** v. 26, 2006.
- PETRUSEVSKI, G. et al. Pholcodine monohydrate: Crystal structure and polymorphism. **Journal of Crystal Growth.** v. 375, p. 119-124, 2013.
- PHARM. F. **The Dissolution Procedure: Development and Validation**, v. 30, n. 1, 2004.

PINHEIRO, G. M. Determinação e avaliação de indicadores da qualidade em farmácia magistral - preparação de cápsulas gelatinosas duras. [Tese] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

PINHO, J.J.R.G. et.al. Avaliação da qualidade físico-química de cápsulas manipuladas de carbamazepina. **Hu Revista**, v.37,n.1, 2011.

POLLI, J.E.; REKHI, G.S.; SHAH, V.P. Methods to compare dissolution profiles. **Drug Information Journal**, v 30, 1996.

POLONINI, H.C. etal. Optimization of a new dissolution test for oxcarbazepine capsules using mixed-level factorial design. **J. Braz. Chem. Soc.** Minas Gerais, v.22, n.7, 2011.

PORASUPHATANA, S. et.al. Glycemic and oxidative status of patients with type 2 diabetes mellitus following oral administration of alpha lipoic acid: a randomized double-blinded placebo controlled study. **Asia Pac J Clin Nutr.** v.21, n.1, 2012.

PORNSAK, S.; KANOKPORN, B. Particle design of itraconazole by evaporative recrystallization for dissolution improvement. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 100, 2015.

PORTELA, et al. Of Alpha-Lipoic Acid Raw Material And Capsules By Dynamic Thermogravimetric Method. **Thermochim Acta.** v.95, n.8, 2012.

PRISTA, L. V. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia Galénica**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian,1991.

PRISTA, N.L. et al. **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

RAJKUMAR, B; BHAVYA, T; KUMAR, A.A. Reverse phase hplc method development and validation for the simultaneous quantitative estimation of alpha lipoic acid and allopurinol in tablets. **Int J Pharm Pharm Sci**, v.6, 2014.

REDDY, T.S.K; BALAMMAL, G.; KUMAR, A.S. Ultra performance liquid chromatography: an introduction and review. **International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis**. Índia, v. 2, 2012.

RENTFROW, G et al. The effects of the antioxidant lipoic acid on beef longissimus bloom time. **J Anim Sci.** v. 82, 2004

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**. v. 27, n.5, 2005

RIBEIRO, A. et al. Preparation and Solid-State Characterization of Inclusion Complexes Formed Between Miconazole and Methyl- β -Cyclodextrin. **AAPS Pharm Sci Tech.** v. 9, n.4, 2008.

RIBEIRO, F.A.L. e tal. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova**. São Paulo, v.31, n.1,2008.

ROCHA, F.R.P; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Química Nova**. v. 27, 2004.

SANTOS, I. M. S. et al. Alterations on monoamines concentration in rat hippocampus produced by lipoic acid. **Arq. Neuro-psiquiatr**, São Paulo, v. 68, n. 3, 2010.

SANTOS, O.M.M.S e tal. A Dissolution Test for Finasteride in Immediate-Release Capsules. **Dissolution Technologies**. Alfenas, 2013.

SCHESHOWITSCH, K. et.al. Avaliação da qualidade e perfil de dissolução de cápsulas manipuladas de piroxicam. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 26, n.5, 2007.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Rev. Bras. Cienc. Farm**.v.43, n.2, 2007.

SEILEROVÁ, L. et al. Using thermal analysis methods in research and development of medicines. **Chem. Listy. Praga**, n. 106, 2012.

SENA, C. M.; NUNES, E.; LOURO, T. Disfunção Endotelial na Diabetes Tipo 2: Efeito de Antioxidantes. **Rev Port Cardiol**. v. 26, 2007.

SERRA, C.H.R.; STORPITIS, S. Comparação de perfis de dissolução de cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Rev Bras Cienc Farm.**, v.43, n.1, 200.

SHAI, Y. ATR-FTIR studies in pore forming and membrane induced fusion peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.4c, 2010.

SHAMSIPUR, M. etal. Thermal stability and decomposition kinetic studies of acyclovir and zidovudine drug compounds. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 14, n.1, 2013.

SHAY, K.P. et al. Alpha Lipoic acid as dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1790, 2009.

SHERIF, S.; BENDAS, E.R.; BADAWY, S. The clinical efficacy of cosmeceutical application of liquid crystalline nanostructured dispersions of alpha lipoic acid as anti-wrinkle. **Eur J Pharm Biopharm**. v.86, 2014.

SILVA, A.E. **Micropartículas poliméricas à base de xilana e Eudragiv® S-100 contendo mesalazina visando à liberação cólon-específica**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2009.

SILVA, E.B.; PAOLA, M.V.R.V; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 43, n.3, 2007.

SILVA, G.; IHA, K. Polimorfismo: caracterização e estudo das propriedades de uma fase cristalina. **J. Aerosp. Technol. Manag**, São José dos Campos, v.2, n.3, 2010.

- SILVA, P.C.D. **Estudo termoanalítico de compatibilidade fármaco-excipiente e de estabilidade entre ácido lipóico e adjuvantes tecnológicos**. 2014. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2014.
- SILVA, P.C.D. et al. Compatibility study between lipoic acid with polymers used in controlled drug release systems. **J Therm Anal Calorim**. 2015.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000.
- SKOOG, D. A. et al. Fundamentos de química analítica. 8.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. São Paulo: Bookman Companhia Editora, 2006.
- SRIAMORNSAK, P.; BURAPAPADH, K. Characterization of recrystallized itraconazol prepared by cooling and anti-solvent crystallization. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2015
- STANIFORTH, J.N. Fluxo de pós. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- STEPHENSON, G.A. Structure determination from conventional powder diffraction data: Application to hydrates, hydrochloride salts, and metastable polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 89, n.7, 2000.
- STORPIRTIS, S. et al. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 35, n.1, 1999.
- STORPITIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- SWHARTZ, M.E. Ultra Performance Liquis Chromatography (UPLC): An Introduction. **Separation Science Redefined**. Massachusetts, 2005.
- TEICHERT, J. et al. Pharmacokinetics of alfa -lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. **J. Clin. Pharmacol**. v. 45, 2005.
- TEIXEIRA, L. S. G. et al. Determination of formaldehyde in Brazilian alcohol fuels by flow-injection solid phase spectrophotometry. **Talanta**.v.64, 2004.
- TROMBINO, S. et al. Preparation, characterization and efficacy evaluation of synthetic biocompatible polymers linking natural antioxidants. *Molecules*, v.17, n.11, 2012
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. 32 ed. Rockville: **United States Pharmacopeial Convention**, 2009.
- VENCATO, I. Estruturas cristalinas por difração de raios –x. **Cad. Cat. Ens. Fis**. Florianópolis, v.5, n.3, 1988.

VILA JATO, J. L. **Tecnologia farmacêutica: formas farmacêuticas**. Madrid: Editorial Síntesis, 2001.

WANG, J. Physicochemical characterization, identification and improved photo-stability of alpha-lipoic acid-loaded nanostructured lipid carrier. **Drug Dev Ind Pharm**. v.40, n. 2, 2014

WATERS. Sobre o processo de separação cromatográfica. **Waters Corporation**, 2013. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/pt_BR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=pt_BR&cid=10049055>. Acesso em: 25 out. 2015.

WELLS, F.I.; AULTON, M.E. **Pharmaceutics: the science of dosage form design**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1998.

WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

WOLLIN, S. D.; JONES, P. J. Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition**. v. 133, p. 3327–3330, 2003.

YU, L.X. et al. Scientific considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications. **Pharmaceutical Research**. v. 20, n. 4, 2003.

ZANG, G. G. Z., et al. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 371-390, 2004.

ZHAO, L.; HU, F.X. Lipoic acid treatment of aged type 2 diabetes mellitus complicated with acute cerebral infarction. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. v.18, 2014.

ZONGMING, G. Mathematical Modeling of Variables Involved in Dissolution Testing. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.100, n.11, 2011.