

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS

Desenvolvimento de validação de metodologia analítica, para determinação de teor e avaliação de dissolução, na associação de diosmina 450mg e hesperina 50mg em comprimidos revestidos.

Leonardo Doro Pires

Anápolis – GO
2009

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, para determinação de teor e avaliação de dissolução, na associação de diosmina 450mg e hesperina 50mg em comprimidos revestidos.

Leonardo Doro Pires

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica**, oferecido numa associação entre a Universidade Católica de Goiás, a Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra Professora Caridad Noda Pérez

Anápolis – GO
2009

P667d Pires, Leonardo Doro.

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, para determinação de teor e avaliação de dissolução, na associação de diosmina 450mg e hesperina 50mg em comprimidos revestidos / Leonardo Doro Pires. – 2009.

65 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás; Universidade Estadual de Goiás; Centro Universitário de Anápolis, 2009.

“Orientadora: Prof^a. Dr^a. Caridad Noda Pérez”.

1. Diosmina – hesperidina – análise de dissolução – determinação do teor – equivalência farmacêutica. 2. Distúrbios venosos – circulação periférica de retorno. I. Título.

CDU: 615.074:547.972(043.3)

Banca Examinadora:

Dra. Sci. Caridad Noda Pérez (Orientadora)

Dr. Sci. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino

Dr. Sci. Antonio Carlos Severo Menezes

Agradecimentos

Agradeço à minha esposa pela dedicação, aos meus pais pelo companheirismo, mesmo à distância, e às minhas irmãs pela paciência.

À minha orientadora, Dra Caridad Noda Pérez, por ter assumido este compromisso, mesmo com as dificuldades que sabia que teríamos.

Ao professor Antônio Menezes (UEG) pelas portas que se abriram há 6 anos e possibilitaram o início da minha carreira docente. Professor obrigado pela confiança!

À minha eterna equipe de trabalho do Neoquímica pela amizade e parceria.

Aos companheiros que vieram comigo para Anápolis em 2001 e aos que conheci nos 7 anos em que vivi e aprendi, nessa cidade maravilhosa.

À Dra Dulcinéa pela parceria, infelizmente por pouco tempo, na Unievangélica. Professora, obrigado pelas oportunidades!

Aos professores da UEG, entidade que me acolheu por 4 anos e que me abriu as portas para a carreira docente.

Aos professores Gilberto, Ademir, Edílson, Fabiane, Francisco Itami, Hamilton, Leonardo, Lúcio e Wilker, do mestrado em Tecnologia Farmacêutica, pelos preciosos ensinamentos e momentos de descontração.

A Deus, por ter chegado até aqui!

Resumo

Palavras-chave: Diosmina, hesperidina, análise, teor e dissolução.

Diosmina e hesperidina são flavonóides utilizados no tratamento dos distúrbios venosos e da circulação periférica de retorno. Estes princípios ativos agem basicamente de três formas na circulação de retorno: prolonga a atividade da norepinefrina parietal das veias, aumentando o tônus venoso e reduzindo a venostase; na micro-circulação, reduz a hiper-permeabilidade capilar e reduz a fibrinólise e nos vasos linfáticos, aumenta a frequência e a intensidade das contrações. Na realização da presente trabalho foram desenvolvidas e validadas as técnicas para a análise de dissolução e determinação do teor de ambos os princípios ativos, diosmina e hesperidina, na associação proposta. A quantificação dos princípios ativos foi feita em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) acoplado a um detector DAD, usando como fase móvel uma mistura de acetonitrila:ácido acético glacial:metanol:água (2:6:28:66 v/v) e um fluxo de 1,5 mL/min, e como fase estacionária uma coluna X-Terra C-18 com 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno com partículas 5 µm, a coluna foi aquecida a 40 °C. Os compostos foram detectados em 275 nm. As análises de dissolução foram realizadas utilizando o meio tampão tris-hidroximetilaminometano pH 12,4 + 1% de lauril sulfato de sódio, 900 mL, aparato II a 100 rpm durante 60 minutos. Os resultados obtidos mostraram que ambas as metodologias, teor de diosmina e hesperidina e dissolução de ambos, apresentaram resposta linear. Foram encontrados coeficientes lineares de 0,9954 para diosmina e 0,9992 para hesperidina na análise de teor, e de 0,9984 para diosmina e 0,9947 para hesperidina na análise de dissolução. Assim chegou-se à conclusão de que as técnicas analíticas propostas são específicas, sensíveis, precisas, exatas e robustas para a análise quantitativa e de dissolução da associação de diosmina 450 mg e hesperidina 50 mg na forma farmacêutica comprimido revestido.

Abstract

The Diosmina and Hesperidin are flavonoids used in disorders venous and disorders of the peripheral circulation of return treatment. These active principles act basically in three ways in the circulation of return: extending the activity of norepinephrine parietal of the veins, increasing venous tone, and reducing venostase, in micro-circulation, reduces the capillary hyper-permeability and reduces the fibrinolysis; in lymphatic vessels, increases the frequency and the intensity of contractions. In carrying out this work, techniques for analysis of dissolution and determination of the level of actives principles, Diosmine and Hesperidin in the proposed combination, were developed and validated. The quantification of active principles was performed by a high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a PDA detector, using as mobile phase with a flow rate of 1,5 mL per minute of a mixture of acetonitrile: glacial acetic acid: methanol: water (2:6:28:66 v / v), using a stainless steel column (15cm x 4,6mm) packed with octadecylsilyl silica gel for chromatography (5µm) (X terra) maintained at a temperature of 40°. The compounds were detected at 275nm. The analysis of dissolution were performed using tris-hidroximetilaminometano as buffered medium pH 12, 4 + 1% of lauryl sodium sulfate, 900 mL, apparatus II and rotate the paddle at 100 revolution per minute for 60 minutes. The results showed that both methods, assay of diosmine and hisperidin and dissolution of both, showed linear response. It were found linear coefficients of 0.9954 for diosmina and 0.9992 for hesperidin in the analysis of assay, and 0.9984 for diosmina and 0.9947 for hesperidin in the analysis of dissolution. Thus it was concluded that the analytical techniques proposed are specific, sensitive, precise, accurate and robust for the quantitative analysis and dissolution of the association of diosmine 450 mg and hesperidin 50 mg in coated tablet form.

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura básica dos flavonóides	4
Figura 2	Estrutura molecular do princípio ativo diosmina	6
Figura 3	Estrutura química da hesperidina	7
Figura 4	Diagrama esquemático de um espectrofotômetro de feixe simples	10
Figura 5	Aparelho Dissolutor	24
Figura 6	Aparato pá agitadora	25
Figura 7	Cromatograma do padrão de diosmina	42
Figura 8	Cromatograma do padrão de hesperidina	42
Figura 9	Cromatograma de uma amostra da associação de diosmina e hesperidina em comprimidos revestidos.	43
Figura 10	Cromatograma do placebo da associação de diosmina e hesperidina em comprimidos revestidos	43
Figura 11	Cromatograma de uma amostra da associação de diosmina e hesperidina depois de submetido à dissolução.	52
Figura 12	Cromatograma do placebo da associação de diosmina e hesperidina depois de submetido à dissolução.	53

Lista de Tabelas

Tabela 1	Principais classes de flavonóides e algumas características conhecidas.	5
Tabela 2	Classificação dos testes de validação segundo sua finalidade	21
Tabela 3	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade	22
Tabela 4	Fator de recuperação das metodologias que não se aplicaram ao medicamento desenvolvido pelo laboratório Neoquímica.	36
Tabela 5	Estabilidade do ativo diosmina em NaOH 0,1N	37
Tabela 6	Estabilidade do ativo hesperidina em NaOH 0,1N	37
Tabela 7	Estabilidade da solução padrão para o teste de teor	38
Tabela 8	Estabilidade da solução analítica da amostra para o teste de teor	39
Tabela 9	Variação de fluxo da fase móvel para o teste de teor	40
Tabela 10	Teste de variação de lotes de colunas cromatográficas para o teste de teor	41
Tabela 11	Seletividade do método de teor proposto	42
Tabela 12	Resultados obtidos no teste de linearidade para a metodologia de teor do ativo diosmina	44
Tabela 13	Resultados obtidos no teste de linearidade para a metodologia de teor do ativo hesperidina	44
Tabela 14	Repetibilidade do teor do 1º dia de análise	46
Tabela 15	Repetibilidade do teor do 2º dia de análise	47
Tabela 16	Avaliação de precisão intermediária	48
Tabela 17	Teste de exatidão em 80% da concentração de trabalho	48
Tabela 18	Teste de exatidão em 100% da concentração de trabalho	49
Tabela 19	Teste de exatidão em 120% da concentração de trabalho	49
Tabela 20	Teste de meios de dissolução, através de uma dissolução simples	50
Tabela 21	Seletividade do método proposto para dissolução	52
Tabela 22	Resultados obtidos no teste de Linearidade no método de dissolução para o ativo Diosmina	54
Tabela 23	Resultados obtidos no teste de Linearidade no método de dissolução para o ativo Hesperidina	54
Tabela 24	Repetibilidade para dissolução, 1º dia de análise	56
Tabela 25	Repetibilidade para dissolução, 2º dia de análise	57
Tabela 26	Avaliação de precisão intermediária no teste de dissolução	57

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Gráfico de linearidade para a metodologia proposta para teor do ativo diosmina	44
Gráfico 2	Gráfico de linearidade para a metodologia proposta para teor do ativo hesperidina	45
Gráfico 3	Perfil de dissolução, Daflon 500 x Medicamento teste (diosmina 450 mg + hesperidina 50 mg) em tampão tris-hidroximetilaminometano pH 12,4 + 1% de lauril sulfato de sódio	51
Gráfico 4	Gráfico de linearidade obtida com os resultados da tabela de Linearidade no método de dissolução para o ativo diosmina	54
Gráfico 5	Gráfico de linearidade obtida com os resultados da tabela de Linearidade no método de dissolução para o ativo hesperidina	55

Lista de abreviaturas

UV – Ultravioleta

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

PGE – Prostaglandina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

CE – Eletroforese Capilar

LC-MS – Liquid chromatography-mass spectrometry

ICH - International Conference on Harmonisation

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

ISO - International Organization for Standardization

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

US-FDA - United States Food and Drug Administration

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

BPF - Boas Práticas de Fabricação

USP - The United States Pharmacopeia

PDA (DAD) - Photo Diode Array

DPR – Desvio padrão relativo

Sumário

1.	Introdução	01
2.	Revisão da literatura	03
2.1	Flavonóides	03
2.1.1	Diosmina	06
2.1.2	Hesperidina	07
2.1.3	Atividade biológica associada à diosmina e à hesperidina	07
2.1.4	Métodos analíticos descritos na literatura para detecção e quantificação de flavonóides	08
2.2	Espectrofotometria	09
2.2.1.1	Lei de Lambert-Beer	11
2.2.2	Medições nas regiões do ultravioleta e visível	12
2.3	Cromatografia	13
2.3.1	Cromatografia líquida de alta eficiência	14
2.5	Validação de métodos analíticos	15
2.5.1	Parâmetros requeridos em uma validação de metodologia	19
2.1	Teste de dissolução.	22
3.	Materiais e métodos	27
3.1	Produto farmacêutico	27
3.2	Substâncias químicas de referência	27
3.3	Reagentes	27
3.4	Placebo	27
3.5	Metodologia experimental	28
3.5.1	Metodologia para determinação do teor em comprimido revestido de diosmina 450 mg e hesperidina 50 mg	28
3.5.1.1	Padrão de diosmina	28
3.5.1.2	Padrão de hesperidina	28
3.5.1.3	Preparo da amostra a partir de comprimidos revestidos	28
3.5.2	Análises por HPLC	29
3.5.2.1	Testes para validação da metodologia para	29

determinação do teor de princípios ativos	
3.5.2.1.1	Robustez/ resistência 29
3.5.2.1.1.1	Estabilidade das soluções analíticas 30
3.5.2.1.1.2	Variação no fluxo da fase móvel 30
3.5.2.1.1.3	Variação na coluna cromatográfica 30
3.5.2.1.2	Especificidade/seletividade 31
3.5.2.1.3	Linearidade / faixa de trabalho 31
3.5.2.1.4	Precisão 31
3.5.2.1.5	Exatidão 33
3.5.3	Ensaio de dissolução 33
3.1.2.1	Testes realizados para desenvolvimento do método de dissolução 33
3.5.3.2	Validação do ensaio de dissolução 34
3.5.3.2.1	Especificidade/seletividade 34
3.5.3.2.2	Linearidade / faixa de trabalho 34
3.5.3.2.3	Precisão 34
4.	Resultados e discussão 35
4.1	Determinação de teor dos princípios ativos 35
4.1.1	Teor dos princípios ativos obtidos pelo método desenvolvido 35
4.1.2	Robustez da metodologia proposta para determinação de teor 36
4.1.2.1	Estabilidade das soluções analíticas 36
4.1.2.2	Variação do fluxo da fase móvel 39
4.1.2.3	Variação da coluna cromatográfica 41
4.1.3	Especificidade / seletividade 41
4.1.4	Linearidade e faixa de trabalho 43
4.1.5	Determinação de precisão 45
4.1.5.1	Repetibilidade 45
4.1.5.2	Precisão intermediária 47
4.1.6	Exatidão 48

4.1.7	Conclusões sobre a metodologia de determinação de teor desenvolvida	50
4.2	Determinação do ensaio de dissolução	50
4.2.1	Método proposto	50
4.2.2	Especificidade / seletividade para dissolução	51
4.2.3	Determinação de linearidade e faixa de trabalho:	53
4.2.4	Determinação de precisão	55
4.2.5	Conclusões sobre o desenvolvimento e validação da metodologia de dissolução	57
5.	Conclusões	58
6.	Bibliografia	60

1. Introdução

O tratamento conservador das doenças do sistema circulatório depende em grande parte da mudança de hábitos de vida, alimentação e prática de atividade física adequada, correção de fatores de risco e de condições desencadeantes e tratamento farmacológico de doenças associadas. Por outro lado, a utilização de drogas com a finalidade de melhorar a qualidade de vida do paciente portador de vasculopatia periférica é uma prática freqüente e obviamente necessária. Portanto é de suma importância que o angiologista e ou cirurgião vascular estejam familiarizados com os conceitos fisiopatológicos e as opções terapêuticas da especialidade médica (ARAÚJO, 2002).

A doença venosa dos membros inferiores certamente é a causa mais freqüente de procura da especialidade. Dependendo do estágio evolutivo pode manifestar-se através de vários sinais e sintomas, muitas vezes subjetivos podendo variar desde a sensação de peso nas pernas, desconforto, inquietação, cansaço, parestesias, câibras e edema até as alterações tróficas (hiperpigmentação, lipodermatoesclerose, eczemas) e ulceração cutânea. A ocorrência de varizes como componente do quadro de insuficiência venosa crônica pode ser primária, congênita ou secundária. Excetuando-se o quadro agudo da trombose venosa profunda onde o tratamento farmacológico com heparina e anticoagulantes orais é inquestionável, nos casos crônicos desde os mais leves até os mais severos a utilização de drogas com o objetivo específico de mitigar os sintomas da insuficiência venosa devem ser considerados com parcimônia e certamente são coadjuvantes na terapia destas condições (ARAÚJO, 2006).

Alguns flavonóides apresentam ação farmacológica sobre o processo inflamatório. Dentre eles estão a diosmina e a hesperidina, componentes específicos do tratamento de transtornos perivenosos e pró-inflamatórios. Os flavonóides são conhecidos como inibidores da atividade de enzimas envolvidas na transformação dos ácidos graxos polissaturados da membrana citoplasmática. A hesperidina tem propriedades venotônica, vasoproteora e antivaricos e atua sobre a micro-circulação, aumentando a resistência e a permeabilidade, protegendo o endotélio. Além destas propriedades antiinflamatórias, os flavonóides apresentam efeitos analgésicos e antiagregante plaquetário. Tanto a diosmina quanto a hesperidina, reduzem o edema induzido por obstrução venosa (GRANADOS, 2003). Estudos clínicos recentes reportam a utilização de diosmina e hesperidina no tratamento de úlcera venosa da

perna, hemorróida e como agentes preventivos do câncer de cólon (EL-SHAFAE; EL-DOMIATY, 2001).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, combinada com diferentes detectores é comumente utilizada como método analítico para separação de flavonóides (KANAZE, *et. al.*, 2003). Alguns métodos de análise por HPLC foram relatados para a determinação de diosmina e hesperidina, isoladas ou em associação. No entanto, estes métodos possuem algumas desvantagens, como: (a) a utilização de ácidos e outras misturas terciárias ou quaternárias na fase móvel, (b) gradiente de eluição, conseqüentemente um longo tempo de análise, (c) não envolvem padrão interno, (d) o uso de álcalis fortes (por exemplo, NaOH) para extração dos flavonóides (EL-SHAFAE; EL-DOMIATY, 2001).

Para a associação diosmina e hesperidina na forma comprimido revestido, de uso bastante difundido no Brasil, não existem análises químicas descritas em farmacopéias e/ou formulários oficiais, existindo artigos científicos que relatam metodologias para quantificação das duas substâncias. Sendo assim, os objetivos principais do presente trabalho foram desenvolver e validar métodos analíticos para o controle de qualidade da associação diosmina e hesperidina presentes no medicamento de referência comercializado no Brasil (Daflon®) e no medicamento similar de uma empresa nacional de grande porte, utilizando a técnica de separação por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrofotometria UV, além de desenvolver e validar um método de dissolução para a associação de diosmina e hesperidina na forma farmacêutica de comprimido revestido. É importante ressaltar que a metodologia desenvolvida deve se aplicar ao medicamento teste e ao medicamento de referência, para que posteriormente seja efetuado o teste de equivalência farmacêutica.

A validação da metodologia analítica se faz necessário quando não existem análises descritas em farmacopéias e/ou formulários oficiais devidamente reconhecidos pela ANVISA, sempre que de forma direta ou indireta o processo de fabricação dos fármacos tenha sido alterado pela utilização de novos equipamentos, quando houver dúvida da qualidade final do produto e em caso de implantação de um processo ou método analítico novo (VALENTINI, 2002).

2. Revisão da literatura

2.1. Flavonóides

O termo “flavonóide” se deriva do latim flavus, que significa amarelo, apesar de grupos como os dos flavonóis e flavonas serem incolores e das antocianinas variarem seu espectro de cores do verde ao azul. Conhecem-se mais de 4200 flavonóides divididos de acordo com as características químicas e biosintéticas (MARTÍNEZ-FLÓREZ, *et.al.*; HOBBS; KRIS-ETHERTON, *et.al.*; 2002, 1991, 2002).

Os flavonóides foram descobertos em 1930, pelo prêmio Nobel Szent-Gyorgy pela extração da citrina da casca do limão. A citrina tem a propriedade de regular a permeabilidade capilar. Estes produtos naturais foram denominados inicialmente como vitamina P (permeabilidade) e também como vitamina C2 (algumas das substâncias pertencentes a este grupo apresentavam propriedades semelhantes às da vitamina C). Mas esta classificação foi abandonada em 1950 porque estas substâncias não foram confirmadas como vitaminas. Os flavonóides na verdade são uma classe de metabólitos secundários de plantas que se derivam da condensação de uma molécula de ácido cinâmico com três grupos malonil-CoA e que participam da fotossíntese catalisando o transporte de elétrons (YLMAZ; TOLEDO, 2004).

A quantidade de flavonóides nas plantas é grande e complexa devido à existência da forma O-glicosídica com diversos açúcares, tais como glucose, galactose, ramnose, arabinose, xilose e rutinose. A glicosilação aumenta a polaridade dos flavonóides e como conseqüência sua solubilidade. Acredita-se que a função dos flavonóides nas plantas seja a de proteger-las contra a radiação UV e contra os micro-organismos. Os efeitos fisiológicos em humanos são desconhecidos, mas as teorias se baseiam na função dos flavonóides como antioxidantes e captadores de radicais livres (JUSTESEN; KNUTHSEN; LETH, 1998).

Os flavonóides são encontradas com freqüência em frutas, vegetais, flores, folhas, cereais e no vinho (KRIS-ETHERTON, *et. al.*, 2002). Os efeitos bioquímicos e farmacológicos dos flavonóides são muito vastos, tais como as ações antioxidantes, antiinflamatória, antiplaquetária, vasodilatadora, anticancerogênica, antimicrobiana, antiviral, antialergênica, diurética, dentre outras (CLIMENT; CORMA, *et. al.*, 2004).

A amargura de alguns sucos e sumos de frutas é uma qualidade indesejável para a indústria, principalmente no suco de laranja. Os principais grupos de compostos presentes nesses frutos e que são responsáveis pela amargura são chamados de flavonóides (RIBEIRO, 2008).

Os princípios ativos hesperidina e diosmina são flavonóides utilizados no tratamento de insuficiência venosa crônica, dermatite varicosa, úlceras varicosas, linfedemas, hemorróidas, transtornos retinianos e vasculares (GRANADOS, 2003).

Os flavonóides são um dos maiores grupos de metabólitos secundários que desempenham um papel importante nas plantas como a defesa, a sinalização de compostos na reprodução e a simbiose. Estes compostos estão envolvidos em mecanismos de resposta contra o estresse, como a causada pela elevação das radiações UV-B, por infecção de microorganismos ou por ataque de herbívoros. Além disto, os flavonóides estão envolvidos na produção de nódulos radiculares como o sistema de fixação de nitrogênio em uma variedade de leguminosas, são precursores de pigmentos que conferem coloração às flores e desempenham um papel importante na interação com insetos. Eles também afetam a saúde humana e animal devido ao seu papel na a dieta, o que é atribuído às suas propriedades antioxidantes ou sua ação estrogênica. Os flavonóides apresentam atividade antimicrobiana e muitas enzimas envolvidas na sinalização intracelular podem ser afetadas pelos flavonóides (RIJKE, *et. al.*, 2006).

Podemos caracterizar os flavonóides por serem compostos de baixo peso molecular da família dos polifenóis complexos, com uma estrutura base C6-C3-C6 (dois anéis fenil – A – B – ligados através de um anel pirano – C) e geralmente ocorrem em plantas na forma de glicosídeos, sendo uma das substâncias responsáveis pela atribuição do perfil sensorial de frutas, atribuindo-lhes o corpo característico e pigmentos naturais. A estrutura básica dos flavonóides se apresenta na Figura 1 (MARTÍNEZ-FLÓREZ, *et.al.*, 2002).

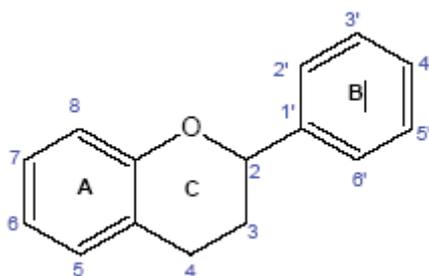


Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides (MARTÍNEZ-FLORES, *et.al.*, 2002).

Dependendo da substituição e do grau de oxidação do anel C, os flavonóides podem ser divididos em 14 classes. Na Tabela 1 se apresentam as principais classes e um resumo de suas características [YLMAZ, TOLEDO, (2004), MARTÍNES-FLORES, *et.al.*,(2002)].

Tabela 1. Principais classes de flavonóides e algumas características conhecidas (YLMAZ, TOLEDO, 2004, MARTÍNES-FLORES, *et. al.*, 2002).

Classes	Características
Flavonas e flavonóis	Pigmentação em flores; protetores contra raios UV nas folhas
Antocianos	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	Pigmentação amarela
Auronas	Pigmentação amarela
Flavononas	Podem apresentar sabor amargo
Isoflavonóides	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Di-hidro-flavonóis	Presentes em tecidos de madeira
Bioflavonóis	Propriedades antifúngicas
Flavanas	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes

Dentro da mesma classe os flavonóides diferem na substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000). Estes se encontram na natureza sob a forma de glicosídeos, formados através da união de resíduos de D-glucose à posição 3 ou à posição 7 destes flavonóides, sendo a primeira substituição a mais freqüente, que promove uma melhor absorção intestinal e uma maior bio-disponibilidade. No entanto, o glicosídeo apresenta menor reatividade na neutralização de radicais livres que o flavonóide correspondente, bem como uma maior hidrosolubilidade (MARTÍNES-FLORES, *et.al.*; HOBBS, 2002, 1991).

Em pesquisas epidemiológicas associaram alguns flavonóides à prevenção de doenças provenientes do envelhecimento, isto pode ser devido à sua ação antioxidante. A formação de radicais livres pelo oxigênio é supostamente a chave para o desenvolvimento de câncer e de doenças coronárias. Os radicais livres podem atacar as biomoléculas, como os lipídios, as proteínas ou o DNA, mas estas podem ser preservadas pela ação dos agentes antioxidantes (BIRCH, *et. al.*; BRENNAN; PAGLIARINI; KOO; SUHAILA, 2001).

O interesse econômico pelos flavonóides é decorrente de suas propriedades, tais como, as cores que esses pigmentos possuem, sua importância no processo de tanagem do couro, na fermentação do chá-da-índia, na manufatura do cacau e suas contribuições na nutrição e no sabor dos alimentos. Além disso, esses compostos possuem também importância farmacológica, funcionam como foto-protetores em cremes solares e repelentes de insetos, etc. (HARBONE; MBRY, 1982).

Diosmina e hesperidina são flavonóides glicosilados que ocorrem naturalmente nos citrinos. Estes compostos apresentam uma grande variedade de propriedades farmacológicas tais como antiinflamatório, antioxidante, seqüestro de radicais livres e antiulceroso, além de inibir determinadas enzimas do citocromo P-450, resultando em interações medicamentosas (KANAZE, *et. al.*, 2003).

2.1.1. Diosmina

A diosmina, 3',5-dihidroxi-4'-metoxiflavone 7-O-rutinoside, $C_{28}H_{32}O_{15}$, é um flavonóide obtido via reação de desidrogenação da hesperidina presente em grandes quantidades em várias frutas cítricas (QUINTIN; LEWIN, 2004). O produto se apresenta na forma sólida com ponto de fusão de 274 °C e massa molecular de 608,54 g/mol. A Figura 2 apresenta a estrutura química do princípio ativo diosmina.

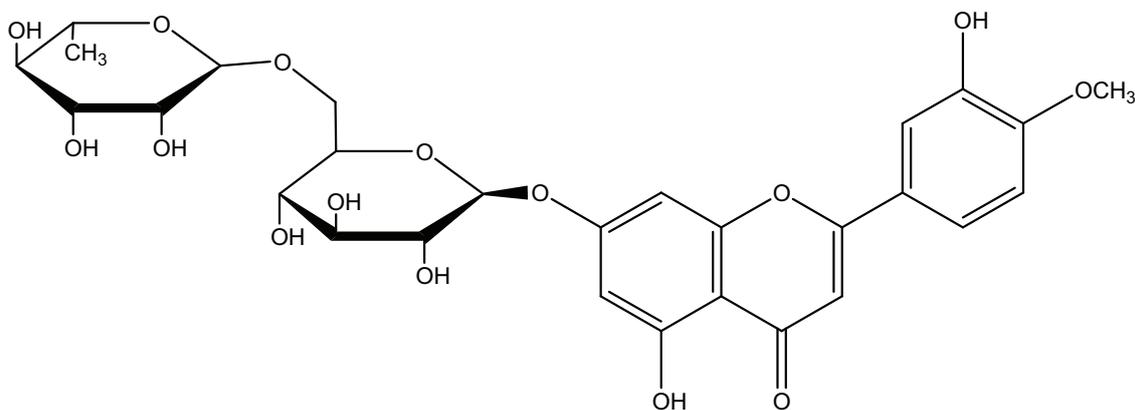


Figura 2. Estrutura molecular do princípio ativo diosmina.

2.1.2. Hesperidina

A hesperidina (3',5-dihidroxi-4'-metoxiflavanona-7-O-rutinoso), $C_{28}H_{34}O_{15}$, é um flavonóide de ocorrência natural em frutas e vegetais. A hesperidina é um flavonóide extraído principalmente de espécies cítricas e se apresenta sob a forma de um pó cristalino claro, com ponto de fusão entre 250 e 255 °C. A massa molecular da hesperidina é de 610,56 g/mol. A estrutura química da hesperidina se apresenta na Figura 3 (SAKATA, et.al., 2003).

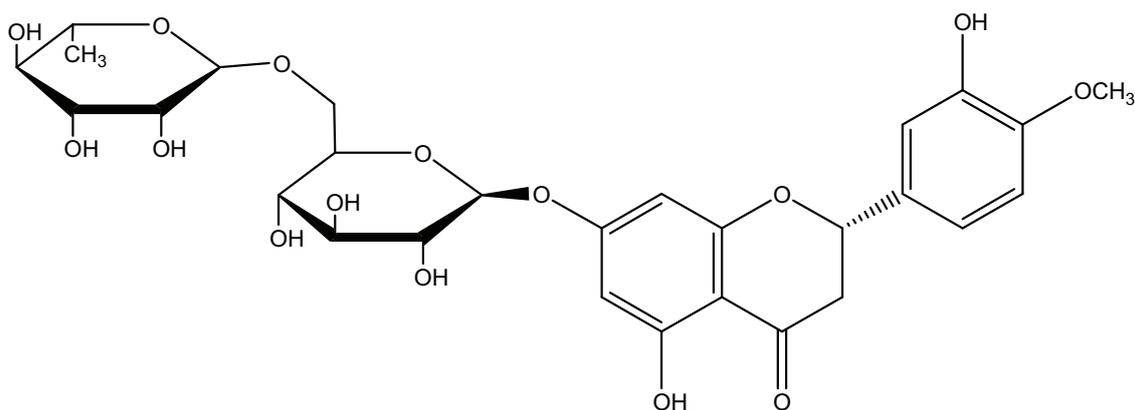


Figura 3. Estrutura química da hesperidina.

2.1.3. Atividade biológica associada à diosmina e à hesperidina

A literatura reporta que uma dieta rica em hesperidina combinada ou não com diosmina, exerce ação contra o câncer de língua, de colon, entre outros (TANAKA, et. al.; TANAKA, et.al.; SAKATA, et.al., 1997, 2000, 2003), no entanto é fato observado que a associação destes dois ativos possui ação sinérgica no tratamento da maioria das patologias para quais a hesperidina é indicada (SAKATA, et.al., 2003). Atualmente o Daflon 500 mg é usado no tratamento de doenças inflamatórias e insuficiência venosa e existe uma co-relação possível entre o efeito anti-inflamatório e a atividade quimiopreventiva da hesperidina. Existem dados reportados na literatura que indicam uma associação positiva entre a inflamação crônica e os riscos de câncer. Estudos recentes mostraram enzimas como COX-2 e/ou a sintase indutiva de óxido nítrico (iNOS) estão associadas com respostas inflamatórias (ARBABI, et.al., 2001, LALA, CHAKRABORTY, 2001) e tem um papel importante no câncer (CAO, et.al., 2002, CHAN, et.al., 1999, KO, et.al., 2002). Alguns trabalhos têm reportado que a hesperidina poderia modular a síntese da prostaglandina. SAKATA e colaboradores

reportaram que o tratamento com hesperidina suprime a produção de PGE₂, dióxido de nitrogênio (NO₂) e as expressões da proteína iNOS e concluíram que a hesperidina atua como inibidor de COX-2 e iNOS, os quais poderiam estar relacionados com a eficácia anti-inflamatória e anti-tumoral (SAKATA, *et.al.*, 2003).

2.1.4. Métodos analíticos descritos na literatura para detecção e quantificação de flavonóides

Várias técnicas podem ser empregadas na detecção e quantificação de flavonóides como: HPLC, HPTLC, LC-MS, CE, TLC (cromatografia em camada delgada). A espectroscopia de absorção no UV-Visível, entretanto, é o método mais simples para a análise destes compostos. Os flavonóides absorvem no UV-Visível devido à presença das ligações duplas dos anéis aromáticos (MARKHAN, 1982).

Muitos métodos são relatados na literatura para a determinação de flavonóides em vegetais (principalmente frutas cítricas) e produtos industrializados como sucos, vinhos e chocolates, é fator predominante na análise quantitativa e qualitativa destes compostos a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV ou de fluorescência, além de extração prévia por meio de soluções aquosas de solventes orgânicos, como metanol e acetonitrila, em banho ultra-som (SAKAKIBARA *et al.*, 2003 ; CARISTI *et al.*,2003).

A identificação dos flavonóides, quando utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, se baseia na comparação do tempo de retenção destes compostos com padrões comerciais. A coluna cromatográfica que têm proporcionado uma separação mais eficaz para estes compostos em extratos de frutas e vegetais é a C18 (ROLIM *et. al.*, 2006; JUSTESEN, KNUTHSEN, LETH, 1998).

Apesar da abundância de descrições analíticas para análise de flavonóides em plantas, pouco são os autores que relatam sua determinação em medicamentos, Segundo EL-SHAFAE e EL-DOMIATY (2001), a quantificação dos ativos da associação de diosmina e hesperidina em Daflon® pode ser feita empregando-se como diluente uma solução de 10% de DMSO em metanol, uma coluna LiChrosorb 10 µm, RP 18 de 25 x 4,6 mm, utilizando como fase móvel uma mistura de metanol e água (6/40, v/v), um fluxo de 1,5 mL/min, com detecção em 345 nm (método 1).

KANAZE *et. al.* (2003), cita como metodologia para separação de diferentes flavonóides, dentre eles a diosmina e a hesperidina, o seguinte método (método 2):

- a) Diluente: dimetilsulfóxido:metanol (1:1)

- b) Coluna: C8 (250 x/4.6 mm, 5 µm) acoplada a uma pré coluna C18 (20 x 4.6 mm, 37 a /53 µm)
- c) Temperatura da coluna: 34°C
- d) Fase Móvel: tetraidrofurano/água/ácido acético (21:77:2, v/v),
- e) Fluxo: 0,85 ml/min.
- f) Detecção: 280 nm
- g) Volume de injeção: 20 µL

Como já mencionado neste trabalho, nenhum compendio oficial traz uma metodologia que possa ser utilizada para determinação de diosmina e hesperidina, simultaneamente, no entanto, a Farmacopéia Britânica, trás o seguinte método para determinação de teor de diosmina, matéria prima (método 3):

- a) Diluente: dimetilsulfóxido
- b) Coluna: 10 cm x 4,6 mm C 18, 3 µm
- c) Temperatura da coluna: 40°C
- d) Fase Móvel: acetonitrila:ácido acético glacial:metanol:água (2:6:28:66 v/v).
- e) Fluxo: 1.5 ml/min.
- f) Detecção: 275 nm
- g) Volume de injeção: 10 µL

2.2. Espectrofotometria

A espectrofotometria é um processo de medida que basicamente, emprega as propriedades dos átomos e moléculas de absorver e/ou emitir energia eletromagnética em uma das regiões do espectro eletromagnético (CIENFUEGOS, 2000).

A espectroscopia de absorção é uma das ferramentas mais úteis e amplamente usadas disponíveis para análise quantitativa. Características importantes dos métodos espectrofotométricos incluem: (1) ampla utilização em sistemas orgânicos e inorgânicos, (2) sensibilidades típicas de 10^{-4} a 10^{-5} M, (3) seletividade moderada a alta, (4) boa exatidão (tipicamente, incertezas relativas de 1 a 3% são encontradas, embora com precauções especiais os erros podem ser reduzidos a décimos de uma parte por cento) (5) facilidade e conveniência de aquisição de dados (SKOOG, 2002).

Tecnicamente dizemos que quando uma molécula absorve um fóton, a energia da molécula aumenta, ou seja, os elétrons são promovidos a um estado excitado. Se a molécula emite um fóton, a energia da molécula diminui. O estado de menor energia

de uma molécula é chamado de estado fundamental. A radiação de microondas estimula o movimento de rotação das moléculas quando absorvida. A radiação infravermelha estimula as vibrações das moléculas, e a luz visível e a radiação ultravioleta causa a transferência de elétrons para orbitais de maior energia (HARRIS, 2005).

Quando a luz é absorvida por uma amostra, a energia radiante do feixe de luz diminui. A energia radiante, P , é a energia por segundo por unidade de área do feixe de luz. Na Figura 4 se apresenta um esquema de um espectrofotômetro de feixe simples.

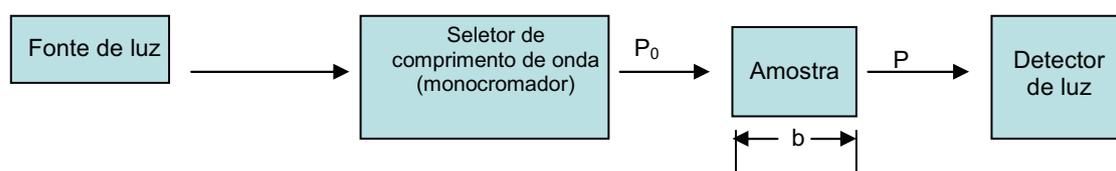


Figura 4: Diagrama esquemático de um espectrofotômetro de feixe simples.

No espectrofotômetro de feixe simples luz monocromática, oriunda de uma fonte apropriada, com energia radiante P_0 , atinge uma amostra em uma cubeta de comprimento b . A energia radiante do feixe que sai do outro lado da amostra é P . Alguma quantidade de luz pode ser absorvida pela amostra, de forma que $P < P_0$ [FARMACOPÉIA BRASILEIRA, (1988); HARRIS, (2005)].

Os espectrofotômetros podem dispor de registradores gráficos que permitem a obtenção de espectros de absorção. As escalas dos espectrofotômetros são, com frequência, calibradas para a leitura direta em absorbância e, também, em porcentagem de transmitância (VOGEL, 2002).

Uma aplicação moderna da espectrofotometria se dá através do DAD (Diode Array Detector), utilizado em cromatografia líquida de alta eficiência, que consiste numa série de detectores de fotodiodo, posicionados lado a lado, em um cristal de silício, de modo que cada comprimento de onda difrata, pela grade, e atinge um ponto deste arranjo. Cada diodo tem um capacitor dedicado, este é conectado por um interruptor, tipo transistor, a uma linha de saída comum a todos. Desta forma a radiação que atravessa a amostra é integral e instantaneamente analisada, determinando-se, portanto, a absorbância em todos os comprimentos de onda de modo simultâneo (HARRIS, 2001).

Os comprimentos de onda mais úteis em cromatografia líquida variam entre cerca de 210 nm a 330 nm (ou seja, luz ultravioleta) e, assim, um número suficiente de diodos devem ser incorporados na matriz do detector para poder cobrir esta gama de comprimentos de onda. Muitos compostos orgânicos, dentre eles os flavonóides, têm como característica absorção de energia na região UV. Desta forma o DAD é a melhor opção para monitorar a eluição destes compostos quando se utiliza a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para separação dos mesmos (CORNE, *et. al.*, 2006, ERTAS, *et. al.*, 2007; KLEJDUS, *et. al.*, 2005).

A utilização de um DAD elementar como detector para uma análise por HPLC UV / Visível pode oferecer uma gama de informações qualitativas sobre o analito químico em estudo, podendo até mesmo identificar a presença de contaminantes presentes nas amostras estudadas (George, Maute, 1982). Uma revisão dos trabalhos publicados sobre a análise espectrofotométrica mostra que a quantificação de compostos continua sendo um problema difícil quando existe alta sobreposição espectral, o que torna indispensável a utilização de detectores do tipo DAD. (Blanco *et. al.*, 1987)

2.2.1. Lei de Lambert-Beer

A absorvância é diretamente proporcional à concentração, C, de espécies absorventes de luz na amostra. A relação entre a absorvância e a concentração está dada pela Equação 1, conhecida como a lei de Lambert-Beer, ou simplesmente lei de Beer, que é o coração da espectrofotometria aplicada à química analítica (HARRIS, 2001).

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad \text{Equação 1}$$

A concentração da amostra, C, geralmente é dada em mol por litro (mol/L). O caminho óptico, b, geralmente é expresso em centímetros (cm). A grandeza ϵ (épsilon), absorvidade molar tem unidades de $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para tornar o produto $\epsilon \cdot b \cdot C$ adimensional. A absorvidade molar é uma característica da substância que indica a quantidade de luz absorvida num determinado comprimento de onda (HARRIS, 2001).

A lei de Beer é válida para radiação monocromática passando através de uma solução diluída, onde a espécie absorvente não está participando de um equilíbrio que seja dependente da concentração. Ela estabelece que a absorvância é proporcional à concentração da espécie absorvente. Ela se aplica à maioria das substâncias quando

a radiação é monocromática e as soluções a serem estudadas são suficientemente diluídas (menores ou iguais a 0,01M). Em soluções concentradas, as moléculas do soluto influenciam umas as outras devido à sua proximidade. Quando as moléculas do soluto ficam muito perto umas das outras suas propriedades sofrem ligeiras modificações. Em concentrações muito altas, o soluto torna-se o solvente. As propriedades de uma molécula não são exatamente as mesmas quando dissolvidas em solventes diferentes (HARRIS, 2005).

Para a maioria das análises químicas, a resposta do procedimento analítico deve ser avaliada usando-se quantidades conhecidas do analito (os padrões), de forma que a resposta para uma quantidade desconhecida possa ser determinada. Tendo em vista esse propósito, normalmente faz-se uso de uma curva de calibração, que mostra a resposta de um método analítico em função de quantidades conhecidas do analito (HARRIS, 2005).

Quando se trabalha com soluções padrão se faz uso da relação entre concentrações e absorbâncias. Entretanto, nem sempre tais soluções podem ser mantidas estáveis e sua preparação diária demanda grande perda de tempo. É por isso que, com mais freqüência, se recorre ao uso de curvas de calibração (CIENFUEGOS, 2000).

2.2.2. Medições nas regiões do ultravioleta e visível

A espectroscopia UV-Visível é uma técnica simples, rápida e de baixo custo se comparada a outras técnicas, bons resultados já foram obtidos em trabalhos que buscavam utilizar esta técnica para detecção de flavonóides (CHABARIBERI, 2003).

As medições espectrofotométricas na região do ultravioleta e visível em geral requerem a comparação da absorbância da solução da amostra, preparada na concentração especificada da metodologia analítica, com a absorbância de padrões de concentração conhecida. Inicialmente se procede à leitura da solução padrão e, em seguida, à da amostra, com o menor intervalo de tempo possível ente as duas etapas e em condições experimentais idênticas. O importante é que cada substância tem um espectro característico e, desse modo, se queremos identificar um material desconhecido, poderemos fazê-lo a partir de sua curva de absorção, comparando-a com curvas de substâncias conhecidas. (CIENFUEGOS, 2000, FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Em análises realizadas com grande freqüência, pode-se elaborar uma curva de calibração (gráficos de absorbância *versus* concentração), utilizando soluções de

concentrações crescentes de padrões de referência. O resultado do teor da amostra é obtido por interpolação ou através da equação da reta (obtida por regressão linear) (CIENFUEGOS, 2000, HARRIS, 2005).

O cálculo para a determinação da concentração da solução-amostra em referência à solução-padrão baseia-se na equação da lei de Beer, igualmente válida para ambas:

$$A_p = abC_p \quad \text{Equação 1a}$$

$$A_a = abC_a \quad \text{Equação 1b}$$

Onde:

A_p e A_a = Absorvância da solução-padrão e da amostra;

C_p e C_a = Concentração da solução-padrão e da amostra;

Se as concentrações são expressas nas mesmas unidades e as cubetas não diferem nas dimensões, a absorvidade, A , e o caminho óptico, b , possuem o mesmo valor e ambas as equações e podem ser combinadas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

$$C_a = C_p(A_a/A_p) \quad \text{Equação 2}$$

Da Equação 2 infere-se que, conhecendo-se a concentração do padrão, obtém-se a concentração da amostra, a partir de um espectrofotômetro. Porém o uso de espectrofotômetros, puramente, pode ser limitado, no caso de medições de concentração de fármacos, pelo fato de que diferentes compostos podem ter os mesmos cromóforos.

Para quantificar ou identificar substâncias de qualquer natureza é necessário, na maioria dos casos, separar o composto de interesse dos demais elementos constituintes da amostra, para evitar erros na sua identificação e quantificação. Dentre as principais técnicas de separação utilizadas, a cromatografia vem sendo, há mais de meio século, a grande responsável pelo avanço e aperfeiçoamento das metodologias de análise empregadas em controle de qualidade (GIL, *et. al.*, 2005).

2.3. Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação que se fundamenta na migração diferencial dos componentes de uma mistura devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande

variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (CASS; DEGANI, 2001).

Movimentando-se com a mesma velocidade na fase móvel os compostos não seriam separados uns dos outros, porém por possuírem afinidade pela fase estacionária em diferentes intensidades esses compostos são atrasados uns em relação aos outros. Esse é o pressuposto da separação nos métodos cromatográficos (GIL, *et. al.*, 2005).

A técnica HPLC faz análises mais rápidas do que a cromatografia clássica, com alta resolução e eficiência. Dependendo do detector pode atingir sensibilidade em nível de parte por bilhão (ppb) ou trilhão (ppt) (SKOOG, *et. al.*, 2002).

Dentre as técnicas analíticas de separação, a HPLC é a mais usada, possuindo alta sensibilidade, fácil adaptação em determinações quantitativas acuradas, adequação a separações de espécies não voláteis ou termicamente instáveis, ampla aplicabilidade a substâncias, como exemplo, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, aminoácidos, carboidratos terpenóides, pesticidas, dentre outras (SKOOG, *et. al.*, 2002).

O detector mais utilizado para separações por HPLC é o detector de UV-Visível, sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicos, entre outros (DEGANI, *et. al.*, 1998).

Os detectores de fotodiodos fornecem espectros no UV-Vis do eluente da coluna em determinados intervalos de tempo. Este tipo de detector é muito útil para desenvolvimento de métodos, pois possibilita a varredura da região UV-Vis em uma única corrida cromatográfica, medidas de pureza de pico e na análise de amostras desconhecidas (CASS, DEGANI, 2001).

2.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida em coluna clássica utiliza colunas de vidro de diâmetro relativamente grandes que contêm fases estacionárias finamente divididas através das quais percolam fases móveis sob a ação da gravidade. Estes sistemas permitem a separação de misturas bastante complexas. A separação é demorada e as diversas frações coletadas devem ser submetidas à análise química ou espectroscópica para conhecer sua pureza e composição (VOGEL, 2002).

No entanto, se a fase móvel líquida for submetida a uma pressão alta, se a fase estacionária possuir uma alta superfície de contato em um pequeno volume, e se a

saída da coluna de separação estiver diretamente ligada a um espectrofotômetro então ter-se-ia um método eficiente para a separação e quantificação da amostra.

Nos equipamentos usados para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), também conhecida como HPLC (do inglês *high performance liquid chromatography*) se acopla um sistema cromatográfico de alta pressão a um espectrofotômetro.

O primeiro cromatógrafo líquido foi construído por CSABA HORVATH na Universidade de Yale, em 1964 e foi inicialmente chamado de “cromatógrafo com líquido sob alta pressão” (HPLC), mas o próprio HORVATH adotou para o processo o nome “cromatografia líquida de alta eficiência” com o qual hoje é conhecido (VOGEL, 2002).

As características da cromatografia líquida de alta eficiência são:

- Alto poder de resolução;
- Separações rápidas;
- Monitoramento contínuo do eluente;
- Medidas quantitativas exatas;
- Análises repetitivas e reprodutíveis com a mesma coluna;
- Automação do procedimento analítico e do manuseio dos (VOGEL, 2002).

Os detectores mais utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência são os espectrofotométricos. Estes se baseiam no princípio de absorção de luz ultravioleta ou de luz visível, quando amostra sai da coluna passa por uma pequena célula de escoamento mantida no feixe de radiação. Os detectores espectrofotométricos podem apresentar comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo. Detectores de comprimento de onda fixo operam em um único valor, tipicamente 254 nm, emitido por uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão. Os detectores com comprimento de onda variável contêm uma fonte contínua de emissão, como uma lâmpada deutério ou xenônio de alta pressão, um monocromador ou um filtro de interferência, de modo a gerar radiação monocromática a um valor selecionado pelo operador, podendo, ainda, ser programados para alterar o comprimento de onda durante o desenvolvimento da análise. Os detectores de comprimento de onda múltiplo medem, simultaneamente, a absorbância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo diodos (CORNE, *et. al.*, 2006, VOGEL, 2002).

2.4. Validação de métodos analíticos

A validação de metodologia analítica pode ser considerada como uma das mais bem conhecidas áreas de química analítica. O que se reflete no número de artigos apresentados e publicados em revistas a cada ano. No entanto, alguns dos parâmetros relevantes, recomendados por órgãos reguladores, são freqüentemente utilizados de forma indiscriminada e incorreta, devido à aplicação incoerente de conceitos estatísticos (ARAÚJO, 2009).

Os resultados advindos da validação de um método analítico podem não ser melhores do que a qualidade do método que foi desenvolvido. Assim, antes do iniciar a validação de um método, é muito importante que o mesmo seja testado por diversas vezes e que todos os passos de desenvolvimento do mesmo tenham sido devidamente documentados (BANSAL, DE STEFANO, 2007).

A garantia de que um método analítico novo gere informações confiáveis e interpretáveis sobre uma amostra, está dada no processo de validação do mesmo. A validação de um método então é um processo contínuo que se inicia com o planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo seu desenvolvimento (RIBANI, *et. al.*, 2004). Atualmente a validação das metodologias analíticas é requisito fundamental no processo de registro de medicamentos genéricos pelo Ministério da Saúde (GREEN, 1996).

Tamãha é a importância da validação de uma metodologia analítica que, quando utilizada para fins periciais sem estar validada, pode até mesmo gerar uma inconsistência judicial, sendo assim questionável como prova criminal e tendo como nulo os resultados através dela encontrados. Mesmo na área forense, pode-se definir validação analítica como um programa documentado que proporciona um alto grau de segurança de que um processo específico produzirá um resultado que satisfaz as especificações e atributos de qualidade pré-determinados. (Peters; Drummer; Musshoff, 2007)

Validar um processo, equipamento, sistema ou metodologia é tornar legítimo, através do estabelecimento de documentações, tudo o que envolve o processo de produção e controle de qualidade, desde as condições do ambiente, até os insumos e matérias-primas que entram em sua composição. Em outras palavras, validar significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância, rigorosamente, preestabelecidos (MORETTO, SHIB, 2000, NICOLÓSI, 2003).

A validação é o processo que permite então definir uma exigência analítica e confirmar se o método que está sendo submetido à investigação, tem a capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer (EURACHEM WORKING GROUP, 1998). O processo de validação inclui a especificação dos requisitos do método; a determinação das características do método; a verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método (SILVA, *et. al.*, 2007).

Órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e outros exigem a validação de métodos analíticos como requisito fundamental para o credenciamento de qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (RIBANI, *et. al.*, 2004).

Todo método analítico, para merecer o nome, deve estar cientificamente respaldado e quando utilizado por diferentes operadores, com equipamentos similares, em diferentes laboratórios deve ser capaz, dentro de certos limites, de fornecer resultados confiáveis. Em outras palavras, deve ter uma base racional e ser adequada para o propósito estabelecido. O processo que demonstra que tal método funciona é chamado de validação analítica ou validação de método analítico (SHARP, 2002).

A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) também redigiu um documento técnico que define um guia para validação de métodos analíticos que tem sido utilizado pela ISO. A norma internacional ISO/IEC 17025, é uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração que apresenta a “validação de métodos” como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação. O US-FDA (United States Food and Drug Administration) também tem proposto guias sobre validação de métodos (RIBANI, *et. al.*, 2004).

O tema validação de metodologia analítica foi introduzido na legislação brasileira com a publicação da Resolução (RE) nº 391 de agosto de 1999, que aprovou o regulamento técnico para medicamentos genéricos, determinando a validação dos métodos analíticos e dos processos de fabricação, como critérios a serem seguidos para o registro e o controle da qualidade dos medicamentos genéricos. A validação da metodologia analítica foi normatizada no anexo III desta portaria, através do Guia de Validação de Métodos Analíticos. Esta resolução foi substituída pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, de janeiro de 2001, que manteve o Guia de Validação de Métodos Analíticos como anexo V (BRASIL, 2001a).

Os estudos de validação como parte essencial das Boas Práticas de Fabricação foram introduzidos com a publicação da RDC nº 134 de julho de 2001. A partir de esta data a validação passou a ser de aplicação geral para todos os medicamentos no Brasil (BRASIL, 2001b).

A publicação da RDC nº 84, de março de 2002, substituiu a RDC nº 10, os guias que compunham o regulamento técnico de genéricos foram desmembrados em resoluções específicas, assim, a validação da metodologia analítica passou a ser normatizada pela Resolução (RE) nº 475 de 19 de março de 2002 (BRASIL, 2002a).

A partir deste momento, pode-se dizer que a validação de metodologia analítica ganhou uma legislação específica, não apenas ligada ao medicamento genérico. Apesar disso, esta resolução não esclareceu quando se deve validar uma metodologia analítica. Esta lacuna foi preenchida com a publicação da Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003, que prevê que no caso de metodologia analítica, não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia deverá ser submetida aos parâmetros de validação, e após avaliação dos resultados obtidos, considerada validada (BRASIL, 2003a).

O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que o mesmo é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, para a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de quantificação e exatidão adequadas à análise (BRASIL, 2003a).

Para os estudos de validação devem-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados (BRASIL, 2003a).

Segundo Resolução BRASIL, 2003b, na ausência de uma metodologia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais inscritos na Farmacopéia Brasileira, poderá ser adotada a metodologia oficial, última edição, de um dos seguintes compêndios internacionais:

- Farmacopéia Alemã
- Farmacopéia Americana e seu Formulário Nacional
- Farmacopéia Britânica
- Farmacopéia Européia

- Farmacopéia Francesa
- Farmacopéia Japonesa
- Farmacopéia Mexicana

A Resolução BRASIL, 2006, incluiu a Farmacopéia portuguesa à lista de compêndios oficiais utilizados no Brasil.

A Farmacopéia dos Estados Unidos resume de maneira clara os atributos que o método analítico deve apresentar: exatidão, precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008).

2.4.1. Parâmetros requeridos em uma validação de metodologia

No caso de uma metodologia analítica que não está descrita em farmacopéias ou formulários oficiais devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir e detalhados mais adiante na Tabela 2 (BRASIL, 2003a, UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008, RIBANI, *et. al.*, 2004).

- Exatidão
- Precisão
- Robustez
- Linearidade e Intervalo
- Especificidade e Seletividade
- Limite de detecção (sensibilidade)
- Limite de quantificação (USP, 2008)

A exatidão representa o grau de concordância ou compatibilidade entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão do método deve ser determinada utilizando-se três concentrações (baixa, média e alta), contemplando o intervalo linear do procedimento. A exatidão pode ser expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a equação 3 (BANSAL, DE STEFANO, 2007; GIL, 2007; RIBANI, *et. al.*, 2004; UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008).

$$Exatidão = \frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ teórica} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI, *et. al.*, 2004). A partir dos valores obtidos, calcula-se o desvio padrão e quanto menor for seu valor melhor será a precisão do método, o DPR e calculado conforme equação 4 (DUX, 1990).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{equação 4}$$

Onde,

DP é o desvio padrão;

CMD é a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, com a concentração do analito na amostra e com a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5,0 % (BANSAL, DE STEFANO, 2007).

De acordo com o INMETRO, a robustez de um método (“robustness”) mede a sensibilidade que o mesmo apresenta face às pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não for afetado por uma modificação pequena e deliberada nos seus parâmetros (RIBANI, *et. al.*, 2004).

O intervalo de linearidade do método se determina através de resultados analíticos diretamente proporcionais à concentração das substâncias em estudo, sendo então construída uma curva de calibração analítica. Usando um método de regressão linear determina-se a melhor reta que passa pelos pontos obtidos experimentalmente (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008).

A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e outros produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008).

O limite de detecção (LD), utilizado para detecção de substâncias em nível de traços, representa a menor concentração da substância que está sendo analisada que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada e o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI, *et. al.*, 2004).

Para o caso da transferência de metodologias da matriz de uma empresa as subsidiárias no Brasil e/ou das empresas nacionais para os centros de estudos de equivalência farmacêutica, uma metodologia poderá ser considerada validada, se foram avaliados os parâmetros de precisão, especificidade e linearidade. Uma cópia de toda a documentação original da validação da metodologia deverá ser anexada, como prova de que a metodologia foi originalmente validada e deverá conter, no mínimo, todos os parâmetros relacionados anteriormente (BRASIL, 2003a).

Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e treinados de forma adequada (LEITE, 2004). Os testes para a validação de acordo com sua finalidade são classificados em 4 categorias conforme se apresenta na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos testes de validação segundo sua finalidade (BRASIL, 2003a).

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou em matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e em matérias-primas
III	Testes de desempenho (dissolução, liberação do ativo, etc.)
IV	Testes de identificação

Para cada uma de destas categorias anteriores exige-se a realização de um conjunto de testes que estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade (BRASIL, 2003a).

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

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

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária (BRASIL, 2003a).

2.5. Teste de dissolução.

Os testes de dissolução para formas farmacêuticas sólidas foram inicialmente incluídos na Farmacopéia Americana na década de 1960. Estes testes objetivam avaliar a cedência do fármaco contido ou não (dissolução intrínseca) em uma forma farmacêutica, para um meio similar aos líquidos corpóreos. O obstáculo mais significativo à aplicação universal dos métodos de dissolução foi à padronização das condições necessárias ao teste e que possibilitam a reprodução dos resultados por outros laboratórios. A partir desta constatação foram estudadas diferentes variáveis como: vibração durante o funcionamento do equipamento, alinhamento e velocidade do sistema de agitação, geometria da cuba de dissolução, adsorção, presença de gás dissolvido nos meios de dissolução, centralização dos cestos, posição/local de amostragem, entre outras. Os resultados desses trabalhos deram origem a um guia de dissolução publicado em 1978, nos Estados Unidos (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS; 2007)

Os estudos de dissolução são uma ferramenta indispensável nas várias etapas dos processos de desenvolvimento galênico, identificação de variáveis críticas na produção, formulação, controle de qualidade, estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* e assuntos regulamentares (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002)

Há diversas maneiras de verificar o poder desafiador do teste de dissolução: variações nas características do fármaco (tamanho de partícula, cristalinidade, solvatação, rota de síntese), na formulação (variações qualitativas e quantitativas) e nos processos e parâmetros produtivos (via úmida ou compressão direta; força de compressão, método de secagem, revestimento, ordem de adição dos componentes da formulação, capacidade e tamanho dos equipamentos envolvidos) gerando, conseqüentemente, liberações distintas do fármaco (*Pharmacopecial forum*, 2004).

O teste de dissolução se baseia no princípio de que, à medida que um comprimido se fragmenta em pequenos pedaços, a área de superficial aumenta e facilita a dissolução no meio o que, portanto, está relacionado com a biodisponibilidade do fármaco no organismo (LACHMAN *et al.*, 2001).

É importante diferenciar o teste de dissolução com o teste de desintegração, este último é realizado para determinar o tempo necessário para que o comprimido se desintegre nas condições do teste e, para que todas as partículas atravessem uma rede de 10 *mesh*. Este teste não permite determinar se as partículas resultantes libertarão, ou não, o fármaco para o meio do teste a uma velocidade adequada (LACHMAN *et al.*, 2001).

Assim, os testes de dissolução e as especificações para estes testes, têm sido desenvolvidos para quase todos os tipos de comprimidos. Se for pretendido que o fármaco contido num comprimido atinja rapidamente níveis elevados no sangue, o fármaco deve dissolver rapidamente. Pode-se, então, relacionar a velocidade de dissolução do fármaco diretamente com a eficácia do comprimido, ou com as diferenças de biodisponibilidade entre formulações. Portanto, determinar se um comprimido liberta, ou não, o fármaco quando colocado num meio semelhante ao que encontrará no trato gastrintestinal é de grande importância para o formulador (LACHMAN *et al.*, 2001).

De acordo com a FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV (1988), o aparelho de dissolução, demonstrado na figura 8, consiste de sistema contendo as seguintes partes:

- (1) Um recipiente de forma cilíndrica e fundo arredondado com a parte superior achatada, de vidro, plástico ou qualquer outro material transparente e inerte, que não reaja, adsorva ou interfira com o medicamento a ser testado com 1

- L de capacidade. Pode ser adaptada tampa de material transparente com um furo central para permitir a colocação de agitadores e outro para permitir as coletas de amostras e a inserção do termômetro;
- (2) Uma haste metálica (de aço inoxidável) para agitar o meio de dissolução, podendo ter em seus extremos dois tipos de agitadores; pás ou cestas. A haste deve ser centralizada em relação ao fundo do recipiente que contém o meio de dissolução e ao rodar suavemente seu eixo não deve ser desviado mais de 0,2 mm em relação ao eixo vertical do recipiente;
 - (3) Um dispositivo com seletor de velocidade que imprima à haste a velocidade de rotação especificada na farmacopéia, e capaz de manter essa velocidade dentro dos limites de +/- 2%.



Figura 5. Aparelho Dissolutor (<http://www.flowscience.com.br>)

Os recipientes estão submersos em um banho de material transparente e tamanho adequado, o qual deve possuir dispositivo capaz de manter temperatura homogênea de 37°C +/- 0,5°C durante o período do teste. De preferência, a montagem da aparelhagem deve permitir a visualização das amostras testadas e dos agitadores durante o teste (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Quando especificado na farmacopéia, utiliza-se como agitador uma haste inoxidável, que possui em sua extremidade uma cesta desmontável, do mesmo material. A amostra deve ser colocada dentro da cesta seca, no início do teste. Em outros casos, utiliza-se como agitador uma haste de aço inoxidável, contendo uma pá em sua extremidade, sendo que a haste e a pá formam um conjunto único, podendo ser revestido de material inerte. Durante o teste, deve ser mantida distância de 25 mm +/- 2 mm entre o extremo inferior da pá e o fundo interno do recipiente que contém o meio de dissolução. Logo após adicionar a amostra ao meio de dissolução, inicia-se a agitação (tempo zero) com velocidade pré-fixada e durante o tempo especificado na farmacopéia correspondente (PRISTA, *et. al.*, 1995). Este aparato é representado na Figura 9.

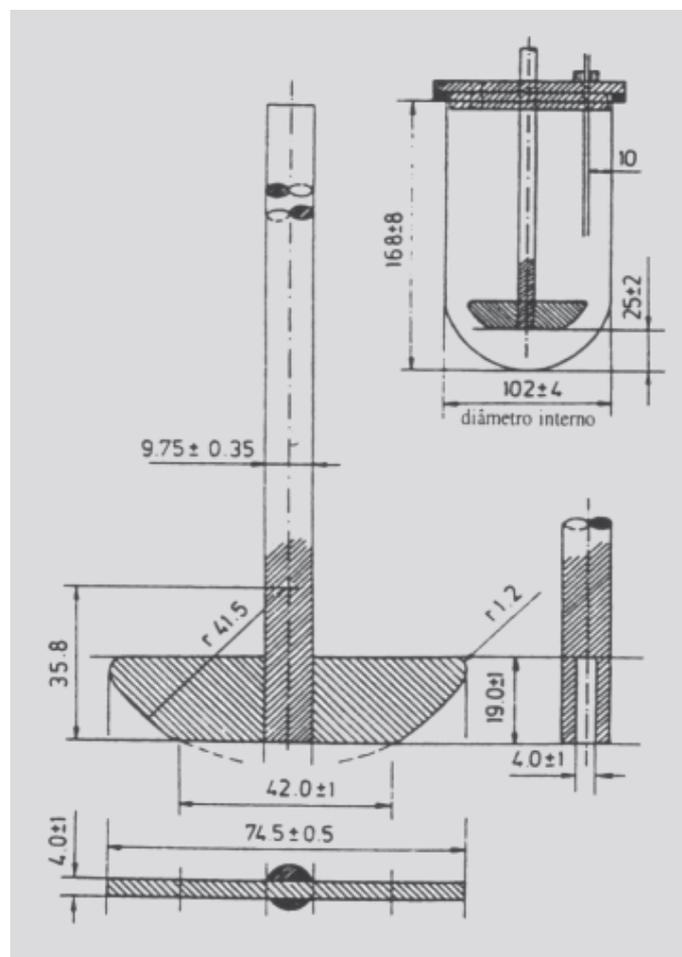


Figura 6. Aparato pá agitadora (INFARMED, 1997)

Quando são usados estes aparelhos, a tomada de amostra deve ser efetuada a meia distância entre a superfície do líquido e a parte de cima da pá ou do cesto e a,

pelo menos, 10 mm da parede do recipiente. Após a filtração das amostras, procede-se à medição do fármaco segundo a metodologia analítica correspondente (PRISTA *et al.*, 1995).

O meio de dissolução que deve ser utilizado está especificado na farmacopéia. Os gases naturalmente dissolvidos no meio de dissolução devem ser retirados antes do início do teste, pois ao serem liberados sob a forma de pequenas bolhas durante os testes causam turbulências no meio, alterando significativamente os resultados. Quando o meio de dissolução for solução tampão, o pH deve ser ajustado a mais ou menos 0,05 unidades do valor do pH especificado na farmacopéia (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Se na farmacopéia existe um único tempo especificado, este representa o tempo máximo dentro do qual deve ser dissolvida a quantidade mínima, em porcentagem, de princípio ativo estabelecido na mesma (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

A interpretação dos resultados de um teste de dissolução pode ser conseguida em três fases se necessário, sendo que o termo Q é especificado na metodologia analítica do produto e significa o teor de princípio ativo, liberado no meio de dissolução. Na primeira fase (F_1) testam-se seis comprimidos, sendo aprovado o lote se todos os comprimidos estão dentro dos limites de tolerância apresentados na metodologia ($Q + 5\%$). Se os resultados não estão de acordo com F_1 , testam-se mais seis comprimidos (S_2). O lote de comprimidos é aprovado se a média dos doze comprimidos é maior, ou igual, a Q, e nenhuma das unidades, forem inferiores a ($Q - 15\%$). Se o lote continua a não passar no teste, testam-se outros doze comprimidos, aceitando-se o lote se a média de todos os 24 comprimidos for maior, ou igual a Q e, se não mais do que 2 comprimidos apresentarem resultados inferiores a ($Q - 15\%$) (LACHMAN *et al.*, 2001).

Os ensaios de dissolução *in vitro* constituem importante meio de caracterização da qualidade biofarmacêutica de uma forma farmacêutica sólida oral, possibilitando o controle da qualidade farmacêutica e o estabelecimento de correlações com os dados obtidos *in vivo*. O conhecimento e controle das variáveis que podem influenciar a liberação da substância ativa bem como a padronização e conseqüente calibração e validação de equipamentos e procedimentos fortalecem a importância destes ensaios, tornando-os mais confiáveis, robustos e exeqüíveis. A seleção criteriosa das condições do ensaio deve ser orientada no sentido de se obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios aos padrões de qualidade inicialmente pretendidos (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

3. Materiais e métodos

3.1. Produto farmacêutico

Na realização do presente trabalho foi utilizada a associação de Diosmina 450 mg e Hesperidina 50 mg, na forma farmacêutica de comprimido revestido, cujo medicamento referência no mercado é o Daflon® 500 mg.

3.2. Substâncias químicas de referência

Como padrões de referência foram usados para a Diosmina o “Diosmin” código Y000094, lote 01, com 94,6% de pureza, da Farmacopéia Britânica e para a Hesperidina, devido à inexistência de padrão primário utilizou-se a Hesperidina fornecida pela Sigma-Aldrich lote H5354 e teor de 93,1%.

3.3. Reagentes

Os reagentes usados no desenvolvimento do presente trabalho foram: metanol grau HPLC, acetonitrila grau HPLC, ácido acético, fornecidos pela J.T. Baker. Hidróxido de sódio, fornecido pela DMallinckrodt. Tris-hidroximetil-aminometano, fornecido pela Merck. Lautil sulfato de sódio, fornecido pela VETEC. Ácido fosfórico grau HPLC, fornecido pela Tedia.

A água empregada no preparo das soluções analíticas e na fase móvel foi água ultra-pura obtida pelo Sistema Mili-Q Gradient.

3.4. Placebo

Os comprimidos para os testes com placebo foram preparados pelo setor de desenvolvimento farmacotécnico, conforme a formulação utilizada no laboratório Neoquímica, excluindo-se as substâncias em estudo (diosmina e hesperidina).

3.5. Metodologia experimental

3.5.1. Metodologia para determinação do teor em comprimido revestido de diosmina 450 mg e hesperidina 50 mg

3.5.1.1. Padrão de diosmina

Pesaram-se de forma exata em balança analítica 90,0 mg de Diosmin padrão e foram transferidos cuidadosamente para um balão volumétrico de 50,0 mL. A seguir a diosmina foi então dissolvida com NaOH 0,1 mol/L e submetida a agitação em ultrassom até completa dissolução e o volume do balão foi completado com NaOH 0,1 mol/L. A amostra assim preparada foi filtrada através de uma membrana de 0,45 µm de diâmetro de poros diretamente no vial de 2 mL.

3.5.1.2. Padrão de hesperidina

Pesaram-se exatamente 20,0 mg de hesperidina padrão em balança analítica e foram transferidos para um balão volumétrico de 100,0 mL, o conteúdo foi dissolvido com NaOH 0,1 mol/L e levado a um banho ultra-sônico até dissolução completa. A seguir foi completado o volume do balão com NaOH 0,1 mol/L. A amostra foi filtrada em uma membrana de 0,45 µm de diâmetro de poros diretamente no vial de injeção de HPLC de 2 mL.

3.5.1.3. Preparo da amostra a partir de comprimidos revestidos

Pesaram-se 20 comprimidos, separadamente, e determinou-se o valor do peso médio dos mesmos, procedeu-se à pulverização. A seguir, pesou-se um peso médio, equivalente a 450,0 mg de diosmina e 50,0 mg de hesperidina. O material foi então transferido para um balão volumétrico de 250,0 mL e dissolvido com NaOH 0,1 mol/L. A mistura foi submetida a agitação em um banho ultra-sônico até a solubilização completa e depois completou-se o volume do balão com NaOH 0,1 mol/L. A mistura foi filtrada através de uma membrana de 0,45 µm de diâmetro de poros diretamente no vial de 2 mL.

3.5.2 Análises por HPLC

Para determinação do teor dos princípios ativos, diosmina e hesperidina, foi empregado um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo Alliance 2695 (com bomba e injetor integrados) e um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) modelo 2996, também da Waters. O volume de injeção foi de 10 µl. Utilizou-se uma coluna X-Terra C-18 lote W33571S004 com 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. A fase móvel usada foi uma mistura de água:metanol:acetonitrila:ácido acético (66:28:2:6) a um fluxo de 1,5 mL/min, o tempo total de análise foi de 10 min.

No preparo da solução de NaOH 0,1 mol/L foram pesados exatamente 4,08 g de hidróxido de sódio PA e dissolvidos na quantidade de água necessária para preparar 1000,0 mL de solução.

O cálculo do teor foi realizado segundo a seguinte expressão:

$$\text{Teor (\%)} = \frac{AA}{AP} \times 100$$

Onde: AA = Área da soma dos picos de diosmina e hesperidina da amostra

AP = Área da soma dos picos de diosmina e hesperidina da amostra

3.5.2.1. Testes para validação da metodologia para determinação do teor de princípios ativos

3.5.2.1.1. Robustez/ resistência

Para a validação da metodologia analítica para a determinação do teor de ambos os princípios ativos foram realizados os testes de robustez do método analítico, estabilidade das soluções analíticas, variação do fluxo da fase móvel e variação da coluna cromatográfica. O teste de robustez do método avalia se o método proposto é robusto frente às pequenas alterações na metodologia analítica empregada. A realização do teste de estabilidade das soluções analíticas permite conhecer quanto tempo após a preparação uma solução é capaz de fornecer uma resposta confiável. Os testes de variação do fluxo da fase móvel e da coluna cromatográfica permitem avaliar a confiabilidade do método cromatográfico frente a eventuais mudanças da fase móvel e da coluna cromatográfica.

3.5.2.1.1.1. Estabilidade das soluções analíticas

Para o estudo de estabilidade as soluções analíticas do padrão e das amostras, ambas as preparações foram analisadas após sua preparação e re-analisados após 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 e 24 horas. A análise de estabilidade das soluções analíticas foi feita pela variação dos resultados (R) encontrados para a área dos picos das soluções analíticas do padrão e da amostra utilizando a equação 5:

$$\% \text{Variação} = \frac{R_T - R_0}{R_0} \times 100$$

Equação 5

Onde:

R_T = Área do pico da solução analítica obtida no tempo t após a leitura inicial.

R_0 = Área do pico da solução analítica obtida imediatamente após o seu preparo.

3.5.2.1.1.2. Variação no fluxo da fase móvel

O teste de variação do fluxo da fase móvel permite verificar a robustez do método analítico através da quantificação de soluções do padrão e de amostra, analisadas de forma semelhante (a mesma solução de padrão e a mesma solução da amostra), diante de variações no fluxo da fase móvel utilizada para a análise. Neste teste se pretende verificar se há alteração no número de pratos teóricos, no valor de k' (fator de capacidade) e no fator de cauda (assimetria dos picos). Foram testados os seguintes fluxos: 1,0 mL/min, 1,5 mL/min e 2,0 mL/min.

3.5.2.1.1.3. Variação na coluna cromatográfica

No teste de variação da coluna cromatográfica empregaram-se colunas de lotes diferentes para a realização das análises. Neste teste se verifica se há alterações no número de pratos teóricos, no valor de k' e no fator de cauda. Para a realização do teste se preparou uma solução analítica de uma amostra contendo 1,8 mg/mL de dismina 0,2 mg/mL de hesperidina, que foi analisada em dois lotes de colunas cromatográficas.

3.5.2.1.2. Especificidade/seletividade

O teste de especificidade, ou seletividade, do método analítico, permite determinar se a metodologia utilizada para a análise de diosmina e hesperidina em comprimidos revestidos não sofre interferência dos outros componentes da formulação.

No desenvolvimento do teste foram injetadas soluções de padrão de diosmina e de hesperidina, da amostra e do placebo. Estes analitos foram submetidos às condições cromatográficas descritas na metodologia proposta.

Em paralelo foi realizado a varredura espectral de cada uma das soluções, utilizando um detector PDA (arranjo de fotodiodos), na faixa de comprimento de onda de 190-400 nm. Os espectros obtidos ao longo do pico cromatográfico da substância de interesse devem corresponder com o espectro da solução padrão do pico correspondente. A análise foi realizada determinando-se o teor das soluções analisadas, através da quantificação do pico principal com detecção no comprimento de onda proposto no método. Neste caso é necessário verificar se há ou não interferência de outros componentes (placebo, impureza / produtos de degradação) com o princípio ativo.

O cálculo da especificidade do método se realiza utilizando a equação 6.

$$E = 100 - I (\%)$$

Equação 6

Onde: I = Interferência detectada.

3.5.2.1.3. Linearidade / faixa de trabalho

O teste de determinação da faixa de resposta linear do detector para ambos os princípios ativos e dos limites de detecção foi realizado como descrito a seguir:

Primeiramente foi determinada a curva de calibração pela preparação e análise em duplicata de 5 soluções do padrão associado, nas concentrações correspondentes a 60%, 80%, 100%, 120% e 140% em relação ao valor teórico da concentração de trabalho do método analítico. Cada duplicata foi injetada duas vezes nas mesmas condições de análise descritas na metodologia analítica proposta.

3.5.2.1.4. Precisão

Os testes para a determinação da precisão do método analítico foram realizados em dois níveis: a repetibilidade e a precisão intermediária.

Repetibilidade

Para a realização dos testes de repetibilidade do método analítico, foram preparadas, sob as mesmas condições (mesmo analista, mesma instrumentação, em um curto período de tempo), 6 soluções analíticas da amostra, na concentração de trabalho do método. Todas as amostras preparadas foram injetadas, duas vezes, nas condições de análise cromatográfica descritas na metodologia. Os valores de área dos picos cromatográficos obtidos foram usados para calcular o valor da área média, do desvio padrão (S) e do desvio padrão relativo (DPR%).

Precisão Intermediária:

A avaliação da precisão intermediária foi feita de forma similar ao teste de repetibilidade, porém em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes, de acordo com o método proposto e utilizando amostras de um mesmo lote. Os valores das áreas dos picos cromatográficos foram usados então para calcular o valor médio, o desvio padrão (S) e o desvio padrão relativo (DPR%).

$$\begin{aligned} \text{Média} &= \frac{\sum X}{n} \\ S &= \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}} \\ \text{DPR (\%)} &= \frac{S \times 100}{\bar{X}} \end{aligned}$$

Onde:

n = nº de pontos ou determinações;

X= Área de Pico;

\bar{X} = Valor da área média do pico de todos os valores de X;

S= Desvio Padrão;

DPR = Desvio Padrão Relativo.

3.5.2.1.5. Exatidão

Para os testes que permitem avaliar a exatidão do método cromatográfico, foram preparadas, sob as mesmas condições, soluções analíticas em triplicata da forma farmacêutica (placebo com quantidades conhecidas de padrão, ou seja, amostras enriquecidas com placebo) nas concentrações de 80, 100 e 120% da concentração teórica. As soluções foram injetadas em triplicata nas mesmas condições descritas na metodologia analítica proposta no item 3.5.2. Também foram preparadas soluções padrão com 100% da concentração teórica para a quantificação das amostras conforme descrito nos itens 3.5.1.1 e 3.5.1.2, injetou-se em triplicata. Com os dados obtidos calcularam-se os valores de área média dos picos, desvio padrão (S), desvio padrão relativo (DPR) e a quantidade média recuperada a cada nível de concentração (exatidão em porcentagem).

3.5.3. Ensaio de dissolução

Durante a pesquisa bibliográfica não foi encontrada nenhuma técnica de análises específica que apresentasse o ensaio de dissolução para comprimidos revestidos que contenham os princípios ativos Diosmina e Hesperidina juntos. Sendo assim, o medicamento em estudo (amostra) e o medicamento referência (Daflon®) foram submetidos a testes em 4 meios de dissolução, com posterior realização de perfil de dissolução no meio em que a dissolução ocorreu dentro de parâmetros aceitáveis pela Farmacopéia Britânica (Q = 70%). A etapa de quantificação do ensaio de dissolução foi realizada com a metodologia obtida no desenvolvimento de método de teor, descrita no item 3.5.2.

3.5.3.1. Testes realizados para desenvolvimento do método de dissolução

Para o desenvolvimento do método foi realizada a dissolução simples dos princípios ativos em estudo em HCl 0,1mol/L (meio de dissolução 1), água (meio de dissolução 2), tampão fosfato de potássio monobásico 0,05 mol/L (meio de dissolução 3) e tampão tris-hidroximetilaminometano pH 12,5 + 1% de lauril sulfato de sódio (meio de dissolução 4). A quantificação dos princípios ativos dissolvidos na forma de flavonóides totais foi realizada fazendo uso da metodologia desenvolvida para a determinação do teor por HPLC apresentada anteriormente. Para testar os meios de dissolução acima, foram utilizados os seguintes parâmetros físicos:

Volume do meio: 900 mL
Aparato: 2 (Pá)
Rotação: 100 RPM
Tempo de dissolução: 60 min
Temperatura do meio: 37°C

3.5.3.2. Validação do ensaio de dissolução

Após definida a metodologia para a realização dos testes de dissolução dos princípios ativos diosmina e hesperidina, efetuou-se a validação da mesma conforme os critérios da resolução (ANVISA) RE nº 899, de 29/05/2003.

3.5.3.2.1. Especificidade/seletividade

Os testes de especificidades foram realizados de forma similar à reportada anteriormente no item 3.5.2.1.2.

3.5.3.2.2. Linearidade / faixa de trabalho

Estes testes foram realizados da forma similar à reportada no item 3.5.2.1.3.

3.5.3.2.3. Precisão

Os testes de precisão foram realizados segundo descrito anteriormente no item 3.5.2.1.4.

4. Resultados e discussão

4.1. Determinação de teor dos princípios ativos

Os resultados para a validação do método de determinação do teor de ambos os princípios ativos presentes nos comprimidos em estudo são apresentados a seguir.

4.1.1. Teor dos princípios ativos obtidos pelo método desenvolvido

Nas tabelas 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 se apresentam os resultados obtidos para a validação da metodologia de determinação de teor de ambos os princípios ativos. Devido a não existência, na literatura oficial (reconhecida pela ANVISA), de métodos que descrevam a análise simultânea de ambos os princípios ativos em formulações farmacêuticas, para definição da metodologia analítica para realização do ensaio de teor, fez-se necessário avaliar as metodologias descritas por EL-SHAFAE e EL-DOMIATY (2001), citada na revisão bibliográfica desta dissertação como método 1, descrita no item 2.1.3, KANAZE, *et. al.* (2003) citada como método 2, descrita no item 2.1.3, e a monografia da Farmacopéia Britânica para a Matéria Prima diosmina (método 3, do item 2.1.3). Esta avaliação se deu através de uma análise de teor dos princípios ativos utilizando os métodos citados anteriormente e a comparação posterior do fator de recuperação obtido por cada método analítico.

Na Tabela 4, se apresentam as porcentagens de recuperação, obtidas para os princípios ativos empregando os três métodos reportados no parágrafo anterior e para a metodologia em estudo de validação, para a formulação de diosmina e hesperidina na forma farmacêutica de comprimidos revestidos. Tais resultados, usando as metodologias reportadas em literatura, apresentaram baixa recuperação dos ativos para o medicamento do laboratório patrocinador do estudo (Neoquímica).

Segundo BANSAL e DE STEFANO (2007), num método analítico a recuperação deve ser eficiente, ou seja, estar próxima a 100%. Fator este que não pode ser observado para os métodos 1, 2 e 3 quando aplicados ao medicamento

do Laboratório Neoquímica, o que nos levou a optar pela utilização da metodologia em estudo no presente trabalho.

Tabela 4. Fator de recuperação das metodologias que não se aplicaram ao medicamento desenvolvido pelo laboratório Neoquímica.

	Recuperação diosmina	Recuperação de hesperidina
Método 1	87,10%	84,30%
Método 2	92,30%	88,90%
Método 3	81,50%	78,50%
Metodologia em estudo	99,77%	100,97%

4.1.2. Robustez da metodologia proposta para determinação de teor

4.1.2.1. Estabilidade das soluções analíticas

Verificou-se a estabilidade dos ativos, diosmina e hesperidina, no diluente NaOH 0,1N. Para tanto, foi preparado, conforme metodologia de teor proposta nesta dissertação, um padrão contendo os ativos utilizando hidróxido de sódio 0,1mol/L como diluente. Esta solução foi quantificada frente a um padrão solubilizado em DMSO e observou-se uma recuperação de 99,1% para a diosmina e 101,4 para a hesperidina.

Não existe literatura oficial que preconize qual deve ser a aceitabilidade para este teste, sendo assim, na indústria farmacêutica adota-se um valor de recuperação entre 98,0% e 102,0% para considerar a não degradação dos ativos, especificação esta em consonância com os parâmetros de exatidão das Farmacopéias Americana, e Européia, sendo o mesmo especificado pela legislação Brasileira.

Outro fato que deve ser observado é que obteve-se um desvio padrão bem abaixo de 5,0% para ambos os ativos (valor limite preconizado pela Farmacopéia americana para o teste de repetibilidade e pela legislação brasileira). Daí, conclui-se que não há degradação dos ativos, quando expostos ao NaOH 0,1mol/L. Os resultados dos testes de estabilidade são apresentados nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Estabilidade do ativo diosmina em NaOH 0,1 mol/L

Solução Padrão em DMSO	Área Média de diosmina	Teor diosmina (%)
		14389758
Amostra Simulada em NaOH 0,1mol/L		
Replicata	Área Média de Diosmina	Teor Diosmina
1	14189754	98,6
2	14298542	99,4
3	14287520	99,3
4	14287526	99,3
5	14158624	98,4
6	14381470	99,9
Média		99,1
S		0,6
DPR %		0,6
Recuperação (%)		99,1

Tabela 6. Estabilidade do ativo hesperidina em NaOH 0,1 mol/L

Solução Padrão em DMSO	Área Média de Hesperidina	Teor Hesperidina (%)
		1422140
Amostra Simulada em NaOH 0,1 mol/L		
Replicata	Área Média de Hesperidina	Teor Hesperidina
1	1451110	102,0
2	1445214	101,6
3	1441105	101,3
4	1431234	100,6
5	1430028	100,6
6	1450095	102,0
Média		101,4
S		0,6
DPR %		0,6
Recuperação (%)		101,4

Para a avaliação da estabilidade da solução analítica, em relação ao tempo de preparo, do padrão e da amostra, foram escolhidos de forma aleatória os tempos. As amostras e os padrões foram re-analisados os após 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 e 24 horas da análise inicial. Os resultados de estas análises são apresentados nas tabelas 7 e 8.

Apesar do teste de estabilidade da solução ser de grande importância para garantir a confiança nos resultados encontrados com a metodologia em questão, não existe parâmetro de aceitação, para variação, descrito em literatura oficial. Mediante

este fato, adotou-se como critério de variação um valor de DPR inferior a 2,0%, valor este em consonância com as exigências expostas pelo corpo técnico da ANVISA e praticado pela indústria farmacêutica.

Para solução analítica do padrão as maiores variações observadas foram: uma diminuição de 0,8% para diosmina e 3,3% para hesperidina, ambos 24 horas após a análise inicial. Adotando-se um limite de aceitação de 2,0%, que é o preconizado pelo órgão fiscalizador (ANVISA) conclui-se que a solução analítica do padrão foi estável, nas condições do método proposto, por até 08 horas, tempo no qual o padrão de hesperidina tem uma variação de 1,7%.

Tabela 7. Estabilidade da solução padrão para o teste de teor

Tempo transcorrido após o preparo da solução	Área da Diosmina	Área da Hesperidina	Varição Diosmina (%)	Varição Hesperidina (%)
Análise Inicial	14235300	1447102		
2 horas	14131967	1438506	0,7	0,6
4 horas	14334293	1427646	-0,7	1,3
6 horas	14296044	1425171	-0,4	1,5
8 horas	14286957	1422950	-0,4	1,7
12 horas	14281940	1410346	-0,3	2,5
16 horas	14215883	1414541	0,1	2,3
20 horas	14277271	1404883	-0,3	2,9
24 horas	14124475	1398682	0,8	3,3

Na Tabela 8 se apresentam os resultados da análise de estabilidade para a solução analítica da amostra.

Tabela 8. Estabilidade da solução analítica da amostra para o teste de teor

Tempo transcorrido após o preparo da solução	Área da Diosmina	Área da Hesperidina	Varição Diosmina (%)	Varição Hesperidina (%)
Análise Inicial	14258567	1472019		
2 horas	14469677	1460149	-1,5	0,8
4 horas	14508302	1444068	-1,8	1,9
6 horas	14406845	1438279	-1,0	2,3
8 horas	14503494	1438006	-1,7	2,3
12 horas	14626533	1409419	-2,6	4,3
16 horas	14650393	1401877	-2,7	4,8
20 horas	14837080	1368371	-4,1	7,0
24 horas	14801225	1332074	-3,8	9,5

Para solução analítica da amostra a maior variação observada foi: uma diminuição de 4,1% para diosmina (após 20 horas) e 9,5% para hesperidina, após 24 horas. Com base nos resultados apresentados na Tabela 8, conclui-se que a solução analítica da amostra somente foi estável por até 4 horas nas condições previstas no método, visto que após este ponto a variação, em relação ao tempo inicial, não ultrapassou o limite de 2,0%, tendo como resultado o valor de -1,8% para diosmina e 1,9% para hesperidina.

4.1.2.2. Variação do fluxo da fase móvel

Os resultados da análise da variação do fluxo da fase móvel na validação do método cromatográfico para a determinação do teor de ambos os princípios ativos são apresentados a seguir na Tabela 9.

Tabela 9: Variação de fluxo da fase móvel para o teste de teor

Solução Padrão (Pico de Diosmina)		
Fluxo	Fator de Simetria	Pratos teóricos
1,0 mL/min	1,17	3742,9
1,5 mL/min	1,16	2796,1
2,0 mL/min	1,15	2224,6
Solução Amostra (Pico de Diosmina)		
Fluxo	Fator de Simetria	Pratos teóricos
1,0 mL/min	1,17	3761,6
1,5 mL/min	1,16	2799,2
2,0 mL/min	1,14	2231,2
Solução Padrão (Pico de Hesperidina)		
Fluxo	Fator de Simetria	Pratos teóricos
1,0 mL/min	1,04	3244,4
1,5 mL/min	1,04	2424,7
2,0 mL/min	1,04	1941,0
Solução Amostra (Pico de Hesperidina)		
Fluxo	Fator de Simetria	Pratos teóricos
1,0 mL/min	1,04	3211,4
1,5 mL/min	1,04	2437,9
2,0 mL/min	1,05	1954,0

Na Tabela 9 se apresentam os resultados obtidos variando o fluxo da fase móvel nos valores 1,0 mL/min, 1,5 mL/min e 2,0 mL/min.

A partir dos dados reportados nas tabelas anteriores verificou -se que quando o fluxo da fase móvel é alterado, não ocorreram alterações significativas no fator de simetria dos picos. Dado este de grande importância na análise da eficiência cromatográfica, pois uma variação no fator de simetria aumenta, significativamente, as variações inerentes a integração do pico. Desta forma concluí-se que o método é robusto para pequenas variações de fluxo da fase móvel.

4.1.2.3. Variação da coluna cromatográfica

O efeito da variação da coluna cromatográfica usada no desenvolvimento do método analítico foi avaliado empregando duas colunas de lotes de diferentes. Os resultados reportados na Tabela 10 mostram que a variação da coluna não teve impacto significativo em valores de simetria dos picos, demonstrando que o método desenvolvido é robusto para variações de colunas cromatográficas C-18 de lotes diferentes.

Tabela 10: Teste de variação de lotes de colunas cromatográficas para o teste de teor

Solução Padrão (Pico de Hesperidina)		
Lote da coluna	Fator de Simetria	Pratos teóricos
W33571S004	1,07	2274,7
015834349130 03	1,08	2270,2
Solução Amostra (Pico de Hesperidina)		
Lote da coluna	Fator de Simetria	Pratos teóricos
W33571S004	1,05	2290,4
015834349130 03	1,08	2280,3
Solução Padrão (Pico de Diosmina)		
Lote da coluna	Fator de Simetria	Pratos teóricos
W33571S004	1,15	2502,2
015834349130 03	1,16	2510,6
Solução Amostra (Pico de Diosmina)		
Lote da coluna	Fator de Simetria	Pratos teóricos
W33571S004	1,15	1490,9
015834349130 03	1,16	2498,2

4.1.3. Especificidade / seletividade

Os resultados para o estudo de especificidade/seletividade do método proposto são apresentados na Tabela 11. As Farmacopéias Americana e Européia preconizam que a interferência do placebo deve ser menor, ou igual, a 2,0%. Como se obteve uma interferência de 0,2% pode-se concluir que o método desenvolvido é específico e

seletivo para análise de diosmina e hesperidina, devido a que, o comprimento de onda usado na análise foi de 275 nm.

Nas figuras 7, 8, 9 e 10 se apresentam os cromatogramas obtidos nas análises cromatográficas de um padrão de diosmina, de um padrão de hesperidina, de uma amostra da associação de diosmina e hesperidina em comprimidos revestidos e, finalmente, do placebo desta associação, respectivamente.

Tabela11. Seletividade do método de determinação de teor proposto

Item Analisado	Área de Pico	Teor (%)
Padrão de Diosmina + Hesperidina	15955092	100,0%
Amostra	16112750	101,0%
Placebo nº 216/07	23439	0,2%

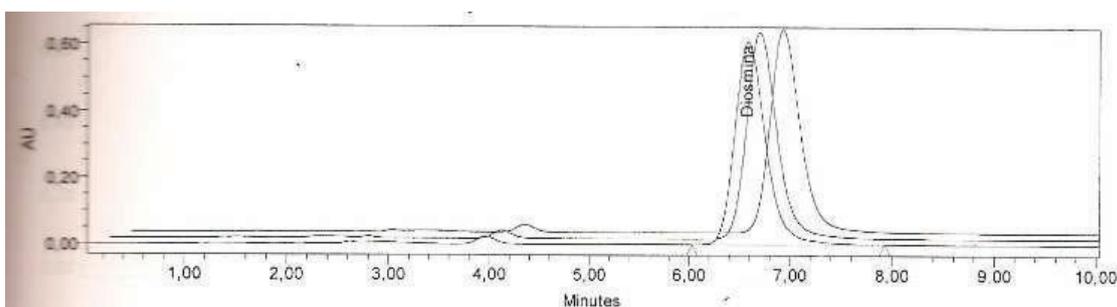


Figura 7. Cromatograma do padrão de diosmina.

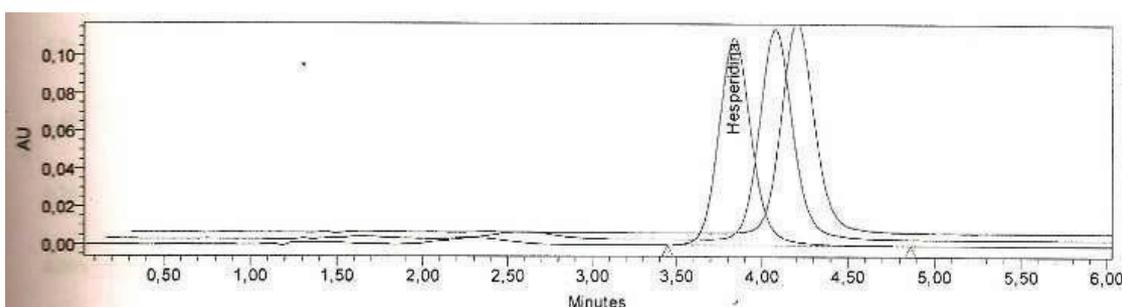


Figura 8. Cromatograma do padrão de hesperidina.

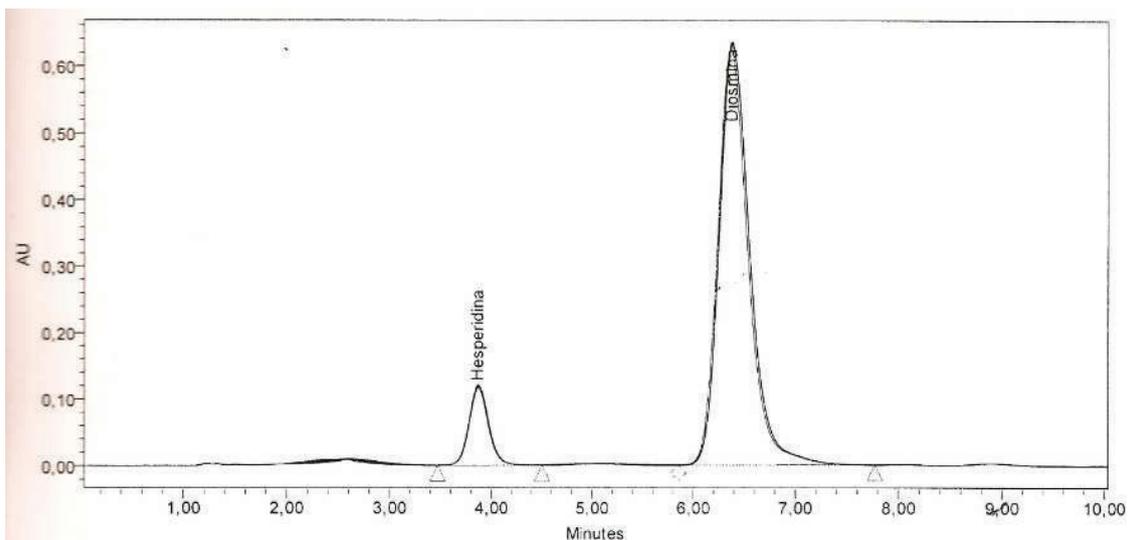


Figura 9. Cromatograma de uma amostra da associação de diosmina e hesperidina em comprimidos revestidos.

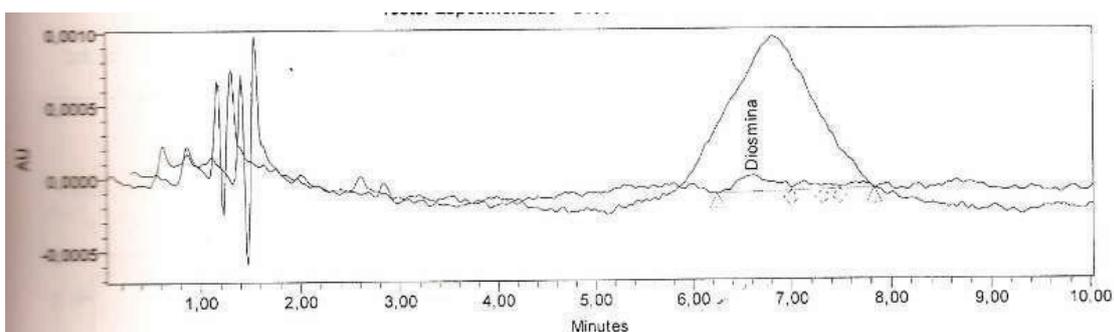


Figura 10. Cromatograma do placebo da associação de diosmina e hesperidina em comprimidos revestidos

4.1.4. Linearidade e faixa de trabalho

A determinação da linearidade e da faixa da faixa de resposta linear ou de trabalho do método analítico em estudo foi realizada usando a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Nas Tabelas 12 e 13 se apresentam os resultados das análises cromatográficas para o teste de linearidade. Os resultados da regressão linear são apresentados nos gráfico 1 e 2.

Tabela 12. Teste de Linearidade para a metodologia de teor do ativo diosmina.

Concentração Teórica (%)	Preparação 1	Preparação 2	Média das Áreas
60%	7345840	7543577	7444709
80%	9433753	9373821	9403787
100%	11091647	11032308	11061978
120%	13460487	13645147	13552817
140%	14718138	15375698	15046918

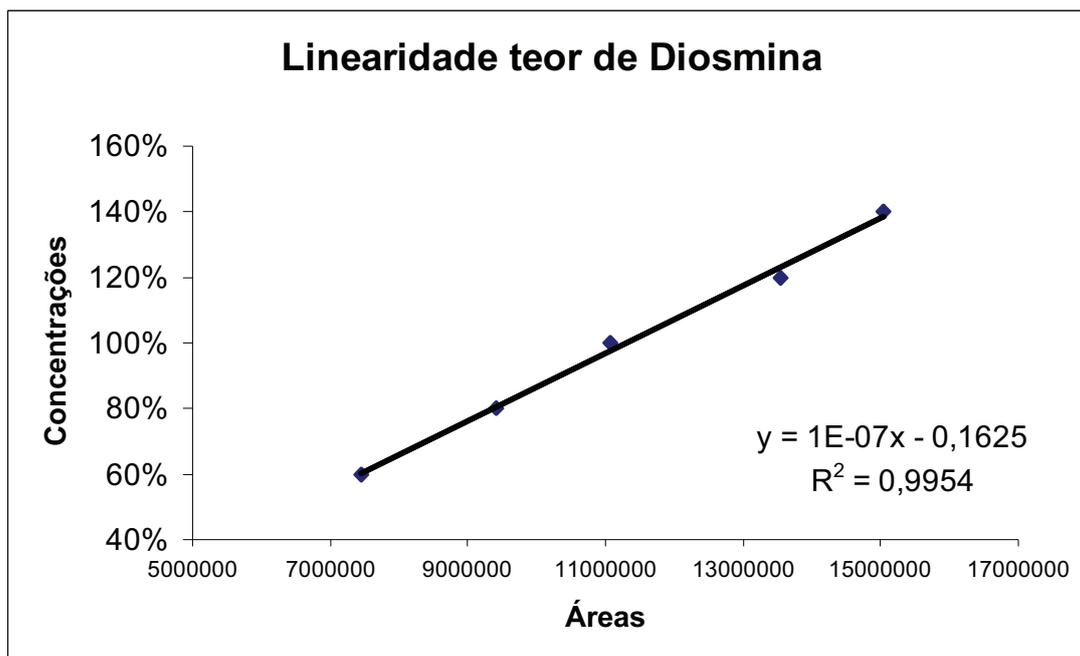


Gráfico 1. Faixa de linearidade para a metodologia proposta para teor do ativo diosmina.

Tabela 13. Teste de Linearidade para a metodologia de teor do ativo Hesperidina

Concentração Teórica (%)	Preparação 1	Preparação 2	Média das Áreas
60%	862158	862180	862169
80%	1151472	1151535	1151504
100%	1498101	1438202	1468152
120%	1728657	1728578	1728618
140%	2013047	2013061	2013054

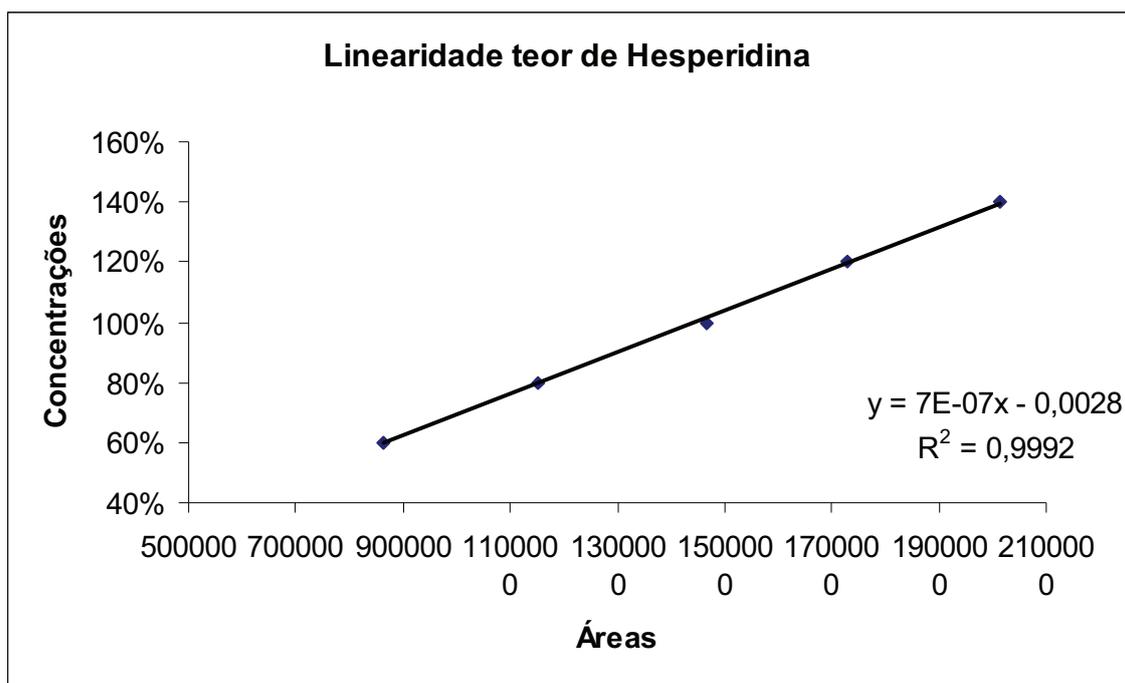


Gráfico 2. Faixa de linearidade para a metodologia proposta para teor do ativo hesperidina.

Segundo ARAÚJO (2009), o ideal num teste de linearidade para análises em medicamentos, é que se obtenha um R^2 maior ou igual a que 0,99. Os dados mostraram que o método desenvolvido foi linear na faixa de 60% a 140% da concentração de trabalho, com coeficiente de correlação linear igual a 0,9954 para diosmina e 0,9992 para hesperidina. Valores de acordo com o preconizado pela literatura científica e maiores do que os preconizados pelas Farmacopéias Americana e Britânica, que é de 0,95.

4.1.5. Determinação de precisão

4.1.5.1. Repetibilidade

Considerando os dados obtidos com as seis soluções analíticas apresentados nas tabelas 14 e 15, o método em estudo apresentou repetibilidade, entre as amostras preparadas em um mesmo dia e sob as mesmas condições, com desvio padrão relativo de 0,39% e 0,22% para diosmina e 1,22% e 0,69% para hesperidina, no primeiro e segundo dia de análise, respectivamente. Segundo BANSAL e DE STEFANO (2007), para que o teste seja repetível o desvio padrão relativo tem de ser igual ou

menor que 5,0%, valor este em consonância com as Farmacopéias Americana, Européia, legislação brasileira e ICH.

Tabela 14. Repetibilidade do teor do 1º dia de análise

Preparação	Injeção	Área do pico de diosmina	Área do pico de hesperidina
1	1	14252717	1433104
	2	14262437	1455358
	3	14282788	1458344
2	1	14346203	1426168
	2	14294388	1440686
	3	14296457	1442199
3	1	14212716	1407400
	2	14237714	1431231
	3	14250807	1428110
4	1	14169384	1396319
	2	14176157	1410359
	3	14166878	1411810
5	1	14224300	1412921
	2	14225528	1422641
	3	14216116	1425575
6	1	14174342	1402130
	2	14159866	1413414
	3	14142595	1412635
Média		14227299,61	1423911,333
S		56119,32071	17408,8343
DPR %		0,39	1,22

Tabela 15. Repetibilidade do teor do 2º dia de análise

Preparação	Injeção	Área do pico de diosmina	Área do pico de hesperidina
1	1	12508233	1544335
	2	12498687	1523011
	3	12487765	1533040
2	1	12505053	1541292
	2	12557289	1517366
	3	12564036	1520922
3	1	12536511	1523995
	2	12503439	1521319
	3	12491719	1519366
4	1	12508840	1517117
	2	12482090	1512838
	3	12507700	1519882
5	1	12453567	1507574
	2	12461474	1511017
	3	12485880	1514897
6	1	12492462	1505964
	2	12508475	1515831
	3	12504817	1511048
Média		12503224,3	1520045,222
S		27974,1533	10476,27733
DPR %		0,22	0,69

4.1.5.2. Precisão intermediária

O método proposto demonstrou ser preciso nas condições de análise, pois os valores de teor apresentaram desvio padrão relativo (DPR) de 0,394% para diosmina e 1,223% para hesperidina entre os dois dias de análises como mostrado na Tabela 16. Neste caso também o teste se considera preciso se o desvio padrão relativo for igual ou menor de 5,0%, valor em consonância com o preconizado pelas Farmacopéias Americana, Européia, legislação brasileira e ICH.

Tabela 16. Avaliação de precisão intermediária

	Média das áreas nos 2 dias	Desvio Padrão	DPR
Diosmina	14227300	56119	0,394
Hesperidina	1423911	17409	1,223

4.1.6. Exatidão

Os resultados obtidos para exatidão nas concentrações de 80%, 100% e 120%, apresentaram porcentagem de recuperação de 101,1%, 99,8% e 100,6% para diosmina e 102,0%, 100,8% e 100,9% para hesperidina são mostrados nas tabelas 17, 18 e 19.

Tabela 17. Teste de exatidão em 80% da concentração de trabalho

Solução Padrão	Área Média de diosmina	Área Média de hesperidina	Teor diosmina (%)	Teor hesperidina (%)
	14408971	1437859	100,0	100,0
Amostra Simulada em 80%				
Replicata	Área Média de diosmina	Área Média de hesperidina	Teor diosmina (%)	Teor hesperidina (%)
1	11808965	1178452	82,0	82,0
2	11808967	1174498	82,0	81,7
3	11809733	1174472	82,0	81,7
4	11553521	1170752	80,2	81,4
5	11551458	1171457	80,2	81,5
6	11542002	1169311	80,1	81,3
7	11630966	1165472	80,7	81,1
8	11600452	1180014	80,5	82,1
9	11574254	1179001	80,3	82,0
Média			80,9	81,6
S			0,8	0,3
DPR %			1,0	0,4
Exatidão (%)			101,1	102,0

Tabela 18. Teste de exatidão em 100% da concentração de trabalho

Solução Padrão	Área Média de diosmina	Área Média de hesperidina	Teor diosmina (%)	Teor hesperidina (%)
	14408971	1437859	100,0	100,0
Amostra Simulada em 100%				
Replicata	Área Média de diosmina	Área Média de hesperidina	Teor diosmina (%)	Teor hesperidina (%)
1	14436985	1461982	100,2	101,7
2	14408987	1460025	100,0	101,5
3	14401478	1454782	99,9	101,2
4	14332145	1435478	99,5	99,8
5	14351398	1439867	99,6	100,1
6	14321478	1454782	99,4	101,2
7	14402149	1449872	100,0	100,8
8	14387854	1443698	99,9	100,4
9	14379859	1449001	99,8	100,8
Média			99,8	100,8
S			0,3	0,6
DPR %			0,3	0,6
Exatidão (%)			99,8	100,8

Tabela 19. Teste de exatidão em 120% da concentração de trabalho

Solução Padrão	Área Média de diosmina	Área Média de hesperidina	Teor diosmina (%)	Teor hesperidina (%)
	14408971	1437859	100,0	100,0
Amostra Simulada em 120%				
Replicata	Área Média de diosmina	Área Média de hesperidina	Teor diosmina (%)	Teor hesperidina (%)
1	17349875	1749879	120,4	121,7
2	17299587	1749875	120,1	121,7
3	17309875	1743254	120,1	121,2
4	17357982	1758972	120,5	122,3
5	17398754	1747472	120,7	121,5
6	17398754	1750002	120,7	121,7
7	17489752	1743652	121,4	121,3
8	17503268	1714785	121,5	119,3
9	17512547	1712472	121,5	119,1
Média			120,8	121,1
S			0,6	1,1
DPR %			0,5	0,9
Exatidão (%)			100,6	100,9

Considerando que o grau de recuperação aceito pela legislação vigente no Brasil, Farmacopéia Americana e Farmacopéia Européia, está entre 98,0% e 102,0%, pode se concluir que o método em questão é exato nas condições propostas.

4.1.7. Considerações sobre a metodologia de determinação de teor desenvolvida

Analisando os dados, reportados nas tabelas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19, ressaltamos que a metodologia utilizada para a determinação do teor de ambos os princípios ativos atende a todos os parâmetros de validação da Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 e das farmacopéias aceitas no país, um dos objetivos deste trabalho. Além do fato de diluente utilizado, o NaOH 0,1mol/L, não promover degradação dos princípios ativos, diosmina e hesperidina.

4.2. Determinação do ensaio de dissolução

4.2.1. Método proposto

Após realização dos testes propostos observou-se que:

Nos meios de dissolução que estão na faixa de pH fisiológico (água, HCl 0,1 mol/L e tampão fosfato de potássio monobásico 0,05 mol/L pH 6,8), em 60 minutos de dissolução não houve liberação de pelo menos 70% da quantidade rotulada dos fármacos, nem para o medicamento de referência (Daflon®) nem para o medicamento em estudo, conforme pode ser observado na Tabela 20.

Tabela 20. Teste de meios de dissolução, através de uma dissolução simples de comprimidos revestidos de diosmina e hesperidina

Meio de dissolução	Liberação de flavonóides totais para o Daflon ®	Liberação de flavonóides totais para a formulação em estudo
Água	29,8%	34,6%
HCl 0,1 mol/L	39,8%	43,8%
Tampão 0,05M pH 6,8	51,8%	39,4%

Quando foi usado como meio de dissolução a solução tampão de tris-hidroxi metilaminometano com pH 12,4 + 1% de lauril sulfato de sódio, em 60 minutos de corrida, ambos os princípios ativos apresentaram liberação de diosmina +

hesperidina acima de 75%. Sendo assim, realizou-se um perfil de dissolução, o que demonstrou ser este um meio adequado para realização do teste de dissolução, pois o perfil encontrado contempla o principal fator que torna este teste de dissolução viável e discriminativo, ou seja, promove uma liberação gradual dos princípios ativos, não levando a um platô de 85% em menos de 15 min (BRASIL, 2004). Por tal motivo este foi o método de escolha para validação.

No gráfico 3 se apresenta o perfil de dissolução de Daflon 500 frente ao medicamento teste (diosmina 450 mg + hesperidina 50 mg) em solução de tampão trishidroximetilaminometano pH 12,4 + 1% de lauril sulfato de sódio.

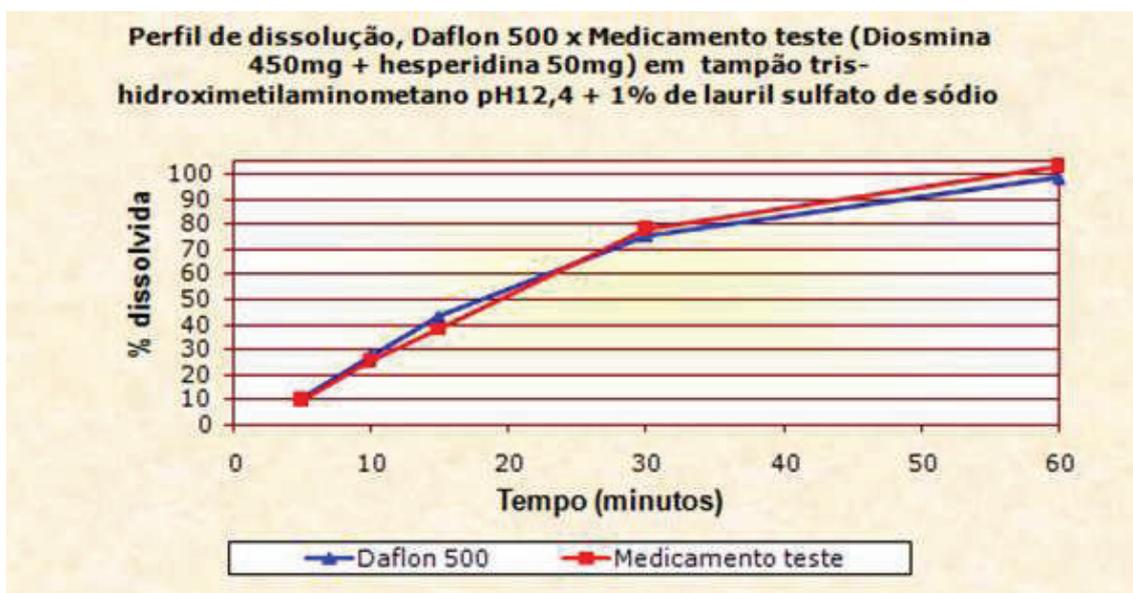


Gráfico 3. Perfil de dissolução, Daflon 500 x Medicamento teste (diosmina 450 mg + hesperidina 50 mg) em tampão tris-hidroximetilaminometano pH 12,4 + 1% de lauril sulfato de sódio.

4.2.2. Especificidade / seletividade para dissolução

Os resultados do teste de especificidade/seletividade para a dissolução dos princípios ativos são apresentados na Tabela 21. Nas figuras 11 e 12 mostram respectivamente as corridas cromatográficas de uma amostra da associação de diosmina e hesperidina depois de submetida à dissolução e uma amostra do placebo desta associação, submetido às mesmas condições da amostra.

Tabela 21. Seletividade do método proposto para dissolução

Item Analisado	Área do Pico	Concentração (%)
Padrão de Diosmina + Hesperidina	3901585	100,0%
Amostra	3957997	101,5%
Placebo nº 216/07	18853,5	0,5%

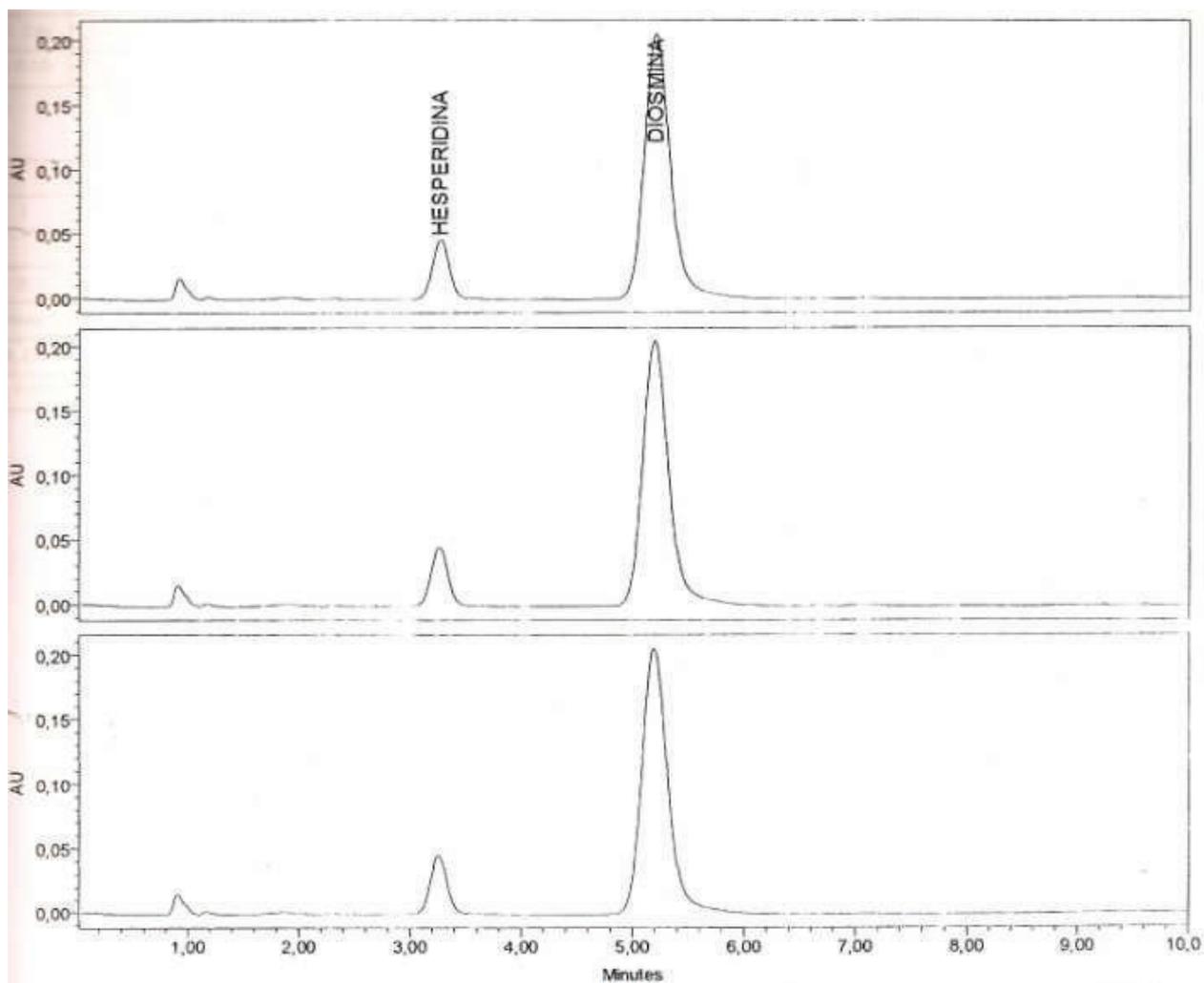


Figura 11. Cromatograma de uma amostra da associação de diosmina e hesperidina depois de submetido à dissolução.

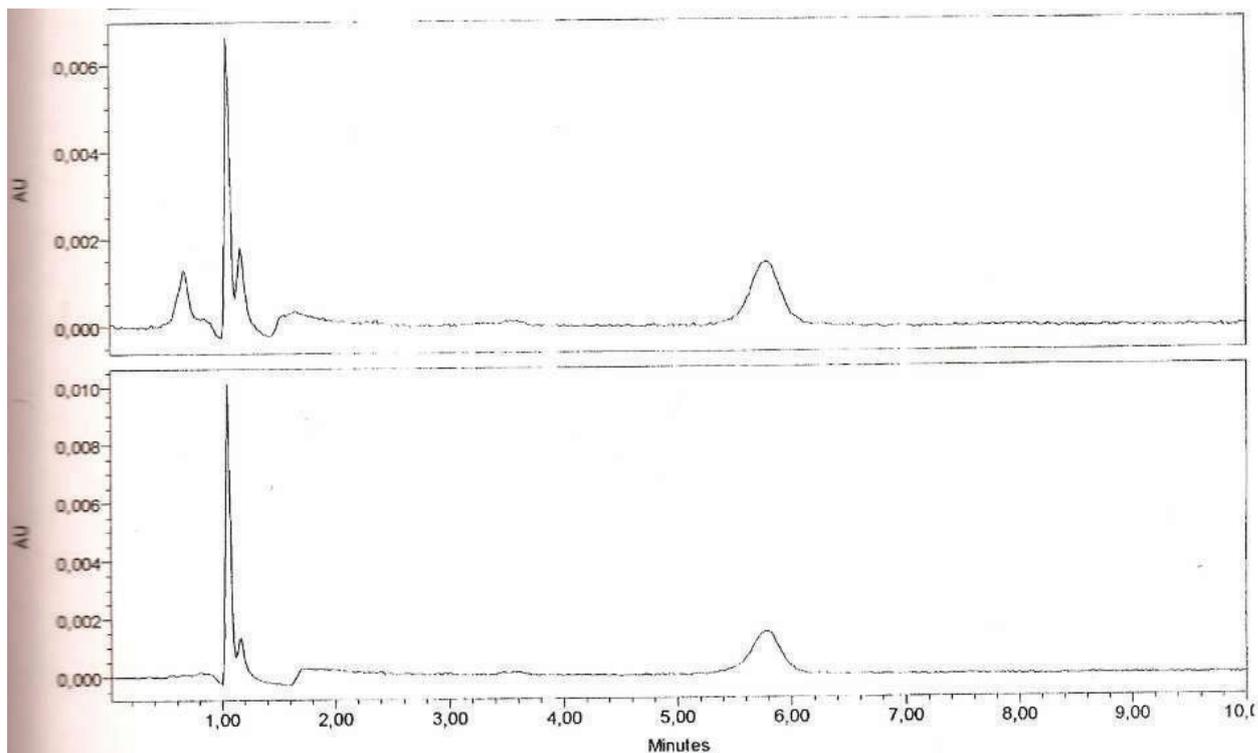


Figura 12. Cromatograma do placebo da associação de diosmina e hesperidina depois de submetido à dissolução.

O método apresentou-se específico e seletivo, com interferência de 0,5% do placebo, ou seja, um valor menor que 2,0%, limite de aceitação da Farmacopéia Americana, Européia e legislação brasileira.

4.2.3. Determinação de linearidade e faixa de trabalho:

A regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados para as amostras analisadas demonstrou que o método proposto é linear na faixa de 40% a 120%, pois o coeficiente de correlação foi igual a 0,9984 para diosmina e 0,9947 para hesperidina, valores em consonância com o preconizado pelas Farmacopéias Americana e Européia. Isto significa que qualquer variação na concentração dentro desta faixa de trabalho irá acarretar em uma resposta proporcional em termo de área dos picos analisados. Estes dados estão apresentados nas tabelas 22 e 23 e nos gráficos 4 e 5.

Tabela 22. Teste de Linearidade no método de dissolução para o ativo diosmina.

Concentração Teórica (%)	Preparação 1	Preparação 2	Média das Áreas
60%	1217421	1215248	1216335
80%	1835247	1845478	1840363
100%	2465870	2411245	2438558
120%	3042587	3054784	3048686
140%	3760258	3812547	3786403

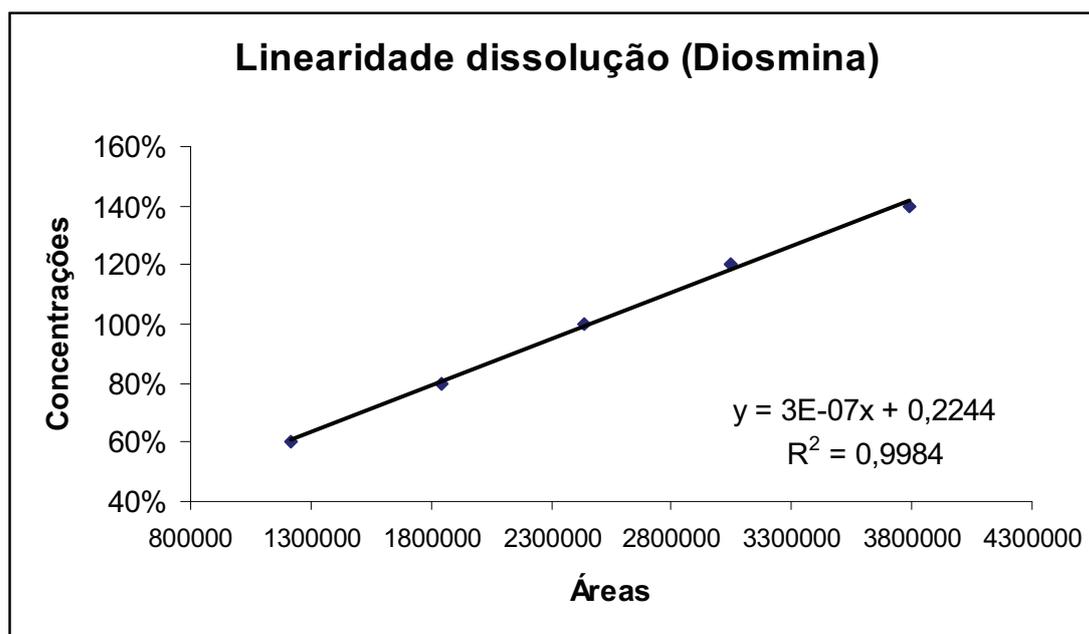


Gráfico 4. Faixa de linearidade obtida com os resultados da tabela de Linearidade no método de dissolução para o ativo Diosmina

Tabela 23. Teste de Linearidade no método de dissolução para o ativo hesperidina.

Concentração Teórica (%)	Preparação 1	Preparação 2	Média das Áreas
60%	385428	433217	409323
80%	514521	586547	550534
100%	713214	680365	696790
120%	794587	777752	786170
140%	937453	933321	935387

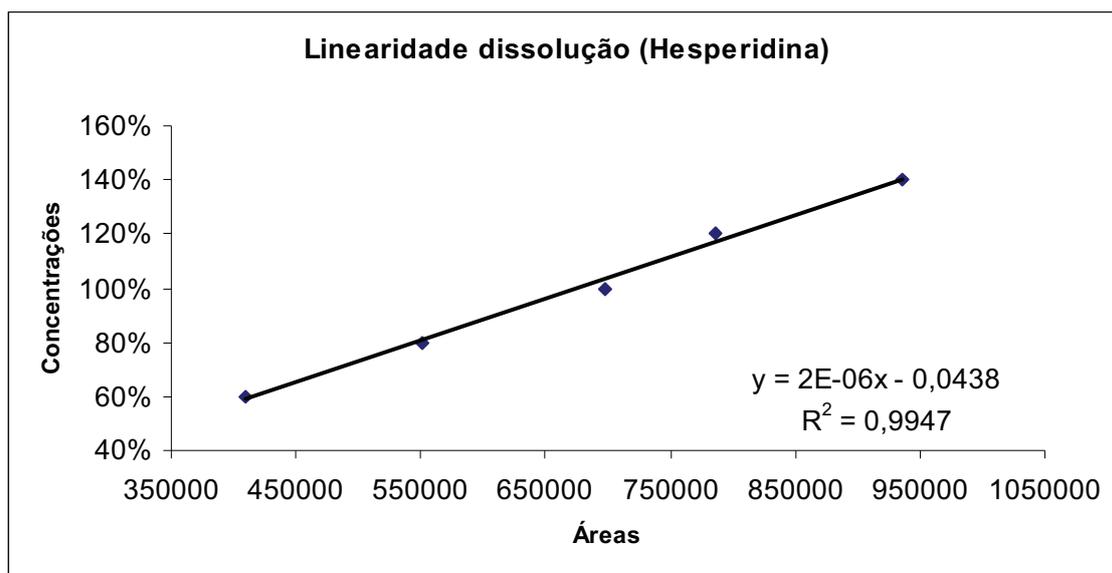


Gráfico 5. Faixa de linearidade obtida com os resultados da tabela de Linearidade no método de dissolução para o ativo hesperidina.

4.2.4. Determinação de precisão

- Repetibilidade:

O método apresentou repetibilidade, com desvio padrão relativo máximo de 1,14% para diosmina e 0,90% para hesperidina, entre amostras preparadas em um mesmo dia sob as mesmas condições. Valores estes inferiores a 5,0%, que é o preconizado pela legislação brasileira e pelas Farmacopéias Americana e Européia, desta forma, conclui-se que o método proposto é preciso. Os resultados do este teste são apresentados nas tabelas 24 e 25.

Tabela 24. Repetibilidade para dissolução, 1º dia de análise.

Preparação	Injeção	Área do pico de diosmina	Área do pico de hesperidina
1	1	3101416	461071
	2	3115559	462796
	3	3110099	459466
2	1	3085983	460721
	2	3091135	463860
	3	3087892	461728
3	1	3057061	458119
	2	3053346	459196
	3	3054709	458798
4	1	3057500	455788
	2	3058213	456405
	3	3057222	456759
5	1	3120340	467320
	2	3103421	465120
	3	3102130	463379
6	1	3102312	467773
	2	3103423	467765
	3	3102313	468679
Média		3086893	461930,1667
S		23741,0295	4163,201006
DPR %		0,77	0,90

Tabela 25. Repetibilidade para dissolução, 2º dia de análise.

Preparação	Injeção	Área do pico de diosmina	Área do pico de hesperidina
1	1	3121472	462354
	2	3102472	458723
	3	3132478	458214
2	1	3081478	452178
	2	3021457	458793
	3	3021457	452147
3	1	3069854	458752
	2	3052147	458721
	3	3054142	460001
4	1	3052134	458752
	2	3051125	452147
	3	3052145	452368
5	1	3122145	458721
	2	3112425	456210
	3	3102145	457210
6	1	3110246	452157
	2	3102144	452138
	3	3100021	458721
Média		3081193,722	456572,6111
S		35035,70178	3401,016615
DPR %		1,14	0,74

- Precisão Intermediária

O método proposto demonstrou ser preciso nas condições de análise do laboratório, pois o valor para o desvio padrão relativo foi de 0,769% para diosmina e 0,901% para hesperidina, entre as análises realizadas em dois dias diferentes. Valor este inferior ao limite preconizado pelas Farmacopéias Americana, Européia e legislação vigente no Brasil, que é de 5,0%. Para este teste foram utilizados analistas distintos. Os resultados deste teste se apresentam na Tabela 26.

Tabela 26. Avaliação de precisão intermediária no teste de dissolução

	Média das áreas nos 2 dias	Desvio Padrão	DPR (%)
Diosmina	3086893	23741	0,769
Hesperidina	461930	4163	0,901

4.2.5. Considerações sobre o desenvolvimento e validação da metodologia de dissolução

Analisando os dados, reportados nas tabelas 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26, ressaltamos que a metodologia utilizada no ensaio de dissolução de ambos os princípios ativos atende a todos os parâmetros de validação da Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003, um dos objetivos deste trabalho. Além do fato comprovarmos, como mostrado no gráfico 3, que o método de dissolução é discriminativo, por não apresentar um platô de 85% de liberação dos ativos em menos de 15 minutos de dissolução.

5. Conclusões

As metodologias reportadas na literatura científica consultada não se mostraram adequadas para realização de análise de teor na formulação da empresa patrocinadora (Neoquímica) do estudo devido ao fato de apresentarem baixos fatores de recuperação.

O método desenvolvido utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrofotometria UV mostrou-se linear, específico, sensível, preciso, exato e robusto para a análise quantitativa da associação de diosmina 450 mg e hesperidina 50 mg na forma farmacêutica comprimido revestido.

O uso de 900 mL trishidroximetilaminometano pH 12,5 contendo 1% de lauril sulfato de sódio a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, aparato pá, com velocidade de 100 rpm, demonstra-se satisfatório para análise de dissolução da associação de diosmina 450 mg e hesperidina 50 mg na forma farmacêutica comprimido revestido.

Sugere-se para associação de diosmina 450 mg e hesperidina 50 mg na forma farmacêutica comprimido revestido um $Q \geq 70,0 \%$, valor este em consonância com o indicado no método geral para o teste de dissolução da Farmacopéia Britânica.

O método desenvolvido, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrofotometria UV para determinação de teor de diosmina 450 mg e hesperidina 50 mg na forma farmacêutica comprimido revestido, mostrou-se adequado para quantificação dos ativos dissolvidos, nas amostras do teste de dissolução.

Os métodos, de teor e dissolução, desenvolvidos neste trabalho são adequados para realização de equivalência farmacêutica da associação de diosmina e hesperidina em comprimidos revestidos.

6. Bibliografia

ARAÚJO M. Drogas que visam agir na circulação periférica. In Silva P. Farmacologia, Guanabara Koogan, 6ª edição, Rio de Janeiro, 2002.

ARAÚJO M. Farmacoterapia nas doenças vasculares periféricas. In: Pitta, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

ARAÚJO, P., Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, Journal of Chromatography B, Vol. 877, No. 23, pp. 2224-2234; 2009.

ARBABI, S., ROSENGART, M.R., GARCIA, I., JELACIC, S., MAIER, R.V., "Epithelial cyclooxygenase-2 expression: a model for pathogenesis of colon cancer", J. Surg. Res., 97, 60-64, 2001.

BANSAL, S, DE STEFANO, A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. AAPS Journal. 2007

BIRCH, A.E., FENNER, G. P., WATKINS, R., BOYD, L. C., "Antioxidant proprieties or evening primrose seed extracts", J. Agric. Food Chemistry, vol. 49, 4502-4507, 2001.

BRASIL, 1999a. Resolução (RE) nº 391 de 9 de agosto de 1999. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/391_99.htm Acesso em: agosto de 2008

BRASIL, 2001a; Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/10_01rdc.htm Acesso em: agosto de 2008

BRASIL, 2001b. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 134, de 13 de julho de 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/134_01rdc.htm Acesso em: agosto de 2008

BRASIL, 2002a. Resolução (RE) nº 475, de 19 de março de 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/legis/resolucao/index_2002_re_mar.htm Acesso em: agosto de 2008

BRASIL, 2003a. Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/resol/2003/index_re_mai.htm Acesso em: agosto de 2007.

BRASIL, 2003b. Resolução - RDC nº 79, de 11 de abril de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/resol/2003/index_re_mai.htm Acesso em: agosto de 2007.

BRASIL, 2004. Resolução RE nº 310, de 01 de setembro de 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/resol/2003/index_re_mai.htm Acesso em: julho de 2009.

BRASIL, 2006. RESOLUÇÃO-RDC Nº 169, DE 21 DE AGOSTO DE 2006. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/resol/2003/index_re_mai.htm Acesso em: agosto de 2007.

BRENNA, D.V., PAGLIARINI, E., "Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines", J. Agric. Food Chemistry, 49, 4841-4844, 2001.

CAO, Q.J., EINSTEIN, M.H., ANDERSON, P.S., RONOWICZ, C.D., BALAN, R., JONES, J.B., "Expression of COX-2, Ki-67, Cyclin D1, and P21 in Endometrial Endometrioid Carcinomas", *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 21, 147–154, 2002.

CARISTI, C.; BELLOCCO, E.; PANZERA, V.; TOSCANO, G.; VADALÀ, R.; LEUZZI, U. Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from sicilian cultivars. *J. Agric. Food. Che*, 51, 3528–3534, 2003.

CASS, Q. B. & DEGANI, A.L.G. Desenvolvimento de métodos por HPLC - Fundamentos, Estratégias e Validação. Editora UFSCar, 2001.

CHABARIBERI, R. A. O. Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonóides da "espinheira-santa" (*Maytenus aquifolium* e *Maytenus ilicifolia*). 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

CHAN, G., BOYLE, J.O., YANG, E.K., ZHANG, F., SACKS, P.G., SHAH, J.P., EDELSTEIN, D., SOSLOW, R.A., KOKI, A.T., WOERNER, B.M., MASFERRER, J.L., DANNENBERG, A.J., "Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck", *Cancer Res.*, 59, 991–994, 1999.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise instrumental, Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 606 p., 2000.

CLIMENT, M.J., CORMA, A., IBORRA, S., VELTY, A., "Activated hidrotalcites as catalysts for the synthesis of chalcones of pharmaceutical interest", *Journal of Catalysis*, 221, 474-482, 2004.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S.; Introdução a métodos cromatográficos, 6ª Edição, Editora da Unicamp, 1995.

CORNE V. , Y. GOVAERT, G. MOENS, J. VAN LOCO, J.M. DEGROODT, Development of a fast analytical method for the determination of Sudan dyes in chilli- and curry-containing foodstuffs by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection, *J. Agric. Food Chem.* 54, 639–644, 2006.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q. B. e VIEIRA, P. C. Cromatografia: Um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, n. 7, p. 21-25, 1998.

DUX, J. P. Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory. New York: Van Nostrand Reinold, 1990. p. 59-77.

EL-SHAFAE, A.M.; EL-DOMIATY, M.M., "Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 26, p. 539-545, 2001.

ERTAS E., H. OZER, C. ALASARVAR, A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chilli pepper, *Food Chemistry* 105, 756–760, 2007.

EURACHEM WORKING GROUP. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, a Laboratory Guide to Method. Validation and Related Topics, 1998.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 5th ed. Strasbourg, France. 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, parte I, 1988.

GBB, CASTRO AA, BURIHAN E, editores. *Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado*. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA; 2003. Disponível em: URL: <http://www.lava.med.br/livro>. Acesso em: 19 de setembro de 2008.

GEORGE, S.A., MAUTE, A. A photodiode array detection system: design, concept and implementation, *Chromatographia* 15, 1982.

GIL, E. S.; ORLANDO, R.; MATHIAS, R.; SERRANO, S.H. P. *Controle físico-químico de qualidade de medicamentos*, Campo Grande: Uniderp, 2005.

GRANADOS LOARCA, E.A.. *Uso de flavonoides (hesperidina) en el tratamiento de venas varicosas vesicales sangrantes*, *Actas Urol Esp.*, Madrid, v. 27, n. 9, 2003.

GREEN, J.M., *A practical guide to analytical method validation*. *Analytical Chemistry News & Features*, p. 305-309, ICH, *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceutical for Human Use Q2A*. "Text on Validation of Analytical Procedures", Genebra, 1995.

HARBONE, J.B., MBRY, T.S. *The flavonoids: advances in research*, New York: Chapman and Hall, 1982

HARRIS, D. C., *Análise Química Quantitativa*, 5ª edição, São Paulo, Editora LTC, 2001

HARRIS, D.C. *Análise química quantitativa*, 6 ed. Rio de Janeiro: Ed. LTC 876p., 2005.

HOBBS, C., "Ginkgo, Elixir of Youth – Modern Medicine from an Ancient Tree", *Botanica Press, Capitola*, 1991.

HSIEH, P., CHANG, F., LEE, K., HWANG, T., CHANG, S. WU, Y. A new anti-HIV alkaloid, drymaritin, and a new C-glycoside flavonoid, diandraflavone, from *Drymaria diandra*. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 1175-1177, 2004.

INFARMED. *Farmacopeia Portuguesa VI*, Lisboa, 1997.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LET, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chrom. A*, v.799, p.101-110, 1998.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analyses of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*. Amsterdam, n. 799, p. 101-110, 1998.

KANAZE, F. I.; GABRIELI, C.; KOKKALOU, E.; GEORGARAKIS, M.; NIOPAS, I., "Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin, and naringin in different Citrus fruit juices and pharmaceutical formulations", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33, 243–249; 2003.

KLEJDUS, B.; MIKELOVA, R.; PETRLOVA, J.; POTESIL, D.; ADAM, V.; STIBOROVA, M.; HODEK, P.; VACEK, J.; KIZEK, R.; KUBAN, V. Evaluation of isoflavone aglycon and glycoside distribution in soy plants and soybeans by fast column high-performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector. *J. Agric. Food Chem*, 53, 5848-5852, 2005.

KO, S.C., CHAPPLE, K.S., HOWCROFT, G., COLETTA, P.L., MARKHAM, A.F., HULL, M.A., "Paracrine cyclooxygenase-2-mediated signalling by macrophages promotes tumorigenic progression of intestinal epithelial cells", *Oncogene*, 21, 7175-7186, 2002.

KOO, H.M.; SUHAILA, M., "Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempfero, luteolin and apigemin), content of edible tropical plants", *J. Agric. Food Chemistry*, 49, 3106-3112, Chicago, 2001

KRIS-ETHERTON, P.M., HECKER, K. D., BONANOME, A., COVAL, S. M., BINKOSKI, A. E., HILPERT, K. F., GRIEL, A. E., ETHERTON, T. D., "Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer", *Am. J. Med*, 113, 71-88, 2002.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANING, J.L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*, Lisboa: Fundação Calouste, 2001.

LALA, P.K., CHAKRABORTY, C., "Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression", *Lancet Oncol.*, 2, 149-156, 2001.

LEITE, F., *Validação em Análise Química*, 4ª edição, São Paulo, Atheneu Editora São Paulo LTDA, 2004.

M. BLANCO, J. GENE, H. ITRRIAGA AND S. MASPOCH, Application of a photodiode array detector to multi-component determination by flow injection analysis, *Chromatographia* 20 (1987).

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.

MARKHAM, K. R. *Techniques of flavonoid identification*. New York: Academic Press, 113 p., 1982.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al, Los flavonoides: propiedades y acciones antroxidantes, *Nutr. Hop. XVII* (6) 271-278, 2002.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. *VOGEL's análise química quantitativa*, 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

Merck. "Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures", *Carbohydr. Res.* 328, 141-146, FT-IR 2 (2), 2503:D / RegBook 1 (2), 1695:K / Sax 6, 1504 / Structure Index 1, 270:C:3; 2000.

MORETTO LD, SHIB M. A era da validação. *Pharmaceutical Technology*. ; 4:4-48, 2000.

Nicolósi M. *Validação de métodos analíticos. Controle de Contaminação*. 54:12-21; 2003;

- PERKIN ELMER; Curso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Goiânia, 2006.
- Peters F.T. , Drummer O.H., Musshoff F., Validation of new methods, Forensic Sci. Int. 165, 216–224, 2007.
- PHARMACOPEIAL previews. Pharmacopeial forum. v.30, n.1, p.356, 2004.
- PIETTA, P. G., “Flavonoids as Antioxidants”, J. Nat. Prod, 63, 1035-1042, 2000.
- PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. Técnica farmacêutica e farmácia galênica, Vol. 1, 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.
- QUINTIN, J.; LEWIN, G.; “Semisynthesis of linarin, acacetin and 6-iodoapigenin derivatives from diosmin”; J. Nat. Prod., 67, 1624, 2004.
- RIBANI, M., MELO, L. F. C., BOTTOLI, C. B. G., et. al. “Validação em Métodos Cromatográficos e eletroforéticos”, Química Nova, v.27, pp. 771-780, 2004.
- RIBEIRO I.A., RIBEIRO M.H.L. “Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method” Food Control, 19 (4), pp. 432-438, 2008.
- RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A.T., “Analytical separation and detection methods for flavonoids”, Journal of Chromatography A, v. 1112, p. 31-63, 2006.
- ROLIM, A., et al. "Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants." Int. J. Pharm. Feb 3; 308(1-2): 107-14. 2006.
- SAKAKIBARA, H.; HONDA, Y.; NAKAGAWA, S.; ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 51, n. 03, p. 571-581, 2003.
- SAKATA, K.; HIROSE, Y.; QIAO, Z.; TANAKA, T; MORI, H.; “Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line”; Cancer Letters; 199, 139, 2003.
- SHARP, J. Quality in the manufacture of medicine and other healthcare products, London: Pharmaceutical Press, 2002.
- SILVA, A.L.M. et al; “Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas”, Quím. Nova, São Paulo, v. 30, n. 5, Oct. 2007.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Princípios de análise instrumental. 5a.ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 836p, 2002.
- SKOOG,D.A.; HOLLER,F.J.; NIEMAN, T.A.; Princípios de análise instrumental, 5 ed. Porto Alegre: Ed. Bookman, 2002.
- SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S., “Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção”, Rev. Bras. Cienc. Farm., São Paulo, v. 43, n. 4, Dec. 2007.

TANAKA, T., KHONO, H., MURAKAMI, M., SHIMADA, R., KAGAMI, S., SUMIDA, T., AZUMA, Y., OGAWA, H., "Suppression of azoxymethane- induced colon carcinogenesis in male F344 rats by mandarin juices rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin", *Int. J. Cancer*, 88, 146–150, 2000.

TANAKA, T., MAKITA, H., OHNISHI, M., MORI, H., SATOH, K., HARA, A., SUMIDA, T., FUKUTANI, K., OGAWA, H., "Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination", *Cancer Res.*, 57, 246–252, 1997.

USP. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA). *Validation of Compendial Methods*, 30 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VALENTINI, S. R. Atributos da validação da metodologia analítica do captopril num programa de garantia de qualidade. Florianópolis. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

VOGEL, A.I, *Análise Química Quantitativa*, 6° ed. Rio de Janeiro, LTC, 2002.

YLMAZ, Y, TOLEDO, R. T., "Health aspects of functional grape seed constituents", *Trends in food science and technology*, 15, 422-433, 2004.