



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ALESSANDRA MOREIRA DE OLIVEIRA

*ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DE COMPATIBILIDADE E
ESTABILIDADE ESTENDIDA DE SOLUÇÃO PARA
ANALGESIA PERIDURAL EM PACIENTES ONCOLÓGICOS
PÓS-TORACOTOMIZADOS*

RIO DE JANEIRO

Alessandra Moreira de Oliveira

TÍTULO: Estudo físico-químico de compatibilidade e estabilidade estendida de solução para analgesia peridural em pacientes oncológicos pós-toracotomizados.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Elias Estrela

RIO DE JANEIRO

2012

O482e Oliveira, Alessandra Moreira de.

Estudo físico-químico de compatibilidade e estabilidade estendida de solução para analgesia peridural em pacientes oncológicos pós-toracotomizados/ Alessandra Moreira de Oliveira; orientador Rita de Cássia Elias Estrela. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2012.

130f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Clonidina. 2. Ropivacaína. 3. Fentanila. 4. Estabilidade estendida.
5. CLAE. I. Estrela, Rita de Cássia Elias. II. Título.

CDD 615.19

Alessandra Moreira de Oliveira

TÍTULO: Estudo físico-químico de compatibilidade e estabilidade estendida de solução para analgesia peridural em pacientes oncológicos pós-toracotomizados.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de maio de 2012

ORIENTADORA:

Prof^ª. Dra. Rita de Cássia Elias Estrela Marins
Faculdade de Farmácia - UFRJ

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Claudia Garcia Serpa Osório-de-Castro
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – FIOCRUZ

Prof^ª. Dra. Monica Costa Padilha
Instituto de Química – UFRJ

Prof^ª. Dra. Valéria Pereira de Sousa
Faculdade de Farmácia – UFRJ

“Não se acostume com o que não o faz feliz,
revolte-se quando julgar necessário.
Alague seu coração de esperanças, mas não
deixe que ele se afogue nelas.
Se achar que precisa voltar, volte!
Se perceber que precisa seguir, siga!
Se estiver tudo errado, comece novamente.
Se estiver tudo certo, continue.
Se sentir saudades, mate-a.
Se perder um amor, não se perca!
Se o achar, segure-o!”

Fernando Pessoa

“... E esta é a vitória que vence o mundo: a
nossa fé.”

1 João 5:4

Aos meus amados e saudosos pais, Francisco e Alcina, ao meu marido Luís
Antônio e ao meu maior amigo, Jesus Cristo

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Rita Estrela**, pelo amadurecimento profissional, amizade e orientação ao longo deste trabalho. Obrigada pela confiança depositada e por me ensinar tanto. É um privilégio de poucos poder aprender com tanta verdade e amizade. Meu mais profundo agradecimento.

Ao professor **José Saraiva** por me receber em seu laboratório e por todas as observações importantes para o crescimento deste estudo. Além de todos os momentos de descontração, que fazem do LabFarma um lugar de construção de amizades.

Aos amigos do LabFarma, **Angélica, Aline, Daylane, Edlaine, Eliana, Karine, Luciano, Patrícia, Rafael, Tácio, Vanessa**. Obrigada pela torcida e por todos os bons momentos proporcionados.

À **Edlaine Rijo**, meu especial agradecimento por tamanha dedicação e disponibilidade, sempre disposta a me ouvir e ajudar. Muito obrigada, Edi !!

À aluna de Iniciação Científica, **Mariana Tavares**, por toda a colaboração.

Ao meu amigo, **Marcelo Marsico**, por todos os conselhos, conversas e muito, muito café (com creme...).

A toda equipe do LAbCQ e LADEG, pela colaboração.

À banca de acompanhamento, professoras Elisabete Pereira dos Santos e Valéria Pereira de Sousa pela grande contribuição para a construção desta dissertação.

A todos os professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por todo aprendizado proporcionado e pelos momentos de descontração e apoio.

Às professoras **Gisela Dellamora Ortiz** e **Ana Luiza Palhares de Miranda** pela orientação e incentivo.

Aos secretários da Secretaria de Pós-Graduação **Carlos, Thiago Meyer, Marcelo Araujo**, pela prestabilidade e atenção.

A todos os professores que aceitaram participar da banca examinadora e contribuir para a melhora deste trabalho.

À farmacêutica **Letícia Boechat**, pela motivação e incentivo. Por conseguir ver além e contribuir tanto para o crescimento da Farmácia Hospitalar Brasileira.

À chefe da Seção de Farmácia, **Dulce Helena Nunes Couto** (Hospital de Câncer I/ Instituto Nacional de Câncer) e toda a sua equipe, por proporcionar a aplicabilidade de execução deste trabalho

Aos farmacêuticos da Central de Preparo de Medicamentos Antineoplásicos pela manipulação das bolsas e seringas.

À Marinha do Brasil, em nome do Contra Almirante Médico **Dr. Paulo César de Almeida Rodrigues** pela disponibilização do cromatógrafo nas instalações do Instituto de Pesquisa Biomédicas e aos Capitães de Mar e Guerra **Antônio Carlos dos Santos Filho, Marcelo Eduardo Moreira Goulart e Carlos Alberto Ferreira da Rosa**. Agradeço imensamente ao Capitão de Corveta **Marcelo Leal Gregório** e a toda a equipe do IPB por tamanha colaboração e generosidade, a saber, à Capitã de Corveta, **Josiane Pinheiro**, à Tenente **Bianca Ortiz**, a Dra. **Maria da Graça Santos Quintela**, ao suboficial **Carlos de Queiroz dos Santos**, ao sargento **Bergson Moreira do Vale**, aos Cabos **Carlos Eduardo de Souza, Leandro Ferreira e Andrew Alves**, à dona **Albertina** e à **Ana Paula**. Muito obrigada a todos !!

Aos pesquisadores **Saranjit Singh e Michael Hartmann** e colaboradores por gentilmente e prontamente me enviarem os artigos solicitados.

Aos meus colegas farmacêuticos e técnicos pelo crescimento profissional e amizade.

Ao paciente, objeto maior de minha atuação profissional e acadêmica.

Ao laboratório Cristália, pelo fornecimento dos padrões.

À minha amiga **Esteliane Rosa** e a toda sua família (**Alexandre, Arthur, Bruninha**). Obrigada pela torcida, amiga. Serei eternamente grata por estar ao meu lado quando mais precisei. Amo todos vocês !!!

À minha irmã **Andréa** pela amizade e por podermos nos ajudar sempre !! Ao meu irmão **Rodrigo** e ao meu cunhado **Hélio**.

Aos meus sobrinhos **Matheus, Thami e Bia**. Amo vocês!!

À minha sogra **Iracema** por todo apoio.

Aos meus amados e saudosos pais **Francisco e Alcina**. Em qualquer lugar ou tempo, sempre levarei comigo tudo que me ensinaram. Sempre saberei o que é certo e que é melhor ser do que ter. Agradeço a Deus pelos pais e amigos que tive. Ficam a imensa saudade e o amor que nunca se acabará.

Ao meu marido **Luís Antônio**. Não me lembro de um único dia, de um único momento em que você não tenha me ajudado e me apoiado, com dedicação e amor. Sou grata a Deus pela família linda que construímos. Te amo muito!!

Ao meu **Deus**, razão de tudo e luz da minha vida. Estou certa que mais este sonho se realiza, porque antes de nascer no meu coração, nasceu no Seu. Ajude-me a andar pelos seus caminhos e que tudo o que eu faça, seja sempre para honra e glória do **Seu Nome**.

RESUMO

OLIVEIRA, Alessandra Moreira de. **Estudo Físico-químico de Compatibilidade e Estabilidade Estendida de Solução para Analgesia Peridural em Pacientes Oncológicos Pós-toracotomizados.** Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A solução extemporânea utilizada no controle da dor pós-toracotomia é uma mistura de cloridrato de clonidina (CLO HCl) 1 µg/mL, cloridrato de ropivacaína (ROP HCl) 0,1% ou 0,2% e citrato de fentanila (FENT CIT) 5 µg/mL em soro fisiológico. Não existem dados na literatura acerca da estabilidade físico-química destes fármacos na mesma bolsa. Desenvolver e validar uma metodologia para avaliar a estabilidade estendida das soluções analgésicas constitui o principal objetivo deste trabalho. Foi desenvolvido um método analítico, em fase reversa por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE/DAD), isocrático, para a mistura de CLO HCl, ROP HCl e FENT CIT, nas respectivas concentrações 4 µg/ml, 100 µg/ml e 30 µg/ml. As condições cromatográficas empregadas foram: a fase móvel com tampão fosfato de sódio monobásico (pH 5,0; 5mM) - metanol - acetonitrila (45:45:10 v/v), uma coluna Kromasil[®] C18 (250 X 4.6 mm, 5µ), detecção na faixa de 200-400 nm, temperatura de 40 °C e fluxo de 1,0 mL/min. O método desenvolvido foi utilizado para a execução do estudo de estabilidade estendida. O conteúdo de doze bolsas de infusão de PVC foi analisado quanto a presença de material particulado pelo ensaio de contagem de partículas microscópicas e ensaio de pH nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h (3 por dia); e sob as condições cromatográficas do método desenvolvido, amostras de solução analgésica de cinco bolsas de infusão de PVC, cinco equipos de infusão peridural e seringas, nos tempos de 0 h e 24 h foram analisadas. O pH das amostras não apresentou variação superior a 5% e nenhuma formação de partícula foi observada em até 72h. A validação foi feita em termos de especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, precisão e robustez durante

três dias. O método cromatográfico mostrou-se específico; os coeficientes de correlação (\pm desvio padrão) obtidos para CLO HCl, ROP HCl e FENT CIT foram $0,994457 \pm 0,00138$, $0,993297 \pm 0,002328$ e $0,991658 \pm 0,000207$ respectivamente e linear nos intervalos de 3,2-4,8 $\mu\text{g/mL}$, 80,0-100,0 $\mu\text{g/mL}$ e 24,0-36,0 $\mu\text{g/mL}$; para os fármacos CLO HCl, ROP HCl e FENT CIT, respectivamente. Os valores de exatidão e precisão intra e inter-ensaio não variaram mais que 5% e o método se mostrou robusto dentro das variações de temperatura e fluxo. A perda percentual da concentração observada em 24 h para os fármacos CLO HCl, ROP HCl e FENT CIT, em bolsa de infusão, equipo e seringa foram respectivamente, 24,43%, 33,71%, 20,40%; 9,36%, 22,23%, 21,94% e 1,31%, 16,86%, 13,24%. No estudo de estabilidade estendida foi encontrado um composto suspeito, sem relação com os recipientes utilizados. Assim, a solução analgésica não foi considerada estável de acordo com a metodologia empregada.

Palavras-chave: clonidina, ropivacaína, fentanila, estabilidade estendida, CLAE.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Alessandra Moreira de. **Physical-chemical Study of Compatibility and Stability of Solution Used In Peridural Analgesy In Post-Toracotomized Oncologic Patients.** Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

The extemporaneous solution used to post-thoracotomy pain control is a mixture of, clonidine hydrochloride (CLO HCl) 1 µg/mL, ropivacaine hydrochloride (ROP HCl) 0,1% or 0.2% and fentanyl citrate (FENT CIT) 5 µg/mL in sodium chloride (NaCl) 0,9%. There are no available data about the physical-chemical stability of these drugs in the same bag. Develop and validate a method to evaluate the extended stability of the analgesic solutions is the principal objective of this work. It has been developed an analytical, reversed phase and isocratic method by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC/DAD) to the mixture of CLO HCl, ROP HCl and FENT CIT at the respective concentrations: 4 µg/ml, 100 µg/ml and 30 µg/ml. The chromatographic conditions employed were a mobile phase of buffer monobasic sodium phosphate (pH=5.0; 5mM) - methanol - acetonitrile (45:45:10 v/v), a Kromasil[®] column C18 (250 X 4.6 mm, 5µ), range of wavelength between 200-400 nm, temperature at 40 °C and a flow rate of 1,0 mL/min. The developed method was used to execute the extended stability study. The content of twelve PVC infusion bags was used for analysis of particulate matter in injections by the microscopic particle count test and pH on times 0, 24, 48 and 72 h (3 by day); and under the chromatographic conditions of the developed method, samples of analgesic solution of five PVC infusion bags, five peridural infusions administration sets and five syringes from times 0 h and 24 h were analyzed. The variations of the pH of the samples were not more than 5% and it was not observed any particle in 72 h. Validation of the method was made in terms of specificity, linearity, range, accuracy, precision during three days. The method was specific,

the correlation coefficient (\pm standard deviation) to CLO HCl, ROP HCl and FENT CIT were $0,994457 \pm 0,001381$; $0,993297 \pm 0,002328$ and $0,991658 \pm 0,000207$, respectively and linear in the range of 3,2-4,8 $\mu\text{g/mL}$; 80,0-100,0 $\mu\text{g/mL}$ and 24,0-36,0 $\mu\text{g/mL}$ to the drugs CLO HCl, ROP HCl and FENT CIT, respectively. Accuracy, intra and interday precision values have not more than 5% and the method was robust under variations of temperature and flow rate. Through the extended stability study it has been found one suspected product. The percentual lost in 24 h to the drugs CLO HCl, ROP HCl and FENT CIT in PVC infusion bags, peridural infusions administration sets and syringes were, respectively, 24,43%, 33,71%, 20,40%; 9,36%, 22,23%, 21,94% and 1,31%, 16,86%, 13,24%.

Key words: clonidine, ropivacaine, fentanyl, extended stability, HPLC.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	24
1.1 O CÂNCER DE PULMÃO	24
1.2 A TORACOTOMIA	26
1.3 A DOR	28
1.4 A ANALGESIA EPIDURAL	32
1.5 FÁRMACOS UTILIZADOS NA ANALGESIA PERIDURAL	35
1.5.1 Cloridrato de clonidina	35
1.5.2 Cloridrato de ropivacaína	39
1.5.3 Citrato de fentanila	42
1.6 ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS	44
1.6.1 Estudo de estabilidade estendida	46
1.7 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS	48
1.7.1 A cromatografia líquida de alta eficiência	48
1.7.2 Detector de ultravioleta/visível	49
1.7.3 Detector de arranjo de diodos	50
1.7.4 Quantificação de FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl por CLAE/UV ou CLAE/DAD	51
1.8 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	56
1.8.1 Especificidade	58
1.8.2 Linearidade	59
1.8.3 Intervalo	60
1.8.4 Precisão	60
1.8.5 Exatidão	60
1.8.6 Robustez	61
2. OBJETIVOS	62
2.1 OBJETIVO GERAL	62
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
3. MATERIAL E MÉTODOS	63

	Página
3.1 MATERIAL	63
3.1.1 Fármacos, excipientes e reagentes	63
3.2 EQUIPAMENTOS	63
3.3 MÉTODOS	64
3.3.1 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por CLAE/DAD para a quantificação de FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl em solução fisiológica de NaCl 0,9%	65
3.3.1.1 Etapas do desenvolvimento da metodologia analítica	65
3.3.1.1.1 Controle de qualidade de medicamentos em suas embalagens originais	65
3.3.1.1.1.1 Aspecto	65
3.3.1.1.1.2 Cor	65
3.3.1.1.1.3 Volume	66
3.3.1.1.1.4 pH	66
3.3.1.1.2 Dados sobre a amostra	67
3.3.1.2 Validação da metodologia	69
3.3.1.2.1 Preparo das soluções-estoque	69
3.3.1.2.2 Determinação da especificidade	70
3.3.1.2.2.1 Degradação da solução analgésica	70
3.3.1.2.2.1.1 Degradação por hidrólises ácida e básica	72
3.3.1.2.2.1.2 Degradação por oxidação	75
3.3.1.2.3 Determinação da linearidade	75
3.3.1.2.4 Determinação do intervalo	75
3.3.1.2.5 Determinação da precisão	75
3.3.1.2.6 Determinação da exatidão	77
3.3.1.2.7 Determinação da robustez	77
3.3.1.2.8 Determinação da estabilidade de curta duração	78
3.3.2 Estudo de estabilidade estendida	78
3.3.2.1 Apresentação das formulações farmacêuticas	78
3.3.2.2 Preparo das bolsas de infusão, seringas e equipos de infusão peridural	78
3.3.2.3 Coleta das amostras das soluções manipuladas na seção de pré-quimioterapia (HCl/INCa - Seção de Farmácia)	79

	Página
3.3.2.4 Transporte das amostras	79
3.3.2.5 Validação do transporte	80
3.3.3 Ensaio para a determinação da estabilidade física e compatibilidade química	80
3.3.3.1 Apresentação das formulações farmacêuticas	80
3.3.3.2 Preparo das bolsas de infusão	80
3.3.3.3 Determinação de pH	80
3.3.3.4 Transporte das amostras	81
3.3.3.5 Teste de contagem de partículas microscópicas	81
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	84
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	94
4.2.1 Determinação da especificidade	94
4.2.2 Determinação da linearidade	99
4.2.3 Determinação da exatidão e da precisão	100
4.2.4 Determinação da robustez e da estabilidade de curta duração	102
4.3 VALIDAÇÃO DO TRANSPORTE DAS AMOSTRAS DE SOLUÇÃO FISIOLÓGICA	103
4.4 ENSAIO DE CONTAGEM DE PARTÍCULAS	104
4.5 ENSAIO DE pH	106
4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE ESTENDIDA DA SOLUÇÃO ANALGÉSICA EM BOLSA DE INFUSÃO, SERINGA EQUIPO DE INFUSÃO PERIDURAL	108
5. CONCLUSÕES	117
6. REFERÊNCIAS	118

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página	
FIGURA 1	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma	24
FIGURA 2	Representação espacial das taxas de incidência neoplasia maligna de traquéia, dos brônquios e do pulmão por 100 mil mulheres (esquerda) e por 100 mil homens (direita), estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação	25
FIGURA 3	Imagem de adenocarcinoma primário em vermelho em lobo superior esquerdo do pulmão. Imagem simultaneamente adquirida por tomografia computadorizada com fusão com tomografia por emissão de pósitrons com 2-[F-18]-fluoro-2-deoxi-d-glucose (^{18}F -FDG-PET)	26
FIGURA 4	Paciente em posição lateral submetido ao procedimento de toracotomia posterolateral	27
FIGURA 5	Escada analgésica da dor proposta pela Organização Mundial de Saúde	32
FIGURA 6	Esquema representativo dos locais de administração dos analgésicos locais - bloqueio epidural em detalhe	34
FIGURA 7	Fórmula estrutural da CLO	35
FIGURA 8	Representação esquemática do mecanismo molecular da ação de agonistas α_2 ligados à proteína G	37
FIGURA 9	Representação das respostas que podem ser mediadas por receptores α_2 adrenérgicos	38
FIGURA 10	Fórmula estrutural da ROP	40
FIGURA 11	Representação esquemática dos estados de repouso, ativado e inativado dos canais de sódio controlados por voltagem	41
FIGURA 12	Fórmula estrutural do FENT	42
FIGURA 13	Representação esquemática do mecanismo de ação do agonista opióide no receptor μ na medula espinhal	45
FIGURA 14	Representação esquemática dos módulos componentes do cromatógrafo	49
FIGURA 15	Figura esquemática de um detector UV/visível	50

	Página
FIGURA 16 Figura esquemática de um detector de arranjo de diodos	52
FIGURA 17 Cromatogramas do FENT no estudo de degradação	53
FIGURA 18 Produtos de degradação e impurezas do FENT	55
FIGURA 19 Organograma do estudo de estabilidade estendida da solução analgésica	65
FIGURA 20 Etapas para o desenvolvimento da metodologia analítica por CLAE	66
FIGURA 21 Figura da bolsa de infusão em sistema fechado acoplada a equipo de infusão peridural e seringa com solução analgésica (em detalhe, setas com indicação dos pontos de coleta). À direita, pontos de coleta: (a) bolsa de infusão, (b) equipo e (c) seringa	79
FIGURA 22 Figura de microscópio binocular acoplado à gráticula e iluminador	83
FIGURA 23 Cromatograma obtido a 210 nm da solução analgésica acondicionada em bolsa de solução fisiológica de NaCl a 0,9% em sistema fechado (em detalhe pico cromatográfico não correspondente aos fármacos do estudo)	87
FIGURA 24 Cromatograma com pico de assimétrico de ropivacaína em detalhe	90
FIGURA 25 Cromatogramas exemplificando a degradação das soluções preparadas a partir das ampolas e do padrão secundário em meio alcalino: (a) clonidina; (b) solução analgésica e (c) ropivacaína	96
FIGURA 26 Determinação da pureza para CLO HCl (a), ROP HCl (b) e FENT CIT (c)	97
FIGURA 27 Cromatograma soro fisiológico (a), cromatograma solução analgésica (b) mapa de contorno (c) e espectro de varredura em 3D (d) referentes aos fármacos: CLO HCl (1), ROP HCl (2) e FENT CIT (3)	99
FIGURA 28 Resultados do estudo de pH nos tempos de 0, 24, 48, 72 h. (*) Valores de pH significativamente ($p=0,05$) diferentes em relação ao tempo de 0h através do teste de Bonferroni.	108
FIGURA 29 Cromatogramas do estudo de estabilidade estendida em tempo 0 h em bolsa (a), equipo (b) e seringa (c). Em detalhe, picos adicionais	111
FIGURA 30 Cromatogramas do estudo de estabilidade estendida em tempo 24 h em bolsa (a), equipo (b) e seringa (c). Em detalhe, picos adicionais	114

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Dados sobre a composição e propriedades da amostra	67
TABELA 2	Dados referentes ao preparo das soluções-estoque	70
TABELA 3	Preparo das soluções para ensaio de especificidade	71
TABELA 4	Preparo das soluções a partir das ampolas para o ensaio de degradação	73
TABELA 5	Preparo das soluções a partir das soluções-estoque para o ensaio de degradação	74
TABELA 6	Preparo das soluções a partir das soluções-estoque para o ensaio de linearidade	76
TABELA 7	Preparo das soluções a partir dos padrões secundários para os ensaios de precisão e exatidão	77
TABELA 8	Dados referentes ao preparo das soluções de trabalho	78
TABELA 9	Dados referentes ao preparo das soluções de trabalho	81
TABELA 10	Condições cromatográficas iniciais no desenvolvimento da metodologia por CLAE/UV	85
TABELA 11	Condições cromatográficas para otimização da metodologia por CLAE/DAD	89
TABELA 12	Condições cromatográficas para otimização da metodologia por CLAE/DAD	90
TABELA 13	Parâmetros cromatográficos obtidos para o método desenvolvido por CLAE/DAD	94
TABELA 14	Resultado do ensaio de degradação forçada para as soluções dos fármacos isolados e em mistura preparadas a partir do padrão e da ampola	95
TABELA 15	Média dos parâmetros de linearidade do método analítico obtidos nos três dias de validação	100
TABELA 16	Resultados de exatidão e precisão inter-ensaio	101
TABELA 17	Resultados de exatidão e precisão intra-ensaio	102

		Página
TABELA 18	Resultados do ensaio de robustez e estabilidade de curta duração	102
TABELA 19	Registros de temperaturas máxima e mínima durante a validação do transporte	104
TABELA 20	Resultados obtidos para ensaio de partículas microscópicas	105
TABELA 21	Valores de pH obtidos nos tempos 0 h, 24 h, 48 h e 72 h	107
TABELA 22	Tempos de retenção observados em 0 h e 24 h em bolsas de infusão, equipo e seringa	112
TABELA 23	Resultado dos espectros dos compostos suspeitos observados nas amostras de bolsa de infusão, equipo e seringa em 24 h.	115

LISTA DE QUADROS

		Página
QUADRO 1	Classificação dos testes por categoria, segundo a sua finalidade proposto pela ANVISA	57
QUADRO 2	Parâmetros de desempenho analítico necessários para a validação do método analítico segundo a sua finalidade	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	acetonitrila
AET	analgesia epidural torácica
AL	anestésico local
AMP	monofosfato de adenosina
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CH₃COONa	acetato de sódio
CH₃COOH	ácido acético
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLO HCl	cloridrato de clonidina
CMD	concentração média determinada
CP	câncer de pulmão
CPPC	câncer de pulmão pequenas-células
CPNPC	câncer de pulmão não-pequenas-células
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CT	concentração teórica
CV	coeficiente de variação
d	diâmetro da coluna
DAD	detector de arranjo de diodos

DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
F	fluxo de fase móvel
¹⁸F-FDG-PET	2-[F-18]-fluoro-2-deoxi-d-glucose
FENT CIT	citrato de fentanila
GDP	guanosina difosfato
GTP	guanosina trifosfato
GTPase	enzima trifosfato de guanosina
H₃PO₄	ácido fosfórico
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
HEPA	do inglês <i>High Efficiency Particulate Air</i>
NH₄OH	hidróxido de amônio
HPLC	do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>
IASP	do inglês <i>International Association for the Study of Pain</i>
ICH	do inglês <i>International Conference on Harmonization</i>
INCa	Instituto Nacional de Câncer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IPB/HNMD	Instituto de Pesquisas Biomédicas/Hospital Naval Marsílio Dias
k	fator de retenção
KH₂PO₄	fosfato de potássio monobásico

L	comprimento de coluna
MeOH	metanol
MS	Ministério da Saúde
Na₃PO₄	fosfato de sódio
NaH₂PO₄	fosfato de sódio monobásico
NaOH	hidróxido de sódio
NRF	norfentanila
3-OH-PPX	3-hidroxi-2', 6'-pipecoloxilidida
4-OH-ROP	4-hidroxi-ropivacaína
3-OH-ROP	3-hidroxi-ropivacaína
p	nível de significancia
1-PEP	1-feniletilpiridinium
Pi	fosfato inorgânico
pKa	- logaritmo da constante de ionização do ácido
pH	potencial hidrogeniônico
PPA	N-fenil-N-(4-piperidinil) propionamida
PPX	2', 6'-pipecoloxilidida
PRP	propionanilida
Psi	Do inglês <i>pound per square inch</i> Libra por polegada quadrada (unidade de pressão).
PVC	cloreto de polivinila
R	coeficiente de correlação linear
R_s	resolução (em cromatografia)

RE	Resolução (em legislação)
ROP HCl	cloridrato de ropivacaína
SDPT	síndrome da dor pós-toracotomia
1-SPO	1-estiril-1H-piridin-2-ona
T₀	tempo volume morto
T_R	tempo de retenção
TEA	trietilamina
USP- NF	do inglês <i>The United States Pharmacopeia–National Formulary</i>
UV	ultravioleta
V_m	volume morto
WHO	World Health Organization
W_{MÁX}	peso máximo

LISTA DE SÍMBOLOS

S(+)	isômero S
μ	“mi”
K⁺	íon potássio
Ca⁺⁺	íon cálcio
α₁	alfa 1 (receptor)
α₂	alfa 2 (receptor)
α_{2A}	alfa 2A (receptor)
α_{2B}	alfa 2B (receptor)
α_{2C}	alfa 2C (receptor)
Mg⁺⁺	íon magnésio
OH	hidroxi (grupo funcional)
ε	absorptividade molar
H⁺	íon hidrogênio

1. INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE PULMÃO

O câncer é considerado a principal causa de morte no mundo, com 7,6 milhões de mortes (13% de todas as mortes) em 2008 (WHO, 2011a). Até o início do século 20, o câncer de pulmão (CP) era considerado raro. Com o aumento do consumo de cigarros, principalmente a partir da contribuição de economias socialistas e de países em desenvolvimento, o CP tornou-se no século 21 a maior causa de morte por câncer (HAUGEN & MOLLERUP, 2008), com o índice de 1,4 milhões de pessoas por ano, apesar da diminuição do consumo de tabaco; seguido por câncer de estômago (740.000 mortes), fígado (700.000), colorretal (610.000) e mama (460.000). Estima-se que esses números irão aumentar atingindo mais de 11 milhões de óbitos em 2030 (WHO, 2011a).

Desta forma, o câncer tornou-se tanto em países desenvolvidos e como naqueles em desenvolvimento, um problema de saúde pública. No ano de 2000 foram registrados 10 milhões de novos casos - 4,7 milhões de mulheres e 5,3 milhões de homens, destes registrados 6,2 milhões de óbitos por esta causa (BRASIL, 2003a).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 apontam para 518.510 novos casos de câncer. A estimativa para o sexo masculino é de 257.870 casos novos e para o sexo feminino, de 260.640. O câncer de pulmão está entre os cinco tumores mais incidentes na população brasileira, tanto para homens (17.210 novos casos), quanto para as mulheres (10.110 mil) (BRASIL, 2011) (Figura 1).

Localização primária			casos novos	percentual			Localização primária		
					Homens	Mulheres			
	Próstata	60.180	30,8%				Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%				Colo do Útero	17.540	9,3%	
	Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%	
	Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%	
	Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%	
	Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%	
	Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%	
	Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%	
	Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%	
	Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%	

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma (BRASIL, 2011)

Fonte: Instituto Nacional de Câncer

No Brasil, estes valores apontam para um risco estimado de 10 novos casos a cada 100 mil mulheres e 18 a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, as taxas de incidência de neoplasia maligna de pulmão, brônquios e traquéia em mulheres, na região sul, é o terceiro mais frequente (19/100 mil), o quarto mais frequente na região Centro-Oeste (9/100mil casos) e o quinto nas regiões Norte (5/100 mil), Nordeste (6/100 mil) e Sudeste (11/100 mil). Para os homens, a situação torna-se mais grave, sendo o segundo mais frequente na região sul (37/100 mil) e centro-oeste (17/100 mil) (BRASIL, 2011) (Figura 2).

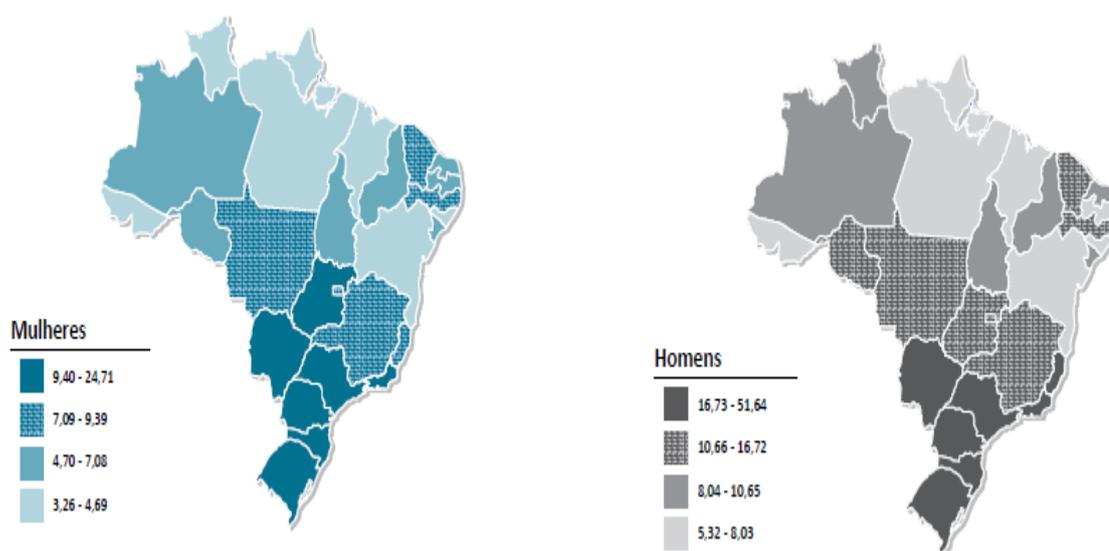


Figura 2. Representação espacial das taxas de incidência neoplasia maligna de traquéia, dos brônquios e do pulmão por 100 mil mulheres (esquerda) e por 100 mil homens (direita), estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (BRASIL, 2011)
Fonte: Instituto Nacional de Câncer

De acordo com os últimos dados publicados pelo Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde (INCa/MS), apesar da alta incidência de casos de CP estar relacionada com o consumo de tabaco (aproximadamente 90%) (BRASIL, 2009), este pode ocorrer em não-fumantes, o que implica na correlação com outros fatores, como predisposição genética, poluição, vírus, fatores ocupacionais e exposição à carcinógenos oriundos da fumaça do tabaco, como hidrocarbonetos aromáticos polinucleares e carcinógenos específicos do tabaco, como o 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (HAUGEN & MOLLERUP, 2008).

Infelizmente, o CP é geralmente detectado em estágios avançados, pois é rara a sintomatologia em estágios iniciais, o que o torna uma doença altamente letal, com uma razão de mortalidade/incidência de aproximadamente 86% (BRASIL, 2011). A classificação do CP

depende da avaliação anátomo-patológica, que pode ser classificado em: 1. câncer de pulmão pequenas-células (CPPC) e 2. câncer de pulmão não-pequenas-células (CPNPC).

O CPPC corresponde a um CP indiferenciado representado por três subtipos celulares: intermediário, linfocitóide e combinado (células pequenas com adenocarcinoma ou carcinoma epidermóide). O CPNPC corresponde a 75% dos pacientes diagnosticados com CP. Consiste em um grupo heterogêneo de três tipos histológicos distintos: adenocarcinoma (Figura 3), epidermóide e carcinoma de grandes células (BRASIL, 2009-2011).

Os pacientes diagnosticados CPPC respondem bem à quimioterapia, com diminuição significativa do tamanho do tumor. O CPNPC pode ser diagnosticado por biópsia por broncoscopia para tumores centrais e tomografia computadorizada. Este é considerado não operável se forem observados durante a biópsia depósitos de metástases. No entanto, em alguns casos não é possível diagnosticar o câncer através da histologia, apesar da suspeita obtida através de dados clínicos e de evidência radiológica. O diagnóstico pode ser obtido então, por uma biópsia intra-operatória, através de uma incisão do peito chamada toracotomia, através da qual, o estágio do câncer pode ser determinado (HUNT & TREASURE, 2009).

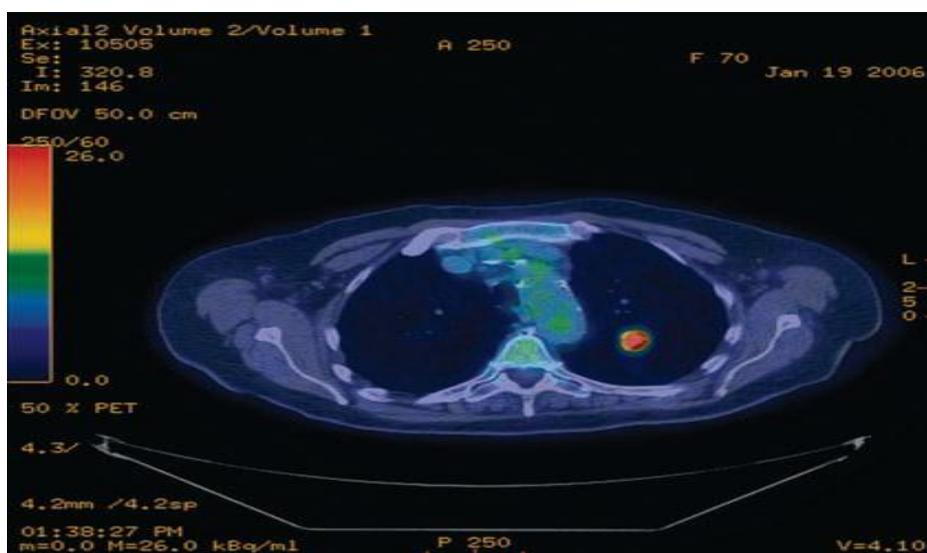


Figura 3. Imagem de adenocarcinoma primário em vermelho em lobo superior esquerdo do pulmão. Imagem simultaneamente adquirida por tomografia computadorizada com fusão com tomografia por emissão de pósitrons com 2-[F-18]-fluoro-2-deoxi-d-glucose (^{18}F -FDG-PET) (HANSEN, 2008)

Fonte: Livro Textbook of Lung Cancer. Informa Healthcare, 2008

1.2 A TORACOTOMIA

No tratamento do câncer, exames são relevantes para o estabelecimento do diagnóstico e da terapêutica do tumor. Entre os procedimentos realizados (exames clínicos, exames por

imagem, marcadores tumorais, entre outros); a cirurgia exploradora é utilizada quando estes impossibilitam a conclusão de um diagnóstico preciso (BRASIL, 2010a).

A toracotomia exploradora (tórax) objetiva retirar o tecido tumoral para ressecção ou biópsia, mapear a doença e restabelecer funções. Estes procedimentos poderão tornar-se terapêuticos para intervenções com fins de tratamento em situações onde é possível aproveitar a via de acesso e sedação do paciente em centro cirúrgico (BRASIL, 2010a).

Neste contexto, a toracotomia consiste então, na abertura da cavidade torácica, com o objetivo do acesso exploratório dos órgãos internos e da cavidade (Figura 4) (BRASIL, 2010b). Este procedimento justifica-se normalmente pela presença de tumores malignos localizados centralmente, com necessidade de maior controle vascular. E em aproximadamente 70% dos casos, substitui a cirurgia torácica assistida por vídeo para a realização da ressecção pulmonar (MCKENNA, 2005).

A incidência da dor crônica pós-cirúrgica varia de cirurgia para cirurgia e está relacionada com uma síndrome neuropática causada principalmente pela injúria do nervo. Os fatores de risco relacionados à dor crônica abrangem fatores psicossociais, demográficos e genéticos, que contribuem não somente para a conversão da atividade somatossensorial em dor, mas também para a amplitude da reação ao estímulo. No entanto, a síndrome da dor pós-toracotomia (SDPT) é um resultado adverso importante da cirurgia torácica, com uma etiologia mais complexa (KEHLET, JENSEN, WOOLF, 2006; MACRAE, 2008).

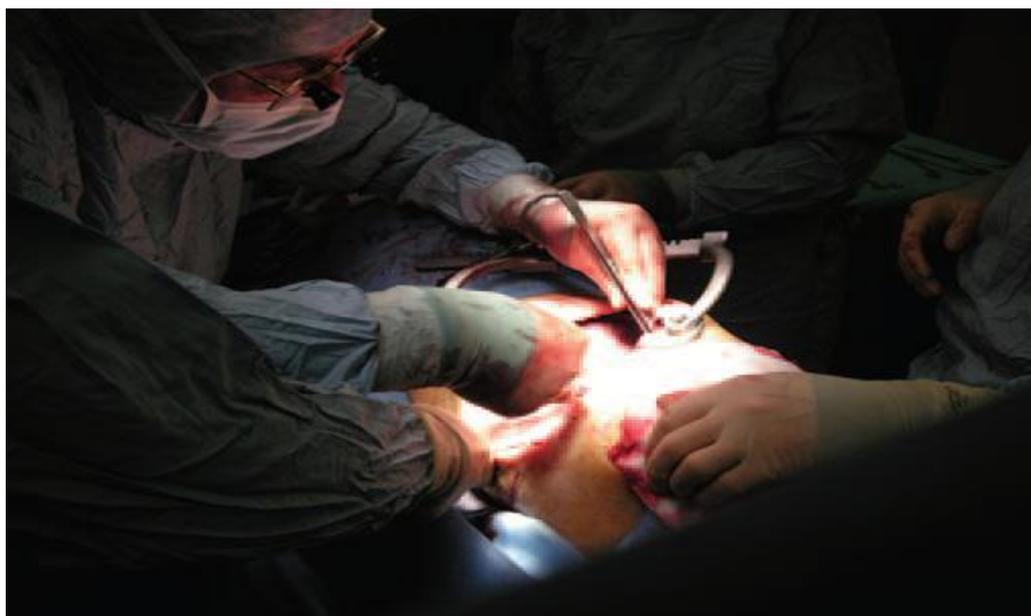


Figura 4. Paciente em posição lateral submetido ao procedimento de toracotomia posterolateral (HUNT & TREASURE, 2009)

Fonte: ABC of Lung Cancer. Oxford. Willey-Blackwell

A dor pós-toracotomia está associada à 1. Retenção de saliva; 2. Maior propensão ao desenvolvimento de atelectasia, devido a mudanças nos mecanismos pulmonares; 3. Redução do volume residual funcional e 4. Inabilidade ao tossir (THOMAS, BERRY, RUSSEL, 1995; KENT, ALVELO-RIVERA, LUKETICH, 2008).

Além disso, o regime de tratamento, apesar de significativo para a promoção de qualidade de vida e diminuição de morbidade, comumente ocasiona aumento de morbidade, com a diminuição de ventilação pulmonar, retenção urinária, náusea e hipotensão, reações normalmente causadas por opióide (KENT, ALVELO-RIVERA, LUKETICH, 2008).

O desenvolvimento da SDPT é caracterizado por uma dor queimante na incisão cirúrgica, que não responde significativamente à terapia medicamentosa. Possui como fator de risco a dor no período perioperatório. A toracotomia também promove importante disfunção nos joelhos, o que diminui mais a execução das atividades diárias dos pacientes pós-toracotomizados (KENT, ALVELO-RIVERA, LUKETICH, 2008).

Wildgard e colaboradores observaram em um estudo com 546 pacientes que a prevalência da SDPT foi de 36% no período de 12-17 meses após a cirurgia, 30% em 18-23 meses, 27% em 24-29 meses e 33% em 30-35 meses após o procedimento. Da prevalência total de dor (32%) observada, verificou-se que 18% dos pacientes sentiam dor constantemente, 44% diariamente, 22% semanalmente e 16% mensalmente. Nos casos diagnosticados como dor intensa, 14, 17 e 42% apresentaram a SDPT ao descansar, ao caminhar e ao fazer atividade física, respectivamente (2011).

Gotoda e colaboradores observaram o tempo de duração da dor pós-toracotomia em homens e mulheres com CP primário, submetidos à cirurgia curativa. De 85 pacientes, 13% relataram dor moderada um dia após a cirurgia, 40% relataram aparecimento ou piora da dor, um mês após a cirurgia e 1% relatou piora do quadro de dor um ano após o procedimento (2001). De acordo com Senturk e colaboradores, o controle da SDPT com a utilização da técnica de analgesia epidural torácica no período pré-operatório e operatório mostrou-se eficaz. Foi possível obter maior controle de dor aguda pós-operatória e com menor necessidade de utilização de fármacos por vias intravenosa e epidural, em comparação com as técnicas de analgesia epidural torácica pós-operatória e analgesia intravenosa (2002).

1.3 A DOR

O tratamento da dor em pacientes com câncer é complexo e exige interdisciplinaridade a fim de se obter melhor qualidade de vida (FERREIRA, CALMO & HIDALGO, 2006). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), o conceito de dor é:

Uma experiência emocional e sensorial desagradável, associada com um dano tecidual potencial ou real, ou descrita em termos de tal dano (IASP, 2011).

A dor representa um sinal de muitos processos patológicos, cujo diagnóstico etiológico completo, permite uma abordagem mais completa e a terapia adequada. Pode ser classificada de acordo com (VARELA, 2006):

1. A causa desencadeante:

a) Neuropática: estabelece-se em condições anormais e está relacionada por um processamento aberrante em sistema nervoso central e periférico;

b) Psicogênica: trata-se de um tipo de dor puramente psicogênica, com apresentação de um quadro algico inexplicável e relacionada a uma perturbação psicológica a causal;

c) Central: dor proveniente de lesão do sistema nervoso central;

d) Neurogênica: relacionada à lesão em sistema nervoso central ou de fibras sensitivas de um nervo periférico responsáveis pela condução do estímulo doloroso;

e) Nociceptiva: trata-se de um estímulo anormal de nociceptores viscerais e periféricos somáticos, sem lesão de estruturas nervosas;

2. A localização:

a) Visceral: origina-se de processos inflamatórios, da ação de substâncias químicas diversas, de processos isquêmicos com anóxias tissulares e de distensões ou contrações das estruturas que formam as paredes das vísceras. Irradia-se de forma difusa, normalmente com caráter ondulante;

b) Somática: pode ser profunda, se sua origem localizar-se em cartilagens, ossos, articulações ou músculos esqueléticos. Irradia-se segundo a disposição dos nervos somáticos, é produzida por estímulo nociceptivo e possui uma natureza aguda bem definida.

3. A duração:

a) Aguda: consiste em uma sensação dolorosa de curta duração, caracterizada por uma manifestação imediata. A informação nociceptiva neste caso é conduzida pelas fibras mielínicas delgadas Ab. Sua localização é precisa quanto ao local da agressão;

b) Crônica: é uma síndrome clínica caracterizada pela duração de sua evolução. Sua persistência pode provocar modificação no comportamento do paciente e alterar profundamente sua qualidade de vida.

A dor é uma das mais freqüentes razões de incapacidade e sofrimento para pessoas com câncer em progressão (BRASIL, 2001), originada por 1. Invasão direta do tumor em nervos, ossos, tecidos, ligamentos e fásia, 2. Metástase ou 3. Efeitos adversos do tratamento (quimioterapia, cirurgia, radioterapia) (CHRISTO & MAZLOOMDOOST, 2008a).

Estima-se que 80% das pessoas com câncer sentirão dor em algum momento da evolução da doença (BRASIL, 2001). No entanto, é possível manter o alívio da dor durante todo o tratamento: um estudo realizado na Alemanha por Zech e colaboradores com 2118 pacientes com câncer com o objetivo de avaliar o controle algico aos quais aqueles foram submetidos, demonstrou que para 76% destes, o controle da dor foi considerado adequado, enquanto que para 12%, foi satisfatório (1995).

A ausência do alívio da dor é uma das conseqüências mais temidas e um problema clínico grave, que exige tanto dos oncologistas, como da equipe de saúde conhecimento adequado, a fim de promover o manejo efetivo da dor (VALEBERG, RUSTEON, BJORDAL, 2008). O controle da dor consiste na verdade em um direito de todo paciente oncológico (AHMEDZAI, 1997), para o qual deve ser esclarecido sobre sua doença e o tratamento a ser utilizado (TORRENT *et al.*, 2007).

Historicamente, o controle da dor é uma questão de baixa prioridade no cuidado ao paciente: uma pesquisa realizada com 897 médicos (oncologistas, cirurgiões, radioterapeutas e hematologistas) da *Eastern Couperative Oncologic Group* quanto à avaliação do controle da dor na prática clínica, demonstrou que 51% consideravam bom ou muito bom; 86% acreditavam que seus pacientes com dor intensa encontravam-se em subtratamento; 31% aguardavam aproximadamente seis meses para iniciarem analgesia máxima. Dentre as principais razões relatadas para o controle algico inadequado estavam: 1. Avaliação inadequada da dor; 2. Relutância do paciente em relatar a dor; 3. Relutância do paciente em utilizar opióide; 4. Relutância do médico em prescrever opióides (VON ROENN *et al.*, 1993); 5. Restrições legais para a utilização de analgésicos opióides; 6. Conceitos médicos sobre uso de opióides, quanto à promoção de abuso e dependência psicológica; 7. Baixo financiamento em pesquisa e limitações da equipe de saúde e 8. Ausência de políticas sobre alívio da dor oncológica e cuidados paliativos (WHO, 1996).

Na década de 60, Cicely Saunders introduziu o conceito de dor total, que foi sedimentado na década de 80, cujo manejo não incluía somente a utilização de opióides, mas

o entendimento bem estabelecido dos problemas sociais, emocionais e espirituais que envolviam a pessoa com câncer (CLARCK, 2000).

Deandrea e colaboradores demonstraram que o manejo inadequado da dor pode estar relacionado a fatores como a área geográfica, ao menor poder econômico de alguns países e ao tratamento não específico do câncer. Estes dados são importantes para a elaboração de políticas públicas de saúde que minimizem a alta prevalência de dor (2008).

Apesar da própria terapia oncológica contribuir para o efetivo controle do alívio da dor, a obtenção da qualidade de vida, é por vezes exequível, somente em paciente com câncer em estágio avançado que são submetidos a um tratamento mais agressivo para o controle dos sintomas (ZECH *et al.*, 1995).

Dentre as diferentes alternativas que objetivam o manejo da dor pós-operatória, estão:

1. Uso de analgésicos sistêmicos;
2. Terapia farmacológica com a utilização de anestésicos locais e opióides por vias intratecal e epidural;
3. Manejo anestésico regional através do bloqueio do nervo intercostal e uso de catéteres e utilização de catéteres interpleurais e
4. Tratamentos adjuvantes, como aplicação de calor (PEETERS-ASDOURIAN & GUPTA, 1999).

Em 1986, a Organização Mundial de Saúde propôs uma metodologia gradual para o tratamento da dor chamada Escada Analgésica da Dor que propõe a administração do fármaco certo, na dose e tempo certos (WHO, 2011b). Esta abordagem abrange três estágios: passo 1: utilização de analgésicos não-opioides, passo 2: utilização de analgésicos opióides fracos, passo 3: uso de analgésicos opióides fortes (Figura 5). A utilização sistemática e consistente de fármacos adjuvantes combinados aos analgésicos é uma pré-condição para a obtenção de bons resultados e para o sucesso do tratamento (ZECH *et al.*, 1995).

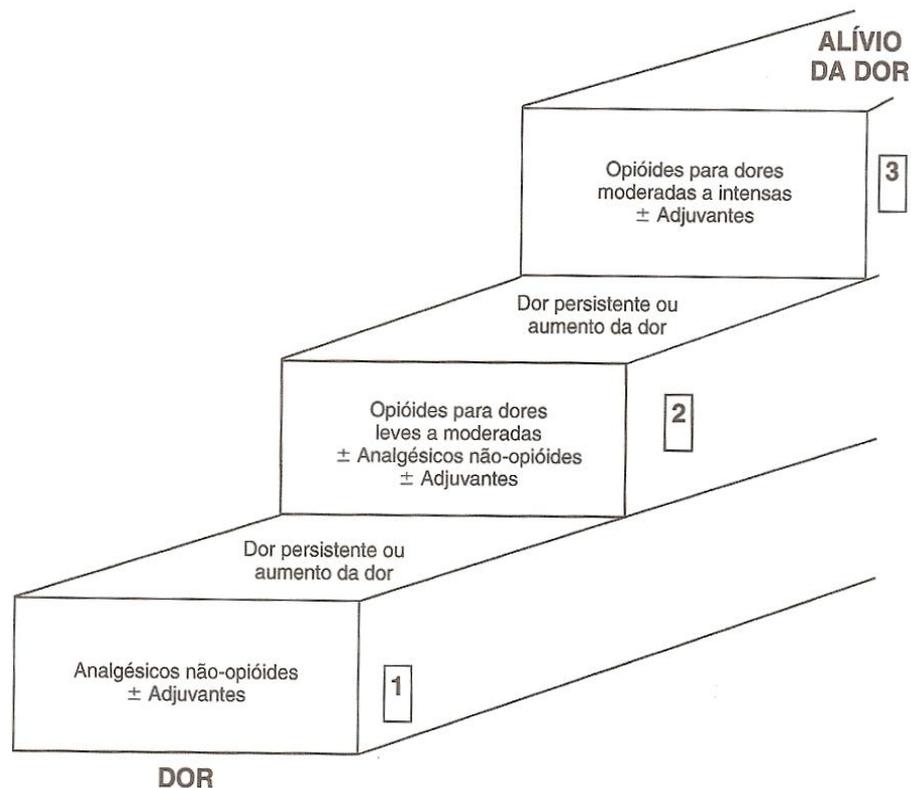


Figura 5. Escada analgésica da dor proposta pela Organização Mundial de Saúde (FERREIRA, CALMO, HIDALGO, 2006)

Fonte: Farmacologia Clínica. Fundamentos da Terapêutica Racional. Editora Guanabara Koogan

1.4 A ANALGESIA EPIDURAL

O cuidado pós-operatório de pacientes submetidos à toracotomia é realizado em unidade de tratamento intensivo, com promoção de ventilação eletiva se necessário. Após o término da cirurgia, a tubulação endotraqueal é retirada e o paciente é estimulado a respirar. O manejo da dor pós-operatória é um ponto crítico para sua recuperação. A analgesia intravenosa controlada, a anestesia paravertebral ou epidural torácica são procedimentos padrão para melhora da capacidade respiratória, associados à fisioterapia peitoral repetida, com diminuição de complicações pós-operatórias por retenção de secreções, infecção e atelectasia (HUNT & TREASURE, 2009).

A nociceção intra-operatória é um estímulo nocivo enfrentado no período perioperatório que sensibiliza o sistema nervoso central, com exacerbação da dor aguda em crônica. O aspecto multimodal desta ação considera diversas etapas em que é necessário o conhecimento dos múltiplos mecanismos farmacologicamente distintos para a modulação desta mensagem. A minimização de efeitos adversos importantes, em particular, a depressão

respiratória pode ser obtida a partir do controle da dor. Os aspectos do manejo analgésico objetivam intervenções analgésicas específicas pelo cirurgião e anesthesiologista, além dos aspectos cirúrgicos, que podem também impactar a duração e a intensidade da dor experimentada pelo paciente (GOTTSCHALK *et al.*, 2006).

A analgesia peridural consiste na administração de um anestésico local no espaço extradural (epidural ou peridural), que é delimitado posteriormente pelo ligamento flavo, lateralmente pelo periósteo e anteriormente pela dura-máter. Pode ser realizada nas regiões cervical, torácica, lombar e sacral.

O espaço epidural é constituído por artérias, vasos linfáticos, e uma rede de veias que intermedeiam tecidos conjuntivo e adiposo (Figura 6). Como não há fluido no espaço epidural, anesthesiologistas podem utilizar este espaço como compartimento para a administração de soluções analgésicas que modulem a percepção e a transmissão da dor (CHRISTO & MASLOOMDOOST, 2008b).

Atualmente são utilizados catéteres que podem ser introduzidos no espaço epidural para a promoção de infusão contínua ou em *bolus*, com bloqueio das raízes nervosas espinhais (CATTERALL & MACKIE, 2006; CHRISTO & MASLOOMDOOST, 2008b). Sob condições assépticas, os catéteres são inseridos, conectados a filtros e a uma bolsa de solução analgésica que promove a analgesia por infusão epidural (CHRISTO & MASLOOMDOOST, 2008b).

O controle da dor pós-operatória deve ter início no período pós-operatório, com o objetivo de melhorar o estado psicológico do paciente frente ao estado álgico (PEETERS-ASDOURIAN & GUPTA, 1999). Seu manejo na fase aguda fornece melhor prognóstico quanto ao desenvolvimento da dor crônica, com preservação da função pulmonar (SABANATHAN, 1995).

Os fármacos mais frequentemente utilizados na analgesia epidural torácica (AET) são morfina, hidromorfona, fentanila (FENT), bupivacaína, ropivacaína (ROP) e clonidina (CLO) (VISSERS *et al.*, 2011). Podem ser também utilizadas associações para alívio significativo da dor, como sufentanila, ROP, CLO e S(+) cetamina. É necessária, no entanto, a avaliação dos efeitos causados pela associação de diferentes fármacos em diferentes concentrações (GOTTSCHALK *et al.*, 2008).

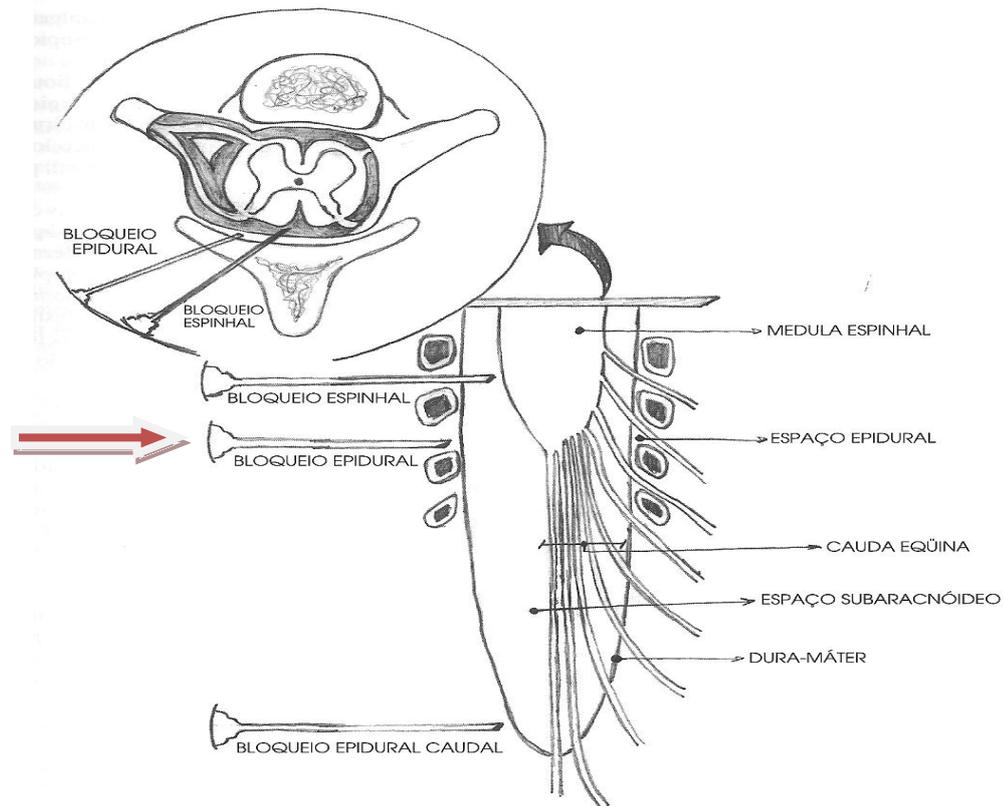


Figura 6. Esquema representativo dos locais de administração dos analgésicos locais - bloqueio epidural em detalhe (FERREIRA, 2006, adaptado)

Fonte: Farmacologia Clínica. Fundamentos da Terapêutica Racional. Guanabara Koogan

A clínica da dor do Instituto Nacional de Câncer realiza o tratamento e diagnóstico de pacientes cirúrgicos e clínicos com dor crônica ou aguda, durante os períodos pré, intra e pós-operatório. Para estes, são utilizadas técnicas e equipamentos para analgesia contínua pela via epidural e/ou intravenosa (BRASIL, 2010b). Para a promoção da analgesia epidural contínua em pacientes toracotomizados é administrada uma solução de cloridrato de clonidina (CLO HCl), cloridrato de ropivacaína (ROP HCl) e citrato de fentanila (FENT CIT) nas respectivas concentrações de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1000 ou 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em bolsa de solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% em sistema fechado de 250 mL. Os controles de qualidade físico-químicos e microbiológicos justificam-se pelo tempo de infusão prolongado, pelo grande volume de solução, pelo local de administração e por não existirem dados na literatura da estabilidade física e da compatibilidade química dos três fármacos em solução fisiológica de NaCl a 0,9%.

1.5 FÁRMACOS UTILIZADOS NA ANALGESIA PERIDURAL

1.5.1 Cloridrato de clonidina

A CLO é um derivado imidazólico (Figura 7) solúvel em lipídios, com completa absorção após administração oral, com pico de concentração plasmática atingido após 60-90 minutos. A meia-vida de eliminação, após a administração de CLO 150 µg/mL, é de 30 minutos; 20% do fármaco encontra-se ligado a proteínas plasmáticas e seu volume de distribuição é 1,7-2,5 l.kg⁻¹. O fármaco é excretado não modificado pelos rins e menos de 50% é metabolizado pelo fígado em metabólitos inativos, enquanto 20% são excretados nas fezes (KHAN, FERGUSON, JONES, 1999).

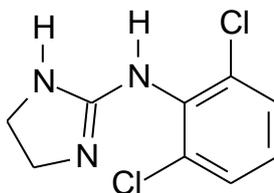


Figura 7. Fórmula estrutural da CLO
Fonte: Elaboração própria

A solução injetável de CLO apresenta-se como uma solução incolor. Os excipientes utilizados na ampola são NaCl e água para injetáveis (CLONIDIN[®], 2008). O aspecto da solução é límpido.

A CLO (N(2,6-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-amina), na forma cloridrato apresenta-se como cristais, de peso molecular 266,56 e ponto de fusão 305 °C. O sal é solúvel em etanol absoluto, levemente solúvel em clorofórmio e praticamente insolúvel em éter (THE MERCK INDEX, 2001).

Utilizada no tratamento da hipertensão, a CLO merece destaque em outras indicações clínicas, devido a seu efeito sedativo. Em anestesiologia, destaca-se na cirurgia cardíaca, na pré-anestesia, na cirurgia oftalmológica, na anestesia regional e na analgesia pós-operatória (SIMONETTI, VALINETTI & FERREIRA, 1997).

Os principais efeitos farmacológicos da CLO são provenientes da sua ação sobre receptores α_2 pós-sinápticos do músculo liso vascular (KAMIBAYASHI & MAZE, 2000; CATTERALL, 2005). Apesar de ser um agonista parcial, este fármaco possui alta afinidade pelo receptor - seletividade α_2/α_1 200:1 (SIMONETTI, VALINETTI & FERREIRA, 1997).

Tal afinidade promove efeito sinérgico com os analgésicos opióides, com aumento da duração da ação dos anestésicos locais (CATTERALL, 2005).

Os efeitos clínicos dos agonistas adrenérgicos são provenientes da ligação aos três subtipos de receptores α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}). Todos os subtipos produzem uma ação celular sinalizada por proteína G, que está relacionada a mecanismos efetores, que diferem dependendo do subtipo de receptor (KAMIBAYASHI & MAZE, 2000).

A atividade analgésica dos agonistas α_2 está relacionada à ação em receptores do subtipo α_{2A} AR. A identificação destes alvos específicos para esta classe terapêutica contribui para melhora na atividade analgésica isoladamente ou quando associados à opióides (FAIRBANKS *et al.*, 2001).

A hipotensão e a sedação observadas na ação de agonistas α_2 são evitadas pelo uso de fármacos mais seletivos aos subtipos de receptores α_2 (DICKENSON, 1995), com promoção de ganho clínico na atividade nociceptiva.

O mecanismo molecular para o efeito da CLO está proposto na figura 8, que consiste em uma representação esquemática da ação de agonistas α_2 via proteína G em seu estado inativo. Neste, o sítio de ligação do receptor adrenérgico α_2 encontra-se desocupado (A). A ligação de um agonista ao receptor promove uma mudança conformacional na estrutura do receptor que entrará em contato com a proteína G (B). Neste estado, a afinidade de guanosina difosfato (GDP) pela proteína G encontra-se diminuída, por isso na presença de íons magnésio (Mg^{++}), a GDP é substituída pela guanosina trifosfato (GTP) (C). Posteriormente, a ligação GTP/receptor α_2 é dissociada, e a GTP liga-se à unidade efetora, com diminuição da afinidade do receptor pelo agonista, que deixa o sítio de ligação (D). A enzima GTPase da subunidade α é ativada e promove a hidrólise de GTP em GDP, com liberação de fosfato inorgânico (Pi). A enzima GTPase altera a velocidade de formação AMP (adenosina monofosfato) cíclico e a modulação do canal iônico (MAZE & TRANQUILLI, 1991).

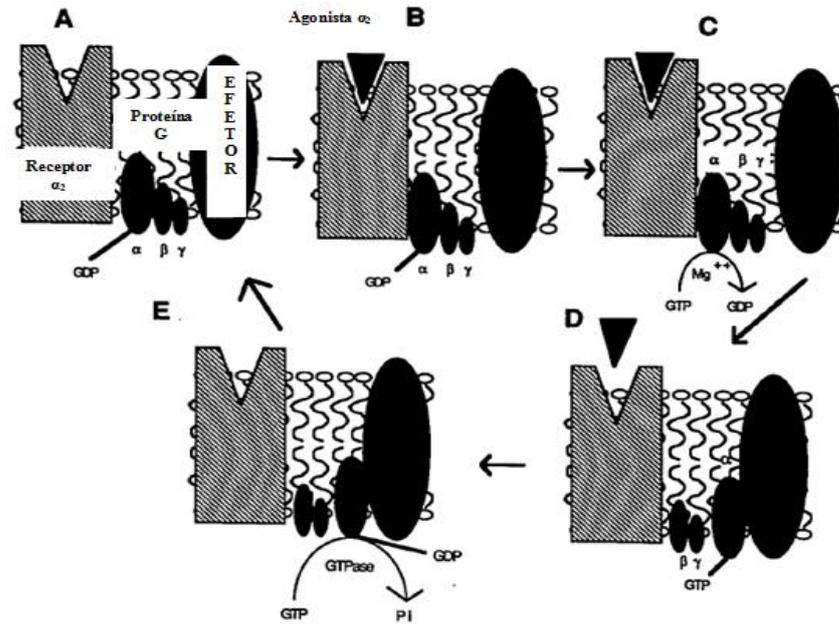


Figura 8. Representação esquemática do mecanismo molecular da ação de agonistas α_2 ligados à proteína G (MAZE & TRANQUILLI, 1991, adaptado)

Fonte: Anesthesiology

Os mecanismos efetores parecem diferir de acordo com o subtipo de receptor. A ação sedativa ocorre no *locus ceruleus* no cérebro e a ação analgésica ocorre na medula espinhal. No coração ocorre a diminuição da taquicardia, por bloqueio nervoso ou bradicardia, por ação vagomimética. Nos vasos sanguíneos periféricos, os agonistas atuam tanto na vasodilatação, pela via simpática, quanto na vasoconstrição mediada por receptores musculares. Os mecanismos que promovem diurese e diminuição de tremores ainda não estão elucidados (Figura 9) (KAMIBAYASHI & MAZE, 2000).

A analgesia promovida pela CLO é iniciada nas vias descendentes noradrenérgicas que se originam nas regiões mais superiores do sistema nervoso central e continuam pela região do bulbo espinhal para o corno dorsal da medula espinhal, com projeção para as lâminas I, III e V, onde se encontram os terminais noradrenérgicos. A ativação pela norepinefrina dos receptores das vias descendentes promove analgesia. A CLO age mimetizando a ação da norepinefrina (SIMONETTI, VALINETTI, FERREIRA, 1997).

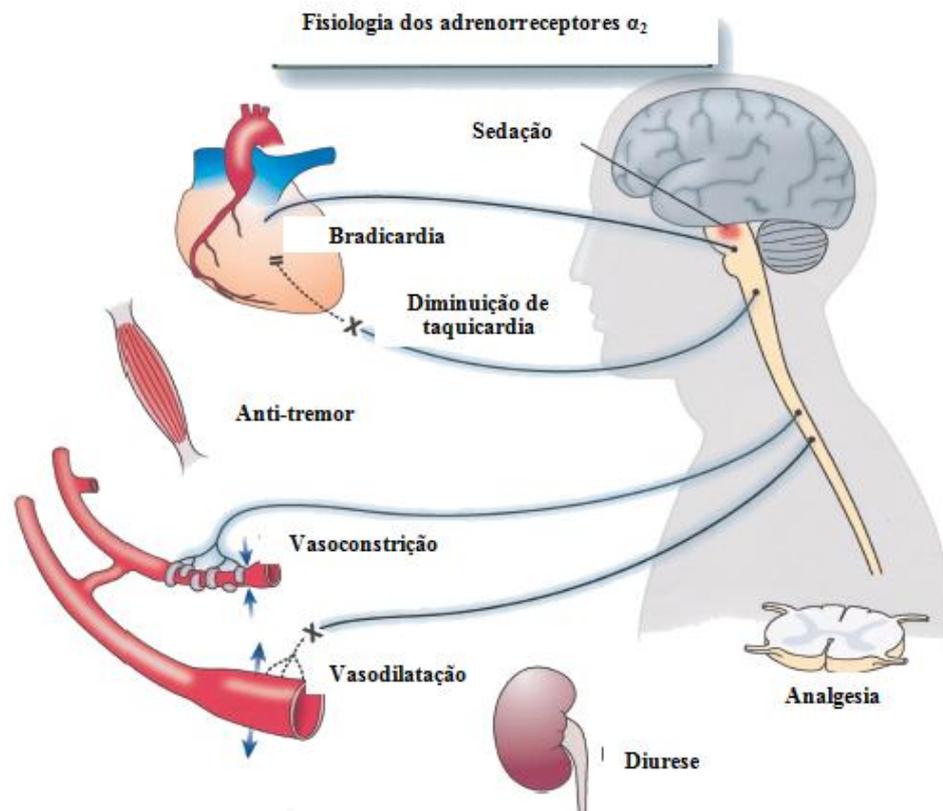


Figura 9. Representação das respostas que podem ser mediadas por receptores α_2 adrenérgicos (KAMIBAYASHI & MAZE, 2000, adaptado)
Fonte: Anesthesiology

A CLO produz a potencialização do efeito anestésico local, com promoção de sedação e redução dos níveis plasmáticos de epinefrina e norepinefrina, além da redução da resposta adrenérgica ao estresse anestésico-cirúrgico (SIMONETTI, VALINETTI, FERREIRA, 1997). Forster e Rosemberg demonstraram que a CLO na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ aumenta a analgesia quando adicionada à ROP e ao FENT nas concentrações de 2 mg/mL e 5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, na infusão epidural lombar contínua, cujo aumento de dose promove a melhora na qualidade do manejo da dor, mas com maior risco de hipotensão (2004). Bhatnagar e colaboradores observaram que a associação CLO/bupivacaína para bloqueio intercostal contínuo por cateter paravertebral, melhorava a analgesia pós-toracotomia, com a sedação como maior efeito adverso (2006). Foi demonstrado que a CLO 50 $\mu\text{g/mL}$ prolonga a analgesia promovida pela associação de sufentanila 7,5 $\mu\text{g/mL}$ e bupivacaína 2,5 mg/mL pela via espinhal (D'ANGELO *et al.*, 1999). A administração pelas vias espinhal e epidural de 150 μg de CLO prolonga em mais de 2% o estado anestésico (KLIMSCHA *et al.*, 1995). Sua ação adjuvante promove a redução da concentração mínima de anestésico local via epidural no primeiro estágio do trabalho de parto (DEWANDRE *et al.*, 2009). A qualidade da analgesia

está relacionada ao aumento da dose de CLO (FANZCA *et al.*, 1997), o que pode aumentar o risco de hipotensão (FORSTER & ROSENBERG, 2004), diminuição significativa do desempenho psicomotor e comprometimento de memória, além de efeitos sobre a função respiratória (HALL, UHRICH, EBERT, 2001). A administração com ROP no espaço peridural promove aumento da duração dos bloqueios analgésicos e motor e prolonga a duração da analgesia pós-operatória. Além, do evidente sinergismo com o anestésico local, a CLO reduz a incidência de tremores per e pós-operatórios e aumenta a sedação. Possui, no entanto, a desvantagem de elevar a incidência de bradicardia nos períodos supracitados (ALVES & BRAZ, 2002). A sedação promovida pela absorção sistêmica é uma propriedade desejável da CLO, observada desde a sua utilização como fármaco pré-anestésico, além da ação anestésica local intrínseca em fibras C e A, com intensificação e prolongamento do efeito bloqueador sensitivo (SIMONETTI, VALINETTI, FERREIRA, 1997).

A administração concomitante com opióides, no período pós-operatório, para uso epidural, possui também a vantagem de reduzir a dose destes, com promoção de menos efeitos adversos. A ação da CLO está relacionada com a potencialização da analgesia através da sua ação vasoconstritora e da sua propriedade anestésica local fraca. (EISENACHE, DE KOCK, KLIMSCHA, 1996; D'ANGELO *et al.*, 1999).

As doses mínimas de CLO que prolongam significativamente a duração da anestesia e da analgesia são 0,5 e 0,1 µg/kg após o bloqueio do plexo braquial com mepivacaína e epinefrina a 1% (SINGELYN, GOUVERNEUR, ROBERT, 1996).

A CLO é amplamente utilizada como adjuvante em anestesia, devido aos efeitos desejados promovidos pelo fármaco, como ansiolítico, analgésico, sedação anestesia leve e estabilização de efeitos hemodinâmicos no período peri-operatório (KHAN, FERGUSON, JONES, 1999), além de prolongar e melhorar a analgesia através da sua interação com numerosos agentes, seja pela via periférica, sistêmica ou espinhal (TRYBA & GEHLING, 2002) e melhorar a eficácia e durabilidade no manejo da dor (HILDEBRAND, ELSBERRY, HASSENBUSCH, 2003).

1.5.2 Cloridrato de ropivacaína

A cocaína, isolada em 1860, foi o primeiro anestésico local (AL) utilizado para procedimentos cirúrgicos. Esta foi substituída pela procaína, o primeiro derivado sintético, o que permitiu o desenvolvimento de outros fármacos até os dias atuais (RANG *et al.*, 2007a).

Os AL são moléculas formadas por cadeias aromáticas unidas por uma ligação amida ou éster a uma cadeia básica lateral. Esses fármacos são, portanto, bases fracas e possuem valores de pKa entre 8 e 9. Esta característica físico-química permite que penetrem com facilidade na membrana axonal e na bainha nervosa, uma vez que não se encontram ionizados em pH fisiológico. Assim sua atividade é fortemente influenciada pelo aumento do pH, devido à diminuição da proporção de moléculas ionizadas (RANG *et al.*, 2007a).

Os AL como ROP, bupivacaína, prilocaína, lidocaína e cinchocaína por possuírem ligação amida, não são facilmente hidrolisados, como a procaína, cocaína e tetracaína, que possuem ligação éster (RANG *et al.*, 2007a). Esta característica confere a utilização daqueles na prática clínica em cirurgias de longa duração e grande porte, associados a adjuvantes farmacológicos.

A associação com opióides promove a diminuição da concentração destes, com diminuição da incidência de depressão respiratória sem comprometer o efeito analgésico (MAHON *et al.*, 1999).

A solução de FENT 0, 2, ou 4 µg/mL com bupivacaína 0,1% é usada para infusão pós-operatória desde 1996. A ROP (Figura 10) 0,2% com FENT nas concentrações acima descritas, é a mistura mais utilizada desde 1996 (CAMERON *et al.*, 2007).

A ROP é um anestésico local usado freqüentemente em analgesia pós-operatória com duração de ação de aproximadamente 24 horas. Possui menor efeito cardiotoxíco comparável ao seu enantiômero R, a bupivacaína.

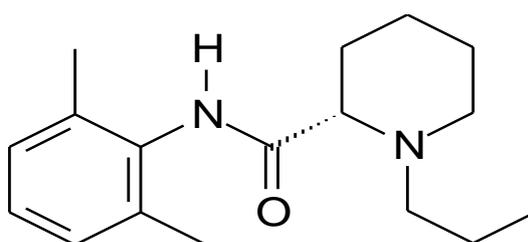


Figura 10. Fórmula estrutural da ROP

Fonte: Elaboração própria

Seu mecanismo de ação consiste na inibição do influxo dos íons sódio, o que promove o aumento do limiar de excitação elétrica da membrana, a redução do potencial de ação, com redução da propagação como anestésico local de longa duração; atua também na membrana celular, impedindo tanto a geração quanto a condução do impulso nervoso. (CATTERALL, 2005). Esses canais (Figura 11) existem em três estados fundamentais: 1. Inativado (quando encontram-se bloqueados por um apêndice móvel da porção intracelular da proteína do canal

de sódio); 2. Ativado (aberto, devido à breve despolarização da membrana) e 3. Em repouso (fechado, durante o potencial de repouso). O processo de despolarização da membrana é capaz de promover uma rápida mudança do estado de repouso para o ativado, que permite a entrada de sódio na célula, com aumento rápido e transitório da sua permeabilidade, com promoção da propagação do impulso nervoso. Os canais são posteriormente inativados e a membrana retorna ao seu estado de repouso. Os AL normalmente possuem afinidade por um dos três estados do canal, o que afeta seu comportamento cinético, com consequências na prática clínica. Normalmente apresentam mais afinidade pelo estado inativado do canal, o que contribui para o efeito global do bloqueio (RANG *et al.*, 2007b).

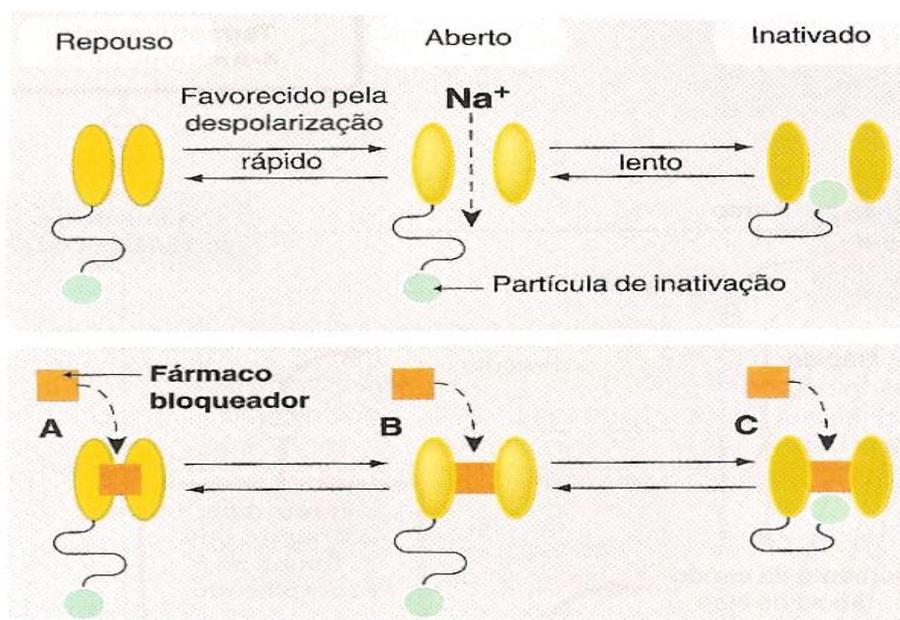


Figura 11. Representação esquemática dos estados de repouso, ativado e inativado dos canais de sódio controlados por voltagem (RANG *et al.*, 2007b)

Fonte: Farmacologia. Elsevier.

Os cristais de ROP ((2S)-N-N(2,6-dimetilfenil)-1-propil-2-piperidinacarboxamida) possuem ponto de fusão de 144-146°C e $\text{pK}_a=8,16$ (THE MERCK INDEX, 2001).

A solução injetável de ROP HCl é uma solução estéril de ROP HCl em água para injetáveis, com não menos que 90% e não mais que 110% da concentração do fármaco rotulado. A solução também contém NaCl, ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio e água para injetáveis (ROPI[®], 2008).

O fármaco é extensamente metabolizado, com somente $1 \pm 0,6\%$ da dose excretada de forma inalterada na urina. O fármaco e seus metabólitos 3-OH-2', 6'-pípecoloxilidida (3-OH-PPX), 4-OH-ROP, 3-OH-ROP, PPX dealquilado são principalmente excretados pela urina,

com uma recuperação total de $86 \pm 3\%$ na urina e $9 \pm 1\%$ nas fezes, após 96 horas de administração intravenosa (ODA *et al.*, 1995; HALLDIN *et al.*, 1996).

Estes fármacos são injetados no espaço epidural, com promoção do bloqueio das raízes espinhais e supressão da descarga espontânea que acontece em neurônios sensitivos, responsáveis pela dor neuropática. Os principais efeitos adversos relacionados aos AL na AET são aqueles relacionados ao bloqueio simpático, como hipotensão e bradicardia, a depressão respiratória, ocasionada pela ação sobre o centro respiratório e sobre o nervo frênico e a retenção urinária pós-operatória, devido ao bloqueio da atividade autônoma da pélvis (RANG *et al.*, 2007b).

1.5.3 Citrato de fentanila

O FENT interage primariamente com os receptores μ distribuídos na medula espinhal, cérebro e outros tecidos. Possui ações sedativa e analgésica, com promoção de aumento de tolerância a dor (DRUGBANK, 2010). Seu vasto uso na prática anestésica é devido à rápida obtenção do pico analgésico, com atividade farmacológica curta depois da administração de pequenas doses em bolos, com relativa estabilidade cardiovascular. É o fármaco de escolha para anestesia em cirurgias cardiovasculares ou para pacientes com a função cardíaca comprometida, devido à sua mínima ação depressiva sobre o músculo cardíaco (GUSTEIN & AKIL, 2006).

É normalmente administrado por via intravenosa para promoção de analgesia. O pico analgésico é obtido após cinco minutos de administração intravenosa. Para o tratamento da dor aguda ou crônica pós-operatória, é administrado pela via epidural ou intratecal. Devido à alta lipossolubilidade, a administração de FENT pela via espinhal possui menor risco de depressão respiratória, comum aos opióides. No entanto, outros efeitos adversos são mais comumente observados durante o uso de FENT, como náuseas, vômitos, prurido e rigidez muscular, esta pode ser evitada através da administração lenta de FENT e com o pré-tratamento com um anestésico não- opióide (GUTSTEIN & AKIL, 2006).

O FENT é um opióide, pertencente ao grupo das fenilpiperidinas (Figura 12), lipofílico, com início de ação rápido e 75 a 100 vezes mais potente que a morfina. É rapidamente distribuído, principalmente aos tecidos muscular e adiposo. Seus metabólitos, norfentanila e despropionionorfentanila, são inativos e não apresentam efeito farmacológico (SAKATA & ISSY, 2008). O FENT atravessa rapidamente a barreira hemato-encefálica, com meia-vida de aproximadamente cinco minutos para a obtenção do equilíbrio plasma/fluido

cérebro-espinhal. Sua redistribuição é rápida, principalmente para os músculos e gordura. É metabolizado pelo fígado e eliminado pelos rins. Sua meia-vida de eliminação varia entre três e quatro horas (GUTSTEIN & AKIL, 2006).

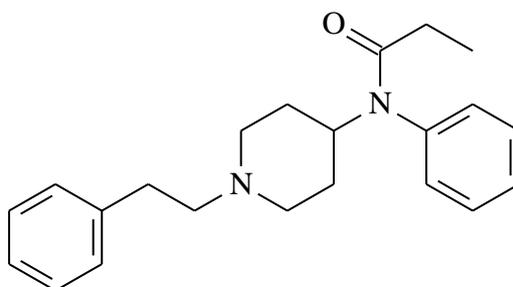


Figura 12. Fórmula estrutural do FENT
Fonte: Elaboração própria

O FENT (N-fenil-N-[1-(2-feniletil)-4-piperidín]propanamida) como sal citrato ($C_{22}H_{28}N_2O \cdot C_6H_8O_7$) de peso molecular 528,59 apresenta-se como sal cristalino, com ponto de fusão 149-151°C. A massa de 1g solubiliza-se em 40 mL de água. O sal é solúvel em metanol e levemente solúvel em clorofórmio (THE MERCK INDEX, 2001).

A utilização isolada de opióides está relacionada a efeitos adversos como espasmos biliares, depressão respiratória, vômitos e náuseas. Fármacos como anestésicos locais, agonistas opióides dos receptores μ , inibidores da enzima óxido nítrico sintetase, agonistas α_2 e bloqueadores dos receptores de N-metil-D-aspartato promovem efeito sinérgico com os opióides, com o aumento da analgesia e diminuição da ocorrência destes efeitos (PEETERS-ASDOURIAN & GUPTA, 1999).

O FENT é amplamente utilizado como adjuvante em anestesia, pelas vias intratecal, intravenosa e epidural. A administração combinada de opióides com anestésicos locais pela via epidural permite a minimização de efeitos adversos, devido ao aumento de analgesia, com diminuição das doses de ambos os fármacos. As infusões intratecal e epidural são utilizadas na prática clínica para o manejo da dor crônica em pacientes com câncer e em casos restritos de dor não oncológica (GUTSTEIN & AKIL, 2006). O mecanismo de ação ocorre através da ativação do receptor opióide μ , com o aumento de efluxo pós-sináptico de íons potássio (K^+), com promoção de hiperpolarização da membrana. Os receptores opióides são receptores associados à proteína G e promovem a inibição da enzima adenilil-ciclase. Ocorre também redução do influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) e consequente diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato (HOWLAND & MYCEK, 2007;

GUTSTEIN & AKIL, 2006) (Figura 13). No entanto, estes mecanismos parecem não estar relacionados à transmissão da dor em vários mecanismos neuronais. A ativação de quinases e fosfolipase C é responsável por mediar a cascata para a formação de diacilglicerol e inositol trifosfato (GUTSTEIN & AKIL, 2006).

A solução injetável de FENT CIT possui as apresentações ampola e frasco-ampola na concentração de 0,0785 mg, equivalente a 0,05 mg de FENT base. Os veículos da forma farmacêutica ampola são ácido cítrico, citrato de sódio e água para injetáveis, enquanto os presentes em frasco-ampola são ácido cítrico, metilparabeno, propilparabeno, citrato de sódio e água para injetáveis (FENTANEST[®], 2008). Na solução, o FENT CIT contém não menos que 98% e não mais que 102% de C₂₂H₂₈N₂O, presente como citrato.

A utilização de opióides para administração espinhal é normalmente combinada a anestésicos locais e menos comumente à CLO (ZECH *et al.*, 1995).

1.6 ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Todos os componentes de uma formulação farmacêutica possuem características que podem propiciar reações químicas que levam a perda de princípios ativos. Reações de hidrólise, oxidação, epimerização, descarboxilação, desidratação e decomposição fotoquímica podem gerar produtos de degradação que não geram evidências olfativas e/ou visuais. A instabilidade físico-química de fármacos injetáveis é especialmente perigosa na prática clínica (NEWTON, 2009). Cada componente da formulação pode afetar a estabilidade de um produto farmacêutico, como 1. pH; 2. Solvente; 3. Excipientes; 4. Difusibilidade de fármacos; 4. Composição da formulação; 5. Compatibilidade iônica; 6. Ligações químicas moleculares; 7. Força iônica da solução; 8. Tamanho de partículas (principalmente em suspensões e emulsões); 9. Presença de aditivos químicos específicos e 10. Embalagem primária. Estes podem promover perda de princípio ativo através de reações químicas que não geram mudanças olfativas ou visuais (USP, 2008). Ademais, dados de estabilidade de fármacos dentro das condições de trabalhos fornecem maior segurança quanto à iminência de degradação (GILL *et al.*, 2004).

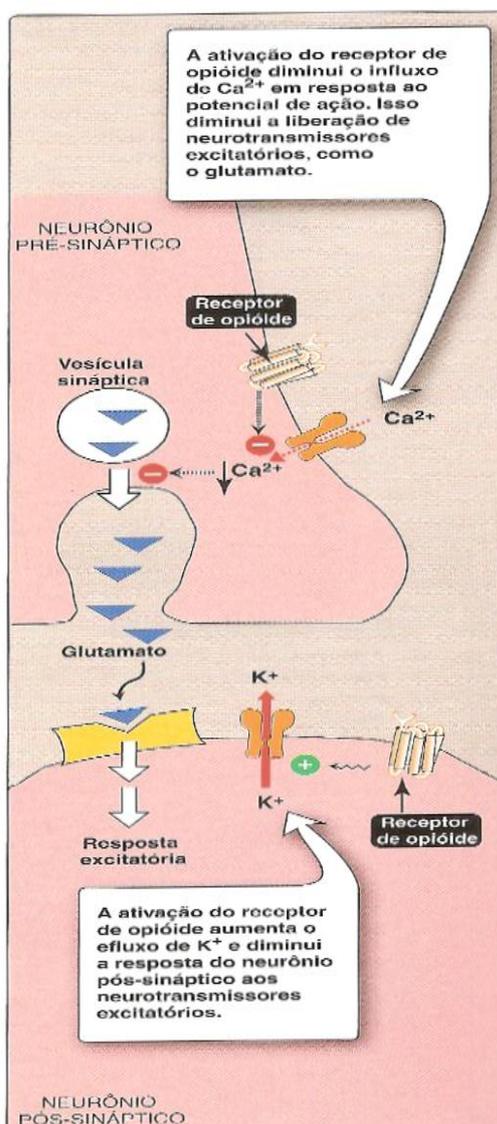


Figura 13. Representação esquemática do mecanismo de ação do agonista opióide no receptor μ na medula espinhal (HOWLAND & MYCEK, 2007)

Fonte: Farmacologia Ilustrada. Artmed

A estabilidade de um medicamento está relacionada ao período no qual ele se mantém estável. Caracteriza-se um produto farmacêutico como estável quando o teor do seu princípio ativo não decaiu mais do que 10% (EV, 2003). De acordo com a Resolução RE n^o 1, de 29 de julho de 2005:

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo

de fabricação, tipo e propriedades do material de embalagem (BRASIL, 2005).

A fim de assegurar a qualidade de um medicamento, é necessário estabelecer por quanto tempo as características do produto podem ser mantidas e quais fatores extrínsecos e intrínsecos podem contribuir para a alteração de suas especificações, uma vez que os laboratórios fabricantes responsabilizam-se somente pela qualidade e efeitos dos medicamentos armazenados e conservados estritamente dentro das condições estabelecidas no processo de fabricação (VENDRELL *et al.*, 2004).

A estabilidade pode ser classificada em:

a) QUÍMICA: está relacionada à manutenção do teor e da integridade dos limites especificados, por um determinado período de tempo;

b) FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICAS: relacionada às propriedades físicas originais da forma farmacêutica mantida dentro das especificações, por um período de tempo determinado;

c) MICROBIOLÓGICA: é entendida como a manutenção da esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano, de acordo com as especificações;

d) TOXICOLÓGICA: determina que não deverá ocorrer aumento significativo da toxicidade no período estabelecido;

e) TERAPÊUTICA: está relacionada à manutenção da eficácia terapêutica, dentro do tempo estabelecido como o período de vida útil do medicamento (EV, 2003).

1.6.1 Estudo de estabilidade estendida

Os ensaios necessários para assegurar a extensão do prazo de validade de um medicamento dependem da forma farmacêutica. Para soluções injetáveis, é necessária a determinação de pH, presença de material particulado, turvação, mudança de cor, potência e presença de conservantes. Para sólidos orais, presença de conservantes, aparência, umidade, dissolução e potência; e para pós para reconstituição, aparência, umidade, pH e potência (LYON *et al.*, 2006).

A extensão da validade depende do conhecimento de dados reais de estabilidade de um produto farmacêutico, considerando-se as diferenças lote a lote; assegurada através da avaliação sistemática e ensaios periódicos de cada lote (LYON *et al.*, 2006).

O estudo de degradação forçada avalia os efeitos causados por condições típicas de degradação de fármacos como: oxidação, umidade, hidrólise, susceptibilidade à hidrólise, extensa variação dos valores de pH, variação de temperatura e fotólise. No entanto, não existe um padrão para a realização destes estudos, o que gera dificuldades quanto à decisão sobre as condições a serem utilizadas sobre os fármacos (SILVA *et al.*, 2009). A determinação destas condições ideais para elucidação da formação de todos os produtos de degradação de um determinado fármaco pode tornar-se uma tarefa árdua no que diz respeito: 1. A escolha dos reagentes necessários para uma condição de estresse particular; 2. A escolha do melhor agente oxidante; 3. A determinação das condições extremas de degradação a fim de se obter produtos em quantidade suficiente para caracterização e elucidação de sua estrutura e 4. A grande diferença de estabilidade inerente de cada fármaco (SINGH & BAKSHI, 2000).

Baseados na estabilidade do fármaco, Singh e Bakshi propuseram uma classificação dos fármacos em seis categorias: 1. Classe 1: extremamente Lábil; 2. Classe 2: muito Lábil; 3. Classe 3: lábil; 4. Classe 4: estável; 5. Classe 5: muito estável e 6. Classe 6: praticamente estável. Em termos práticos, todo fármaco previamente classificado como lábil (classe 3) é submetido a condições de degradação, cuja classificação de sua estabilidade é obtida quando ocorre a “degradação suficiente” que corresponde a 80-100% de degradação se o objetivo é isolar o produto de degradação ou a 20-80% de degradação se o objetivo é conhecer a rota de degradação (2000).

Foi realizada a revisão da literatura sobre o tema, no Pubmed da National Library of Medicine, com a utilização das palavras-chave “fentanyl clonidine ropivacaine stability”, “fentanyl clonidine ropivacaine degradation”. Sem determinação de intervalo de tempo, obteve-se como resultado, um total de 5 trabalhos. Destes, nenhum estudo de estabilidade ou de degradação com os três fármacos no mesmo recipiente. As misturas de ROP (cloridrato) 1-2 mg/mL com morfina (sulfato) 20-100 µg/mL, sufentanila 0,4-4 µg/mL, FENT 1-10 µg/mL ou CLO (cloridrato) 5-50 µg/mL são fisicamente e quimicamente compatíveis e estáveis por mais de 30 dias a 30°C estocadas em bolsa Mark II Polybag[®] (SVEDBERG, McKENZIE, LARRIVEE-ELKINS, 2002). Rudick e colaboradores demonstraram que a CLO é estável na mistura com hidromorfona por 35 dias em refis de bombas intratecal implantadas (2004). Preparações farmacêuticas de sulfato de morfina, cloridrato de hidromorfona e cloridrato de midazolam com ou sem bupivacaína, além da mistura FENT/bupivacaína apresentam-se estáveis para utilização parenteral (WOLF & POKLIS, 2005).

1.7 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS

1.7.1 A cromatografia líquida de alta eficiência

Para a execução do estudo de estabilidade estendida é necessária a escolha de um método que permita separar e quantificar cada componente da formulação em tempo exequível com a rotina - manipulação, estocagem e infusão das bolsas de solução analgésica - do Hospital de Câncer, sem prejuízo das estabilidades físico-química e microbiológica.

Descoberta no início do século 20 pelo botânico russo M. S. Tswet, a cromatografia é um método físico-químico utilizado na separação de misturas complexas (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

Na cromatografia líquida a separação baseia-se em um transporte forçado da fase móvel que carrega a amostra contendo os analitos de interesse através de fase estacionária, cujas interações irão promover diferentes tempos de migração para cada componente da amostra (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

A CLAE permite uma separação do analito de outros componentes de forma a obter com o auxílio de um detector uma quantificação acurada. Os fármacos que compõem a solução analgésica devem estar solubilizados na fase móvel, possuem diferentes tempos de migração na fase estacionária (USP, 2008) e a solução analgésica pode ser preparada na fase móvel. Essas características da amostra permitem a escolha da CLAE para separação desses fármacos (ORNAF & DONG, 2005).

As principais técnicas em CLAE são classificadas de acordo com as interações moleculares dominantes empregadas, dispersivas (fase reversa), iônicas (por exclusão iônica) ou polares (fase normal) (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

A CLAE em fase reversa, utilizada no presente estudo, é o método escolhido para a separação de compostos não-ionizados ou neutros que se solubilizam em misturas orgânicas e em água, que servem como fase móvel. Nesta, são utilizadas colunas classificadas como C18, C8, fenil e ciano. A CLAE por exclusão iônica é escolhida para misturas de íons orgânicos, proteína e ácidos nucleicos. É utilizado como fase móvel água e tampão para controle de pH. A CLAE em fase normal é uma boa escolha para amostras lipofílicas que não se solubilizam bem em água e misturas orgânicas e para misturas de isômeros. Outras técnicas, como a CLAE por exclusão de tamanho, por interação hidrofóbica e por par iônico também podem

ser utilizadas para compostos de alto peso molecular, proteínas e compostos iônicos, como ácidos e bases, respectivamente (SNYDER, GLAJCH, KIRKLAND, 1988).

Atualmente, o cromatógrafo pode ser ou não composto por módulos (Figura 14) que normalmente são representados por: 1. Reservatório de fase móvel, 2. Bomba de alta pressão, 3. Sistema de injeção, 4. Forno com termostato, 4. Detector e 5. Unidade de coleta de dados (MEYER, 2004a).

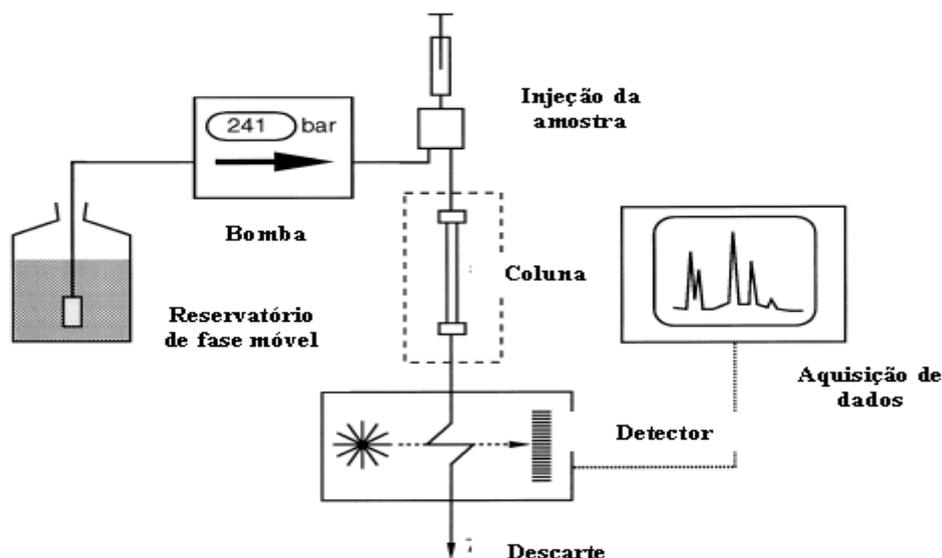


Figura 14. Representação esquemática dos módulos componentes do cromatógrafo (MEYER, 2004a, adaptado)

Fonte: Practical high-performance liquid chromatography. John Wiley & Sons, Ltd

1.7.2 Detector de ultravioleta/visível

A maioria dos fármacos possui estruturas químicas com absorção na região do visível (grupos carboxílicos, azo, nitro, carbonil e cetônicos, além dos compostos aromáticos) com elétrons em orbitais moleculares. A maior parte das bandas de absorção corresponde a transições eletrônicas em orbitais moleculares nestes grupos, o que torna a CLAE acoplada a detector de ultravioleta (UV) um dos mais utilizados para a identificação e quantificação de fármacos (DONG, 2005).

O seu funcionamento consiste em uma lâmpada de deutério e de um monocromador, que é uma grade móvel controlada por um motor escalonado de precisão que seleciona o comprimento de onda através da grade de saída, de onde será direcionada a luz para uma pequena célula de fluxo. Para medir a intensidade da luz, dois fotodiodos são utilizados (Figura 15). Devido à baixa energia da lâmpada de deutério a 400 nm, alguns detectores têm

uma segunda fonte de tungstênio o que eleva o alcance do detector de 190-700 nm para 190-1000 nm (DONG, 2005). A utilização destas lâmpada em um mesmo aparelho permite, na prática, a varredura de 200-400 nm (lâmpada de deutério) e de 400-800 nm (lâmpada de tungstênio).

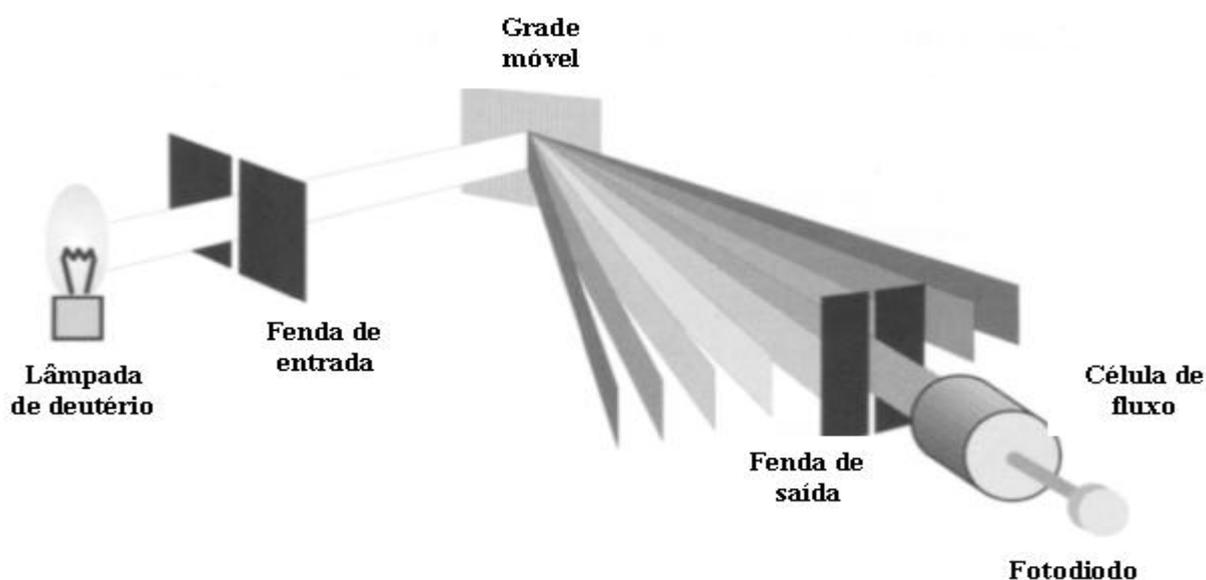


Figura 15. Figura esquemática de um detector UV/visível (DONG, 2005, adaptado)
 Fonte: Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Elsevier

A absorção de radiação ultravioleta resulta na excitação eletrônica, cuja energia de transição e o comprimento de onda absorvido são propriedades de um grupo de átomos, chamados cromóforos (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ, 2001).

A maioria dos hidrocarbonetos aromáticos e seus derivados possuem absorvidade molar (ϵ) de no mínimo 10^3 nos comprimentos de onda 190-330 nm. Para amostras com concentrações maiores que 10 ng/mL, este nível de sensibilidade é adequado. Para os compostos alifáticos saturados, com ϵ maior que 50, com grupos cromóforos com menor absorção (éter, nitro, amida, éster, cloro) (SNYDER, GLARJCH, KIRKLAND, 1988).

A amostra é constituída por três fármacos com insaturações que permitem a absorção no UV. A maioria dos hidrocarbonetos insaturados e seus derivados absorvem na faixa de comprimento de onda de 190-330 nm com uma absorvidade molar (ϵ) de 10^3 . (SNYDER, GLAJCH, KIRKLAND, 1988).

1.7.3 Detector de arranjo de diodos

Problemas analíticos surgem quando não estão disponíveis padrões de metabólitos e produtos de degradação. Neste caso, faz-se necessária a determinação da pureza do pico cromatográfico obtido, através de 1. Utilização de um detector mais específico, como o espectrômetro de massas e 2. Utilização de um detector de arranjo de diodos (DAD) (BRESSOLLE, BROMET-PETIT, AUDRAN, 1996).

O DAD é uma alternativa interessante para a resolução destes problemas, porque facilita a identificação de picos cromatográficos e a avaliação da pureza do pico durante o desenvolvimento do método, o que o torna preferível para a análise de impurezas. O DAD pode identificar compostos de uma amostra em diferentes comprimentos de onda, o que gera mais informações e dados para a análise quantitativa de amostras desconhecidas (MEYER, 2004b).

Este detector consiste em uma lâmpada de deutério cujo espectro passa através de uma célula de fluxo, que então é disperso sobre um elemento de arranjo de diodos, que tem por função medir a intensidade da luz em cada comprimento de onda (Figura 16) (DONG, 2005). O arranjo de diodos consiste em um *chip* com um grande número de diodos sensíveis a luz (100-1000); cada diodo, organizado lado a lado é responsável por obter uma fração bem definida de informações, que são então, processadas por um sistema eletrônico. Possui as vantagens de: 1. Registrar o espectro durante uma separação cromatográfica; 2. Registrar um cromatograma em diferentes comprimentos de onda e 3. Determinar a pureza de um pico cromatográfico (SCOTT, 2003; MEYER, 2004b).

1.7.4 Quantificação de FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl por CLAE/UV ou CLAE/DAD

O FENT CIT injetável pode ser quantificado por CLAE/UV nas seguintes condições cromatográficas: a fase móvel de acetato de amônio 1% : (metanol:acetonitrila:ácido acético glacial 400:200:0,6), pH 6,6±0,1 na proporção 40:60, com uma coluna C18 4,6 mm X 25 cm, a 230 nm e com um fluxo de 2,0 mL/min (USP, 2008). O tempo de retenção obtido nestas condições é de 5 minutos (USP, 2008).

Lambropoulos, Spanos e Lazaridis utilizaram para quantificação de FENT na composição da fase móvel, a solução aquosa de ácido perclórico (p/v) com 1-decano-sulfonato e acetonitrila na proporção de 60:40. Neste método, foi utilizada coluna C18 15 cm X 4,6 mm, 5 µm. O tempo de retenção obtido a 205 nm foi de aproximadamente 9 minutos (2000). Em trabalho anterior, foi desenvolvida e validada metodologia para o estudo de estabilidade por CLAE/UV para determinar FENT e substâncias relacionadas. Neste, foi

utilizada uma coluna C8 e uma mistura de solução aquosa de ácido perclórico (0,23% p/v) e acetonitrila (65:25) como fase móvel, a 206 nm (LAMBROPOULOS *et al*, 1999).

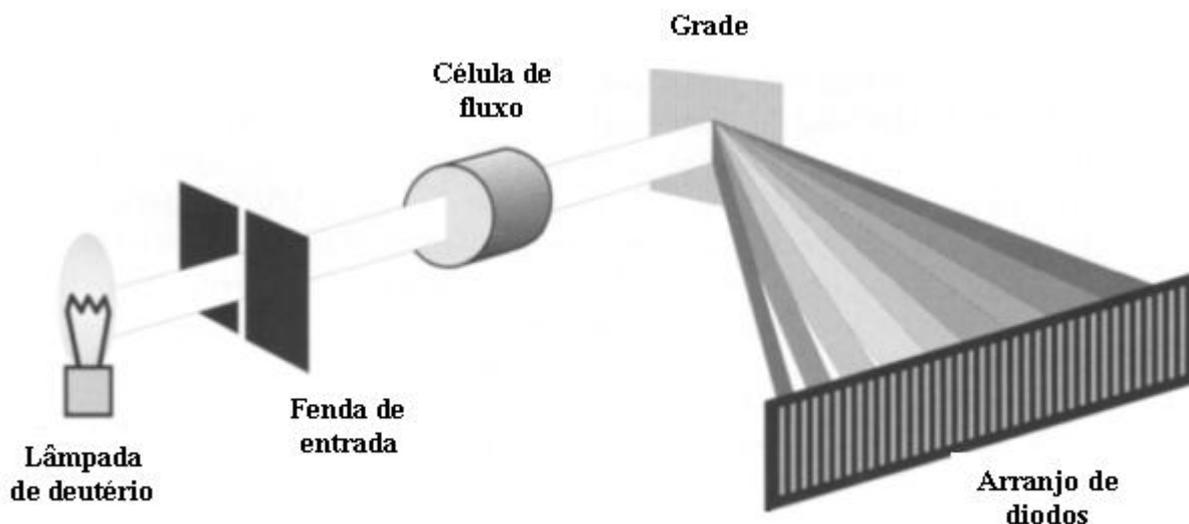


Figura 16. Figura esquemática de um detector de arranjo de diodos (DONG, 2005, adaptado)
Fonte: Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Elsevier

Os dados compendiais para quantificação do CLO HCl não abrangem a forma injetável. Para o ROP HCl, a quantificação por CLAE/UV é realizada a 240 nm, com utilização de uma coluna C18 3,9 mm X 15 cm com tamanho de partícula de 5,0 μm (USP-NF, 2008).

No estudo desenvolvido por Tanaka e colaboradores, para a quantificação do fármaco ROP e seu principal metabólito 2',6'-pipecoloxilidida na presença de outros fármacos, incluindo a CLO; foram utilizadas como condições cromatográficas por CLAE/UV em fase reversa (coluna C18 150 mm X 4,6 mm, tamanho de partícula 5 μm), a temperatura ambiente, com fase móvel: tampão de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) pH=5,6, ACN e MeOH na proporção 300:100:100 v/v/v na ausência de CLO e na proporção 440:120:120 v/v/v, na presença de CLO (2006). Arvidsson e Eklund, para a determinação de ROP, utilizaram como parâmetros cromatográficos para uma análise com CLAE/UV com duas colunas acopladas: um comprimento de onda de 210 nm, a fase móvel ACN e tampão fosfato pH=3,0 na proporção 30:70 v/v para a primeira coluna e para a segunda coluna, a fase móvel foi ACN e tampão fosfato pH=3,0 na proporção 30:70 v/v, com controle de temperatura de 27 $^\circ\text{C}$ e fluxo de 1,0 mL/min (1995).

Em diversos estudos na literatura, foi possível detectar os fármacos FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl por CLAE/UV OU CLAE/DAD (WOLF & POKLIS, 2005; QIN *et al* 2010). Estes fármacos possuem grupos cromóforos, que absorvem na região do visível. Assim, a utilização da CLAE permite a execução de estudos de estabilidade e degradação, e detecção de impurezas e/ou produtos de degradação destes fármacos.

Lambropoulos e colaboradores identificaram através do estudo de degradação de uma formulação de FENT CIT injetável, diferentes produtos de degradação, além do N-fenil-N-(4-piperidinil) propionamida (PPA) (Figura 17). Foi utilizada para tal, a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) (1999).

McCluskey e colaboradores observaram que a solução de FENT CIT injetável em soro fisiológico 0,9%, é estável por 90 dias em seringas de polipropileno, protegidos da luz e em temperatura ambiente (2009) por CLAE/DAD. Enquanto Peterson e colaboradores mostraram que a mistura FENT CIT, N-butilbrometo de escopolamina e midazolam apresentou compatibilidade física por um período de 10 dias, com degradação quando armazenadas a 32 °C em seringas de plástico, com 88% da concentração original (1998).

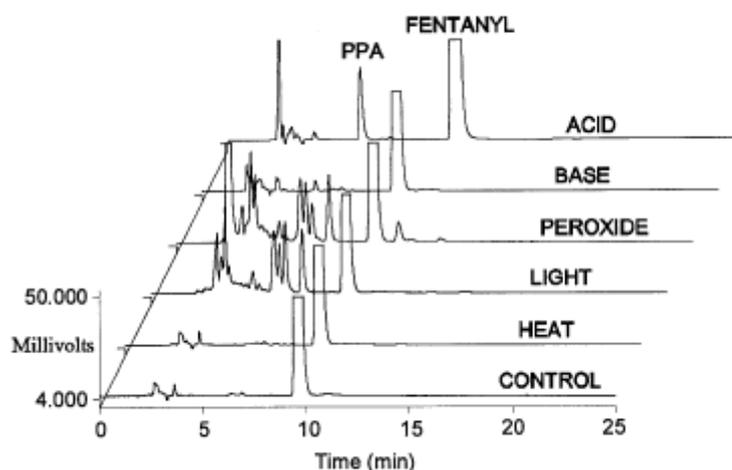


Figura 17. Cromatogramas do FENT no estudo de degradação (LAMBROPOULOS *et al*, 1999)
Fonte: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

A mistura midazolam e FENT manteve-se estável por 4 dias e sob refrigeração, por 7 dias. As soluções de FENT são estáveis por no mínimo 7 dias em temperaturas acima de 38°C (WILSON *et al*, 1998). A mistura FENT 20 e 40 µg/mL (citrato) e midazolam (cloridrato) 0,1 e 0,5 µg/mL é estável em solução de glicose 5% por mais de 3 horas, a 24°C sob exposição à luz fluorescente, sem alteração do pH da solução ou formação de gás, precipitado ou mudança de cor, podendo ser infundida no mesmo equipo (VARSHA *et al*, 1995).

No estudo de degradação forçada de FENT, desenvolvido por Garg e colaboradores, foi mostrado que dentre os produtos de degradação e impurezas do FENT (Figura 18), o fármaco gerou o PPA quando submetido à degradação ácida; além de: 1-feniletípiridínio (1-PEP), norfentanila (NRF), propionanilida (PRP) e 1-estiril-1H-piridin-2-ona (1-SPO) quando submetido à degradação térmica. O FENT mostrou-se estável em presença da luz e em meio básico (2010).

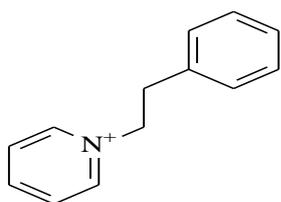
Priston e colaboradores observaram que o FENT a 2 µg/mL permanecia estável na presença de epinefrina (2 µg/mL) e bupivacaína (1 mg/mL) por 184 dias sob refrigeração e proteção da luz (2004).

O CLO HCl na forma injetável mostrou-se estável quanto submetido às condições de estresse, como exposição à luz, oxidação e variação de pH (KOSTECKA, DUNCAN, WAGENKNECHT, 1998).

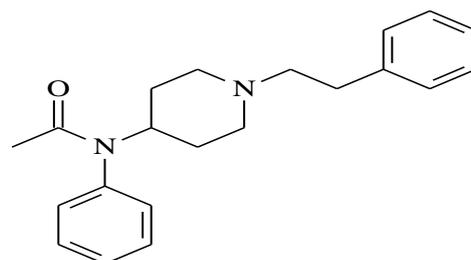
A mistura de sulfato de morfina e CLO HCl mostrou-se estável química e fisicamente por um período de 90 dias, intervalo de tempo aceitável quando estocadas em sistemas de infusão a 37 °C (HILDEBRAND, ELSBERRY, HASSENBUSCH, 2003). O CLO HCl também permaneceu estável na mistura com sulfato de morfina e cloridrato de bupivacaína por 90 dias a 37 °C (CLASSEN, WIMBISH, KUPIEC, 2004). Alvarez e colaboradores mostraram que a mistura para solução injetável para sistemas de infusão implantáveis apresentavam boa estabilidade e eram compatíveis por 14 semanas à temperatura corpórea (2004).

Um estudo de estabilidade da solução de diamorfina em ROP não demonstrou degradação desta em condições diferentes de temperatura e umidade. (SÁNCHEZ DEL ÁGUILA, JONES, VOHRA, 2003).

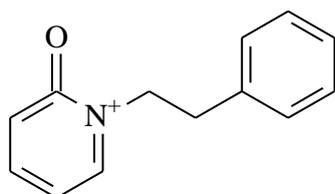
Foi observado que a ROP 0,2% permanecia estável na presença de FENT CIT nas concentrações 0,5, 0,75 e 1,0 µg/mL em recipientes de vidro ou de policloreto de vinila (PVC) por quatro dias, tempo de duração da analgesia epidural (BRODNER *et al*, 2002). A solução de acetato de metilprednisolona 16 mg/mL e ROP HCl 1,2 mg/mL é estável por 30 dias em seringas de polipropileno estocadas a 23-25 °C ou sob refrigeração (4 °C), protegida ou não de exposição luminosa (DELLA-CUNA *et al.*, 2001).



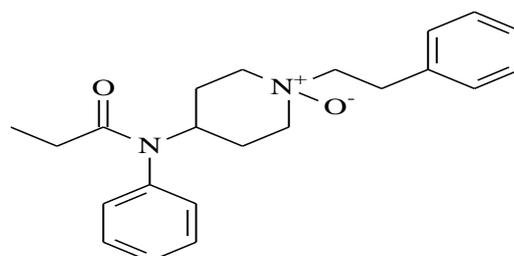
1-Feniletilpiridíneo (produto de degradação)



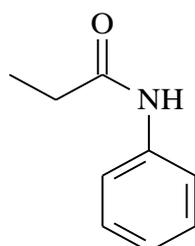
Acetilfentanila (impureza)



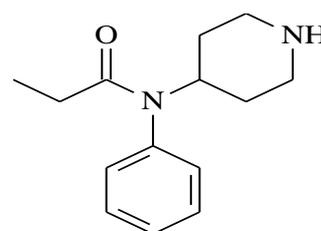
1-Feniletil-1H-piridin-2-ona
(produto de degradação)



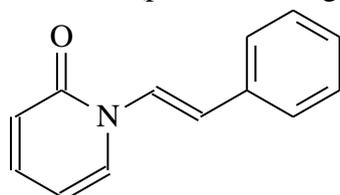
N-óxido de fentanila (produto de degradação)



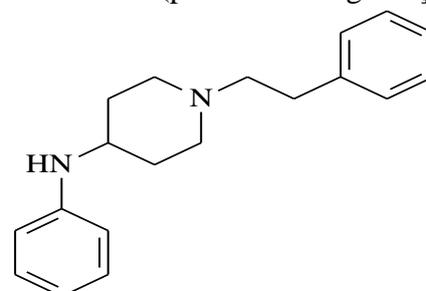
Propionanilida (produto de degradação)



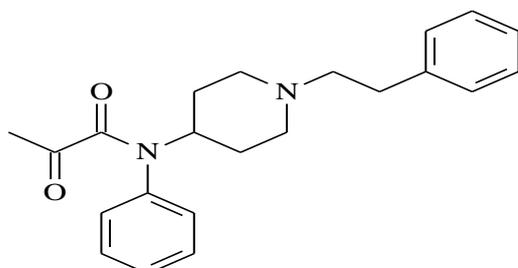
Norfentanila (produto de degradação)



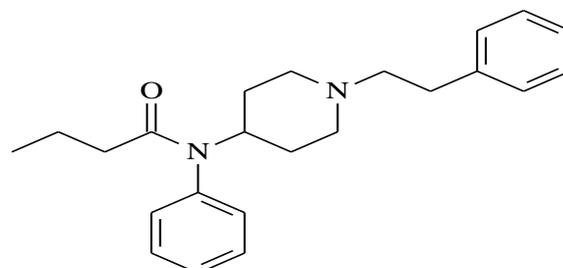
1-estiril-1H-piridin-2-ona
(produto de degradação)



N-fenil-1-(2-feniletil)-piperidin-4-amina
(produto de degradação)



Piruvil fentanila (impureza)



Butiril fentanila (impureza)

Figura 18. Produtos de degradação e impurezas do FENT (GARG *et al.*, 2010; adaptado)
Fonte: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

1.8 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

O desenvolvimento de um novo método analítico, ou a adaptação/implementação de um método conhecido deve atender a padrões de qualidade das medições químicas com rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade de resultados. Dados oriundos de métodos não desafiados podem conduzir a prejuízos financeiros irreparáveis e decisões desastrosas (RIBANI *et al.*, 2004). O resultado analítico é uma informação que servirá para os mais diversos propósitos, nas quais importantes decisões serão baseadas (MAROTO, 1999).

Assim, o método analítico deve atender às exigências das aplicações analíticas, a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados; para tal este deve ser validado, com o objetivo de se demonstrar que a metodologia desenvolvida é apropriada para a finalidade pretendida – determinação qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa (BRASIL, 2003b).

Validação é um termo não-específico, uma vez que existem várias definições descritas na literatura (BRITO *et al.*, 2001). Os conceitos evoluem continuamente, e constantemente estão sob consideração das agências reguladoras (RIBANI *et al.*, 2004). Abaixo estão algumas definições transcritas:

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003b).

Comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2003).

A validação de um procedimento analítico objetiva demonstrar que o método é adequado para o objetivo proposto (ICH, 2005).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – dispõe através da Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, o Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. De acordo com esta, para metodologias analíticas não descritas em formulários oficiais ou em farmacopéias reconhecidos pela ANVISA, devem ser avaliados alguns parâmetros de desempenho analítico durante o processo de validação, de acordo com a classificação dos testes segundo a sua finalidade (BRASIL, 2003b) (Quadro 1):

Quadro 1. Classificação dos testes por categoria, segundo a sua finalidade proposto pela ANVISA (BRASIL, 2003b)

<i>Categoria</i>	<i>Finalidade do teste</i>
I	Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio-limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de desempenho
IV	Testes de identificação

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

O procedimento de validação deve ser previamente desenvolvido para a rotina analítica e devem ser consideradas todas as variáveis do método (BRESSOLLE, BROMET-PETIT, AUDRAN, 1996). As características de desempenho consideradas para a validação da metodologia para quantificação de FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl são: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez, de acordo com os testes categoria 1 (Quadro 2) (BRASIL, 2003b).

Em validação, a quantificação do composto de interesse, pode ser obtida por diferentes métodos, como: 1. Padronização externa, 2. Padronização interna, 3. Superposição de matriz e 4. Adição de padrão (RIBANI *et al*, 2004), cujos dois os últimos métodos são comumente utilizados para ensaios de exatidão.

a) padronização interna: esse método consiste na preparação de soluções padrão da substância de interesse em concentrações conhecidas. A estas se adiciona a mesma quantidade conhecida de uma segunda substância chamada padrão interno. A partir da análise das soluções, constrói-se um gráfico da relação da razão entre as áreas substância/padrão interno (concentração constante) com a área do analito (concentração variável) (RIBANI *et al*, 2004);

b) padronização externa: consiste em comparar as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas que foram preparadas a partir do padrão com a área da substância a ser quantificada na amostra em estudo. A partir da equação da curva resultante, calcula-se a concentração da área da substância em estudo, através de um cromatograma resultante de uma injeção separada (RIBANI *et al*, 2004) A padronização externa pode ser realizada com ou sem superposição de matriz (CHIARADIA, 2009). Esta consiste em se adicionar o padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz, sem a substância de interesse. A partir

das análises, constrói-se um gráfico que relaciona as áreas obtidas com as concentrações do padrão (RIBANI *et al*, 2004);

Quadro 2. Parâmetros de desempenho analítico necessários para a validação do método analítico segundo a sua finalidade (BRASIL, 2003b)

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

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

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

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

c) adição de padrão: consiste em adicionar quantidades conhecidas da substância do estudo a quantidades conhecidas de amostra. Esta amostra fortificada será utilizada na obtenção dos cromatogramas, a partir dos quais será construída uma curva analítica (RIBANI *et al*, 2004).

1.8.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade que o método analítico possui de distinguir um composto de outro e de outros componentes da matriz, uma vez que esta é formada por analito(s), pela matriz e outros componentes, como impurezas e produtos de degradação

(BRASIL, 2003b; INMETRO, 2003). Pode ser obtida por ensaios de pureza de pico, com o uso de detector de arranjos de diodos, com o objetivo de demonstrar que um pico cromatográfico é atribuído a somente um componente da amostra (ICH, 2005). Com o objetivo de realizar a análise quantitativa de teor pode-se realizar a comparação de resultados de amostras armazenadas em condições de armazenamento, com àquelas armazenadas sob condições de estresse, como por exemplo, meio oxidativo, ácido, básico, etc (BRASIL, 2003b).

O estudo de degradação forçada objetiva determinar a estabilidade intrínseca de um fármaco, com o objetivo de elucidar possíveis produtos de degradação e gerar conhecimentos sobre a estabilidade intrínseca do fármaco e das reações de degradação. A natureza do ensaio depende, no entanto, de cada fármaco individualmente e do tipo de produto de degradação que pode ser gerado (ICH, 2003).

A susceptibilidade de cada fármaco a reações de degradação pode variar muito em termos de reações de degradação e taxa de decaimento, o que torna, portanto, uma árdua tarefa determinar as condições de degradação para novos fármacos. Singh e Bakshi propuseram um sistema de classificação para a caracterização de fármacos baseados em sua estabilidade inerente. Neste estudo, foram propostos pelos autores fluxogramas para a determinação das condições de degradação forçada para reações de hidrólise (ácida, alcalina e neutra), fotólise e oxidação. Através desta proposta, é possível determinar condições práticas para um estudo de degradação, que não estão especificados na literatura, como por exemplo, a escolha do melhor ácido para promoção de hidrólise ácida ou do melhor agente oxidante (2000).

A compilação de dados realizada pelos autores associada à experiência prática em química de degradação de fármacos, determinaram a construção de um sistema de classificação de estabilidade e as condições de estresse (SINGH & BAKSHI, 2000).

1.8.2 Linearidade

A linearidade está relacionada à proporcionalidade dos resultados da metodologia analítica com o aumento de concentração do analito, em no mínimo cinco concentrações diferentes (BRASIL, 2003b; ICH, 2005). A avaliação da linearidade pode ser realizada através da curva sinal x concentração crescente do analito e posterior análise dos resultados obtidos a métodos estatísticos, como a determinação do coeficiente de correlação linear, a

intersecção com o eixo y, o coeficiente angular, a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e o desvio padrão relativo (BRASIL, 2003b; ICH, 2005).

1.8.3 Intervalo

Constituem os limites de quantificação superior e inferior do método analítico que variam de acordo com o objetivo do método: 1. 70-130%, para ensaios de uniformidade de conteúdo; 2. Variação de 20% da concentração teste, para ensaios de dissolução; 3. 80-120% da concentração teste, para ensaios com fármacos ou medicamentos (ICH, 2005), faixa que será utilizada neste estudo.

1.8.4 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa a proximidade de resultados de medidas de uma amostragem múltipla obtida de uma amostra. (ICH, 2005). Foi considerada para o presente estudo em dois níveis: 1. Repetibilidade (precisão intra-ensaio): expressa pela concordância dos resultados sob as mesmas condições de medição, em um curto intervalo de tempo e 2. Precisão intermediária (precisão inter-corrída): demonstra a concordância dos resultados em diferentes condições no mesmo laboratório, em dias diferentes com no mínimo dois dias de análise. A precisão deve ser realizada por no mínimo 6 medições na concentração do valor esperado ou 9 determinações dentro do intervalo especificado do método, em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas de cada. É expressa pelo coeficiente de variação (CV) (Equação 1) (BRASIL, 2003b; ICH, 2005):

$$\text{Equação 1: } \text{DPR}\% = \text{DP}/\text{CMD} \times 100$$

Onde, DPR: Desvio padrão relativo;

DP: Desvio Padrão;

CMD: Concentração Média Determinada.

1.8.5 Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico está relacionada com a concordância entre os resultados obtidos com o valor verdadeiro. Diversos métodos podem ser utilizados para a sua determinação dentro da faixa especificada de procedimentos analíticos de fármacos, formas farmacêuticas e impurezas (BRASIL, 2003b; ICH, 2005). Para a análise da forma farmacêutica dos fármacos FENT CIT, CLO HCl e CLO HCl, onde não estão disponíveis todos os componentes do medicamento, o método a ser utilizado consiste na adição de padrão, no qual serão utilizadas quantidades conhecidas do padrão de referência ao medicamento (BRASIL, 2003b).

Para a determinação da exatidão são necessárias 9 determinações dentro do intervalo especificado do método, em três concentrações, baixa, média e alta em triplicata, após a determinação da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do método. Pode ser expressa pela razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica (Equação 2) (BRASIL, 2003b):

$$\text{Equação 2: } EXATID\tilde{A}O \% = CMD/CT \times 100$$

Onde: CMD: Concentração média determinada;

CT: Concentração teórica.

1.8.6 Robustez

A robustez consiste na medida da capacidade de um método analítico em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003b). Neste um desenho experimental estatístico examina simultaneamente o efeito da variação em diferentes parâmetros do método (HEYDEN, 1999).

Em cromatografia líquida durante o desenvolvimento da metodologia, alguns parâmetros devem sofrer variações para a determinação da robustez. São eles: 1. o pH da fase móvel, 2. a Composição da fase móvel, 3. os Lotes ou fabricantes de coluna, 4. a Temperatura e 5. o Fluxo da fase móvel (BRASIL, 2003b).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar através de parâmetros físico-químicos a compatibilidade e estabilidade da solução analgésica para uso peridural em pacientes submetidos à toracotomia com promoção de manipulação segura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação do teor dos fármacos na solução analgésica para uso peridural;
- b) Promover estudo físico-químico de compatibilidade e estabilidade dos fármacos utilizados na preparação da solução analgésica administrada no Hospital do Câncer I em pacientes pós-toracotomizados no período de 24 horas;
- c) Avaliar os fatores físico-químicos para estabelecer a estabilidade da mistura de CLO HCl, ROP HCl e FENT CIT através de ensaios de pH, contagem de partícula e estudo de estabilidade estendida

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Fármacos, excipientes e reagentes

- a) Acetato de sódio anidro (CH_3COONa) (PRÓ-Quimios[®]);
- b) Acetonitrila (ACN) grau HPLC (TEDIA[®]);
- c) Ácido acético glacial (CH_3COOH) (PRÓ-Quimios[®]);
- d) Ácido clorídrico (HCl) 37% (TEDIA[®]);
- e) Ácido fosfórico (H_3PO_4) (PRÓ-Quimios[®]);
- f) Água purificada grau tipo I;
- g) Bolsa de PVC Halex Istar[®] acoplada a equipo de infusão peridural (Hospira[®]);
- h) Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (PRÓ-Quimios[®]);
- i) Fosfato de sódio (Na_3PO_4) (PRÓ-Quimios[®]);
- j) Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) (PRÓ-Quimios[®]);
- l) Hidróxido de amônio (NH_4OH) (PRÓ-Quimios[®]);
- m) Hidróxido de sódio (NaOH) micropérolas (VETEC[®]);
- n) Metanol (MeOH) grau HPLC (TEDIA[®]);
- o) Padrões de trabalho de CLO HCl, ROP HCl e FENT CIT (Cristália[®]);
- p) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% (PRÓ-Quimios[®]);
- q) Seringa 10 mL (BD[®]);
- r) Solução injetável de FENT CIT - ampola 0,05 mg/mL (Cristália[®]);
- s) Solução injetável de CLO HCl 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cristália[®]);
- t) Solução injetável de ROP HCl 2,0 mg/mL (Cristália[®]);
- u) Trietilamina (TEA) (VETEC[®]);

3.2 EQUIPAMENTOS

- a) Coluna Symmetry[®] C18, 150 mm X 4,6 mm, 3,5 μm (Waters[®]);
- b) Coluna Supelcosil LC 18[®] 250 mm X 4.6 mm, 5 μm (Supelco[®]);
- c) Coluna Kromasil[®] C18 250 mm X 4.6 mm, 5 μm (AKZO NOBEL[®]);
- d) Concentrador Centrivap LabConco;

- e) Cromatógrafo JASCO acoplado a DAD (Cromatec[®]);
- f) Cromatógrafo Shimadzu Class VP 5.032, acoplado a detector de UV (Shimadzu[®]);
- g) Balança analítica AG 200 (Gehaka[®]);
- h) Bomba a vácuo tipo hidrovácuo (QUIMIS[®]);
- i) Filtro de membrana preto de 47 mm de celulose, quadriculado com 0,8 mm de porosidade (Millipore[®]);
- j) Filtro micropore 3 mm; 0,45 micra. (Spartan[®]-3). Schleicher & Schuell;
- l) Filtro hidrofóbico (Millipore[®]);
- m) Filtro hidrofílico (Sartorius[®]);
- n) Manta aquecedora (QUIMIS[®]);
- o) Microscópio óptico articulado a gráticula acoplado a iluminador MF-830 Microforge (NARISHIGE[®]);
- p) Potenciômetro modelo DM-20, eletrodo DME-CV1, com alimentação 110 ou 220 V, com seguintes faixas de medição: pH= -2 a 20 e temperatura= -20 a 120 °C (Digimed[®]);
- q) Termômetro (Incoterm[®]).
- r) Termômetro de máxima e mínima (Halex Istar[®]);
- s) Vortex (Certomat[®] MV). B. Braun Biotech International.

3.3 MÉTODOS

O estudo em todas as suas etapas (Figura 19) tem a natureza exploratório-descritiva acerca dos principais conceitos relacionados à caracterização de um processo de qualidade das características físico-químicas da solução analgésica utilizada no Hospital do Câncer I. Este, em seu caráter exploratório irá caracterizar alguns dos principais conceitos de qualidade através das técnicas de CLAE/DAD, determinação de pH e teste de contagem de partículas por microscopia aplicadas à mistura analgésica dos fármacos FENT , CLO e ROP em NaCl 0,9% utilizada em pacientes pós-toracotomizados.

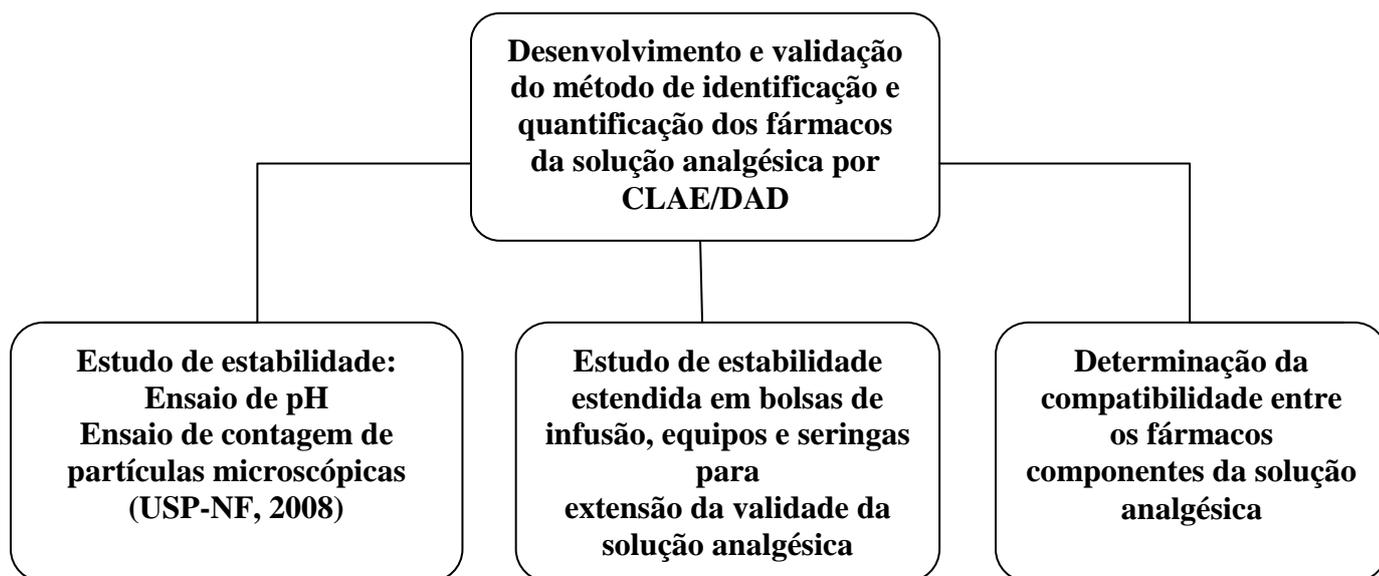


Figura 19. Organograma do estudo de estabilidade estendida da solução analgésica
Fonte: Elaboração própria

3.3.1 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por CLAE/DAD para a quantificação de FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl em solução fisiológica de NaCl 0,9%

3.3.1.1 Etapas do desenvolvimento da metodologia analítica

O desenvolvimento de uma metodologia analítica requer o seguimento de etapas para a elucidação completa e a otimização do método. De acordo com Snyder, Glajch e Kirkland, alguns passos são necessários para este propósito (1988). Estas etapas foram seguidas no presente estudo (Figura 20).

3.3.1.1.1 Controle de qualidade de medicamentos em suas embalagens originais

3.3.1.1.1.1 Aspecto

Foi realizada análise visual das soluções injetáveis de FENT CIT 5 µg/mL, CLO HCl 1 µg/mL e ROP HCl 0,2%. Estas possuíam aspecto límpido e essencialmente livre de partículas visíveis.

3.3.1.1.1.2 Cor

Através da análise visual das soluções injetáveis de FENT CIT 0,05 mg/mL, CLO HCl 150 µg/mL e ROP HCl 10 mg/mL, foi possível observar que todas as soluções injetáveis apresentaram aspecto incolor.

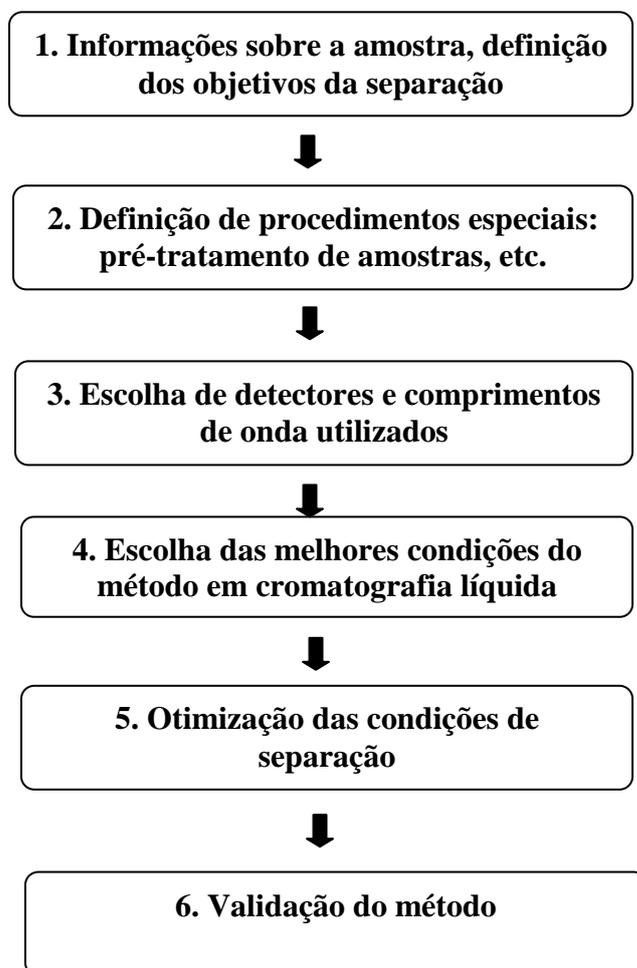


Figura 20. Etapas para o desenvolvimento da metodologia analítica por CLAE (SNYDER, GLAJCH, KIRKLAND, 1988, adaptado)

Fonte: Practical HPLC method development. A Wiley-Interscience publication

3.3.1.1.1.3 Volume

As ampolas das soluções injetáveis de FENT CIT 0,05 mg/mL, CLO HCl 150 µg/mL e ROP HCl 10 mg/mL devem apresentar o volume mínimo de 5,0 mL, 1,0 mL e 20,0 mL, respectivamente.

3.3.1.1.1.4 pH

As ampolas das soluções injetáveis de FENT CIT 0,05 mg/mL, CLO HCl 150 µg/mL e ROP HCl 10 mg/mL devem apresentar o pH na faixa de 4,0-7,5; 4,0-7,0 e 4,0-6,0 (USP-NF, 2008).

3.3.1.1.2 Dados sobre a amostra

Para o início do desenvolvimento da metodologia analítica, foi necessária a elucidação de informações quanto à composição e propriedades da amostra do estudo (SNYDER, GLARJCH, KIRKLAND, 1988) (Tabela 1). As informações referentes à amostra foram utilizadas para a escolha dos parâmetros para o desenvolvimento do método.

Tabela 1. Dados sobre a composição e propriedades da amostra

Fármacos presentes na amostra	CLO	ROP	FENT
Peso molecular	266,56 (cloridrato) (THE MERCK INDEX, 2001).	310,87 (cloridrato) (THE MERCK INDEX, 2001).	528,59 (citrato) (THE MERCK INDEX, 2001).
pKa (caráter ácido/básico)	8,20 (RENKO, SWART, BICKELHAUPT, 2006). (básico)	8,16 (THE MERCK INDEX, 2001). (básico)	8,44±0,05 (THURKILL <i>et al</i> , 2005). (básico)
Comprimento de onda	280 nm (WOLF & POKLIS, 2005).	210 nm (RIFAI <i>et al</i> , 2001; QIN <i>et al</i> , 2010).	206 nm (LAMBROPOULOS <i>et al</i> , 1999; WOLF & POKLIS, 2005).
Componentes das ampolas	NaCl e água para injetáveis (CLONIDIN [®] , 2008).	NaCl, ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio e água para injetáveis (ROPI [®] , 2008).	ácido cítrico, citrato de sódio e água para injetáveis (FENTANEST [®] , 2008).
Concentração na solução analgésica	1 µg/mL	2000 µg/mL	5 µg/mL
Solubilidade da amostra	O sal é solúvel em etanol absoluto, levemente solúvel	Solúvel em água (USP-NF, 2008).	A massa de 1g solubiliza-se em 40 mL de água. O

Fármacos presentes na amostra	CLO	ROP	FENT
	em clorofórmio e praticamente insolúvel em éter (THE MERCK INDEX, 2001).		sal é solúvel em metanol e levemente solúvel em clorofórmio (THE MERCK INDEX, 2001).

Fonte: Elaboração própria

A partir dos parâmetros obtidos através da revisão de literatura e dos dados da amostra, foram realizadas injeções dos fármacos em cromatógrafo da marca Shimadzu Class VP 5.032[®], acoplado a detector de UV. Diferentes soluções e proporções foram testadas como fase móvel e os respectivos tempos de retenção de cada um dos três fármacos foram observados.

A partir da escolha das melhores condições cromatográficas, a otimização do método foi realizada em cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de diodos módulo LC 2000 (cromatógrafo JASCO/Cromatec[®], acoplado a DAD), composto por duas bombas com degaseificador PU-2089s, autoinjeter AS-2059, detector de arranjo de diodos MD-2018, forno com termostato CO-2060 e interface LC-NetII/ADC.

Dentre os fatores que determinam a escolha das melhores condições cromatográficas está a alta concentração do fármaco ROP HCl em relação à FENT CIT e CLO HCl. Pois um fármaco, quando muito concentrado, causa alteração nos tempos de retenção e perda de resolução. O cálculo da concentração máxima de analito ($W_{MÁX}$) - equações 3-6 - pode ser utilizado depois do desenvolvimento do método e constitui uma ferramenta importante para prever a massa máxima de analito injetada (SNYDER, GLAJCH, KIRKLAND, 1988).

$$\text{Equação 3: } W_{MÁX} \sim 50(1 + k/k)^2 d_c^2$$

Onde:

$W_{MÁX}$: concentração/massa máxima, em microgramas;

k: fator de retenção;

d: diâmetro da coluna, em cm.

Como:

$$\text{Equação 4: } V_m \sim 0,5L d_c^2$$

Onde:

V_m : volume morto, em mL;
 L : comprimento da coluna, em cm;
 d : diâmetro da coluna, em cm.

$$\text{Equação: } T_0 = V_m/F$$

Onde:

T_0 : tempo de volume morto, em min;
 V_m : volume morto;
 F : fluxo da fase móvel, em mL/min.

Como:

$$\text{Equação: } k = (T_R - T_0)/T_0$$

Onde:

k : fator de retenção
 T_R : tempo de retenção
 T_0 : tempo de volume morto.

3.3.1.2 Validação da metodologia

3.3.1.2.1 Preparo das soluções-estoque

A partir dos padrões secundários, foram preparadas soluções-estoque dos fármacos FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl nas concentrações de 1,0 mg/mL, 1,0 mg/mL e 10,0 mg/mL respectivamente. Dados referentes ao preparo das soluções constam na tabela 2.

Tabela 2. Dados referentes ao preparo das soluções-estoque

<i>Fármaco</i>	<i>Teor (%)</i>	<i>Massa calculada (g)</i>	<i>Massa pesada (g)</i>	<i>Volume final (mL)^(*)</i>	<i>Concentração final (mg/mL)</i>
CLO HCl	98,97	0,0050	0,0050	5,00	1,0 mg/mL
ROP HCl	94,38	0,05297	0,050	5,00	10,0 mg/mL
FENT CIT	100,56	0,0050	0,0050	5,00	1,0 mg/mL

^(*) *Completado com metanol.*

Fonte: Elaboração própria

3.3.1.2.2 Determinação da especificidade

A especificidade foi determinada a partir da análise de amostras de soluções preparadas sem triplicata verdadeira de CLO HCl, ROP HCl e FENT CIT, nas concentrações correspondentes a 80%, 100% e 120% da concentração teórica do teste, a partir das soluções-estoque preparadas (Tabela 3). As amostras foram injetadas em cromatógrafo acoplado a detector de arranjo de diodos, através do qual foram utilizados ensaios de pureza de pico e de degradação, para atribuir a somente um componente o pico cromatográfico obtido (BRASIL, 2003b).

3.3.1.2.2.1 Degradação da solução analgésica

O estudo de degradação realizado seguiu a metodologia proposta por Singh & Bakshi (2000). A partir da metodologia proposta foi criado um sistema de classificação, no qual o fármaco é submetido a diferentes condições (hidrólises ácida, básica e oxidação). Para o presente estudo, foram escolhidas as condições para a classificação do fármaco como estável. Nestas condições, o fármaco é submetido à: 1. Reações de hidrólise ácida (HCl 1 N) e alcalina (NaOH 1 N) com refluxo a 90 °C por 12 h e 2. Reação de degradação oxidativa (H₂O₂ 3%) a temperatura ambiente por 12 h. Para o estudo de especificidade, não foram realizadas reações de degradação fotolítica. Se o fármaco não sofrer degradação, o mesmo é considerado estável. Para realização deste ensaio, foram preparadas soluções em altas concentrações dos fármacos CLO HCl (25 µg/mL), ROP HCl (500 µg/mL) e FENT CIT (25 µg/mL) em solução fisiológica de NaCl 0,9%, isolados e em mistura, e também da solução fisiológica de NaCl 0,9% (branco) preparadas a partir das ampolas e dos padrões secundários, com o objetivo de

avaliar suas propriedades de estabilidade e a especificidade do método em meios ácido, básico e oxidativo.

Tabela 3. Preparo das soluções para ensaio de especificidade

<i>Balão volumétrico</i>	<i>Fármacos</i> (Concentração)						Volume final (mL) ^(*)	% da concentração teórica do teste
	CLO HCl (1000 µg /mL)		ROP HCl (15000 µg /mL)		FENT HCl (1000 µg /mL)			
	Volume (µL)	Massa (µg)	Volume (µL)	Massa (µg)	Volume (µL)	Massa (µg)		
1	16,0	16,0	40,0	400,0	120,0	120,0	5,00	80
Concentração final 1 (µg/mL)	3,2		80,0		24,0			
2	20,0	20,0	50,0	500,0	150,0	150,0	5,00	100
Concentração final 2 (µg/mL)	4,0		100,0		30,0			
3	24,0	24,0	60,0	600,0	180,0	180,0	5,00	120
Concentração final 3 (µg/mL)	4,8		120,0		36,0			

^(*) Completado com solução fisiológica de NaCl a 0,9%.

Fonte: Elaboração própria

a) Preparo da solução de degradação/neutralização de ácido clorídrico HCl 1N

Com auxílio de uma proveta de 10 mL, foram medidos 4,25 mL de HCl 37% (TEDIA[®]) e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL. A este foi adicionada quantidade suficiente de água purificada grau tipo I, para completar o volume de 50 mL.

b) Preparo da solução de degradação/neutralização de hidróxido de sódio (NaOH)

Foi pesada em uma balança analítica a massa de 2 g de NaOH. As micropérolas de NaOH foram transferidas para um Becker de 50 ml, ao qual foi adicionada água purificada grau tipo I para dissolução inicial com controle de aquecimento. Após a dissolução, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL. A este foi adicionada quantidade suficiente de água purificada grau tipo I, para completar o volume de 50 mL.

c) Preparo da solução de degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3 %

Com o auxílio de uma proveta, foram medidos 5,0 mL de H_2O_2 30 % (PRÓ-Quimios[®]) e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, ao qual foi adicionada quantidade suficiente de água purificada grau tipo I, para completar o volume de 50 mL.

d) Preparo das amostras de FENT CIT 25 $\mu\text{g/mL}$, CLO HCl 25 $\mu\text{g/mL}$ e ROP HCl 500 $\mu\text{g/mL}$ a partir das ampolas

Para o estudo de degradação por hidrólises ácida e básica e por oxidação foram preparadas cinco soluções a partir das ampolas dos fármacos utilizados no preparo da solução analgésica, a saber: 1. Solução fisiológica de NaCl 0,9%; 2. FENT CIT 25 $\mu\text{g/mL}$; 3. CLO HCl 25 $\mu\text{g/mL}$; 4. ROP HCl 500 $\mu\text{g/mL}$ e 5. Solução de FENT CIT 25 $\mu\text{g/mL}$, CLO HCl 25 $\mu\text{g/mL}$ e ROP HCl 500 $\mu\text{g/mL}$. Todas as soluções foram preparadas com o auxílio de balão volumétrico de 5000 μL e pipeta automática de 200 μL (Tabela 4).

e) Preparo das amostras de FENT CIT 25 $\mu\text{g/mL}$, CLO HCl 25 $\mu\text{g/mL}$ e ROP HCl 500 $\mu\text{g/mL}$ a partir das soluções-estoque de padrão secundário.

Para o estudo de degradação por hidrólises ácida e básica e por oxidação foram preparadas cinco soluções a partir das soluções-estoque dos fármacos FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 15000 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, a saber: 1. solução fisiológica de NaCl 0,9%; 2. FENT CIT 25 $\mu\text{g/mL}$; 3. CLO HCl 25 $\mu\text{g/mL}$; 4. ROP HCl 500 $\mu\text{g/mL}$ e 5. solução de FENT CIT 25 $\mu\text{g/mL}$, CLO HCl 25 $\mu\text{g/mL}$ e ROP HCl 500 $\mu\text{g/mL}$. Todas as soluções foram preparadas com o auxílio de balão volumétrico de 5000 μL e pipeta automática de 200 μL (Tabela 5).

3.3.1.2.2.1.1 Degradação por hidrólises ácida e básica

Tabela 4. Preparo das soluções a partir das ampolas para o ensaio de degradação

<i>Balão volumétrico</i>	<i>Fármacos (Concentração)</i>						Volume final (mL) ^(*)
	CLO HCl (0,15 mg/mL)		ROP HCl (10,0 mg/mL)		FENT CIT (0,05 mg/mL)		
	Volume (μ L)	Massa (μ g)	Volume (μ L)	Massa (μ g)	Volume (μ L)	Massa (μ g)	
<i>1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,00
<i>Concentração final (μg/mL)</i>	-		-		-		-
<i>2</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	2500,0	125,0	5,00
<i>Concentração final (μg/mL)</i>	-		-		25 μ g/mL		-
<i>3</i>	833,3	125,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,00
<i>Concentração final (μg/mL)</i>	25 μ g/mL		-		25 μ g/mL		-
<i>4</i>	0,0	0,0	250,0	2500,0	0,0	0,0	5,00
<i>Concentração final (μg/mL)</i>	-		500 μ g/mL		-		500 μ g/mL
<i>5</i>	833,3	125,0	250,0	2500,0	2500,0	125,0	5,00
<i>Concentração final (μg/mL)</i>	25 μ g/mL		500 μ g/mL		25 μ g/mL		500 μ g/mL

^(*) Completado com solução fisiológica de NaCl a 0,9%.

Fonte: Elaboração própria

Para cada solução preparada (Tabelas 4 e 5), foi seguida a metodologia para promoção da degradação por hidrólise ácida, com seguimento dos procedimentos: com o auxílio de uma pipeta automática de 1000 μ L, foram transferidos 1000 μ L das soluções dos fármacos do estudo (cada solução separadamente) a um balão volumétrico de 5000 μ L, a este foram adicionados 1000 μ L de HCl 1 N (hidrólise ácida) ou 1000 μ L de NaOH 1 N (hidrólise básica). A solução foi homogeneizada e a esta foi acrescentada pérolas de vidro para controle

da ebulição. O balão foi levado a uma aparelhagem de refluxo em manta aquecedora (QUIMIS[®]) por 12 horas a uma temperatura de 90 °C. O controle de temperatura foi realizado com o auxílio de termômetro Incoterm[®]. Após o refluxo, a solução resfriou a temperatura ambiente e foi neutralizada com solução de NaOH e HCl respectivamente, e posteriormente, as soluções foram concentradas com auxílio de um concentrador (CentriVap LabConco[®]), por 60 minutos a 80°C. A ressuspensão foi realizada com 500 µL de NaCl 0,9% e posteriormente filtrada em filtro *micropore* de 0,45 µ acoplado a seringa de 3 mL.

Tabela 5. Preparo das soluções a partir das soluções-estoque para o ensaio de degradação

Balão volumétrico	Fármacos (Concentração)						Volume final (mL) ^(*)
	CLO HCl (1000 µg /mL)		ROP HCl (15000 µg /mL)		FENT CIT (1000 µg /mL)		
	Volume (µL)	Massa (µg)	Volume (µL)	Massa (µg)	Volume (µL)	Massa (µg)	
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,00
Concentração final (µg/mL)	-		-		-		
2	0,0	0,0	0,0	0,0	125,0	125,0	5,00
Concentração final (µg/mL)	-		-		25 µg/mL		
3	125,0	125,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,00
Concentração final (µg/mL)	25 µg/mL		-		-		
4	0,0	0,0	166,7	2500,0	0,0	0,0	5,00
Concentração final (µg/mL)	-		500 µg/mL		-		
5	125,0	125,0	166,7	2500,0	125,0	125,0	5,00
Concentração final (µg/mL)	25 µg/mL		500 µg/mL		25 µg/mL		

^(*) Completado com solução fisiológica de NaCl a 0,9%.

Fonte: Elaboração própria

3.3.1.2.2.1.2 Degradação por oxidação

Para cada solução preparada (Tabelas 4 e 5), foi seguida a metodologia para promoção da degradação por oxidação. Com o auxílio de uma pipeta automática de 1000 μL , foram transferidos 1000 μL das soluções dos fármacos do estudo (cada solução separadamente) a um balão volumétrico de 5000 μL , a este foram adicionados 1000 μL de H_2O_2 3%. A solução foi homogeneizada e deixada a temperatura ambiente por 24 horas. As soluções foram concentradas com auxílio de um concentrador (CentriVap LabConco[®]), por 60 minutos a 80 °C. A ressuspensão foi realizada com 500 μL de NaCl 0,9% e posteriormente filtrada em filtro *micropore* de 0,45 μ acoplado a seringa de 3 mL.

3.3.1.2.3 Determinação da linearidade

Foi determinada para cada dia de validação a análise de cinco pontos, correspondentes a 80%, 90%, 100%, 110% e 120% da concentração teórica (FENT CIT 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CLO HCl 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e ROP HCl 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do teste. As soluções foram preparadas a partir da solução-estoque dos padrões secundários de FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl para os três dias de validação, com um total de nove replicatas (Tabela 6). Os resultados dos testes foram tratados com a determinação do coeficiente de correlação (valor mínimo aceitável = 0,99).

3.3.1.2.4 Determinação do intervalo

Para a aplicação pretendida do método, o alcance do intervalo determinado foi de 80% - 120%. Para a determinação do intervalo, foi utilizado o estudo de linearidade.

3.3.1.2.5 Determinação da precisão

Foi realizada em dois níveis: 1. Repetibilidade (precisão intra-ensaio) e 2. Precisão intermediária (precisão inter-ensaio).

Para a verificação da repetibilidade foram utilizadas 9 determinações, correspondentes a 85%, 95% e 115% da concentração teórica do teste (concentrações baixa, média e alta). As soluções foram preparadas a partir dos padrões secundários disponíveis de FENT CIT 1,0

mg/mL, CLO HCl 1,0 mg/mL e ROP HCl 10,0 mg/mL em solução fisiológica de NaCl 0,9%. Todas as análises foram realizadas no mesmo dia com a mesma instrumentação e o com o mesmo analista.

Para verificação da precisão intermediária, foram utilizadas 9 determinações (85%, 95% e 115%), a partir dos padrões disponíveis. Todas as análises foram realizadas em três dias diferentes e consecutivos, com a mesma instrumentação e o com o mesmo analista.

Tabela 6. Preparo das soluções a partir das soluções-estoque para o ensaio de linearidade

<i>Balão volumétrico</i>	<i>Fármacos (Concentração)</i>						Volume final (mL) ^(*)	% da concentração teórica do teste
	CLO HCl (1,0 mg/mL)		ROP HCl (10,0 mg/mL)		FENT CIT (1,0 mg/mL)			
	Volume (μ L)	Massa (μ g)	Volume (μ L)	Massa (μ g)	Volume (μ L)	Massa (μ g)		
<i>1</i>	16,0	16,0	40,0	400,0	120,0	120,0	5,00	80
<i>Concentração final (μg/mL)</i>	3,2		80,0		24,0			
<i>2</i>	18,0	18,0	45,0	450,0	135,0	135,0	5,00	90
<i>Concentração final (μg/mL)</i>	3,6		90,0		27,0			
<i>3</i>	20,0	20,0	50,0	500,0	150,0	150,0	5,00	100
<i>Concentração final (μg/mL)</i>	4,0		100,0		30,0			
<i>4</i>	22,0	22,0	55,0	550,0	165,0	165,0	5,00	110
<i>Concentração final (μg/mL)</i>	4,4		110,0		33,0			
<i>5</i>	24,0	24,0	60,0	600,0	180,0	180,0	5,00	120
<i>Concentração final (μg/mL)</i>	4,8		120,0		36,0			

^(*) Completado com solução fisiológica de NaCl a 0,9%.

Fonte: Elaboração própria

3.3.1.2.6 Determinação da exatidão

Foi determinada a partir das soluções estoque dos padrões de trabalho dos fármacos componentes da solução analgésica, nas concentrações correspondentes a 85%, 95% e 115% da concentração teórica do teste. As soluções foram manipuladas em triplicata verdadeira, com o total de 9 determinações para cada dia de validação (Tabela 7).

Tabela 7. Preparo das soluções a partir dos padrões secundários para os ensaios de precisão e exatidão

Balão volumétrico	Fármacos (Concentração)						Volume final (mL) ^(*)	% da concentração teórica do teste
	CLO HCl (1,0 mg/mL)		ROP HCl (10,0 mg/mL)		FENT CIT			
	Volume (μ L)	Massa (μ g)	Volume (μ L)	Massa (μ g)	Volume (μ L)	Massa (μ g)		
1	17,0	17,0	42,5	425,0	127,5	127,5	5,00	85
Concentração final (μg/mL)	3,4		85,0		25,5			
2	19,0	19,0	47,5	475,0	142,5	142,5		
Concentração final (μg/mL)	3,8		95,0		28,5		5,00	115
3	23,0	23,0	57,5	57,5	172,5	172,5		
Concentração final (μg/mL)	4,6		115,0		34,5			

^(*) Completado com solução fisiológica de NaCl a 0,9%.

Fonte: Elaboração própria

3.3.1.2.7 Determinação da robustez

Para o ensaio de robustez, em dois dias diferentes após o terceiro dia de validação, foram modificadas as condições da corrida cromatográfica: 1. Temperatura de corrida de 40°C para 35°C (primeiro dia) e 2. Alteração do fluxo 1,0 mL/min para 0,8 mL/min. As modificações foram realizadas com amostras na concentração teórica do teste (100%) em triplicata verdadeira. Foram calculados, a partir dos resultados obtidos, os valores de exatidão e precisão para cada variação do método proposta.

3.3.1.2.8 Determinação da estabilidade de curta duração

As amostras da solução analgésica em triplicata verdadeira, correspondente a 100% da concentração teórica do teste, tiveram suas concentrações determinadas através da metodologia proposta. As amostras foram analisadas após 10 horas de permanência em bandeja no cromatógrafo.

3.3.2 Estudo de estabilidade estendida

3.3.2.1 Apresentação das formulações farmacêuticas

As soluções injetáveis de FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl são límpidas, incolores e apresentadas na forma de ampola.

3.3.2.2 Preparo das bolsas de infusão, equipos de infusão peridural e seringas

As amostras foram preparadas através da diluição dos fármacos em soro fisiológico 0,9%, a fim de se obter as concentrações de FENT 30 $\mu\text{g/mL}$, CLO 4 $\mu\text{g/mL}$ e ROP 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 8). Estas amostras foram acondicionadas sob refrigeração a 2-8°C, protegidas da luz.

Tabela 8. Dados referentes ao preparo das soluções de trabalho

<i>Dados da ampola</i>	<i>Fármacos</i> <i>(Concentração)</i>						Volume final (mL) ^(*)
	CLO HCl (150 $\mu\text{g/mL}$)		ROP HCl (10000 $\mu\text{g/mL}$)		FENT CIT (50 $\mu\text{g/mL}$)		
	Volume (μL)	Massa (μg)	Volume (μL)	Massa (μg)	Volume (μL)	Massa (μg)	
	2666,67	400,0	1000	10000	60000,0	3000,0	100,00
<i>Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)</i>	4,0		100,0		30,0		

^(*) Completado com solução fisiológica de NaCl a 0,9%.

Fonte: Elaboração própria

3.3.2.3 Coleta das amostras das soluções manipuladas na seção de pré-quimioterapia (HCl/INCa - Seção de Farmácia)

Foram coletadas com auxílio de material esterilizado amostras a partir de um total de 5 bolsas, 5 seringas e 5 equipos para infusão peridural (Figura 21) da solução analgésica de FENT 30 $\mu\text{g/mL}$, CLO 4 $\mu\text{g/mL}$ e ROP 100 $\mu\text{g/mL}$ com utilização de técnica asséptica, com controle de temperatura e umidade relativa do ar. Os testes do estudo de estabilidade foram realizados a partir de amostras coletadas logo após a manipulação (Tempo 1), e 24 horas depois da manipulação (Tempo 2) Todas as amostras foram submetidas ao ensaio de CLAE/DAD.

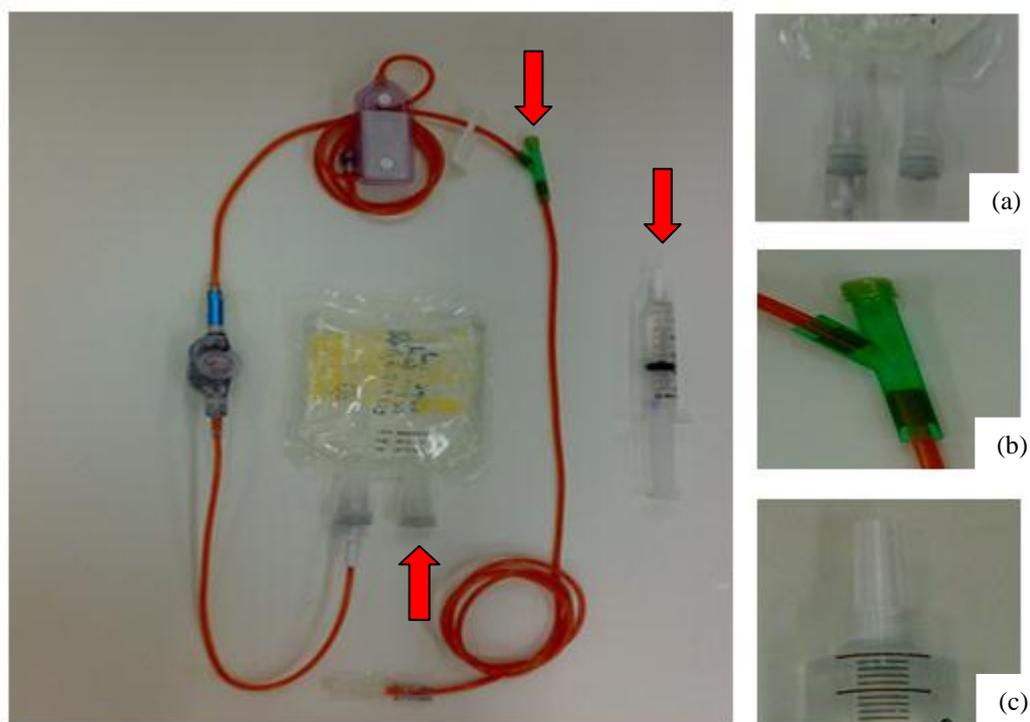


Figura 21. Figura da bolsa de infusão em sistema fechado acoplada a equipo de infusão peridural e seringa com solução analgésica (em detalhe, setas com indicação dos pontos de coleta). À direita, pontos de coleta: (a) bolsa de infusão, (b) equipo e (c) seringa

Fonte: Elaboração própria

3.3.2.4 Transporte das amostras

As 5 bolsas de infusão acopladas a equipo de infusão peridural e 5 seringas foram transportadas da Seção de Farmácia (HCl/INCa) para Instituto de Pesquisa Biomédicas do Hospital Naval Marsílio Dias. O transporte foi validado e realizado em caixa refratária, com controle de temperatura.

3.3.2.5 Validação do transporte

Para a validação do transporte foram utilizados dois blocos de gelo reutilizável acomodados em uma caixa refratária, com vinte bolsas de solução fisiológica de NaCl 0,9%, sem entrar em contato com estas. À caixa foi acoplado um termômetro digital de mínima e máxima. O sensor do termômetro foi posicionado próximo às bolsas, de forma a não entrar em contato com o gelo. A caixa foi fechada e lacrada com fita adesiva.

A caixa foi posicionada em um local que simulasse as condições de transporte. As temperaturas externa e interna foram monitoradas e registradas durante o período de 1 hora (tempo de transporte) em intervalos de 10 minutos em três dias aleatórios.

3.3.3 Ensaio para a determinação da estabilidade física e compatibilidade química

3.3.3.1 Apresentação das formulações farmacêuticas

As soluções injetáveis de FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl são límpidas, incolores e apresentadas na forma de ampola.

3.3.3.2 Preparo das bolsas de infusão

Foram preparadas 12 bolsas de infusão de 100 mL através da diluição dos fármacos em soro fisiológico 0,9%, a fim de obter as concentrações de FENT 5 µg/mL, CLO 1 µg/mL e ROP 2000 µg/mL (Tabela 9). Estas amostras foram acondicionadas sob refrigeração a 2-8°C, protegidas da luz.

3.3.3.3 Determinação de pH

O pH é definido como o valor dado por um potenciômetro adequado, propriamente padronizado capaz de reproduzir valores em 0,02 unidades de pH, usando como indicador um eletrodo de vidro sensível ao íon hidrogênio (H^+) e um eletrodo de referência adequado (USP, 2008).

Foi retirada em cabine de fluxo laminar, com auxílio de material estéril, uma alíquota de 25 mL de cada bolsa de solução analgésica em 4 tempos consecutivos de 0 h, 24 h, 48 h e 72h após o preparo das mesmas.

Para a medição de pH, foi utilizado o potenciômetro da marca DIGIMED[®], modelo DM-20, eletrodo DME-CV1, nas seguintes faixas de medição: pH= -2 a 20 e temperatura= -20 a 120 °C. Para cada dia de ensaio, foram utilizadas 3 bolsas e para cada bolsa e em cada tempo, foram realizadas 3 leituras.

Tabela 9. Dados referentes ao preparo das soluções de trabalho

<i>Dados da ampola</i>	<i>Fármacos</i>						Volume final (mL) ^(*)
	<i>(Concentração)</i>						
	FENT CIT (50 µg/mL)		CLO HCl (150 µg/mL)		ROP HCl (10000 µg/mL)		
(µL)	(µg)	(µL)	(µg)	(µL)	(µg)		
	25000,0	1250,0	1666,67	250,0	50000,0	500000,0	250,00
<i>Concentração final (µg/mL)</i>	5,0		1,0		2000,0		

^(*) Completado com solução fisiológica de NaCl a 0,9%.

Fonte: Elaboração própria

3.3.3.4 Transporte das amostras

As 12 bolsas de infusão foram transportadas da Seção de Farmácia (HCl/INCa) para Centro de Pesquisas/INCa. O transporte validado foi realizado em caixa refratária com controle de temperatura.

3.3.3.5 Teste de contagem de partículas microscópicas

Para este ensaio foi utilizado o volume restante de 225 mL de solução analgésica das 12 bolsas manipuladas. Para a determinação do branco, usou-se 50 mL de água deionizada para a filtração em cabine de fluxo laminar, com filtro HEPA, com o máximo de 100 partículas (0,5µm ou mais) por pé cúbico, para envolver a área onde a análise foi feita.

Aplicou-se o vácuo e retirou-se todo o volume de água do filtro. Removeu-se a membrana e a deixou em placa de Petri para secar. Após examinar a membrana com o uso de microscópio em um aumento de 100X, quando não foram encontradas mais de 20 partículas maiores ou iguais a 10 µm e mais de 5 partículas maiores ou iguais a 25 µm, o nível de partículas foi considerado adequado para a execução do ensaio.

Para a realização deste ensaio, foi necessário o controle de material particulado em todo o equipamento de filtragem e vidraria, através da utilização de solução de detergente à quente para lavagem, seguido de lavagem abundante com água ultrapura. Todo o ensaio foi realizado em cabine de fluxo laminar (USP-NF 2008).

Para cada dia de ensaio foram utilizadas três bolsas de solução analgésica de FENT CIT 5 µg/mL CLO HCl 1 µg/mL e ROP HCl 2000 µg/mL em bolsa de solução fisiológica de NaCl a 0,9% em sistema fechado de 225 mL manipuladas no serviço de quimioterapia da Seção de Farmácia do INCa/HCl. Para cada bolsa de solução analgésica, foram realizadas em cada dia de ensaio a filtração e a análise de 5 mL de água ultra-pura (branco) para o ensaio de contagem de partículas microscópicas. Este procedimento garante que o ambiente, vidraria e equipamentos estejam adequados, isto é, livre de partículas para a realização do ensaio (USP-NF 2008).

Para as soluções parenterais de grande volume com volume de 250 mL ou mais, menos de 10 unidades podem ser testadas. No presente ensaio, foram utilizadas 3 bolsas para cada tempo de ensaio (USP-NF 2008).

Foi utilizado microscópio binocular com combinação de objetiva e ocular que permitiu um aumento de $100 \pm 10x$, com capacidade de abranger filtro de membrana preto de 47 mm de éster de celulose, quadriculado e com porosidade de 0,8 µm. A objetiva e as oculares possuíam um aumento de 10x e a acromática planar, uma abertura de 0,25. Uma das oculares foi articulada a gráticula (Figura 22).

Foram utilizados dois iluminadores, um externo que permitiu a iluminação oblíqua de 10-20° e o outro interno ao microscópio.

O diâmetro circular da gráticula foi combinado à ocular e objetiva, de forma que o tamanho dos círculos estivesse em 2% do tamanho do plano.

Foi utilizado funil de vidro, acoplado a suporte, bomba de vácuo e frasco capaz de suportar pressão de 10-80 psi.

Foram utilizadas pinças de metal não afiadas para manipulação dos filtros de membrana.

Foi utilizado o procedimento de contagem parcial de partículas. Neste método, deve-se usar como referencial as linhas verticais da membrana e analisar toda a membrana sempre da direita para a esquerda, de forma que toda a membrana seja analisada, sem sobreposição de campos ou perda destes.



Figura 22. Figura de microscópio binocular acoplado à grátícula e iluminador
Fonte: Elaboração própria

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Os fármacos CLO, FENT e ROP são amplamente conhecidos na prática clínica hospitalar e utilizados no controle da dor pós-operatória.

Diversos métodos para identificação/quantificação por CLAE/DAD ou CLAE/UV em fluidos biológicos (ARVIDSSON & AKLUND, 1995; RIFAI *et al*, 2001) ou em ensaios de estabilidade, isolados ou em misturas com outros fármacos já foram desenvolvidos (WOLF & POKLIS, 2005).

Apesar da diversidade de métodos, não há nenhum desenvolvido para quantificar os fármacos do presente estudo em uma mesma solução, apesar do evidente sinergismo farmacológico, com já o descrito ganho terapêutico (FÖRSTER & ROSEMBERG, 2004).

A utilização como solução extemporânea (preparação com uso em até 48 horas após a manipulação) somente justifica-se se a formulação em questão for individualizada. Assim, as considerações sobre a estabilidade destes fármacos e sua avaliação físico-química são pontos críticos para a determinação do prazo de validade (BRASIL, 2007).

Durante o desenvolvimento da metodologia por CLAE/DAD foram testadas diversas combinações de fase móvel e colunas cromatográficas nas concentrações dos fármacos utilizados na bolsa de infusão, isto é, CLO HCl 1 µg/mL, ROP HCl 2000 µg/mL e FENT CIT 5 µg/mL.

Foram utilizadas durante a etapa inicial de desenvolvimentos as condições cromatográficas abaixo. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 10.

- a) fase estacionária: Supelcosil LC 18[®] 25 cm X 4,6mm, 5 µm
- b) faixa de comprimento de onda: 200-400 nm;
- c) fluxo de fase móvel: 1,0 mL/min;
- d) temperatura de compartimento de coluna: 40°C;
- e) volume de injeção: 40 µL;
- f) pré-lavagem da coluna por 30 minutos com ACN e TEA 0,2%;
- g) sistema de eluição isocrático.

Tabela 10. Condições cromatográficas iniciais no desenvolvimento da metodologia por CLAE/UV

Condições Cromatográficas						
Fase móvel: ACN: tampão NH₄OH 2 M /H₃PO₄ pH=2,6; Fase Estacionária: C18 25 cm X 4,6 mm, 5 µm; Volume de injeção: 40,0 µL; Fluxo: 0,6 mL; Comprimentos de onda: 210 e 254 nm						
Proporção (v/v/v)	Tampão (%)	MeOH (%)	ACN (%)	Tempo de Retenção (minutos)		
				CLO	ROP	FENT
1	60	0	40	(**)	2,70	(**)
2	50	0	50	4,60	4,00	2,60
3	20	0	80	2,70	(**)	(**)
Fase móvel: ACN: tampão NH₄OH 2 M /H₃PO₄ pH=2,6; Fase Estacionária: C18 25 cm X 4,6 mm, 5 µm; Volume de injeção: 40,0 µL; Fluxo: 0,8 mL; Comprimentos de onda: 210 e 254 nm						
Proporção (v/v/v)	Tampão (%)	MeOH (%)	ACN (%)	Tempo de Retenção (minutos)		
				CLO	ROP	FENT
4	20	0	80	2,40	(**)	(**)
Fase móvel: ACN: tampão NH₄OH 2 M /H₃PO₄ pH=2,6; Fase Estacionária: C18 25 cm X 4,6 mm, 5 µm; Volume de injeção: 40,0 µL; Fluxo: 0,8 mL; Comprimentos de onda: 210 e 254 nm						
Proporção (v/v/v)	Tampão (%)	MeOH (%)	ACN (%)	Tempo de Retenção (minutos)		
				CLO	ROP	FENT
5	90	0	10	2,40	(**)	4,60
Fase móvel: ACN: tampão Na₃PO₄ 1M /H₃PO₄ pH=3,0; Fase Estacionária: C18 25 cm X 4,6 mm, 5 µm; Volume de injeção: 40,0 µL; Fluxo: 0,8 mL; Comprimentos de onda: 210 e 254 nm						
Proporção (v/v/v)	Tampão (%)	MeOH (%)	ACN (%)	Tempo de Retenção (minutos)		
				CLO	ROP	FENT
6	70	0	30	4,70	(**)	(**)
Fase móvel: ACN: MeOH: tampão KH₂PO₄ 30 mM; Fase Estacionária: C18 25 cm X 4,6 mm, 5 µm; Volume de injeção: 40,0 µL; Fluxo: 0,8 mL; Comprimentos de onda: 210 e 254 nm						
Proporção (v/v/v)	Tampão (%)	MeOH (%)	ACN (%)	Tempo de Retenção (minutos)		
				CLO	ROP	FENT
7	65	17,5	17,5	(**)	(**)	(**)

(**) Não observado

Fonte: Elaboração própria

As condições cromatográficas descritas na tabela 10 não permitiram a separação dos fármacos do estudo. Devido ao pH ácido e à presença de grupos silanóis na superfície da

sílica, foi necessária a utilização da trietilamina 0,2% para promover a supressão destes grupos que possui interações secundárias com os grupamentos básicos da CLO e a escolha do tampão acetato/ácido acético pH=5,0 para minimizar a ionização dos fármacos, cuja variação de pH nas formas farmacêuticas encontra-se na faixa de 4,0-7,5; 4,0-7,0 e 4,0-6,0 (USP-NF, 2008) para FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl, respectivamente.

Na etapa de desenvolvimento do método a condição cromatográfica que permitiu uma melhor detecção e separação dos analitos foi a que se utilizou coluna Supelcosil LC 18[®] 25 cm X 4,6 mm, 5 µm. A fase móvel usada foi uma solução tampão de fosfato monobásico de sódio 0,1 M, TEA 0,2% e ácido fosfórico para ajuste de pH a 3,2:acetonitrila:metanol 68:16:16 (v/v) em um fluxo de 1mL/min. O volume de injeção foi de 40 µL a 40 °C, com detector em comprimento de onda de 210 nm para FENT e CLO e 254 nm para ROP. Nestas condições o tempo de corrida obtido foi de 35 minutos.

Com o método descrito anteriormente foram obtidos os seguintes tempos de retenção: 4,50, 13,00 e 28,00 minutos para CLO, ROP e FENT, respectivamente. Nesta fase foram utilizadas para os ensaios, as formas farmacêuticas disponíveis comercialmente e os padrões secundários disponíveis para o preparo de soluções com solução fisiológica de NaCl 0,9% dos fármacos isolados e em mistura. Foi também utilizada solução acondicionada em bolsas de PVC de 250 mL em sistema fechado de infusão. Todas as soluções foram feitas nas concentrações utilizadas para infusão peridural, a saber: 5 µg/mL, 1 µg/mL e 2000 µg/mL, para FENT CIT, CLO HCl E ROP HCl, respectivamente.

O tempo de corrida cromatográfica do método por CLAE/UV mostrou-se longo, o que compromete os tempos planejados para o estudo de estabilidade. Como o presente estudo propõe-se a determinar a estabilidade físico-química em 24 horas, o método não se aplicou a este objetivo, já que a análise das amostras ultrapassaria o tempo necessário para a realização do estudo

Outro aspecto a ser considerado é que durante o desenvolvimento deste método, foi observado através da análise da amostra acondicionada em bolsa de infusão um pico cromatográfico com retenção de 12 minutos não correspondente a nenhum dos fármacos do estudo quando analisadas as soluções preparadas a partir das ampolas e dos padrões secundários, isolados ou em mistura com NaCl 0,9% (Figura 23).

promoção de coeluição dos fármacos ROP e FENT, nas proporções descritas. Desta forma, a alta concentração da ROP 2000 µg/mL, acarretou em formação de pico cromatográfico assimétrico com cauda, impossibilitando a visualização do pico de FENT.

A partir destes resultados, foi necessário utilizar uma coluna de maior tamanho - coluna Kromasil[®] C18 250 mm X 4.6 mm, 5 µm, para a obtenção de maior tempo de corrida, sem prejuízo do estudo de estabilidade (Tabela 12).

Foi realizada também, a alteração da fase móvel para tampão fosfato/ácido fosfórico, ainda com lavagem prévia da coluna com TEA 0,2%, para não promover alteração nas formas ionizadas/não ionizadas dos fármacos em estudo.

Assim, as novas condições cromatográficas foram:

- a) fase móvel: tampão fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄) 5 mM/ ácido fosfórico (H₃PO₄) pH=5,0: MeOH: ACN;
- b) fase estacionária: coluna Kromasil[®] C18 250 mm X 4.6 mm, 5 µm
- c) faixa de comprimento de onda: 200-400 nm;
- d) fluxo de fase móvel: 1,0 mL/min;
- e) temperatura de compartimento de coluna: 40 °C;
- f) volume de injeção: 40 µL;
- g) pré-lavagem da coluna por 30 minutos com a mistura ACN/TEA 0,2%;
- h) Sistema de eluição isocrático.

Os resultados encontrados na tabela 12 mostram que apesar do uso de diferentes proporções da fase móvel, com obtenção de tempo de corrida satisfatório para o estudo de estabilidade estendida, há coeluição de FENT e ROP. Apesar de se ter alcançado diferenças de tempo de retenção maior do que dois minutos entre FENT e ROP, a alta concentração de ROP (400 vezes mais do que FENT) impede que os métodos desenvolvidos sejam aplicáveis ao estudo de estabilidade estendida.

A alta concentração da ROP proporcionou, dentro das condições cromatográficas testadas, um pico cromatográfico largo, com cauda e assimétrico, cujo tempo de retenção próximo ao FENT, impossibilitou a separação destes dois fármacos (Figura 24).

Tabela 11. Condições cromatográficas para otimização da metodologia por CLAE/DAD

Condições Cromatográficas						
Fase móvel: Tampão CH₃COONa 5 mM / CH₃COOH pH= 6,08; MeOH: ACN. Pré-lavagem com ACN/TEA 0,2% por 30 minutos; Fase Estacionária: C18 15 cm X 4,6 mm,5 µm; Volume de injeção: 40,0 µL; Fluxo: 1,0 mL; Faixa: 200 – 400 nm (210 e 254 nm)						
Proporção (v/v/v)	Tampão (%)	MeOH (%)	ACN (%)	Tempo de Retenção (minutos)		
				CLO	ROP	FENT
1	40	40	20	2,41	3,59	3,63 (*)
Fase móvel: Tampão CH₃COONa 5 mM / CH₃COOH pH= 5,00; MeOH: ACN. Pré-lavagem com ACN/TEA 0,2% por 30 minutos; Fase Estacionária: C18 15 cm X 4,6 mm,5 µm; Volume de injeção: 40,0 µL; Fluxo: 1,0 mL; Faixa: 200 – 400 nm (210 e 254 nm)						
Proporção (v/v/v)	Tampão (%)	MeOH (%)	ACN (%)	Tempo de Retenção (minutos)		
				CLO	ROP	FENT
2	40	40	20	2,03	6,76	7,89 (*)
3	40	35	25	2,25	9,67	12,65 (*)
4	55	25	20	1,70	4,43	5,65 (*)
5	55	27	18	1,70	4,59	5,97 (*)
6	55	29	16	1,67	4,83	
Fase móvel: Tampão CH₃COONa 5 mM / CH₃COOH pH= 5,00; MeOH: ACN. Pré-lavagem com ACN/TEA 0,2% por 30 minutos; Fase Estacionária: C18 15 cm X 4,6 mm,5 µm; Volume de injeção: 40,0 µL; Fluxo: 1,0 mL; Faixa: 200 – 400 nm (210 e 254 nm)						
Proporção (v/v/v)	Tampão (%)	MeOH (%)	ACN (%)	Tempo de Retenção (minutos)		
				CLO	ROP	FENT
7	55	35	5	(**)	6,37	6,68 (*)
8	60	35	5	3,31	(**)	(**)
9	55	30	15	3,80	15,00	16,00 (*)
10	55	27	18	(**)	13,84	15,43 (*)
11	50	40	10	(***)	(***)	(***)
12	55	32	13	(***)	14,00	16,00 (*)
13	70	0	30	(**)	(**)	4,31 e 14,30
14	40	30	30	3,00	(***)	1,47
15	45	25	35	3,00	(***)	1,40
16	10	10	80	2,06	2,33	2,45 (*)

(*) *Coeluição com ROP*; (**) *Não observado*; (***) *Não analisado*

Fonte: Elaboração própria

Tabela 12. Condições cromatográficas para otimização da metodologia por CLAE/DAD

<i>Condições Cromatográficas</i>						
Fase móvel: Tampão NaH ₂ PO ₄ 5 mM / H ₃ PO ₄ pH= 5,00: MeOH: ACN. Pré-lavagem com ACN/TEA 0,2% por 30 minutos; Fase Estacionária: C18 25 cm X 4,6 mm,5 µm; Volume de injeção: 40,0 µL; Fluxo: 1,0 mL; Faixa: 210-254 nm						
<i>Proporção</i> (v/v/v)	<i>Tampão</i> (%)	<i>MeOH</i> (%)	<i>ACN</i> (%)	<i>Tempo de Retenção</i> (minutos)		
				<i>CLO</i>	<i>ROP</i>	<i>FENT</i>
<i>1</i>	40	15	45	4,89	14,00	15,02 (*)
<i>2</i>	45	10	45	2,66	7,47	8,46 (*)
<i>3</i>	47	23	30	2,70	8,66	8,90 (*)
<i>4</i>	40	45	15	3,28	15,32	16,92 (*)
<i>5</i>	40	55	5	2,72	8,29	9,43 (*)
<i>6</i>	45	45	10	2,77	8,53	11,44 (*)
<i>7</i>	55	35	10	(**)	13,96	15,89 (*)
<i>8</i>	60	30	10	(**)	16,74	16,74 (*)

(*) *Coeluição com ROP*; (**) *Não observado*; (***) *Não analisado*

Fonte: Elaboração própria

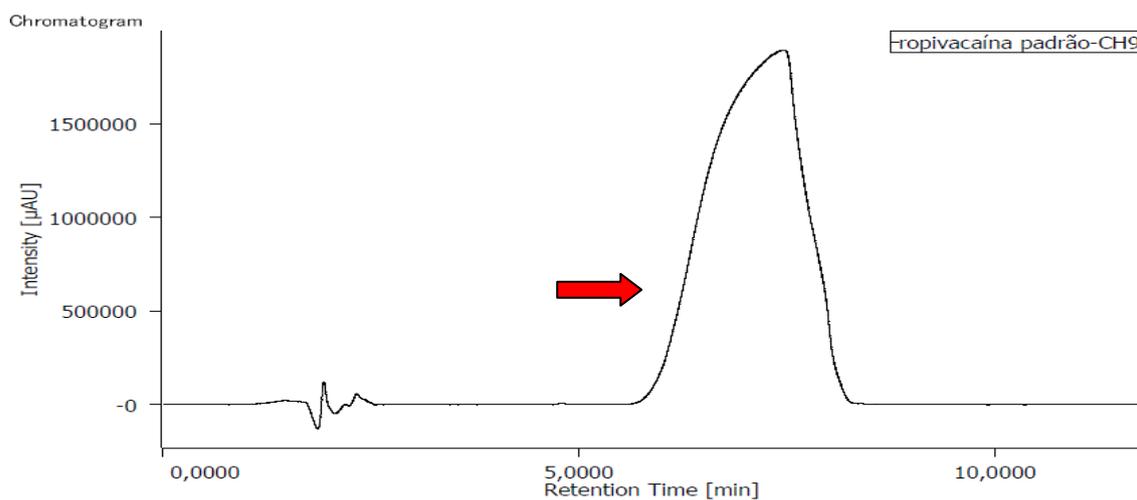


Figura 24. Cromatograma com pico de assimétrico de ropivacaína

Fonte: Elaboração própria

Foi utilizada como ferramenta para o cálculo de massa máxima de ROP a ser injetada a equação 3. Através dos cálculos abaixo, pode-se observar que a massa de ROP na concentração de 2000 µg/mL excede em muito o valor teórico de $W_{MÁX}$ (22,86 µg).

$$W_{MÁX} \sim 50(1 + k/k)^2 d_c^2 \text{ (Equação 3)}$$

$W_{MÁX}$: concentração/massa máxima, em microgramas;

k: fator de retenção;

d: diâmetro da coluna, em cm.

Como:

$$\text{Onde: } V_m \sim 0,5L d_c^2 \text{ (Equação 4)}$$

V_m : volume morto, em mL;

L: comprimento da coluna, em cm;

d: diâmetro da coluna, em cm.

Para a coluna utilizada (C18 25 cm X 4,6 mm, 5 μ m):

$$V_m = 0,5 \times 25 \times (0,46)^2 = 2,645 \text{ mL.}$$

$$\text{Como: } T_0 = V_m/F \text{ (Equação 5)}$$

T_0 : tempo de volume morto, em min;

V_m = volume morto;

F = fluxo da fase móvel.

Assim, para o método proposto:

$$T_0 = 2,645/1 = 2,645 \text{ min.}$$

$$\text{Como: } k = \frac{TR - T_0}{T_0} \text{ (Equação 6)}$$

K: fator de retenção (ou razão de distribuição de massas - D_m).

TR: tempo de retenção

T_0 : tempo de volume morto.

Como o valor de $W_{MÁX}$ é para cada componente da amostra, para tempo de retenção do fármaco ROP de 10,23 min, tem-se:

$$K = \frac{10,23 - 2,645}{2,645} = 2,134.$$

Assim:

$$W_{MÁX} \sim 50(1 + 2,134/2,134)^2 (0,46)^2 = 22,86 \text{ microgramas.}$$

A alternativa para a resolução deste problema foi diluir proporcionalmente todos os fármacos componentes da solução. No entanto, este procedimento ocasionou dentro das

condições experimentais estabelecidas, o comprometimento da detecção do FENT, que apresentou baixa relação sinal X ruído (menor do que 3), quando as injeções das amostras de fármacos foram realizadas individualmente em solução fisiológica de NaCl a 0,9%.

Apesar da perda de separação proporcionada pela alta concentração de ROP, foi observado que os tempos de retenção dos três fármacos eram satisfatórios quando a corrida cromatográfica era realizada com os padrões secundários dos fármacos isolados.

Para proporcionar então, a identificação e quantificação dos fármacos, foram modificadas as concentrações de CLO HCl e FENT CIT, que foram aumentadas para 4 µg/mL e 30 µg/mL, respectivamente. A concentração de ROP HCl, no entanto, foi diminuída para 100 µg/mL.

A concentração da formulação em uma solução ideal pode condicionar a velocidade de reação, que é diretamente proporcional à concentração do princípio ativo. Assim, o aumento ou a diminuição das concentrações pode direcionar o tipo de degradação que irá ocorrer (hidrólise, fotólise, oxidação) (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007).

O aumento das concentrações de CLO HCl e FENT CIT proporcionou maior possibilidade de uma possível reação de degradação com a ROP, cuja concentração permanece alta, sem prejuízo do estudo de estabilidade estendida.

Para a determinação das melhores condições cromatográficas, foram verificados parâmetros cromatográficos em CLAE/UV e/ou em CLAE/DAD, anteriormente estudados para a separação e quantificação.

Assim, os parâmetros cromatográficos finais definidos para o método CLAE/DAD para separação e quantificação de CLO HCl 4 µg/ml, ROP HCl 100 µg/ml e FENT CIT 30 µg/ml foram:

- a) fase móvel: tampão acetato 5 mM/ ácido acético pH=5,0: metanol: acetonitrila (45:45:10 v/v/v);
- b) comprimento de onda: 210 nm;
- c) fluxo de fase móvel: 1,0 mL/min;
- d) temperatura de compartimento de coluna: 40 °C;
- e) volume de injeção: 40 µL
- f) pré-lavagem da coluna por 30 minutos com ACN/TEA 0,2%.
- g) sistema de eluição isocrático.

A mistura CLO, FENT e ROP utilizada em infusão epidural lombar contínua, aumenta a analgesia, com melhora da qualidade do manejo da dor (FORSTER & ROSENBERG, 2004). Apesar disto, os métodos descritos em literatura por CLAE/UV ou CLAE/DAD não

contemplam a identificação/quantificação dos três fármacos na mesma solução, como a descrita associação ROP e FENT ou ROP e CLO (SVEDBERG, MCKENZIE, LARRIVEE-ELKINS, 2002). Para determinar a estabilidade das preparações de FENT X ROP por CLAE/UV, Hartmann e colaboradores utilizaram o comprimento de onda de 210 nm, fase móvel foi acetonitrila: tampão fosfato 0,05 M, pH 4,6 (30:70) e a fase estacionária coluna LiChrospher 60 RP-select-B (250 X 4 mm, 5µm) (2003).

Outros métodos abrangem a identificação/quantificação de ROP, FENT e/ou CLO com outros fármacos. A metodologia por CLAE/UV desenvolvida por Wolf e Poklis para análise de misturas analgésica utilizadas em procedimentos cirúrgicos e sistemas de analgesia controlada pelo paciente apresentou um tempo de corrida superior a 20 minutos. Com este método foi possível promover a separação de hidromorfona 13 mg/mL, CLO 1 mg/mL e bupivacaína 3,3% e FENT 10 µg/mL e bupivacaína 0,08% (2005). Para a determinação de ROP e bupivacaína em mistura analgésica com tramadol e metamizol, foi usada a técnica de CLAE/DAD, que ofereceu mais vantagens, comparada à utilização de um detector UV, pois permitiu determinar a pureza do pico cromatográfico pelo escaneamento do espectro e o comprimento máximo de absorção (SALMERÓN-GARCÍA *et al*, 2009).

O método desenvolvido por CLAE/DAD neste trabalho aplica-se à mistura analgésica CLO 4 µg/mL, ROP HCl 100 µg/mL e FENT CIT 30 µg/mL. O tempo de corrida obtido (12 minutos) favoreceu a aplicabilidade para o estudo de estabilidade estendida e mostrou-se adequado para a separação dos três fármacos.

Os parâmetros cromatográficos obtidos estão descritos na tabela 13. Os tempos de retenção (TR) obtidos para FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl foram 10,23, 2,67 e 8,29, respectivamente. Todos os fármacos apresentaram índice de pureza de pico de 100%. Os valores de assimetria obtidos, relacionados à eficiência cromatográfica, para FENT e CLO (1,0355 e 1,4980) foram satisfatórios. Segundo Snyder e colaboradores, o intervalo aceitável de assimetria é de 0,95-1,30, sendo admitidos valores de até 1.5 (1988). O valor de assimetria obtido para a ROP (0,8810) ficou abaixo do valor inferior preconizado, provavelmente, por ainda se tratar de uma grande massa injetada. No entanto, todos os valores estão abaixo de 2. O número de pratos teóricos para cada fármaco FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl (8655, 6319 e 5219) encontra-se acima de 2000 (US FDA, 1994).

O baixo valor de D_m para o fármaco CLO (abaixo de 2) demonstra a baixa resolução do pico cromatográfico. No entanto, foi obtida a total separação entre os fármacos, com seletividade do método e sem prejuízo cromatográfico no procedimento de validação, uma vez que o pico foi facilmente reconhecido e integrado automaticamente pelo programa

acoplado ao cromatógrafo. Os valores de D_m dos fármacos FENT e ROP encontram-se dentro dos parâmetros recomendados (SNYDER, GLAJCH, KIRKLAND, 1988; US FDA, 1994), o que demonstra a eficácia na mudança de concentração dos fármacos durante o desenvolvimento metodológico.

Tabela 13. Parâmetros cromatográficos obtidos para o método desenvolvido por CLAE/DAD

Parâmetros cromatográficos	FENT CIT	CLO HCl	ROP HCl
Tempo de retenção (TR) (min)	10,23	2,67	8,29
Número de pratos teóricos	8655	6319	5219
Fator de assimetria	1.0355	1,4980	0,8810
Índice de pureza de pico	100,0%	100,0 %	100,0%
Razão de distribuição de massas (D_m)	4,1476	0,3429	3,1713

Fonte: Elaboração própria

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.2.1 Determinação da especificidade

Devido à indisponibilidade de padrões de impurezas ou produtos de degradação, foi realizado ensaio de degradação a fim de comparar os TR de 2,658, 8,283 e 10,197 minutos para CLO HCl, ROP HCl e FENT CIT, respectivamente, com os TR de compostos obtidos de amostras armazenadas sob condições de estresse.

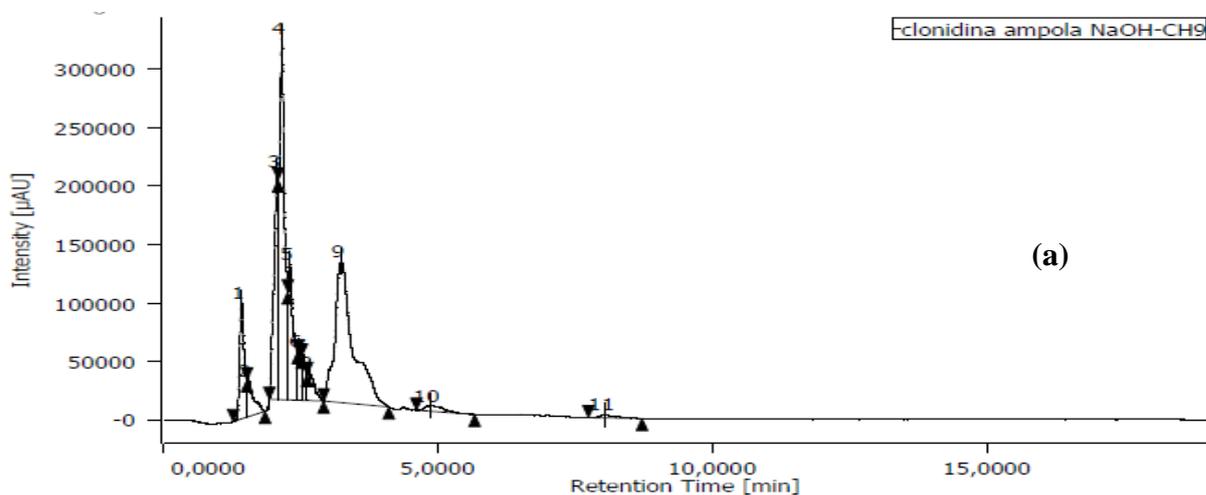
Estão descritos na tabela 14 os tempos de retenção encontrados para possíveis, impurezas, contaminantes e produtos de degradação para as soluções dos fármacos isolados e em mistura em NaCl a 0,9%, deste estudo. Não foi possível realizar o ensaio de oxidação das soluções analgésicas preparadas a partir das ampolas e do padrão secundário devido à perda das respectivas amostras durante o ensaio de degradação.

Tabela 14. Resultado do ensaio de degradação forçada para as soluções dos fármacos isolados e em mistura preparadas a partir do padrão e da ampola

Condição de Degradação	Tempo de retenção dos produtos de degradação (min)				
	NaCl 0,9%	FENT	CLO	ROP	Solução Analgésica
Ácida (padrão) HCl 1 N, 90 °C, 12 h	1,482	1,415	1,438; 4,798	1,468; 4,845; 9,010	1,452; 4,930; 7,648
Ácida (ampola) HCl 1 N, 90 °C, 12 h		4,840	1,438; 4,798	4,338; 4,872	1,448; 2,952; 4,748
Básica (padrão) NaOH 1 N, 90°C, 12 h	1,400; 4,910	1,563; 4,895	1,405; 4,892	1,408; 5,590, 6,718	1,448; 4,953
Básica (ampola) NaOH 1 N, 90 °C, 12 h		1,563; 4,895	1,440; 4,868; 8,045	1,457; 4,852; 6,985	1,448; 4,940; 8,040
Oxidativa (padrão) H ₂ O ₂ 3%, temperatura ambiente, 12 h	4,907	1,662; 4,910	4,902; 16,398	1,793; 3,768; 4,460; 6,857; 15,905; 18,180	Perda de amostra
Oxidativa (ampola) H ₂ O ₂ 3%, temperatura ambiente, 12 h		1,812; 4,850	1,472; 4,852	1,507; 4,858; 6,492; 8,430; 15,585; 16,185; 18,050	Perda de amostra

Fonte: Elaboração própria

A partir dos resultados obtidos (Tabela 14), observa-se que nas condições descritas, não foi observada eluição de pico cromatográfico nos TR correspondentes aos fármacos do estudo, isto é, 2,6683, 8,2883 e 10,2283 minutos. Nas figuras 25a, 25b e 25c estão exemplos de cromatogramas obtidos sob condições de estresse.



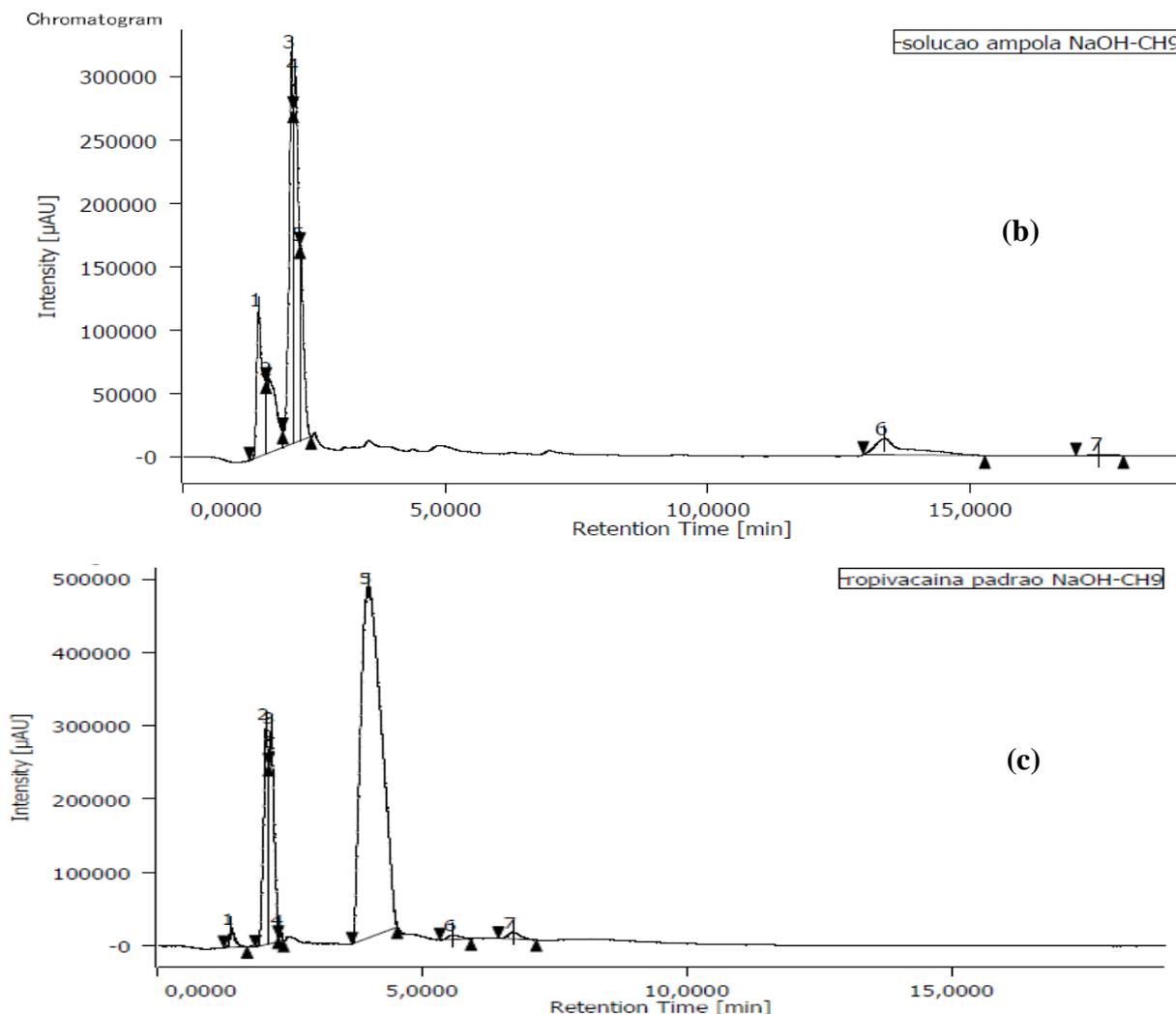


Figura 25. Cromatogramas exemplificando a degradação das soluções preparadas a partir das ampolas e do padrão secundário em meio alcalino: (a) clonidina; (b) solução analgésica e (c) ropivacaína
Fonte: Elaboração própria

O teste de pureza também foi utilizado para demonstrar a especificidade do pico cromatográfico. Na figura 26 podem ser observados os gráficos de pureza de pico para cada CLO, ROP e FENT, respectivamente, obtidos através do detector MD-2018. Para todos os fármacos foram observados com alta sensibilidade e resolução valores de 100% de alta pureza de pico. Os resultados foram obtidos através de um sistema óptico otimizado e com utilização de circuitos com processamento redesenhados (JASCO BRASIL[®], 2012).

Quando comparados, os TR dos picos cromatográficos de cada fármaco separadamente, em solução preparados a partir das ampolas e do padrão; os resultados demonstram similaridade entre os TR obtidos, confirmados pelas injeções realizadas no

estudo de estabilidade estendida, através do doseamento dos fármacos em bolsa, seringa e equipo de infusão.

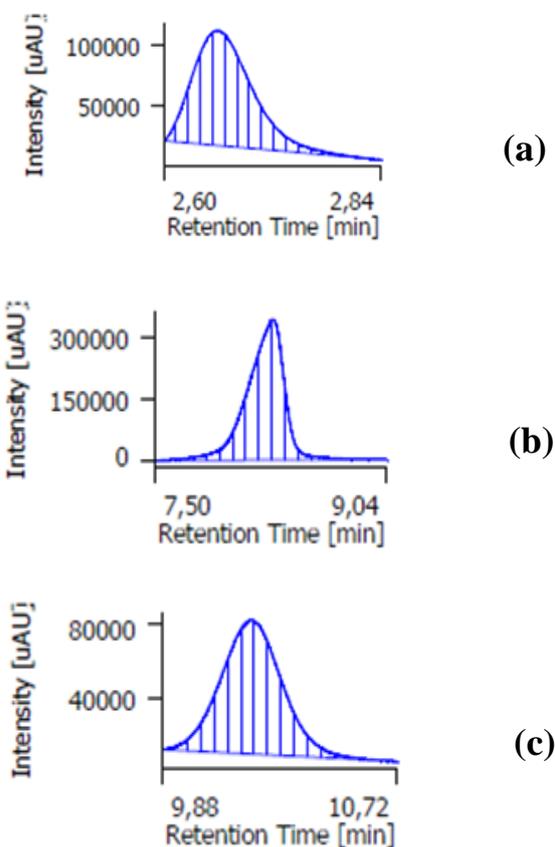
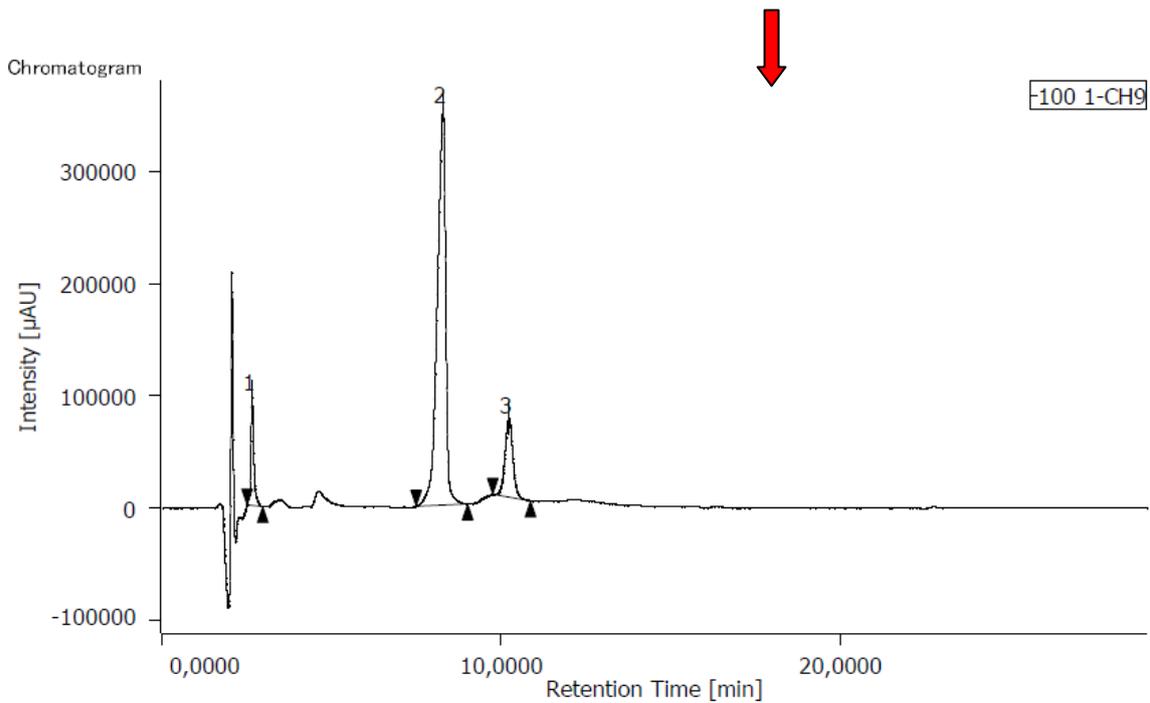
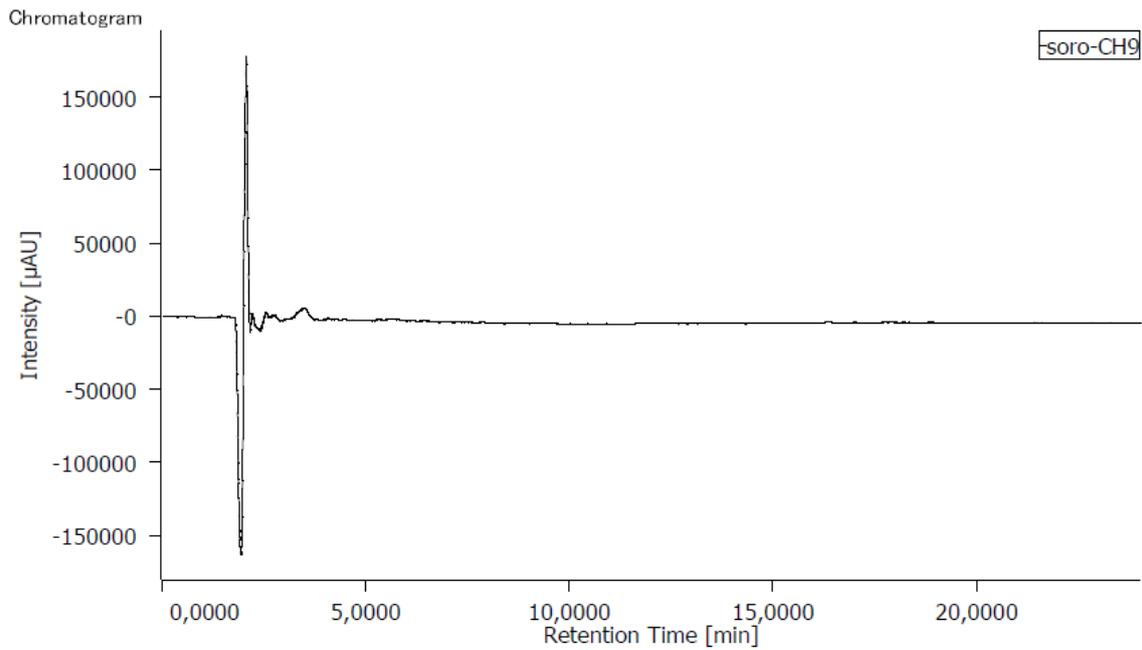


Figura 26. Determinação da pureza para CLO HCl (a), ROP HCl (b) e FENT CIT (c)
 Fonte: Elaboração própria

Para o fármaco citrato de fentanila (solução preparada a partir da ampola), no entanto, foi observada a presença de um pico cromatográfico adicional, que não fora observado na injeção do padrão do fármaco (Figura 27b- detalhe), o que pode ser atribuído a produtos de degradação e/ou impurezas (GARG *et al*, 2010) ou excipientes da ampola (ácido cítrico, citrato de sódio) (FENTANEST[®], 201?). Não é objeto deste estudo identificar as estruturas dos excipientes das formulações comercialmente disponíveis. No entanto, é fundamental demonstrar que o método desenvolvido é seletivo, sem prejuízo na separação e quantificação dos fármacos constituintes.

As figuras 27 (a, b, c e d) representam: o cromatograma da solução fisiológica de NaCl 0,9% a 210 nm (a), o cromatograma da solução analgésica em NaCl 0,9% a 210 nm, com detalhe da eluição da solução de FENT CIT (b), o mapa de contorno da solução

analgésica em NaCl 0,9% a 210 nm (c) e a varredura do espectro em 3D (d) para demonstração geral de toda a amostra na faixa de 200-400 nm, com a separação dos fármacos CLO HCl (1), ROP HCl (2) e FENT CIT (3). A utilização destes ensaios constitui uma ferramenta útil para confirmar se o pico cromatográfico obtido é atribuído a somente um componente da solução analgésica (BRASIL, 2003b).



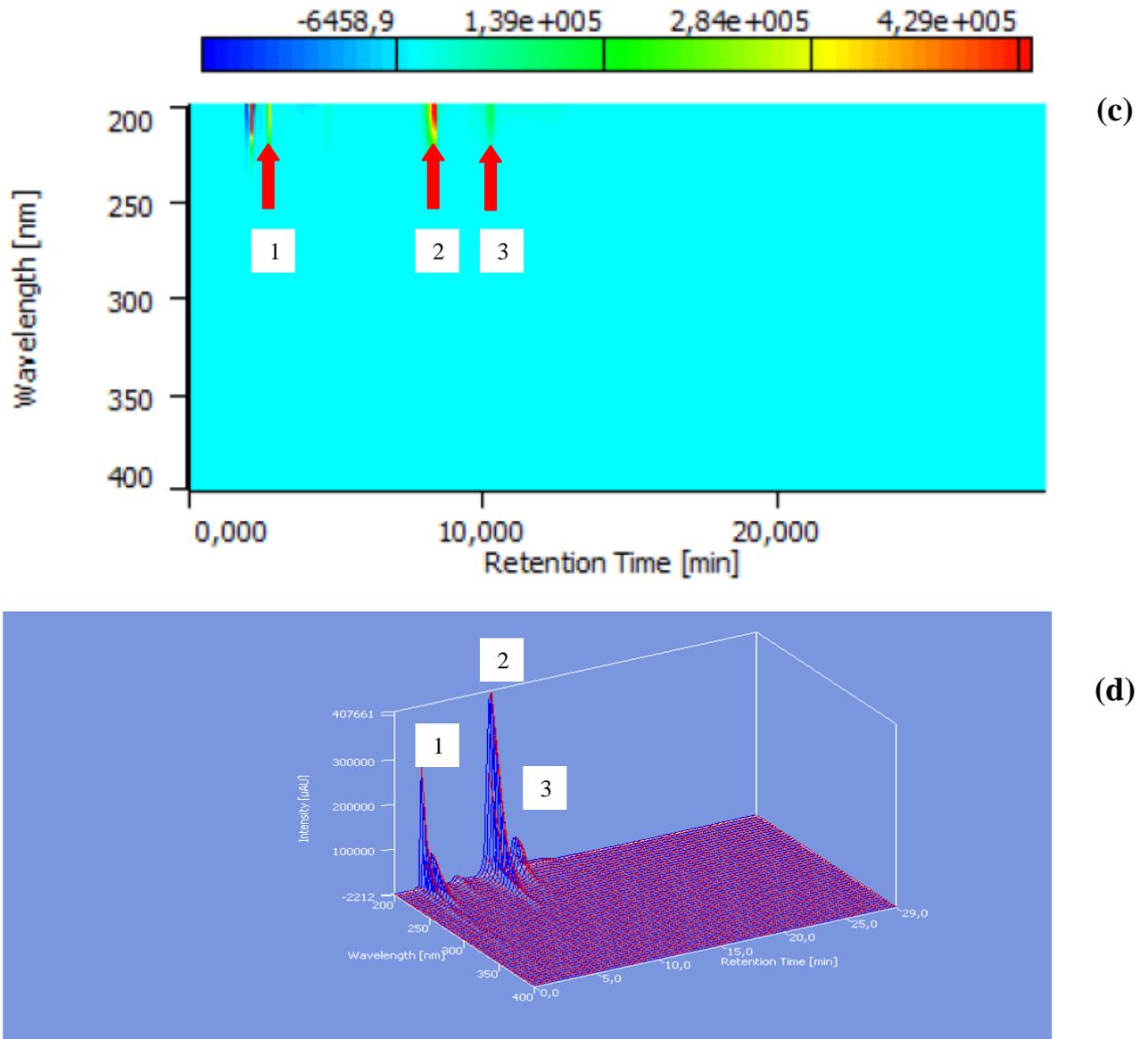


Figura 27. Cromatograma soro fisiológico (a), cromatograma solução analgésica (b) mapa de contorno (c) e espectro de varredura em 3D (d) referentes aos fármacos: CLO HCl (1), ROP HCl (2) e FENT CIT (3)

Fonte: Elaboração própria

4.2.2 Determinação da linearidade

Para a quantificação do analito na forma farmacêutica, foi realizada a análise de uma curva de calibração no intervalo de 80%-120% da concentração teórica dos três analitos, através da determinação de cinco níveis de concentração, correspondentes aos pontos 80, 90, 100, 110 e 120%, respectivamente:

- 1) CLO HCl 3,20 $\mu\text{g/mL}$, FENT CIT 24,00 $\mu\text{g/mL}$ e ROP HCl 80,00 $\mu\text{g/mL}$;
- 2) CLO HCl 3,60 $\mu\text{g/mL}$, FENT CIT 27,00 $\mu\text{g/mL}$ e ROP HCl 90,00 $\mu\text{g/mL}$;
- 3) CLO HCl 4,00 $\mu\text{g/mL}$, FENT CIT 30,00 $\mu\text{g/mL}$ e ROP HCl 100,00 $\mu\text{g/mL}$;

4) CLO HCl 4,40 µg/mL, FENT CIT 33,00 µg/mL e ROP HCl 110,00 µg/mL;

5) CLO HCl 4,80 µg/mL, FENT CIT 36,00 µg/mL e ROP HCl 120,00 µg/mL;

Através dos dados obtidos foi possível estabelecer o coeficiente de correlação (r) da curva de calibração para cada fármaco componente da mistura, para cada dia de validação. Na tabela 15 observa-se que o coeficiente de correlação foi superior a 0,99 (BRASIL, 2003b) para os três fármacos do estudo e a metodologia analítica manteve-se linear dentro do intervalo de 80% a 120%.

Tabela 15. Média dos parâmetros de linearidade do método analítico obtidos nos três dias de validação

Parâmetros de linearidade	CLO Média ± DP	ROP Média ± DP	FENT Média ± DP
Coefficiente angular (a)	156682,3 ± 23995,93	55912,67 ± 3612,837	34245,57 ± 742,6613
Coefficiente linear (b)	2457,943 ± 13543,75	-13425,4 ± 32697,99	-18155,2 ± 15754,53
Coefficiente de correlação (r)	0,994457 ± 0,001381	0,993297 ± 0,002328	0,991658 ± 0,000207

DP: desvio padrão

Fonte: Elaboração própria

4.2.3 Determinação da exatidão e da precisão

Foi feita a quantificação de três réplicas verdadeiras de controle de qualidade de baixa concentração – CQB (3,4 µg/mL para CLO HCl, 25,5 µg/mL para FENT CIT e 85,0 µg/mL para ROP HCl); controle de qualidade de média concentração – CQM (3,8 µg/mL para CLO HCl, 28,5 µg/mL para FENT CIT e 95,0 µg/mL para ROP HCl) e controle de qualidade de alta concentração – CQA (4,6 µg/mL para CLO HCl, 38,5 µg/mL para FENT CIT e 115,0 µg/mL para ROP HCl). Os controles de qualidade CQB, CQM e CQA correspondem respectivamente a 85, 95 e 115% da concentração nominal.

As médias dos resultados da exatidão e precisão inter-ensaio e intra-ensaio encontram-se, respectivamente nas tabelas 15 e 16:

Para a determinação da exatidão inter e intra-ensaio, a metodologia analítica proposta foi aplicada a um padrão de referência de pureza conhecida. A exatidão foi calculada através da diferença percentual entre as médias das concentrações obtidas e o valor verdadeiro, acrescidas dos intervalos de confiança (BRASIL, 2003b).

Observa-se (tabelas 16 e 17) que os valores de exatidão intra e inter-ensaio não foram superiores a 5%, para os três dias de validação para os CQB, CQM e CQA.

A precisão do método inter-ensaio (repetibilidade) e intra-ensaio (precisão intermediária) foram obtidas através do cálculo do DPR da série de medidas obtidas nos três dias de validação para os CQ. Pode ser observado nas tabelas 15 e 16, que os valores de DPR para os três fármacos não foram superiores ao valor máximo aceitável de 5% (BRASIL, 2003b), de acordo com a metodologia empregada.

Tabela 16. Resultados de exatidão e precisão inter-ensaio

Fármacos	Concentrações nominais (µg/mL)	Média das concentrações (DP)	Exatidão inter- ensaio (%)	Precisão inter- ensaio (%)
CLONIDINA	3,4	3,36 (0,09)	98,82	2,70
	3,8	3,83 (0,14)	100,79	3,55
	4,6	4,59 (0,08)	99,78	1,73
FENTANILA	25,5	25,17 (0,74)	98,71	2,93
	28,5	27,83 (0,97)	97,65	3,50
	34,5	33,72 (0,85)	97,74	2,53
ROPIVACAÍNA	85	83,86 (3,65)	98,66	4,36
	95	96,06 (2,82)	101,12	2,93
	115	115,54 (3,57)	100,37	3,00

n=9; DP: desvio padrão relativo

Fonte: Elaboração própria

A susceptibilidade do método às variações analíticas foi determinada através da variação da temperatura (35°C) e fluxo da fase móvel (0,8 mL/min).

Foram calculadas a exatidão e a precisão para os três fármacos. Os resultados do ensaio de robustez obtidos na tabela 18 mostram que o método é robusto à variações nas condições dos parâmetros analíticos, cujos valores não foram superiores a 5%.

A análise das amostras armazenadas em bandeja (estabilidade de curta duração) por 10 horas demonstrou que os fármacos permanecem estáveis durante o período de corrida proposto para o ensaio de estabilidade estendida. Os resultados (tabela 18) demonstram que os valores de exatidão e precisão obtidos não ultrapassam uma variação acima de 5%.

Tabela 17. Resultados de exatidão e precisão intra-ensaio

Fármacos	Concentrações nominais (µg/mL)	Média das concentrações (µg/mL) (DP)	Exatidão intra-ensaio (%)			Precisão intra-ensaio (%)		
			Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
CLO	3,4	3,36 (0,09)	96,62	97,77	101,90	0,46	2,54	1,42
	3,8	3,83 (0,14)	96,84	103,57	101,97	0,00	2,87	0,00
	4,6	4,59 (0,08)	101,09	100,37	97,90	0,49	0,46	1,74
FENT	25,5	25,17 (0,74)	99,75	95,44	100,95	2,05	2,49	2,23
	28,5	27,83 (0,97)	94,51	101,32	97,07	0,00	4,20	0
	34,5	33,72 (0,85)	94,95	98,61	99,67	0,00	2,03	0,00
ROP	85	83,86 (3,65)	95,20	97,30	103,47	1,89	0,52	1,34
	95	96,06 (2,82)	97,72	103,24	102,38	0,00	2,46	0,00
	115	115,54 (3,57)	96,91	102,57	101,93	2,17	4,83	0,39

n=9; DP: desvio padrão

Fonte: Elaboração própria

4.2.4 Determinação da robustez e da estabilidade de curta duração

Tabela 18. Resultados do ensaio de robustez e estabilidade de curta duração

Condições	CLO	
	Exatidão (%)	Precisão (%)
Temperatura 35°C	102,92	0,09
Fluxo 0,8 mL/min	98,13	1,81
Estabilidade na bandeja	96,49	3,07
	FENT	
Temperatura 35°C	98,13	3,94
Fluxo 0,8 mL/min	105,00	4,49
Estabilidade na bandeja	96,95	4,84
	ROP	
Temperatura 35°C	104,26	2,56
Fluxo 0,8 mL/min	101,89	0,01
Estabilidade na bandeja	95,00	1,60

n=3; Fonte: Elaboração própria

Os resultados dos parâmetros cromatográficos estão concernentes com os critérios de aceitabilidade para a validação de métodos analíticos proposto pelo Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bionalíticos (BRASIL, 2003b). Portanto, o mesmo mostrou-se apropriado para a determinação quantitativa dos fármacos FENT, CLO e ROP no estudo de estabilidade estendida.

4.3 VALIDAÇÃO DO TRANSPORTE DAS AMOSTRAS DE SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

A fim de garantir a integridade dos medicamentos, sua qualidade e identidade, o transporte destes deve ser realizado dentro de critérios adequados, principalmente quando se trata de medicamentos termolábeis, que devem ser transportados em caixas térmicas com controle de temperatura (BRASIL, 2007).

Durante o processo de degradação, as reações químicas envolvidas constituem um processo endotérmico, que podem, portanto, ser desencadeadas pelo aumento de temperatura (EV, 2003). A validação do transporte da solução analgésica, como parte do estudo de estabilidade estendida, objetiva mimetizar as condições de transporte e assegurar dentro das mesmas o teor e a integridade da formulação farmacêutica.

O tempo determinado para a validação do transporte equivale ao dobro de tempo necessário para o transporte das bolsas e seringas da solução analgésica da Seção de Farmácia ao Instituto de Pesquisa Biomédicas do Hospital Naval Marsílio Dias (IPB/HNMD). Assim, as temperaturas externas e internas foram monitoradas durante o período de transporte de 1 hora em intervalos de 10 minutos em três dias aleatórios (Tabela 19).

De acordo com as orientações do fabricante das ampolas que serão utilizadas para o preparo das bolsas de infusão e seringas da solução analgésica, a faixa de temperatura de armazenamento para o FENT CIT e CLO HCl é 15-30°C e para o ROP HCl é 15-25°C (FENTANEST[®], CLONIDIN[®], ROPI[®], 2008).

Foi realizada análise estatística das temperaturas máxima e mínima através de ANOVA (análise de variância), com aplicação do teste F de Snedecor. Quando significativo, ao seu valor foi aplicado o teste de Bonferroni. O delineamento experimental foi em blocos casualizados. Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Através desta análise pode ser verificado que as temperaturas máximas são significativamente diferentes ($p = 0,004$), o que pode ser explicado pelas diferenças de temperatura máxima entre os dias de ensaio. A validação da temperatura durante o transporte foi conduzida de modo a

reproduzir as condições reais e verificar se equipamentos, sistemas e participantes envolvidos atendem efetivamente o fluxo do medicamento (ZIANCE, CHANDLER, BISHARA, 2009). Foi verificado que não houve diferenças significativas entre as temperaturas mínimas registradas ($p=0,08$) e as temperaturas internas (\pm desvio padrão) mantiveram-se abaixo de 25 °C (temperatura ambiente) - 20,9 ($\pm 0,076$), 18,0 ($\pm 0,526$) e 17,6 °C - em todas as etapas da validação.

Tabela 19. Registros de temperatura máxima e mínima durante a validação do transporte

Dias	1		2		3	
Tempo (minutos)	Temperatura máxima (externa) (°C)	Temperatura mínima (interna) (°C)	Temperatura máxima (externa) (°C)	Temperatura mínima (interna) (°C)	Temperatura máxima (externa) (°C)	Temperatura mínima (interna) (°C)
0	24,1	20,8	22,7	17,6	31,3	17,3
10	23,8	20,8	23,1	17,6	45,0	17,4
20	23,8	20,8	23,5	17,7	50,0	17,6
30	23,8	20,9	24,5	17,7	52,8	17,7
40	24,0	21,0	27,6	18,0	52,0	17,7
50	23,1	20,9	41,7	18,4	48,9	17,8
60	22,4	20,9	48,1	19,0	47,2	17,8
Temperatura média (\pm DP) (°C)	23,6 ($\pm 0,607$)	20,9 ($\pm 0,076$)	30,2 ($\pm 10,355$)	18,0 ($\pm 0,526$)	46,7 ($\pm 7,318$)	17,6 ($\pm 0,195$)

DP: desvio padrão

Fonte: Elaboração própria

4.4 ENSAIO DE CONTAGEM DE PARTÍCULAS

As especialidades farmacêuticas que são utilizadas no preparo de formulações estéreis devem ser inspecionadas visualmente para a verificação da presença de material particulado (BRASIL, 2006).

Para a determinação de material particulado em soluções injetáveis, como partículas móveis insolúveis ou bolhas de gás, pode ser realizado o teste de contagem de partículas microscópicas (USP-NF 2008).

Este teste pode ser aplicado tanto para soluções de pequeno volume quanto para as de grande volume. Através deste ensaio, é possível especificar nos produtos a presença de material particulado, sólido e não visível sem instrumentação óptica em um determinado volume depois de coletado em filtro *micropore*. Algumas partículas não podem ser avaliadas

na ausência de luz. Esse ensaio não se propõe a verificar o tamanho ou o número de partículas amorfas, semi-líquidas ou materiais morfológicamente indistintos com aspecto no filtro, de mancha ou descoloração. Estes materiais mostram pouco ou nenhum relevo em sua superfície e apresentam o aspecto gelatinoso ou de filme. Desde que esteja em solução, este material consiste em unidades de 1 μm ou menos de tamanho, que podem ser contadas depois de deformação e agregação em membrana analítica (USP-NF 2008).

Os resultados encontram-se na tabela 20. Durante a execução do ensaio de contagem de partículas em diferentes tempos (0, 24, 48 e 72 horas após a manipulação) realizado através do método de contagem de partículas microscópicas (USP-NF, 2008), não foi observada a presença de nenhuma partícula móvel não dissolvida de tamanho maior ou igual a 10 e 25 micra.

No segundo dia de ensaio (24 horas após a manipulação), foi observada a presença de material amorfo. No entanto, este ensaio não se propõe a verificar o tamanho ou número de partículas amorfas, semi-líquidas ou materiais morfológicamente indistintos com aspecto de filtro, mancha ou descoloração (USP-NF, 2008).

Tabela 20. Resultados obtidos para ensaio de partículas microscópicas

Tempo (h)	Placa	Número de partículas	Tamanho de partículas (μm)
0	1 (branco)	0	-
	2	1	6 (*)
	3	0	-
	4	0	-
24	1 (branco)	0	-
	2	1	30 (*)
	3	0	-
	4	1	30 (*)
48	1 (branco)	0	-
	2	0	-
	3	0	-
	4	0	-
72	1 (branco)	0	-
	2	0	-
	3	0	-
	4	0	-

(*) Partículas de aspecto amorfo.

Fonte: Elaboração própria

Na literatura estão descritos diversos métodos para a determinação de material particulado, desde a utilização de estereomicroscopia a inspeção visual. Para a análise da

aparência antes do ensaio de estabilidade de soluções analgésicas: ROP X sulfato de morfina; ROP X citrato de sufentanila; ROP x FENT CIT e ROP x CLO HCl, Svedberg, Mckenzie e Larrivee-Elkins utilizaram um estereomicroscópio no período de 0 – 30 dias (tempos 0, 7, 14 e 30 dias) após a manipulação destas soluções. Não foram observados durante todo o período do estudo, de acordo com os resultados descritos, sinais de precipitação, formação de gás ou névoa nas concentrações de ROP (1 mg/mL e 2 mg/mL) e em todas as combinações descritas (2002). Para executar a inspeção visual de soluções de FENT 5 µg/mL em solução fisiológica de NaCl em seringas de polipropileno, foi utilizada uma caixa de inspeção para soluções intravenosas, nos intervalos de tempo de 30, 60 e 90 dias. Durante todo o período, as soluções mostraram-se livres de material particulado (McCLUSKEY *et al.*, 2009).

Estudos relacionados à presença de material particulado dos fármacos do estudo com outros fármacos estão descritos. Dados relativos à estabilidade da CLO associada a outros fármacos demonstram a presença de material particulado de tamanho maior ou igual a 10 e 25 micra nas misturas de: 1. 50 mg de sulfato de morfina, 24 mg de bupivacaína e 2 mg de CLO HCl e 2. 50 mg de hidromorfona, 24 mg de bupivacaína e 2 mg de CLO HCl em todo o período do estudo de estabilidade (0-90 dias) (BIANCHI, GINGGEN, TARDY, 2008). A CLO quando associada ao fármaco baclofeno, nas concentrações 200 µg/mL e 1000 µg/mL, respectivamente a 37 °C não apresentou nenhum sinal de precipitação ou turbidez por um período de mais de 10 semanas (GODWIN, KIM, ZUNIGA, 2001). Não foi também observada visualmente nenhuma precipitação destes fármacos por um período de 16 semanas (ALVAREZ *et al.*, 2004). E quando associada na concentração de 0,1 mg/mL a esteróides (dexametasona 4 mg/mL, betametasona 6 mg/mL ou triancinolona 40 mg/mL na proporção 1:1), a CLO não contribuiu para agregação ou para o aumento de tamanho de partículas destes fármacos (GAZELKA *et al.*, 2012).

Através do método de contagem parcial de partículas, a mistura FENT, ROP e CLO em NaCl 0,9%, não foi verificada presença de material particulado em até 72 horas. Este resultado é um indicativo de compatibilidade físico-química.

4.5 ENSAIO DE pH

Para cada dia de ensaio foram utilizadas três bolsas de solução analgésica.

Em cabine de fluxo laminar, foram retiradas de cada bolsa, aproximadamente 25 mL de solução analgésica para a medição do pH. Foram realizadas três leituras consecutivas com o auxílio de um pHmetro.

Os valores de pH obtidos encontram-se nas tabela 21.

O pH avaliado durante o estudo de compatibilidade e estabilidade no período de 30 dias de combinações de ROP HCl/morfina (sulfato) (1 mg/mL/10 µg/mL; 2 mg/mL/20 µg/mL; 2 mg/mL/100 µg/mL), ROP (cloridrato)/sufentanila (citrato) (1 mg/mL/0,4 µg/mL; 2 mg/mL/0,4 µg/mL; 2 mg/mL/4 µg/mL), ROP (cloridrato)/FEN (citrato) (1 mg/mL/1 µg/mL; 2 mg/mL/1 µg/mL; 2 mg/mL/10 µg/mL) e ROP (cloridrato)/ CLO (cloridrato) (1 mg/mL/5 µg/mL; 1 mg/mL/50 µg/mL; 2 mg/mL/5 µg/mL) não apresentou variação maior que 10% (SVEDBERG, McKENZIE, LARRIVEE-ELKINS, 2002).

Tabela 21. Valores de pH obtidos nos tempos 0 h, 24 h, 48 h e 72 h

Tempo (h)	Bolsa	pH 1	pH 2	pH 3
0	1	5,04	5,00	4,96
	2	4,99	4,96	4,95
	3	4,97	4,96	4,94
	Média ± Desvio Padrão	5,00 ± 0,04	4,97 ± 0,02	4,95 ± 0,01
24	1	5,16	5,11	5,11
	2	5,13	5,08	5,07
	3	5,11	5,07	5,06
	Média ± Desvio Padrão	5,13 ± 0,04	5,09 ± 0,02	5,08 ± 0,03
48	1	5,18	5,17	5,16
	2	5,13	5,13	5,13
	3	5,13	5,13	5,13
	Média ± Desvio Padrão	5,15 ± 0,03	5,14 ± 0,02	5,14 ± 0,02
72	1	5,16	5,13	5,13
	2	5,12	5,11	5,12
	3	5,11	5,10	5,09
	Média ± Desvio Padrão	5,13 ± 0,03	5,11 ± 0,02	5,11 ± 0,02

Fonte: Elaboração própria

McCluskey e colaboradores em estudo de estabilidade do FENT 5 µg/mL armazenado em seringas de polipropileno, verificaram a variação de pH desta solução durante 90 dias de ensaio. Os valores de pH mensurados apresentaram uma variação menor que 0,5 unidade de pH relativos ao pH inicial de todos os intervalos de tempo, isto é, 30, 60 e 90 dias. E todos os valores de pH mantiveram-se na faixa de 4,0-7,0 (2009).

Peterson e colaboradores verificaram uma faixa de pH mais baixa nas misturas contendo FENT 40 µg/mL, hioscina 850 µg/mL e midazolam 600 µg/mL ($3,54 \pm 0,1$) e FENT 40 µg/mL, metoclopramida 700 µg/mL e midazolam 600 µg/mL ($3,56 \pm 0,1$) durante 10 dias de estudo de estabilidade em seringas de polipropileno a 32 °C (1998).

Soluções de FENT 50 µg/mL ou 30 µg/mL (em NaCl 0,9% e NaOH para ajuste de pH=4,4) e sufentanila 50 µg/mL (em NaCl 0,9% e NaOH e HCl para ajuste de pH=5,6) não apresentaram precipitação aparente durante 28 dias quando estocadas a 4 °C, 25 °C e 35 °C (CHAPALAIN-PARGADE *et al.*, 2006).

Para o presente estudo, o ensaio suplementar de pH foi realizado durante os tempos de 0, 24, 48 e 72 horas após a manipulação). Até o período de 72 horas, a variação de pH da solução analgésica não foi maior que 5%. A análise de variância simples (one-way ANOVA) foi utilizada como ferramenta para análise de dados. Através do teste de Bonferroni, observou-se que os valores de pH obtidos nos tempos 24 h, 48 h e 72 h foram significativamente diferentes ($p=0,05$) em relação ao tempo de 0h. (Figura 29).

A variação do pH em relação ao tempo 0h, demonstra alteração nas características físico-químicas ou nas condições de medida, como temperatura da bolsa. No entanto, os valores obtidos estavam na faixa de pH dos fármacos da mistura: 4,0-7,5; 4,0-7,0 e 4,0-6,0 (FENT CIT, CLO HCl e ROP HCl, respectivamente) (Figura 28) (USP-NF, 2008).

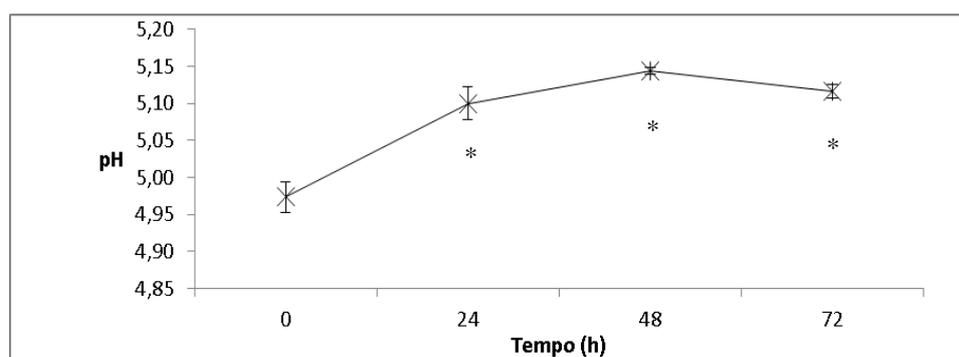


Figura 28. Resultados do estudo de pH nos tempos de 0, 24, 48, 72 h
 (*) Valores de pH significativamente ($p=0,05$) diferentes em relação ao tempo de 0h através do teste de Bonferroni

Fonte: Elaboração própria

4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE ESTENDIDA DA SOLUÇÃO ANALGÉSICA EM BOLSA DE INFUSÃO, SERINGA EQUIPO DE INFUSÃO PERIDURAL

A mesma solução analgésica acondicionada em bolsas flexíveis de infusão em sistema fechado de PVC acopladas a equipo para medicamentos fotossensíveis e seringas de polipropileno, na concentração de 30 µg/mL, 4 µg/mL e 100 µg/mL para o FENT, CLO e ROP respectivamente foi manipuladas a temperatura de 20,4 °C. O tempo de manipulação foi de 1 hora e 30 minutos e as amostras (n=5) manipuladas foram armazenadas em geladeira a 2-8 °C.

As análises foram realizadas até o período de 24 horas. Para identificação/quantificação dos fármacos CLO, ROP e FENT no ensaio de estabilidade estendida, foi utilizado o método desenvolvido e validado no presente estudo.

A recuperação dos fármacos CLO, ROP e FENT em solução fisiológica de NaCl 0,9% armazenadas em três tipos de recipientes, isto é, bolsa de infusão, equipo e seringa foi avaliada.

Observou-se inicialmente que as concentrações de ROP e FENT mostraram-se superiores à concentração nominal para os dois tempos de análise da estabilidade na bolsa, equipo e seringa, o que pode estar relacionado ao processo de manipulação ou evaporação de solvente, como já descrito em literatura. Lee e colaboradores observaram que em bolsas de cloreto de polivinila (PVC), ocorreu o aumento da concentração de fármacos, como possível resultado da permeação e evaporação da água através de bolsas de PVC (2005).

A porcentagem de recuperação foi calculada para os tempos de 0 h e 24 h em relação à concentração nominal. Pode-se observar na tabela 23 uma diminuição da taxa de recuperação da CLO de 99,135 para 74,89%, de 109,69% para 72,77% e de 99,13% para 79,05% em bolsas de infusão, equipo e seringa, respectivamente.

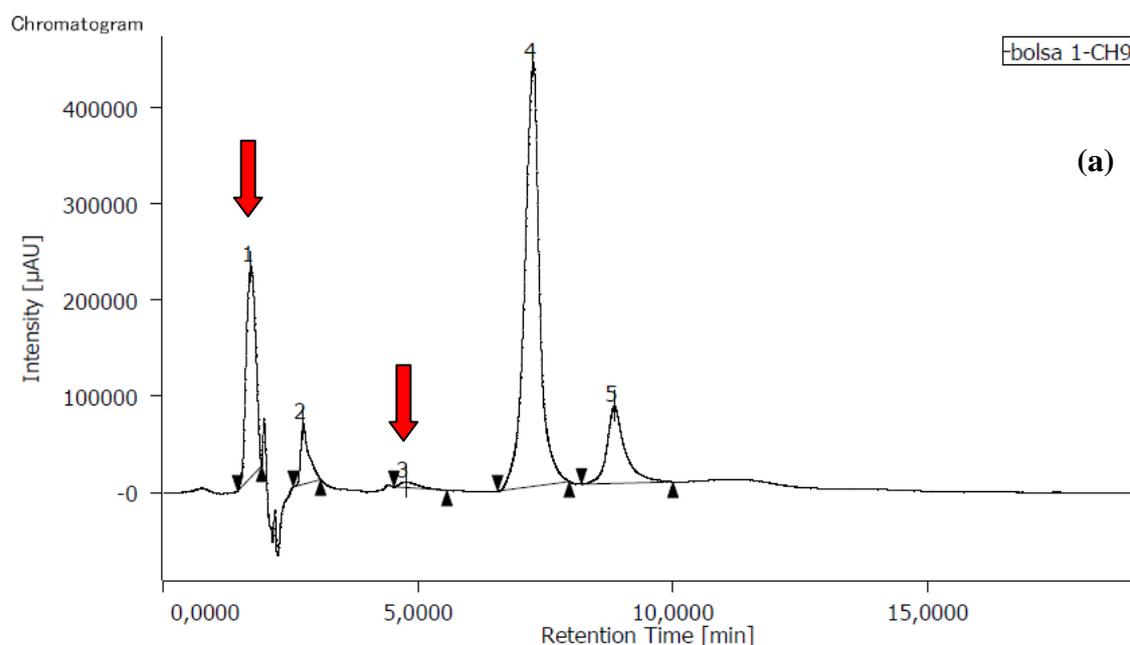
Foi realizado o Test t para comparação do decaimento das concentrações em 24 h em um intervalo de confiança de 95%. Foi observado que houve diferenças significativas em 24 h para CLO HCl (p=0,033) e para ROP HCl (p=0,04). Entretanto, para o FENT CIT, esta diferença não foi significativa (p=0,15).

A taxa de recuperação obtida para os três fármacos está abaixo do estabelecido na literatura para se considerar a solução como estável. O Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade (BRASIL, 2005) determina uma variação menor ou igual a 5% para fins de prazo de validade provisório de estudo de estabilidade acelerado de 24 meses ou de longa duração de 12 meses. Enquanto Ev caracteriza um produto farmacêutico como estável quando o teor do seu princípio ativo não decaiu mais do que 10% (2003). O mesmo para Bing e colaboradores, que caracterizam a validade da estabilidade estendida como o tempo máximo em que 90% ou mais do princípio ativo é encontrado na solução, no recipiente especificado e

sob as condições de armazenamento (2005). Assim pela análise da estabilidade estendida no tempo de 24 h para a solução analgésica para todos os fármacos em bolsas, seringas ou equipos, as taxas de recuperação obtidas foram inferiores a 90% em relação ao tempo zero.

Para todos os fármacos, foi observada diminuição da concentração em 24 h em bolsa, equipo e seringa. A concentração de CLO diminuiu em 24,43%, 33,71% e 20,40% em bolsa, equipo e seringa, respectivamente. A diminuição de ROP para os mesmos recipientes foram 10,22%, 24,51% e 21,46%. A menor diminuição da concentração em relação ao tempo inicial de 0 h para bolsas, seringas e equipos, foi observada com o FENT, cujas diminuições foram de 1,31%, 16,86% e 13,24%, respectivamente (tabela 22).

Após a integração dos picos nos cromatogramas (figura 29) obtidos da mistura analgésica em bolsas de infusão, seringas e equipos, pode ser verificada a presença de picos cromatográficos adicionais aos picos dos fármacos com TR reproduzíveis em todos os recipientes (tabela 23).



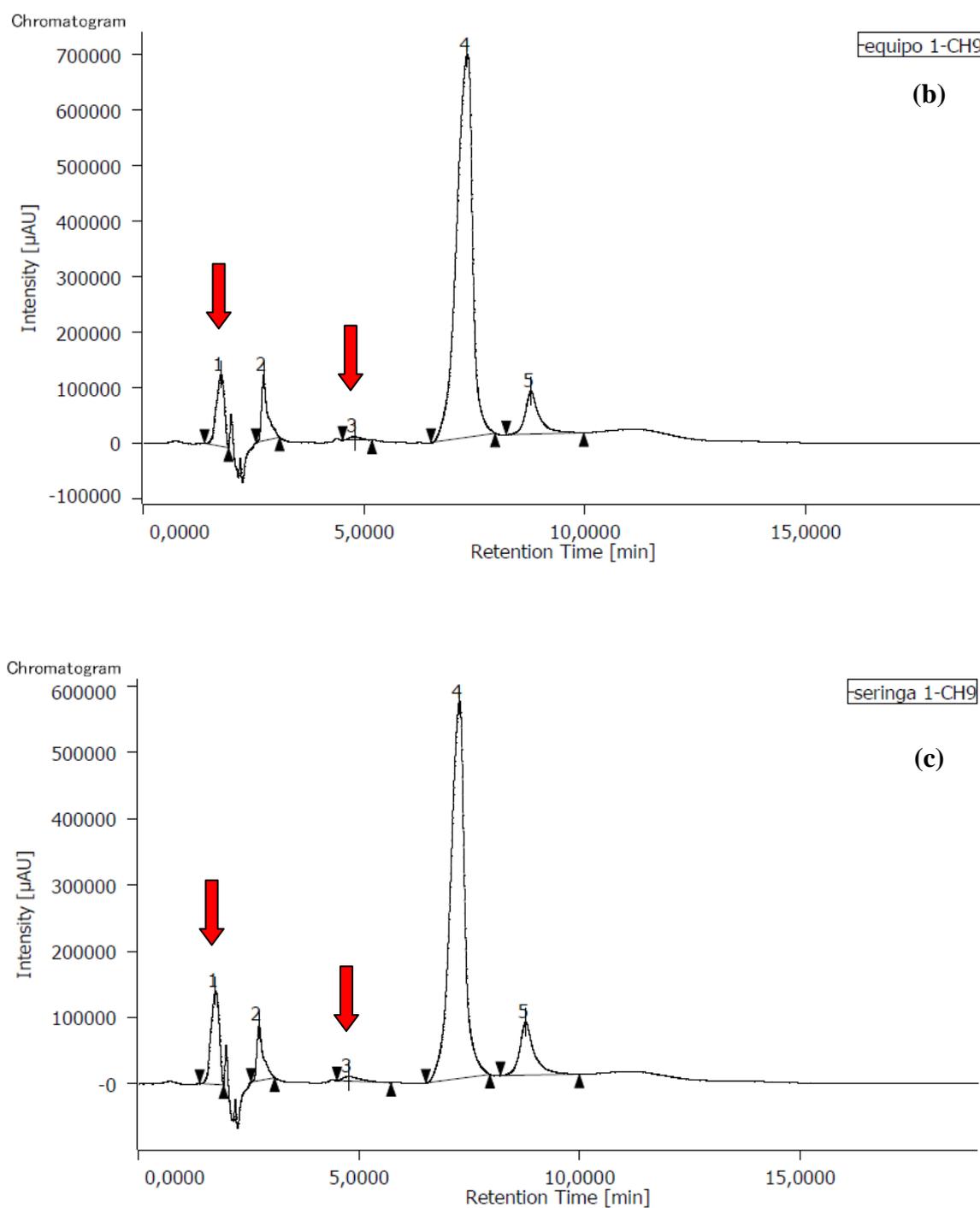


Figura 29. Cromatogramas do estudo de estabilidade estendida em tempo 0h em bolsa (a), equipo (b) e seringa (c). Em detalhe, picos adicionais

Fonte: Elaboração própria

Tabela 22. Tempos de retenção observados em 0 h e 24 h em bolsas de infusão, equipo e seringa

Tempos	Bolsa de infusão TR (min)		Equipo TR (min)		Seringa TR (min)	
	Composto 1	Composto 2	Composto 1	Composto 2	Composto 1	Composto 2
0 h	1,730	4,760	1,765	4,787	1,755	4,778
	1,747	4,752	1,773	4,767	1,763	4,768
	1,742	4,772	1,765	4,750	1,763	4,770
	1,743	4,767	1,767	4,750	1,777	4,780
	1,758	4,750	1,777	4,757	1,768	4,783
24 h	1,712	4,810	1,885	4,957	1,878	4,938
	1,732	4,805	1,882	4,952	1,882	4,952
	1,728	4,755	1,885	4,957	1,878	4,943
	1,732	4,897	1,883	4,950	1,877	4,983
	1,862	4,892	1,893	4,918	1,885	4,943

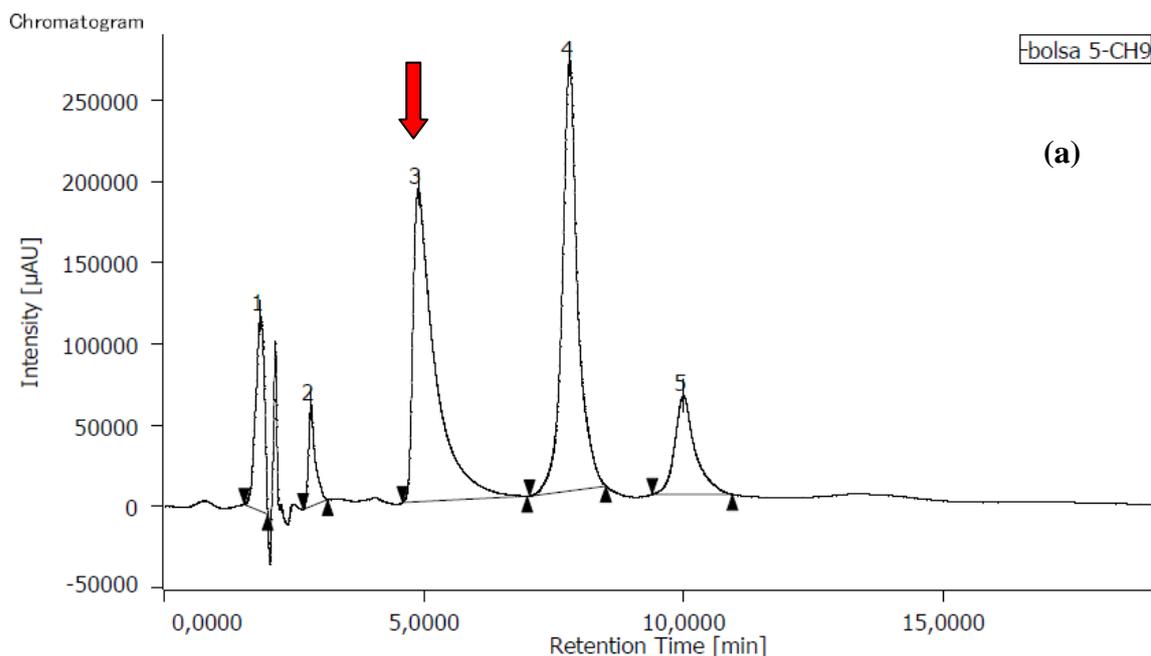
Fonte: Elaboração própria

A identificação de produtos de degradação e/ou impurezas relacionada aos fármacos do estudo, já está bem descrita na literatura, principalmente para o FENT, que devido a sua estrutura, quando submetido à degradação pode gerar aminas e aminas aromáticas, além de impurezas (GARG *et al.*, 2010), como 1. N-fenil-N-[*cis,trans*-1-óxido-1-(2-feniletil)piperidina-4-il]propanamida; 2. N-fenil-N-piperidina-4-il]propanamida; 3. N-fenil-N-[1-(2-feniletil) piperidina-4-il] acetalamida e 4. N-fenil-1-(2-feniletil)piperidina-4-amina (European Pharmacopoeia, 2005). O FENT, de acordo com metodologia desenvolvida por Lambropoulos e colaboradores, apresentou um produto quando submetido à degradação forçada com HCl 0,5 N, a 80°C por 24 h. Em condições básicas (NaOH, 0,5 N, a 80 °C por 5 dias ou a temperatura ambiente), apresentou 4 produtos de degradação. Sob condições oxidativas (H₂O₂ 3% a 80 °C por 3 horas), amostras de FENT apresentaram 14 produtos de degradação. Sob aquecimento a 80 °C por 5 dias ou a temperatura ambiente por 14 dias, foram observados 2 produtos de degradação. Sob condições fotolíticas por 13 dias ou no escuro por 6 dias (1999). FENT CIT 5 µg/mL em solução fisiológica de NaCl 0,9% em pH ácido (~2,0) seguido de aquecimento a 80°C analisado através da técnica de CLAE/DAD, apresentou picos cromatográficos adicionais, caracterizados como impurezas (McCLUSKEY *et al.*, 2009). Enquanto, Rabinowitz e colaboradores submeteram o FENT em pó a aquecimento por 300°C em placa aquecedora, com geração de aerossol com 70% de pureza (2004). Peterson e colaboradores, enfim, submeteram o composto a degradação por hidrólise ácida com HCl 0,1M com aquecimento de autoclavação por 5 horas, a 121 °C a 18 psi, apresentou

recuperação de 32% da concentração inicial do fármaco. Nestas condições, foi também observado o aparecimento de um pico cromatográfico adicional, quando analisado por CLAE/UV (1998).

A análise dos cromatogramas obtidos após 24 h revelou aumento significativo de absorção do composto 2 (TR= 4,892 min (bolsa); 4,918 min (equipo) e 4,938 min (seringa)) (Figuras 30a, 30b, 30c) em relação ao tempo zero, o que provavelmente, está relacionado à mistura analgésica, uma vez que, durante o estudo nos controles injetados não foi observado este pico com alta absorção. Entretanto, um pico de baixíssima intensidade (com relação sinal x ruído menor que 3) pode ser observado em TR= 4,500 min em soluções que continham a mistura dos três fármacos, mas sem ganho de intensidade em qualquer condição.

O pico cromatográfico referente ao composto 1, corresponde ao produto já identificado na ampola de FENT CIT e não cromatografado. O segundo composto suspeito identificado (composto 2), no entanto, pode se tratar de um produto de incompatibilidade, degradação e/ou cedência de material dos recipientes.



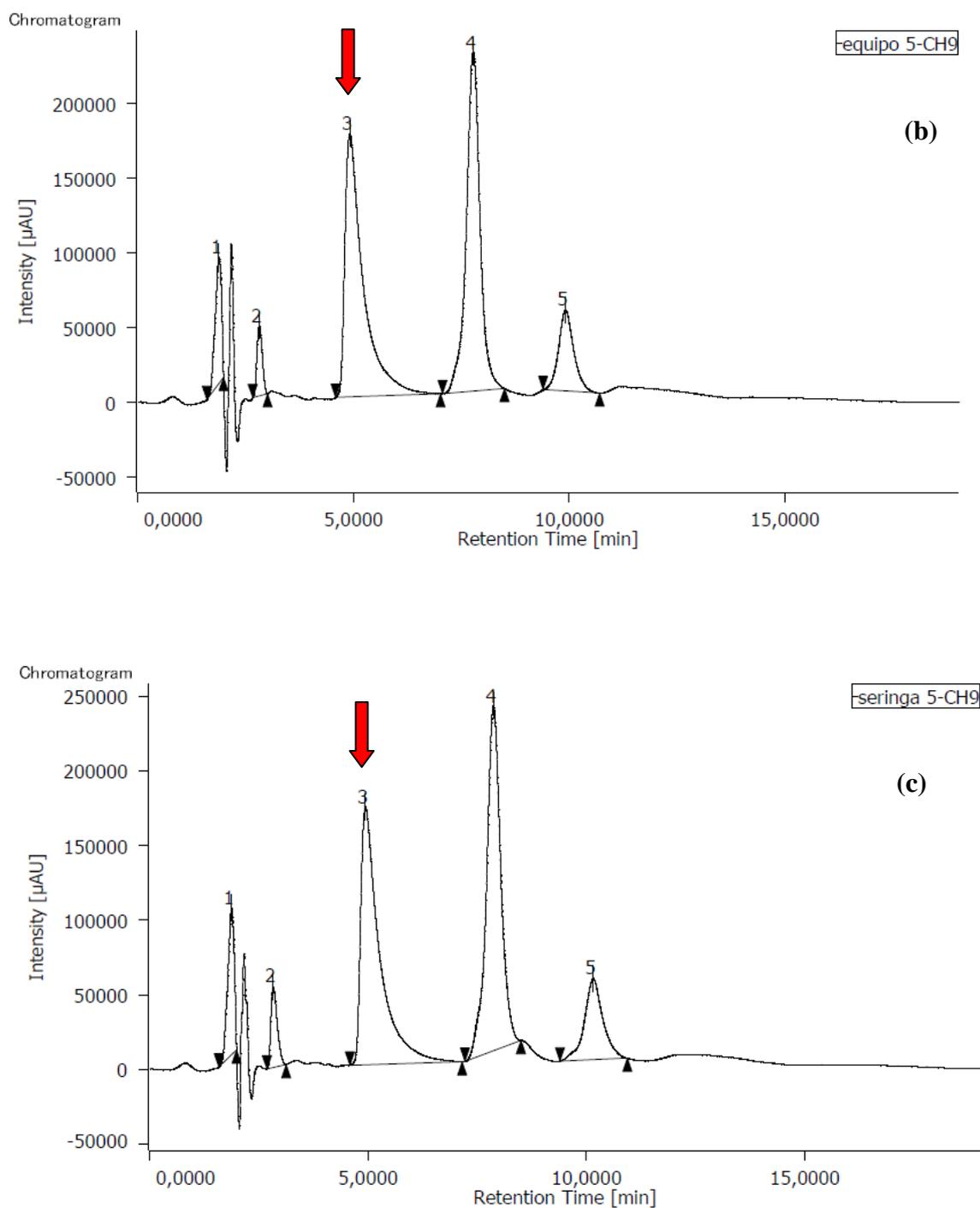


Figura 30. Cromatogramas do estudo de estabilidade estendida em tempo 24h em bolsa (a), equipo (b) e seringa (c). Em detalhes, picos adicionais

Fonte: Elaboração própria

Ao contrário do FENT CIT, poucos são os estudos descritos na literatura sobre possíveis produtos de degradação e impurezas dos demais fármacos da mistura analgésica.

Para a CLO são descritas na literatura, impurezas de natureza imidazólica e aromática, a saber: 1-acetilimidazolidina-2-ona; 1-acetil-2[(2,6-diclorofenil)amino]-5,5-diidro-1-H-

imidazol e 2,6-dicloroanilina (LGC STANDARDS, 2011/2012). Enquanto, o composto (+)-(2R)-N-(2,6-dimetilfenil)-1-propilpiperidina-2-carboxamida ((R)-ROP) é a impureza descrita para a ROP (LGC STANDARDS, 2011/2012).

Na avaliação de estudos de estabilidade em sistemas de infusão de uso restrito ao ambiente hospitalar, é considerado como ponto crítico o tipo de recipiente que armazena a solução em estudo (WULF, GLEIM, MIGNAT, 1994; BROADNER *et al.*, 2002; HILDEBRAND, ELSBERRY, HASSENBUSCH, 2003; LEE *et al.*, 2005; McCLUSKEY *et al.*, 2009).

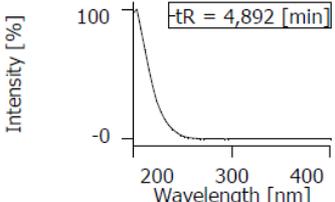
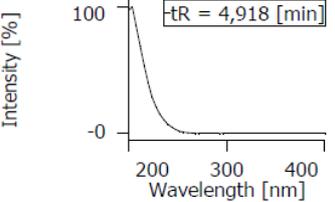
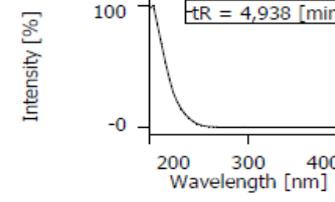
Os estudos de estabilidade dos fármacos deste trabalho e de outros fármacos, abrangem a estabilidade em sistemas implantáveis (CLASSEN *et al.*, 2004; RUDICH *et al.*, 2004), em seringas de polipropileno (DELLA CUNA, 2001; McCLUSKEY *et al.*, 2009), em sistemas de infusão (WILSON *et al.*, 1998), em solução para via intravenosa (VARSHA *et al.*, 1995) e em soluções para uso epidural (SÁNCHEZ DEL ÁGUILA, JONES, VOHRA, 2003; PRISTON *et al.*, 2004).

O envase de produtos manipulados estéreis deve ser feito em recipientes que garantam as estabilidades microbiológica e físico-química da preparação farmacêutica (BRASIL, 2006).

Importa assim, verificar a possível cedência de material nos diferentes recipientes, pois as causas da diminuição da eficácia analgésica no manejo da dor crônica podem estar relacionadas a estes; motivo pelo qual devem ser investigados.

A partir dos resultados obtidos, foi realizada a sobreposição dos espectros do composto 2, obtidos em bolsa de infusão, equipo e seringa no período de 24 h (tabela 24), a fim de se avaliar a procedência do composto em questão. Não foram verificadas diferenças entre os espectros quando sobrepostos. Assim, pode-se concluir que se trata do mesmo composto e que não ocorreu cedência em nenhum recipiente analisado.

Tabela 23. Resultado dos espectros dos compostos suspeitos observados nas amostras de bolsa de infusão, equipo e seringa em 24 h

Bolsa	Equipo	Seringa
		

Fonte: Elaboração própria

Devido à diversidade de características físico-químicas de cada fármaco, a instabilidade química destes compostos ocorre de formas diferentes. Estruturalmente os fármacos (fenóis, álcoois, cetonas, aldeídos, éteres, ésteres, ácidos, sais, alcaloides, glicosídeos, etc) apresentam diferentes susceptibilidades à instabilidade química (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007).

O presente estudo não se propõe, a determinar um prazo de validade para a solução analgésica utilizada em pacientes submetidos à toracotomia, mas determinar a estabilidade físico-química dos fármacos componentes desta solução em um período acima do período de infusão de 24 horas. A determinação de um período mínimo de 24 h baseia-se no trabalho de Forster e Rosemberg que utilizaram a solução de CLO HCl 2 µg/mL, FENT CIT 5 µg/mL e ROP HCl 2 mg/mL para analgesia peridural pós artroplastia total de joelho com infusão peridural de 22 horas (2004).

Não se pode assegurar, através dos parâmetros físico-químicos obtidos aqui, que a mistura de CLO HCl 4 µg/mL, FENT CIT 30 µg/mL e ROP HCl 100 µg/mL é considerada estável. Os dados apontam para uma possível instabilidade entre os componentes da mistura, não relacionada ao recipiente ou aos excipientes da formulação injetável em 24 h, o que leva a necessidade de uma avaliação estrutural futura do composto suspeito.

Tais resultados voltados à prática clínica no controle da dor pós-operatória permitem analgesia adequada, com minimização de efeitos adversos. O aumento do tempo de recuperação, da estadia hospitalar e dos custos, são alguns dos resultados do controle algíco pós-operatório inadequado (LEVY & CARPENTER, 1995).

A obtenção de parâmetros físico-químicos com promoção de dados para a manipulação dos fármacos componentes da solução analgésica é uma prática da assistência farmacêutica hospitalar no cuidado ao paciente.

5. CONCLUSÕES

- A metodologia desenvolvida e validada permitiu a identificação e a quantificação dos fármacos CLO HCl, ROP HCl e FENT CIT, simultaneamente e nas respectivas concentrações 4 µg/mL, 100 µg/mL e 30 µg/mL, dentro dos parâmetros de validação definidos e com tempo de execução exequível para o estudo de estabilidade estendida.
- Através do ensaio de contagem de partículas microscópicas, não foi visualizada partícula em até 72 horas de ensaio. O ensaio de pH demonstrou variação significativa entre os tempos analisados, mas sem comprometimento da conservação dos fármacos. A análise do teor, em 24 h, demonstrou a diminuição da concentração dos três fármacos através da metodologia desenvolvida.
- Através do estudo de estabilidade estendida da solução analgésica CLO HCl 4 µg/mL, ROP HCl 100 µg/mL e FENT CIT 30 µg/mL realizado em diferentes recipientes, foi possível identificar um composto suspeito, além dos fármacos do estudo, sem relação com o recipiente. Assim, esta solução analgésica, não foi considerada estável nas condições utilizadas e de acordo com a metodologia empregada.

Face ao exposto, pode-se concluir que o estudo físico-químico de compatibilidade e estabilidade estendida da solução analgésica mostrou-se viável à rotina clínica, com aprimoramento na qualidade dos produtos e serviços de saúde através do controle de qualidade do medicamento manipulado e busca de padrões de excelência para os pacientes submetidos à toracotomia.

6. REFERÊNCIAS

- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Desenvolvimento de formas farmacêuticas: considerações farmacêuticas e de formulação. In: _____. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ed, Porto Alegre: Artmed Editora, p. 111-203, 2007.
- ALVAREZ, J.C. *et al.* Drug stability testing to support clinical feasibility investigations for intrathecal baclofen-clonidine admixture. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 28, n. 3, p. 268-272, 2004.
- ALVES, T. C. A.; BRAZ, J. R. C. Efeitos da associação da CLO à ROP na anestesia peridural. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 410-419, 2002.
- AHMEDZAI, S. New approaches to pain control in patients with cancer. **European Journal of Cancer**, suppl. 6, p. S8-S14, 1997.
- ARVIDSSON, T.; EKLUND, E. Determination of free concentration of ropivacaine and bupivacaine in blood plasma by ultrafiltration and coupled-column liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 668. p. 91-98, 1995.
- BHATNAGAR, S. *et al.* Clonidine as an analgesic adjuvante to continuous paravertebral bupivacaine for post-thoracotomy pain. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 34, p. 586-591, 2006.
- BIANCHI, F.; GINGGEN, A.; TARDY, Y. Stability and compatibility of drug mixtures in an implantable infusion system. **Anaesthesia**, v. 63, p. 972-978, 2008.
- BING, C. M. *et al.* **Extended stability for parenteral drugs**. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 229p, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Cuidados paliativos oncológicos. Controle da dor**. Rio de Janeiro: INCa, p.5-6, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer no Brasil: dados dos registros de dados populacionais**. Rio de Janeiro: INCa, v. 3, p.13-14, 2003a.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” anexo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2 jun. 2003b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em 04 jul. 2009.

BRASIL. Resolução RE nº. 1, de 29 de julho de 2005. Determinar a publicação do Guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 01 de ago 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em 30 nov. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Aquisição de medicamentos para assistência farmacêutica no SUS. Brasília, p. 22-31, 2006.

BRASIL. Resolução RE nº 67, de 08 de outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias e seus Anexos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 21 ago. 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/67_081007rdc.htm>. Acesso em 04 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Registros Hospitalares de Câncer – Planejamento e Gestão. 2 ed. Rio de Janeiro. INCa, p. 118-125, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Atividades/Anestesiologia**. Rio de Janeiro, 2010b. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2213>. Acesso em: 13 nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2012. Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCa, p. 37-96, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer de pulmão**. 2009-2011. Disponível em http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=340. Acesso em: 07 set. 2011.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. **Journal of Chromatographic B**, v. 686, p. 3-10, 1996.

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BROADNER, G. *et al.* Stability of suFENT -ropivacaine mixture in glass and a PVC reservoir. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 19, p. 295-297, 2002.

CAMERON, C. M. *et al.* A review of neuroaxial epidural morbidity. **Anesthesiology**, v. 106, p. 997-1002, 2007.

CATTERALL, W.; MACKIE, K. Anestésicos locais. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 278-292, 2005.

CHAPALAIN-PARGADE, S. *et al.* Microbiological and physicalchemical stability of fentanyl and sufentanyl solutions for patient-controlled delivery systems. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 32, n. 1, p. 90-97, 2006.

CHIARADIA, M. C. **Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD**. 2009. 144 f. Tese.(Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

CLARK, D. Total Pain: The work of Cicely Saunders and the hospice movement. **American Pain Society**, v. 10, n. 4, 2000. Disponível em <http://www.ampainsoc.org/library/bulletin/jul00/hist1.htm>. Acesso em 20 ago. 2010.

CLASSEN, A. M.; WIMBISH, G. H.; KUPIEC, T. C. Stability of admixture containing morphine sulphate, bupivacaine hydrochloride in an implantable infusion system. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 28, n. 6, p. 603-611, 2004.

CLONIDIN®: CLO HCl. Responsável Técnico Dr. Joaquim A. dos Reis. São Paulo: CRISTÁLIA PRODUTOS QUÍMICOS FARMACÊUTICOS LTDA, [2008]. Bula de remédio.

CHRISTO, P. J.; MAZLOOMDOOST, D. Cancer pain and analgesia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1138, p. 278-298, 2008a.

CHRISTO, P. J., MAZLOOMDOOST, D. Interventional pain treatments for cancer pain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1138, p. 299-328, 2008b.

D'ANGELO, R. *et al.* Spinal clonidine prolongs labor analgesia from spinal suFENT and bupivacaine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 88, p. 573-576, 1999.

DEANDREA, S. *et al.* Prevalence of undertreatment in cancer pain. A review of published literature. **Annals of Oncology**, v. 12, p. 1985-1991, 2008.

DEWANDRE, P. Y. *et al.* Impact of the addition of sufentanil 5 µg/mL or clonidine 75 µg/mL on the minimum local analgesic concentration of ropivacaine for epidural analgesia in labour: a randomized comparison. **International Journal Obstetric Anesthesia**, v. 17, p. 315-321, 2009.

DELLA-CUNA, F. S. R. *et al.* Stability and compatibility of methylprednisolone acetate and ropivacaine hydrochloride in polypropylene syringes for epidural administration. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 58, n. 18, p. 1753-1756, 2001.

DICKENSON, A. H. Spinal cord pharmacology of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75. p. 193-200, 1995.

DONG, M. W. HPLC instrumentation in pharmaceutical analysis: status, advances, and trends. In: AHUJA, S.; DONG, M.W. **Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC**. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 47-75, 2005.

DRUGBANK. **Drugbank Database**. Disponível em <<http://drugbank.ca/drugs/DB00813>>. Acesso em 16 nov. 2010.

EISENACHE, J.C.; DE KOCK, M.; KLIMSCHA, W. α_2 -adrenergic agonists for regional anesthesia. A clinical review of clonidine. **Anesthesiology**. v. 85, p. 655-674, 1996.

EV, L. S. Estabilidade de medicamentos. In: GOMES, M. J. V. M., Reis, A. M. M. **Ciências Farmacêuticas. Uma abordagem em Farmácia Hospitalar**. São Paulo: Atheneu, p. 234 – 250, 2003.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 5th.ed. Main Volume 5.0, 2005.

FANZCA, M. J. *et al.* Postoperative epidural infusion: a randomized, double-blind, dose-finding trial of clonidine in combination with bupivacaine and fentanyl. **Anesthesia & Analgesia**, v. 84, p. 1323-1328, 1997.

FAIRBANKS, *et al.* α_2C - Adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 1, p. 282-290, 2001.

FENTANEST®: FENT CIT. Responsável Técnico Dr. Joaquim A. dos Reis. São Paulo: CRISTÁLIA PRODUTOS QUÍMICOS FARMACÊUTICOS LTDA, [2018]. Bula de remédio.

FERREIRA, M. B. C. Anestésicos Locais. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica. Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 205-227, 2006.

FERREIRA, M. B. C.; CALMO, W.; HIDALGO, M. P. L. Fármacos utilizados em dor crônica. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica. Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 259-291, 2006.

FORSTER, J. G.; ROSENBERG, P. H. Small dose of clonidine mixed with low-dose ropivacaine and fentanyl for epidural analgesia after total knee arthroplasty. **British Journal of Anaesthesia**, v. 93, n. 5, p. 670-677, 2004.

GARG, A. *et al.* Forced degradation of fentanyl: identification and analysis of impurities and degradants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 325-334, 2010.

GAZELKA, H. M. *et al.* Determination of the particulate size and aggregation of clonidine and corticosteroids for epidural steroid injection. **Pain Physician**, v. 15, p. 87-93, 2012.

GILL, M. A. *et al.* Stability of advanced life support drugs in the field. **American Journal of Health-System Pharmacy**. v. 61, p. 597-602, 2004.

GODWIN, D. A.; KIM, N-A.; ZUNIGA, R. Stability of a baclofen and clonidine hydrochloride admixture for intrathecal administration. **Hospital Pharmacy**, v. 36, n. 9, p. 950-954, 2001

GOTODA, Y. *et al.* The morbidity, time course and predictive factor for persistent post-thoracotomy pain. **European Journal of Pain**, v. 5, p. 89- 96, 2001.

GOTTSCHALK, A. *et al.* Preventing and treating pain after thoracic surgery. **Anesthesiology**, v. 104, n. 3, p. 594-600, 2006.

GOTTSCHALK, A. *et al.* Pre-incisional epidural ropivacaine, suFENT , clonidine, and (S) ± ketamine does not provide pre-emptive analgesia in patients undergoig major pancreatic surgery. **British Journal of Anaesthesia**, v.100, n.1, p. 36-41, 2008.

GUSTEIN, H. B., AKIL, H. Analgésicos Opióides. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD., L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 427-464, 2005.

HALL, J. E., UHRICH, T. D., EBERT, T. J. Sedative, analgesic and cognitive effects infusions in humans. **British Journal of Anaesthesia**, v. 86, p. 5-11, 2001.

HALLDIN, M. M. *et al.* Metabolism and excretion of ropivacaine in humans. **Drug Metabolism Disposition**, v. 24, n. 9, p. 962-968, 1996.

HANSEN, H. **Textbook of lung cancer**. 2nd ed. London: Informa Healthcare, p. xiv, 2008.

HARTMANN, M. *et al.* Stability of fentanyl/ropivacain preparations for epidural application. **Pharmazie**, v. 58, p. 434-435, 2003.

HAUGEN, A.; MOLLERUP, S. Etiology of lung cancer. In: HANSEN, H. **Textbook of lung cancer**. 2nd ed. London: Informa Healthcare, p. 1-9, 2008

HEYDEN, Y. V. *et al.* Determination of system suitability limits with a robustness test. **Journal of Chromatography A**, v. 845, p. 145-154, 1999.

HILDEBRAND, K. R.; ELSEBERRY, D. D.; HASSEBUSCH, S. J. Stability and compatibility of morphine-clonidine admixture in an implantable infusion system. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 25, n. 5, p. 464-471, 2003.

HOWLAND, R. D., MYCEK, M. J. Analgésicos e opióides e antagonistas. In: _____. **Farmacologia Ilustrada**. 1ed, Porto Alegre: Artmed Editora, p. 157-168, 2007.

HUNT, I.; TREASURE, T. Surgery for non-small cell lung cancer. In: HUNT, I.; MUERS, M.; TREASURE, T. **ABC of lung cancer**. Oxford: Willey-Blackwell, p. 29-35, 2009.

HUSSONG, D. Sterile products: advances and challenges in formulation, manufacturing and regulatory aspects – a regulatory review perspective. **Pharmaceutical Science & Technology**. v. 11, n. 3, 2010.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. IASP. **Taxonomy**. 2011. Disponível em http://www.iasppain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Defi...isplay.cfm&ContentID=1728. Acesso em: 27 jul. 2011.

ICH, Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2) R1, 2005.

ICH, Harmonised Tripartite Guideline. Stability testing of new drug substances and products (Q1) R2, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOC-CGCRE-008, 2003.

JASCO BRASIL[®]. Disponível em http://www.jasco.com.br/sfc_sfe07.html. Acesso em 10 jun, 2012.

KAMIBAYASHI, T.; MAZE, M. Clinical uses of a α_2 -adrenergic agonists. **Anesthesiology**, v. 93, p. 1345-1349, 2000.

KAZAKEVICH, Y., LOBRUTTO, R. Introduction. In: _____. **HPLC for pharmaceutical scientists**. New Jersey: Wiley-Interscience, p. 3-24, 2007.

KEHLET, H.; JENSEN, T. S.; WOOLF, C. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. **Lancet**, v. 367, p. 1618-1625, 2006.

KENT, M.; ALVELO-RIVERA, M.; LUKETICH, J. Minimally invasive surgery lung cancer. In: ROTH, J. A.; HONG, W. K.; COX, J. D. **Lung Cancer**. 3rd. ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, p. 180-193, 2008.

KHAN, Z. P.; FERGUSON, C. N.; JONES, R. M. Alpha-2 and imidazoline receptors agonists. **Anesthesia**, v. 54, p. 146-165, 1999.

KLIMSCHA, W. *et al.* Hemodynamic and analgesic effects of clonidine added repetitively to continuous epidural and spinal blocks. **Anesthesia & Analgesia**, v. 80, p. 322-327, 1995.

KOSTECKA, D.; DUNCAN, M.R.; WAGENKNECHT, D. Formulation of a stable parenteral product; clonidine hydrochloride injection. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 6, n. 52, p. 320-325, 1998.

LAMBROPOULOS *et al.* Development and validation of an HPLC assay for fentanyl and related substances in fentanyl citrate injection, USP. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 705-716, 1999.

LAMBROPOULOS, J.; SPANOS, G. A.; LAZARIDIS, N. V. Development and validation of an HPLC assay for fentanyl, alfentanil, and sufentanil in swab samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 421-428, 2000.

LEVY, B. S.; CARPENTER, R. Perioperative pain management. **The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists**, v. 2, n. 4, 1995.

LEE, D. K. T.; WANG, D. P.; HARSONO, R.; WONG, C. Y. Compatibility of fentanyl citrate, ketamine hydrochloride, and droperidol in 0,9% sodium chloride injection stored in polyvinyl chloride bags. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 62, n. 1. p. 1190-1192, 2005.

LGC STANDARDS. Pharmaceutical reference substance and impurities 2011/2012. Disponível em <http://www.lgcstandards.com/downloadPDFs.aspx>. Acesso em 27 jul. 2011.

LYON, R. C. *et al.* Stability profiles of drug products extended beyond labeled expiration dates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 7, p.1549-1560, 2006.

MACRAE, W. A. Chronic post-surgical: 10 years on. **British Journal of Anaesthesia**, v. 1, n. 101, p. 77-86, 2008.

MAHON, S. V. Thoracic epidural infusions for post-thoracotomy pain: a comparison of fentanyl-bupivacaine mixtures vs. fentanyl alone. **Anesthesia**, v. 54, p. 641-646, 1999.

MAROTO, A. *et al.* Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 173-185, 1999.

MAZE, M., TRANQUILLI, W. Alpha-2 adrenoreceptor agonists: defining role in clinical anesthesia. **Anesthesiology**, v. 74, p. 581-605, 1991.

MCKENNA, R. J. Anatomic pulmonary resections by videoassisted thoracic surgery. In: FRANCO, K. L.; PUTNAM, J. B. J. **Advanced Therapy in Thoracic Surgery**. 2 ed. Shelton: Editora PMPH-USA Ltd, p. 68-74, 2005.

McCLUSKEY, S. V. *et al.* Stability of fentanyl 5 µg/mL diluted with 0,9% sodium chloride injection and stored in polypropylene syringes. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, n. 1. p. 860-863, 1999.

MEYER, V. R. Introduction. In: _____. **Practical high-performance liquid chromatography**. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, p. 4-13, 2004a.

MEYER, V. R. Detector. In: _____. **Practical high-performance liquid chromatography**. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, p. 82 - 105, 2004b.

NEWTON, D. W. Drug incompatibility chemistry. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, p. 348-357, 2009.

ODA, Y. *et al.* Metabolism of a new local anesthetic, ropivacaine by human hepatic cytochrome P450. **Anesthesiology**, v. 214, p. 214-220, 1995.

ORNAF, R. M.; DONG, M. W. Introduction. In: AHUJA, S.; DONG, M.W. **Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC**. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 20-45, 2005.

PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Ultraviolet spectroscopy. In: _____. **Introduction to spectroscopy**. 3rd. ed, p. 353-389, 2001.

PEETERS-ASDOURIAN, C.; GUPTA, S. Choices in pain management following thoracotomy. **Chest**.v. 115, p. 122S – 124S, 1999.

PETERSON. G. M. *et al.* Compatibility and stability of fentanyl admixtures in polypropylene syringes. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 23, p. 67-72, 1998.

PRISTON, M. J. *et al.* Stability of an epidural analgesic admixture containing epinephrine, fentanyl and bupivacaine. **Anesthesia**, v. 59, p. 979-983, 2004.

QIN, WW. *et al.* Simultaneous determination of procaine, lidocaine, ropivacaine, tetracaine and bupivacaine in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 1185-1189, 2010.

RABINOWITZ, J. D. *et al.* Fast onset medications through thermally generated aerosols. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, n. 2, p. 769-775, 2004.

RANG, H. P. *et al.* Anestésicos locais e outros fármacos que afetam os canais de sódio. In: _____. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 588-609, 2007a.

RANG, H. P. *et al.* Modo de atuação dos fármacos: aspectos celulares-excitação, controle e secreção. In: _____. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 54-71, 2007b.

RENKO, M.; SWART, M.; BICKELHAUPT, F. M. Theoretical study of structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some centrally acting antihypertensives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1715-1728, 2006.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5. p. 771-780, 2004.

RIFAI, N. *et al.* Simultaneous measurement of plasma ropivacaine and bupivacaine concentrations by HPLC with UV detection. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 23, p. 182-186, 2001.

RUDICH, Z. *et al.* Stability of clonidine in clonidine-hydromorphone mixture from implanted intrathecal infusion pumps in chronic pain patients. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 28, n. 6, p. 599-602, 2004.

ROPI[®]: ROP HCl. Responsável Técnico Dr. Joaquim A. dos Reis. São Paulo: CRISTÁLIA PRODUTOS QUÍMICOS FARMACÊUTICOS LTDA, [2008]. Bula de remédio.

SABANATHAN, S. Has postoperative pain been eradicated? **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 77, p. 202-209, 1995.

SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Fármacos para o tratamento da dor. In: _____. São Paulo: Ed. Manole, p. 45-80, 2008.

SALMERÓN-GARCÍA, A. *et al.* Determination of tramadol, metamizole, ropivacaine, and bupivacaine in analgesic mixture samples by HPLC with DAD detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, p. 231-237, 2009.

SÁNCHEZ del ÁGUILA, M. J.; JONES, M. F.; VOHRA, A. Premixed solutions of diamorphine in ropivacaine for epidural anaesthesia: a study on their long term stability. **British Journal of Anaesthesia**, v. 90, n. 2, p. 179-182, 2003.

SCOTT, R. P. W. Liquid Chromatography Detectors. Chrom-Ed Book Series. Lybrary 4Science, 2003. CDROM.

SENTURK, M. *et al.* The effects of three different analgesia techniques on long-term post-thoracotomy pain. **Anesthesia & Analgesia**, v. 94, p. 11-15, 2002.

SILVA, K. E. R. *et al.* Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SIMONETTI, M. P. B.; VALINETTI, E. A.; FERREIRA, F. M. C. CLO : de descongestionante nasal a analgésico potente. Considerações históricas e farmacológicas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 47, p. 37-47, 1997.

SINGELYN, F. J.; GOUVERNEUR, J. M.; ROBERT, A. A minimum dose of clonidine added to mepivacaine prolongs the duration of anesthesia and analgesia after axillary brachial plexus block. **Anesthesia and Analgesia**, v. 83, p. 1046-1050, 1996.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology On-Line**, p. 1-14, Apr., 2000.

SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L.; KIRKLAND, J. J. **Practical HPLC method development**. Nova Iorque: A Wiley - Interscience publication, p.1-77, 1988.

SVEDBERG, K.O.; MCKENZIE, E. J.; LARRIVÉE-ELKINS, C. Compatibility of ropivacaine with morphine, suFENT , fentanyl, or clonidine. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v.27, p. 39-45. 2002.

TANAKA, E. *et al.* Effects of premedication medicines on the formation of the CYP3A4-dependent metabolite of ropivacaine, 2', 6'-pipercoloxylidide, on human liver microsomes *in vitro*. **Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 181-183, 2006.

THE MERCK INDEX, Merck & Company. **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**, 13th.ed, New York: White House Station, p. 2412, 4025, 8343, 2001.

THOMAS, S. D., BERRY, P. D., RUSSELL, G. N. Is the patient fit for thoracotomy and resection for lung tissue? **Postgraduate Medical Journal**, v. 71, p. 331-335, 1995.

THURKILL, R. *et al.* pKa of fentanyl varies with temperature: implications for acid-base management during extremes of body temperature. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**. v. 19, n. 6, p. 759-762, 2005.

TORRENT, J.C. *et al.* Oncologists' perceptions of cancer pain management in Spain: The real and the ideal. **European Journal of Pain**, v. 11, p.352-359, 2007.

TRYBA, M.; GEHLING, M. Clonidine- a potent analgesic adjuvant. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 15, p. 511-517, 2002.

U.S. FDA/CDER. Guidance for validation of chromatographic methods, 1994.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Official Monographs. 31st.ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2008.

VALEBERG, B.T.; RUSTEON, T.; BJORDAL, K. Self-reported prevalence, etiology, and characteristics of pain in oncology outpatients. **European Journal of Pain**, v. 12, p.582-590, 2008.

VARELA. M. R. Dolor. In: CABO DE VILLA, E. D.; BRITO, C. G.; BÁRZAGA, M. A. **Anestesiología Clínica**. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas, p. 315-354, 2006.

VARSHA, B. M. *et al.* Stability of fentanyl citrate and midazolam hydrochloride during simulated intravenous coadministration. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 52, n. 5, p. 511-513, 1995.

VENDRELL, M. C. *et al.* Possible validez de medicamentos termolábiles fuera de lãs condiciones de conservación recomendadas por el fabricante. **Farmácia Hospitalaria**, v.28, n. 6, p. 440-444, 2004.

VON ROENN, J. H. *et al.* Physician attitudes and practice in cancer pain management. **Annals International Medicine**, v. 119, p. 121-126, 1993.

VISSERS, K. C. *et al.* Pain in patients with cancer. **Pain Practice**, v. 11, n. 5, p. 453-465, 2011.

WILDGARD, K. *et al.* Consequences of persistent pain after lung cancer surgery: a nationwide questionnaire study. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 55, p. 60-68, 2011.

WILSON, K. M. *et al.* Stability of midazolam and fentanyl in infusions solutions. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 16, n. 1, p. 52-58, 1998.

WOLF, C.E.; POKLIS, A. A rapid HPLC procedure for analysis of analgesic pharmaceutical mixtures for quality assurance and drug diversion. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, p. 711-714, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer pain relief with a guide to opioid availability. 2nd. ed. Geneva: Switzerland. 69p. 1996. Parcialmente disponível em <http://www.medsch.wisc.edu/painpolicy/publicat/cprguid.htm#WHO>. Acesso em 08 ago. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. 2011a. Acesso em: 07 set. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO's pain ladder. Disponível em <http://www.who.int/cancer/palliative/painladder/en>. 2011b. Acesso em: 08 ago. 2011.

WULF, H.; GLEIM, M.; MIGNAT, C. The stability of mixtures of morphine hydrochloride, bupivacaine hydrochloride and clonidine hydrochloride in portable pump resevoirs for the management of chronic pain syndromes. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 9, n. 5, p. 308-311, 1994.

ZECH, D. F. J. *et al.* Validation of World Health Organization guidelines for cancer pain relief: a 10-year prospective study. **Pain**, v.63, p. 65-76, 1995.

ZIANCE, R.; CHANDLER, C.; BISHARA, R. H. Integration of temperature controlled requirements into pharmacy practice. **Journal of American Pharmacists Association**, v. 49. p. e61-e69, 2009.