

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

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade do carbonato de Iodenafila

CRISTIANE FRANCO CODEVILLA

PORTO ALEGRE, 2012

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

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade do carbonato de Iodenafile

Tese apresentada por **Cristiane Franco Codevilla**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Ana Maria Bergold
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2012

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.10.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Gonçalves Cardoso

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dr. Edna Sayuri Suyenaga

Universidade Feevale

Codevilla, Cristiane Franco

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade do carbonato de Iodenafila / Cristiane Franco Codevilla. - - 2012.

232 f.

Orientadora: Ana Maria Bergold.

Coorientador: Pedro Eduardo Fröhlich.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Carbonato de Iodenafila. 2. Controle da qualidade de medicamentos. 3. Validação. 4. Estabilidade. 5. Dissolução. I. Bergold, Ana Maria, orient. II. Fröhlich, Pedro Eduardo, coorient. III. Título .

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Farmacêutica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com suporte financeiro e bolsa de pesquisa concedida pelo CNPq.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bergold pela amizade, confiança, orientação, incentivo, exemplo de humanidade e profissionalismo;

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich pela amizade, incentivo e co-orientação deste trabalho;

Às amigas Ana Paula Cappra, Tamara dos Santos Castilhos e Pâmela Cristina L. Ferreira pela amizade e ajuda em diferentes etapas do estudo;

Aos amigos do LAPPS Andrea, Andréia, Carol, Felipe, Fernanda, Graciela, Joyce, Marcella, Marquinhos, Raquel, Sirlei pelos momentos de descontração, alegria e discussões científicas;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante a realização deste estudo;

Ao Prof. Dr. Martin Steppe, do Laboratório de Controle de Qualidade, pela colaboração e a possibilidade de utilização do equipamento de eletroforese capilar;

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Aos meus pais, Mário e Margarida, e irmãos, Fábio e Fernando, por serem minha base, pelo apoio e amor constante. Às minhas cunhadas, Ana Cláudia e Juliana, pelo carinho, incentivo e amizade;

Ao Felipe Mann, pelo amor, apoio, incentivo e compreensão;

A todos que colaboraram de alguma maneira para a conclusão desta tese e que não foram citados.

RESUMO

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade do carbonato de lodenafila

O carbonato de lodenafila é um inibidor da fosfodiesterase tipo 5, desenvolvido no Brasil, o qual é um dímero formado por duas moléculas de lodenafila ligadas por uma ponte carbonato. Encontra-se disponível sob a forma de comprimidos. Não existe monografia disponível para este fármaco em nenhum código oficial. Assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver métodos analíticos para análise qualitativa e quantitativa do carbonato de lodenafila em comprimidos, avaliação da estabilidade frente à degradação forçada, contemplando a cinética de fotodegradação, identificação e estudo de citotoxicidade *in vitro* dos produtos de degradação majoritários e desenvolvimento do teste de dissolução baseado em dados *in vivo*. A caracterização da substância química de referência foi realizada através da faixa de fusão por calorimetria exploratória diferencial, métodos espectrofotométricos na região do infravermelho (IV) e do ultravioleta (UV), assim como espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . Os métodos por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria no UV, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) foram utilizados para identificar o fármaco na forma farmacêutica. Os seguintes métodos de análise quantitativa do fármaco em comprimidos foram desenvolvidos e validados: método indicativo da estabilidade por CLAE, espectrofotometria na região do UV e EC. Todos cumpriram com os parâmetros descritos pelas guias de validação e não apresentaram diferença significativa na determinação do fármaco. A cinética de fotodegradação do carbonato de lodenafila apresentou cinética de primeira ordem. Dois produtos majoritários encontrados na fotodegradação foram identificados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-MS/MS) como ácido 4-etoxi-3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazol [4,3-d] pirimidina-5-il) benzenossulfônico e ácido 4-etoxi-3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazol [4,3-d] pirimidina-5-il) benzenossulfínico. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* indicou que a amostra de carbonato de lodenafila degradada não apresentou toxicidade. O teste de dissolução foi desenvolvido e validado utilizando como meio de dissolução 900 mL de HCl 0,1 M + lauril sulfato de

sódio 1,5% (p/v), a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, pás a 25 rpm e quantificação por espectrofotometria no UV. O perfil de dissolução apresentou cinética de primeira ordem. De acordo com os resultados obtidos, todos os métodos propostos podem ser utilizados no controle de qualidade do carbonato de lodenafila.

Palavras-chave: carbonato de lodenafila, validação de métodos analíticos, controle da qualidade, estabilidade, citotoxicidade, dissolução.

ABSTRACT

Development and validation of analytical methodology, dissolution test and stability study of lodenafil carbonate

Lodenafil carbonate is a PDE5 inhibitor developed in Brazil, which is a dimer formed by two lodenafil molecules linked by a carbonate bridge. It is currently available in tablets. There is no monograph available for this drug in any official code. Thus, the purpose of the present study was the development of analytical methods for qualitative and quantitative analysis of LC in tablets, evaluation of drug stability in forced degradation, comprising the determination of photodegradation kinetic, identification and in vitro cytotoxicity study of two major degradation products and develop a dissolution test based on in vivo data. The characterization of the reference chemical substance was performed by: melting range by differential scanning calorimetry, infrared (IR) and ultraviolet (UV) spectrophotometry methods, as well as the ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. The methods by thin-layer chromatography (TLC), UV spectrophotometry, high-performance liquid chromatography (LC) and capillary electrophoresis (CE) were used to identify the drug in pharmaceutical formulations. The following methods, applied to the assay of the drug in tablets were developed and validated: a stability-indicating HPLC method, UV spectrophotometry and CE. All of them met the criteria described by the validation guidelines and showed no significant statistically difference in the drug determination. The photodegradation kinetics of lodenafil carbonate showed first-order kinetics. Two degradation products found by photodegradation were identified by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) as 4-ethoxy-3-(1-methyl-7-oxo-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5-yl)-benzenesulfonic acid and 4-ethoxy-3-(1-methyl-7-oxo-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5-yl) benzenesulfonic acid. The in vitro cytotoxicity evaluation indicated that the lodenafil carbonate degraded sample did not show toxicity. A dissolution test was developed and validated using 900 mL of 0.1 M HCl + 1.5% sodium lauryl sulfate (w/v), at 37 ± 0.5 °C as dissolution medium, paddle at 25 rpm and quantitation by UV spectrophotometry. The dissolution profile showed first order kinetics. According to the obtained results, all proposed methods can be used in the quality control of lodenafil carbonate.

Keywords: Iodenafl carbonate, validation of analytical methods, quality control, stability, in vitro cytotoxicity, dissolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Provável rota de síntese da lodenafila.....	39
Figura 2. Proposta de síntese do carbonato de lodenafila.....	50
Figura 3. Estrutura química do carbonato de lodenafila.....	51
Figura 4. Mecanismo de ereção peniana e da ação dos inibidores da fosfodiesterase tipo 5.....	53
Figura 4.1. Curva de aquecimento obtida por DSC para CL SQR.....	72
Figura 4.2. Estrutura química da vardenafila.....	73
Figura 4.3. Estrutura química da sildenafil.....	74
Figura 4.4. Espectro de RMN de ¹ H do carbonato de lodenafila SQR.....	75
Figura 4.5. Espectro de RMN de ¹³ C do carbonato de lodenafila SQR.....	77
Figura 4.6. Espectro de absorção na região do IV para o carbonato de lodenafila (SQR) em KBr.....	81
Figura 4.7. Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria de UV para soluções aquosas de 20 µg/mL de carbonato de lodenafila.....	85
Figura 4.8. Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria na região UV, para soluções de 10 µg/mL de carbonato de lodenafila em meio ácido.....	85
Figura 4.9. Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria na região do UV para carbonato de lodenafila: comprimidos (a) e SQR (b)..	86
Figura 4.10. Perfil cromatográfico do CL SQR (1), CL comprimidos (2) e citrato de sildenafil (3), sob revelação com luz UV 254 nm.....	88
Figura 4.11. Cromatogramas do carbonato de lodenafila SQR e comprimidos, respectivamente.....	90

Figura 4.12. Eletroferogramas do carbonato de lodenafila SQR e comprimidos, respectivamente.....	92
Figura 5.1. Chemical structure of lodenafil carbonate.....	102
Figura 5.2. Chromatograms of lodenafil carbonate solution after alkaline hydrolysis (1.0 M NaOH) at 60 °C, 5 h (A); at room temperature, 24 h (B)...	109
Figura 5.3. Chromatograms of blank solution after oxidation with 3.0 % hydrogen peroxide (A) and lodenafil carbonate solution after oxidation with 3.0 % hydrogen peroxide (B).....	110
Figura 5.4. Chromatograms of lodenafil carbonate solution after exposition to UV light.....	111
Figura 6.1. Chemical structure of lodenafil carbonate.....	125
Figura 6.2. UV spectra obtained in the analysis of lodenafil carbonate tablets solution (a) and standard solution (b), in water at pH 4.0.....	131
Figura 6.3. UV spectra of lodenafil carbonate reference substance (a) and placebo solution (b), in water at pH 4.0.....	131
Figura 7.1. Chemical structure of lodenafil carbonate.....	142
Figura 7.2. Estimated response surfaces obtained in the optimization procedure: symmetry; migration time and theoretical plates	149
Figura 7.3. CZE electropherograms of LOC and nimesulide: (a) LOC reference substance, (b) LOC after acidic hydrolysis, (c) LOC after basic hydrolysis. (d) LOC after photodegradation condition, (e) LOC after oxidative condition.....	151
Figura 7.4. Pareto charts and normal probability plot representing the effects of the variables and their interactions on the LOC assay for the robustness test using the fractional factorial design 2 level 2^{4-1}	156

Figura 8.1. Chemical structure of lodenafil carbonate.....	165
Figura 8.2. Typical chromatogram for lodenafil carbonate at time zero (A), after 140 min of light exposure (B).....	172
Figura 8.3. Plots of concentration, log of concentration and reciprocal of concentration of remaining lodenafil carbonate versus time.....	173
Figura 8.4. (+)ESI-MS/MS spectra of photoproducts formed by lodenafil carbonate tablets: DP-1 (A) and DP-2 (B).....	176
Figura 8.5. LDH activity measured in human mononuclear cells of different concentrations.....	177
Figura 9.1. Chemical structure of lodenafil carbonate.....	185
Figura 9.2. Percentage of dose absorbed vs. time curve for lodenafil carbonate tablets using Wagner–Nelson method.....	191
Figura 9.3. Mean dissolution profiles of lodenafil carbonate tablets using paddle at 50 rpm and as dissolution medium: 0.1 M HCl + 0.25 % SLS, 0.1 M HCl + 0.1 % SLS and 0.1 M HCl + 0.05 % SLS, compared with percentage of drug absorbed.....	193
Figura 9.4. Mean dissolution profiles of lodenafil carbonate tablets using paddle at 50 rpm and as dissolution medium: 0.01 M HCl + 0.25 % SLS, 0.01 M HCl + 0.5 % SLS and 0.001 M HCl + 1.5 % SLS, compared with percentage of drug absorbed	194
Figura 9.5. Mean dissolution profiles of lodenafil carbonate tablets using paddle at 25 rpm and as dissolution medium 0.1 M HCl with 0.1, 0.25, 1 and 1.5 % SLS, compared with percentage of drug absorbed.....	195
Figura 9.6. Mean percentage of drug absorbed versus mean percentage of drug dissolved for lodenafil carbonate tablets. The line of best fit is shown for each dissolution medium.....	195

Figura 9.7. UV spectrum obtained through the analysis of Iodenafil carbonate standard solution (A) and placebo solution (B), before dissolution in 0.1 M HCl + 1.5 % SLS, using apparatus 2 at 50 rpm..... 196

Figura 13.1. Espectro de RMN de ¹H ampliado do carbonato de Iodenafila SQR..... 229

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos empregados na farmacoterapia da DE.....	46
Tabela 2. Resumo dos métodos analíticos cromatográficos (CLAE) para a determinação do CL em fluidos biológicos.....	58
Tabela 4.1. Atribuições dos picos obtidos no espectro de RMN de ¹ H do carbonato de lodenafila SQR em CDCl ₃	76
Tabela 4.2. Atribuições dos picos obtidos no espectro de RMN de ¹³ C do carbonato de lodenafila SQR em CDCl ₃	78
Tabela 4.3. Parâmetros instrumentais para análise do carbonato de lodenafila SQR, por espectrofotometria no IV.....	80
Tabela 4.4. Frequências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para o carbonato de lodenafila SQR.....	81
Tabela 4.5. Termos descritivos de solubilidade e seus significados.....	84
Tabela 5.1. Method repeatability/intermediate precision for lodenafil carbonate.....	112
Tabela 5.2. Accuracy of method determined by recovery of lodenafil carbonate from tablets solutions spiked with standard solution.....	113
Tabela 5.3. Results of the method robustness study.	114
Tabela 5.4. Results of peak purity of forced degradation study using proposed method.....	116
Tabela 6.1. Repeatability and intermediate precision data evaluated through intra-day and inter-day studies for lodenafil carbonate.....	133
Tabela 6.2. Recovery of reference substance added to samples of lodenafil carbonate tablets	134

Tabela 7.1. Nominal values corresponding to -1 , 0 , $+1$, $-\alpha$ and $+\alpha$ of central composite design for method optimization.....	145
Tabela 7.2. Method repeatability/intermediate precision for LC.....	153
Tabela 7.3. Accuracy data.....	154
Tabela 7.4. Selected 2-Level 2^{4-1} fractional factorial design for the robustness testing of lodenafil carbonate.....	155
Tabela 8.1. Photodegradation kinetics of lodenafil carbonate sample solution exposed to UVC lamp.....	171
Tabela 9.1. Mathematical models applied in drug release analysis.....	190
Tabela 9.2. Solution solubility results.....	192
Tabela 9.3. Precision results.....	198
Tabela 9.4. Comparative release kinetics parameter.....	199
Tabela 10.1. Resultados comparativos da validação dos métodos por UV, CLAE e EC.....	211
Tabela 13.1. Análise da variância (ANOVA) das áreas obtidas para obtenção da curva analítica do carbonato de lodenafila por CLAE.....	231
Tabela 13.2. Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas para obtenção da curva analítica do carbonato de lodenafila por espectrofotometria no UV.....	231
Tabela 13.3 Análise da variância (ANOVA) obtida na curva analítica do carbonato de lodenafila por eletroforese capilar.....	232
Tabela 13.4 Análise da variância (ANOVA) dos resultados do doseamento do carbonato de lodenafila em comprimidos, pelos métodos propostos por CLAE, UV e EC.....	232

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico;
BGE	Background electrolyte;
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado;
CE	Capillary electrophoresis;
CL	Carbonato de Iodenafila;
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência;
CZE	Capillary zone electrophoresis;
DAD	Detecção de arranjo de diodos;
DCC	Delineamento composto central;
DSC	Calorimetria exploratória de varredura;
DE	Disfunção erétil;
DP	Degradation product;
ED	Erectile dysfunction;
ECZ	Eletroforese capilar de zona;
EOF	Electroosmotic flow;
GC	Guanilato ciclase;
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico;
GTP	Guanosina trifosfato;
ICH	International Conference on Harmonization;
k	Velocidade de reação;
LDH	Lactate dehydrogenase;
LSS	Lauril sulfato de sódio;
MS	Massas;
MSC	Model selection criteria;
MSR	Metodologia de superfície de resposta;
NANC	Não-adrenérgico e não-colinérgico;

NO	Óxido nítrico;
PDA	Photodiode array;
PDE5	Fosfodiesterase tipo 5;
PDE5i	Inibidores da fosfodiesterase tipo 5;
PI	Padrão interno;
r	Coeficiente de correlação de Pearson;
RSM	Response surface methodology;
SLS	Sodium lauryl sulfate;
SQ	Soma dos quadrados;
$t_{90\%}$	Tempo de vida útil;
t_m	Tempo de migração
UPLC	Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry;
USP	United States Pharmacopoeia;
WHO	World Health Organization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	31
2. OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVOS GERAIS	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	41
3.1 DISFUNÇÃO ERÉTIL	43
3.2 TRATAMENTO	44
3.3 HISTÓRICO DOS INIBIDORES DA FOSFODIESTERASE TIPO 5	46
3.4 CARBONATO DE LODENAFILA	48
3.4.1 Descrição.....	51
3.4.2 Mecanismo de ação.....	51
3.4.3 Propriedades farmacocinéticas.....	53
3.4.4 Efeitos adversos.....	54
3.4.5 Validação de métodos analíticos.....	55
3.4.6 Estudos de estabilidade.....	55
3.4.8 Determinação do carbonato de lodenafila.....	58
3.5 REFERÊNCIAS	59
4. CAPÍTULO I - Análise qualitativa do carbonato de lodenafila SQR e comprimidos	67
4.1INTRODUÇÃO	69

4.1.1 Carbonato de Iodenafile - SQR.....	70
4.1.2 Forma farmacêutica.....	70
4.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	70
4.2.1 Parte experimental.....	71
4.2.2 Resultados e discussão.....	71
4.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	72
4.3.1 Parte experimental.....	73
4.3.2 Resultados e discussão.....	73
4.4 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV).....	79
4.4.1 Parte experimental.....	79
4.4.2 Resultados e discussão.....	80
4.5 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV).....	82
4.5.1 Parte experimental.....	82
4.5.2 Resultados e discussão.....	83
4.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	87
4.6.1 Parte experimental.....	87
4.6.2 Resultados e discussão.....	88
4.7 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DA ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	89
4.7.1 Parte experimental.....	89
4.7.2 Resultados e discussão.....	90
4.8 ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA.....	91

4.8.1 Parte experimental.....	91
4.8.2 Resultados e discussão.....	92
4.9 REFERÊNCIAS.....	93
5. CAPÍTULO II - Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method for the Assay of Lodenafil Carbonate in Tablets.....	97
5.1 ABSTRACT.....	100
5.2 INTRODUCTION.....	101
5.3 EXPERIMENTAL.....	103
5.3.1 Samples.....	103
5.3.2 Reagents and Solvents.....	103
5.3.3 Instrumentation and Analytical Conditions.....	103
5.3.4 Preparation of Lodenafil Carbonate Reference Standard.....	104
5.3.5 Preparation of Sample Solution.....	104
5.3.6 Validation Study.....	104
5.3.6.1 Linearity.....	105
5.3.6.2 Specificity.....	105
5.3.6.3 Precision.....	106
5.3.6.4 Accuracy.....	106
5.3.6.5 Robustness.....	107
5.3.6.6 Stability of Sample Solution.....	107
5.3.6.7 System Suitability Test.....	107

5.4 RESULTS	108
5.4.1 Method Development	108
5.4.2 Method Validation	108
5.4.2.1 Linearity.....	108
5.4.2.2 Specificity.....	108
5.4.2.3 Precision.....	111
5.4.2.4 Accuracy.....	112
5.4.2.5 Robustness.....	113
5.4.2.6 Stability of Sample Solution.....	115
5.4.2.7 System Suitability Test.....	115
5.5 DISCUSSION	115
5.6 CONCLUSION	117
5.7 ACKNOWLEDGMENTS	118
5.8 REFERENCES	118
6. CAPÍTULO III - Development and Validation of a UV-Spectrophotometric Method for the Determination of Lodenafil Carbonate in Tablets and Comparison with the LC-method	121
6.1 ABSTRACT	124
6.2 INTRODUCTION	125

6.3 MATERIALS AND METHODS	126
6.3.1 Reagents and chemicals	126
6.3.2 Apparatus	127
6.3.3 Preparation of Standard Solutions	127
6.3.4 Preparation of Sample Solutions	128
6.4 METHOD VALIDATION	129
6.4.1 Specificity	129
6.4.2 Linearity	129
6.4.3 Precision	129
6.4.4 Accuracy	130
6.5 RESULTS AND DISCUSSION	130
6.5.1 Comparison between UV-spectrophotometric method and LC method	134
6.6 CONCLUSIONS	135
6.7 ACKNOWLEDGEMENTS	135
6.8 REFERENCES	135
7. CAPÍTULO IV – Lodenafil Carbonate Tablets: Optimization and Validation of a Capillary Zone Electrophoresis Method	137
7.1 ABSTRACT	140
7.2 INTRODUCTION	141
7.3 EXPERIMENTAL	143
7.3.1 Chemical and reagents	143

7.3.2 Apparatus and electrophoretic conditions.....	143
7.3.3 Background electrolyte solution preparation.....	144
7.3.4 Preparation of reference substance solution.....	144
7.3.5 Sample preparation.....	144
7.3.6 Statistical software and design of experiment for method optimization.....	145
7.4 VALIDATION.....	146
7.4.1 Specificity.....	146
7.4.2 Linearity.....	146
7.4.3 Precision.....	147
7.4.4 Accuracy.....	147
7.4.5 Robustness.....	147
7.5 RESULTS AND DISCUSSION.....	148
7.5.1 Method validation.....	149
<i>7.5.1.1 Specificity.....</i>	<i>149</i>
<i>7.5.1.2 Linearity.....</i>	<i>152</i>
<i>7.5.1.3 Precision.....</i>	<i>152</i>
<i>7.5.1.4 Accuracy.....</i>	<i>153</i>
<i>7.5.1.5 Robustness.....</i>	<i>154</i>
7.5.2 Comparison between the CZE method, UV-spectrophotometric method and HPLC method.....	157
7.6 CONCLUSION.....	157

7.7 ACKNOWLEDGMENTS	157
7.8 REFERENCES	158
8. CAPÍTULO V - Photodegradation Kinetics of Lodenafil Carbonate, Structure Elucidation of Two Major Degradation Products Using UPLC-MS/MS and In Vitro Cytotoxicity	161
8.1 ABSTRACT	164
8.2 INTRODUCTION	165
8.3 EXPERIMENTAL	166
8.3.1 Chemicals and Reagents	166
8.3.2 Instrumentation and analytical conditions	167
8.3.3 Preparation of sample stock solution	168
8.3.4 Photodegradation studies	168
8.3.5 Kinetics determination	168
8.3.6 Identification of the photodegradation products	169
8.3.7 In vitro cytotoxicity assay	169
8.4 RESULTS AND DISCUSSION	170
8.5 CONCLUSIONS	177
8.6 ACKNOWLEDGMENTS	178
8.7 REFERENCES	178
9. CAPÍTULO VI- Development and Validation of a Dissolution Test for Lodenafil Carbonate Based on In Vivo Data	181
9.1 ABSTRACT	184

9.2 INTRODUCTION	185
9.3 MATERIALS AND METHODS	186
9.3.1 Reagents and chemicals	186
9.3.2 In vivo study	156
9.3.3 In vitro study	187
9.3.3.1 <i>Solubility of samples</i>	187
9.3.3.2 <i>Dissolution test</i>	187
9.3.3.3 <i>UV spectrophotometric method</i>	188
9.3.4 Data analysis	188
9.3.5 Validation of the dissolution test	188
9.3.5.1 <i>Specificity</i>	188
9.3.5.2 <i>Linearity</i>	189
9.3.5.3 <i>Accuracy/precision</i>	189
9.3.5.4 <i>Standard and sample solution stability</i>	189
9.3.6 Evaluation of release kinetics	190
9.4 RESULTS AND DISCUSSION	190
9.4.1 In vivo study	190
9.4.2 In vitro study	191
9.4.2.1 <i>Solubility of samples</i>	191
9.4.2.2 <i>Dissolution test</i>	193
9.4.3 Validation	166

9.4.3.1 <i>Specificity</i>	196
9.4.3.2 <i>Linearity</i>	196
9.4.3.3 <i>Accuracy and precision</i>	197
9.4.3.4 <i>Standard and sample solution stability</i>	198
9.4.4 Kinetics of drug release	199
9.5 CONCLUSION	199
9.6 ACKNOWLEDGEMENTS	200
9.7 REFERENCES	200
10. DISCUSSÃO GERAL	203
11. CONCLUSÕES	217
12. REFERÊNCIAS	223
13. ANEXOS	227

1. INTRODUÇÃO

A disfunção erétil (DE) definida pelo Instituto Nacional de Saúde como a dificuldade em obter e/ou manter a ereção durante o ato sexual, de forma a levar o casal à satisfação, está inserida dentro do campo dos distúrbios da sexualidade humana (NIH, 1993). Estimativas sugerem que a disfunção erétil afeta cerca de 150 milhões de homens em todo o mundo, e as taxas deverão duplicar até o ano de 2025 (AYTAC, 1999). No Brasil, estima-se haver mais de 10 milhões de homens com queixa de disfunção erétil (MILFONT & CUNHA, 2007; GROMATZKY, 2008).

Embora não seja uma ameaça à vida, essa disfunção sexual não deve ser considerada uma desordem benigna, já que pode afetar negativamente o relacionamento interpessoal e comprometer o bem-estar e a qualidade de vida de homens e mulheres. As disfunções eréteis constituem, muitas vezes, a primeira manifestação de patologias sistêmicas. Existe alta incidência de doença cardiovascular em homens com disfunção erétil (SINGH et al., 2009) e os dados sugerem que a DE pode ser uma das primeiras manifestações de disfunção endotelial, na presença ou ausência de fatores de risco cardiovascular, como hipertensão, diabetes mellitus, hiperlipidemia, tabagismo, obesidade e envelhecimento (AVERSA et al., 2010).

O tratamento medicamentoso oral, eficaz em até 80% dos casos, consagrou-se como a principal opção terapêutica de pacientes com disfunção erétil (CARÁ et al., 2003; GROMATZKY, 2008). Os inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE5i) são uma classe de medicamentos orais considerados seguros e eficientes (PARANHOS et al., 2007), que revolucionaram a maneira como os pacientes vem tratando a disfunção erétil (EARDLEY, 2006; McVART, 2007). Os PDE5i foram introduzidos no mercado em 1998, através da comercialização da sildenafil e desde então vêm sendo eficientemente utilizados para o tratamento da DE. Também surgiram no mercado a vardenafila, tadalafila, udenafila, mirodenafila, avanafila e a lodenafila. Esses fármacos apresentam mecanismo de ação semelhante, além de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas similares (PARANHOS et al., 2007). Com a inibição da PDE5, presente no pênis, ocorre aumento da circulação sanguínea, facilitando a obtenção da ereção, uma vez que ocorra um estímulo sexual adequado (MILFONT & CUNHA, 2007). Em 2009, as vendas desses medicamentos

movimentaram mais de R\$ 500 milhões no país, segundo a consultoria IMS Health (PINHO, 2010).

O carbonato de Iodenafile, Helleva®, é um inibidor seletivo da PDE5, que vem sendo utilizado para o tratamento da DE. Teve registro concedido em 22 de outubro de 2007, com a consequente autorização do Ministério da Saúde para sua comercialização em todo o território nacional (ABIQUIF, 2008). Produzido pelo laboratório paulista Cristália, o Helleva® é vendido em duas apresentações: dois e quatro comprimidos de 80 mg. Este fármaco apresenta poucas publicações, sendo estas relacionadas a estudos farmacológicos (GALVÃO et al., 2007; TOQUE et al., 2008a; GLINA et al., 2009; GLINA et al., 2010; SILVA et al., 2010), porém não existem estudos publicados quanto à determinação quantitativa, tanto como matéria-prima quanto na forma farmacêutica de comprimidos.

Para o registro de um medicamento novo, a análise da qualidade dos medicamentos é feita internamente à Gerência de Medicamentos Novos, Pesquisa e Ensaios Clínicos (GEPEC), na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Além da parte documental, esta análise envolve uma parte ligada ao relatório técnico sobre o produto, onde são fornecidas informações técnicas sobre os princípios ativos, os testes de estabilidade e diversos outros aspectos ligados à produção e controle de qualidade do produto submetido para registro (NISHIOKA, 2006). Admite-se que, para novos fármacos, informações sobre a estabilidade da molécula e métodos empregados nos estudos de estabilidade e no controle de qualidade são usualmente mantidos em sigilo pelos detentores da patente do fármaco (BAKSHI & SINGH, 2002). Desta forma, pressupõe-se que os produtos que estão sendo comercializados já tenham estes dados, mas não disponíveis. Assim sendo, enquanto é aguardada a publicação destes estudos, a qualidade do produto é dependente da idoneidade do laboratório produtor e dos órgãos responsáveis pela liberação do registro do medicamento.

Por estas razões, o carbonato de Iodenafile foi selecionado para possibilitar a obtenção de novos dados científicos em relação à análise qualitativa e quantitativa desse fármaco, tanto na forma de matéria-prima, como de medicamento. Também são inexistentes monografias a respeito do produto. Justifica-se, portanto,

a realização desta tese pela importância do desenvolvimento e validação dos métodos analíticos em produtos farmacêuticos, contribuindo para o controle da qualidade de novos fármacos, imprescindíveis para a avaliação de identidade, pureza e potência dos produtos farmacêuticos, garantindo sua segurança e eficácia terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e validar métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa de carbonato de lodenafila em comprimidos, bem como o perfil de dissolução *in vitro* do produto. Além disso, realizar estudos de estabilidade, elucidando seus prováveis produtos de degradação majoritários.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterizar a substância química de referência (SQR) do fármaco por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e do infravermelho (IV), espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN);
- ❖ Identificar o carbonato de lodenafila em comprimidos por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do UV, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC);
- ❖ Desenvolver e validar métodos para a quantificação do carbonato de lodenafila em comprimidos por espectrofotometria na região do UV, CLAE e EC;
- ❖ Realizar estudo comparativo entre os métodos propostos;
- ❖ Desenvolver e validar ensaio de dissolução;
- ❖ Avaliar a fotoestabilidade do produto e determinar a cinética de fotodegradação;
- ❖ Identificar os produtos de degradação majoritários;
- ❖ Avaliar a citotoxicidade *in vitro* da amostra de carbonato de lodenafila degradada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DISFUNÇÃO ERÉTIL

Denominada anteriormente como impotência sexual, o termo de significado inespecífico e com conotação negativa, foi substituído por um mais preciso: disfunção erétil (NIH, 1993; MARINELLI et al., 2003). A disfunção erétil representa a incapacidade repetida ou permanente de conseguir ou manter a ereção para uma relação sexual satisfatória (MILFONT & CUNHA, 2007).

Estudo realizado em Massachusetts sobre o envelhecimento masculino foi o primeiro estudo abrangente de dados, que analisou uma grande quantidade de homens, com idade entre 40 e 70 anos, e demonstrou que 52% dos entrevistados possuem DE. Além disso, a taxa de incidência anual aumentou a cada década de idade, sendo de 12,4, 29,8 e 46,4 casos por 1000 homens/ano, para homens com idade de 40 a 49, 50 a 59 e 60 a 69, respectivamente (JOHANNES et al., 2000). A projeção para 2025 mostra que cerca de 322 milhões de homens terão DE, com maior projeção para os países em desenvolvimento, ou seja, países na África, Ásia e América do Sul (AYATAC et al., 1999).

Segundo Marinelli e colaboradores (2003), no Brasil, a prevalência de disfunção erétil em homens com 40 a 70 anos é de 48,8%, com 26,6% de disfunção mínima, 18,3% de moderada e 3,9% de completa. Estima-se que cerca de 25 milhões de homens com mais de 18 anos sofrem de algum grau de DE e 11,3 milhões apresentam disfunção moderada ou grave e que aproximadamente um milhão de novos casos ocorrem a cada ano (MOREIRA et al., 2003).

Na década de 70 do século passado a DE era considerada uma condição predominantemente de origem psicológica, levando à provável subnotificação desta condição. Porém, outras causas da DE foram bem descritas ao longo dos anos, incluindo fatores neurogênicos (pacientes após a cirurgia pélvica radical, doença de Parkinson, epilepsia, derrame ou Alzheimer), endócrinos (hipogonadismo) e arteriogênicos (BEROOKHIM & BAR-CHAMA, 2011).

A DE representa um dos primeiros sinais e sintomas de disfunção endotelial e aterosclerose, devendo ser considerada não só um marcador de doença arterial

coronariana como também uma condição relacionada à ocorrência de eventos coronarianos maiores como infarto do miocárdio e a necessidade de revascularização percutânea do miocárdio (ORTIZ et al., 2005). Existem evidências para a associação entre a DE e várias outras doenças, incluindo hipertensão, diabetes, obesidade, distúrbios do trato urinário inferior, deficiência de testosterona/hipogonadismo, doença pulmonar. A utilização de alguns medicamentos, como digoxina, diuréticos tiazídicos, antidepressivos, antiandrogênios, anti-hipertensivos, antipsicóticos, bloqueadores dos receptores H2, agentes antilipídêmicos, medicamentos citotóxicos e cetoconazol também está associada à DE (LEVINE, 2000; SCHIAVINI & DAMIÃO, 2010; VIGNERA et al., 2012). O tabagismo, o alcoolismo e o uso de drogas ilícitas também são fatores predisponentes para os distúrbios da ereção (LEVINE, 2000; FORESTA et al., 2008; GROMATZKY, 2008; AVERSA et al., 2010; BEROOKHIM & BAR-CHAMA, 2011).

3.2 TRATAMENTO

Os tratamentos farmacológicos atuais não curam a DE, mas, geralmente, promovem melhora significativa na função erétil. Antes de um tratamento farmacológico, condições subjacentes reversíveis, como obesidade, comorbidades médicas, problemas de relacionamento, hábitos de vida prejudiciais deveriam ser abordadas e tratadas simultaneamente com o início do tratamento específico para DE. Além disso, mudanças de hábitos como praticar exercícios físicos, deixar de fumar e a perda de peso poderiam trazer algum benefício (McVART, 2007; MILFONT & CUNHA, 2007; ALBERSEN et al., 2011).

Segundo Schiavini e Damião (2010), existem três linhas de terapias. Na farmacoterapia de primeira linha encontram-se os inibidores da fosfodiesterase tipo 5; opções de segunda linha incluem dispositivo de vácuo, terapia com injeções penianas e medicação intrauretral; e como terapia de terceira linha: implantação de prótese peniana. Além de, reposição hormonal e psicoterapia (BRANT et al., 2007; McVART, 2007; GROMATZKY, 2008).

Os medicamentos utilizados na farmacoterapia para a DE podem ser divididos de acordo com seu modo de ação, vias de administração e mecanismos de seletividade. Em geral, eles possuem ação central ou periférica, onde esta última visa principalmente o relaxamento das células da musculatura lisa via guanosina monofosfato cíclica (GMPc) ou adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (Tabela 1) (CHEW, 2006).

Tabela 1. Fármacos empregados na farmacoterapia da DE. Adaptada de CHEW, 2006.

(A) De acordo com o local de ação

— **Fármacos de ação central**

loimbina

Melanotan II

Apomorfina (sublingual)

— **Fármacos de ação periférica**

Inibidores da fosfodiesterase tipo 5

Timoxamina

Fenoxibenzamina

(B) De acordo com a ação nas células da musculatura lisa

— **Fármacos que aumentam o relaxamento das células da musculatura lisa**

Inibidores da fosfodiesterase tipo 5

Nitroprussiato de sódio

Cloridrato de linsidomina

— **Fármacos que diminuem a contração das células da musculatura lisa**

Fentolamina

Trazodona

(C) De acordo com a rota bioquímica

— **Agentes que atuam através de GMPc**

Inibidores da fosfodiesterase tipo 5

L-arginina

— **Agentes que atuam via AMPc**

Alprostadil (intracavernosa, transuretral, transmucosa)

Papaverina

Polipeptídeo intestinal vasoativo

3.3 HISTÓRICO DOS INIBIDORES DA FOSFODIESTERASE TIPO 5

Na década de 80, cinco PDEs foram identificados. PDE3 e PDE4 que catalisam, especificamente, a quebra de AMPc, e PDE1 e PDE2, que catalisam a

quebra de AMPc e GMPc. O quinto membro deste grupo, PDE5, catalisa, exclusivamente, a degradação do GMPc (LA FUENTE et al., 2001; GHOFRANI et al., 2006).

Em 1986, a Pfizer determinou a desenvolver um inibidor seletivo da PDE5, sintetizou um novo composto pirazolopirimidina, inibidor potente da PDE5, sendo designado quimicamente como 1-[4-etoxi-3-(6,7-diidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H pirazol [4,3- d]pirimidin -5- il) fenilsulfonil]-4 -metilpiperazina, inicialmente denominado UK-92,480, mais tarde conhecido como sildenafil (GHOFRANI et al., 2006). O objetivo era utilizar essa substância no tratamento da angina. Em 1991, os estudos demonstraram que essa substância possuía um tempo de meia vida curto, modesto efeito na redução da pressão arterial, moderado efeito vasodilatador em pacientes com angina; além disso, foram observados efeitos colaterais associados com a vasodilatação, como dor de cabeça, rubor, indigestão, dores musculares e ereção peniana. Desse modo, a substância passou a ser contraindicada em pacientes que tomam nitratos, pois o uso simultâneo resultaria em grave hipotensão sistólica. Para o tratamento de angina, o curto tempo de meia vida da sildenafil exigia administração pelo menos três vezes por dia, além da interação com os nitratos. Por isso a pesquisa com sildenafil foi voltada para o tratamento da DE (GHOFRANI et al., 2006).

Em 1998, a introdução da nova classe de medicamentos, os inibidores da fosfodiesterase tipo 5, relativamente eficazes e seguros, através do citrato de sildenafil (Viagra[®]), revolucionou o tratamento da DE (EARDLEY, 2006; GOOREN, 2008; WILLIAMS & MELMAN, 2012). Após poucas semanas da introdução do citrato de sildenafil no mercado americano, mais de um milhão de pacientes receberam prescrição desse fármaco (GHOFRANI et al., 2006).

Em 2003, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou dois novos PDE5i, o cloridrato de vardenafila (Levitra[®]) e tadalafila (Cialis[®]) (BRANT et al., 2007; MCNAMARA & DONATUCCI, 2011). Após, surgiram o carbonato de lodenafila (Helleva[®]), aprovado para comercialização pelo Ministério da Saúde em 2007 (ABIQUIF, 2008; TOQUE et al., 2008a), udenafila (Zydena[®]), aprovado pelo Korean Food and Drug Administration (KFDA) e comercializado na Coreia e Rússia (KIM et

al., 2008; ALWAAL et al., 2011; CHO et al., 2012), e mirodenafila (Mvix[®]), recentemente comercializada na Coreia do Sul (CHOI et al., 2009, KIM et al. 2010; MCNAMARA & DONATUCCI, 2011). Avanafila (Stendra[®]) é um novo inibidor da PDE5, aprovado pelo FDA em abril deste ano (ALWAAL et al., 2011; KOTERA et al., 2012; TRAYNOR, 2012).

A estimulação sexual leva à liberação de óxido nítrico no corpo cavernoso e resulta em um aumento de GMPc que produz relaxamento do músculo liso e aumenta o fluxo sanguíneo (CHEW, 2006). As fosfodiesterases (PDEs) são isoenzimas cuja principal atividade biológica é modular os níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos como guanosina monofosfato cíclico e adenosina monofosfato cíclico. Isoenzimas PDE5 estão envolvidas na inativação do GMPc nas células musculares lisas através de sua degradação (VLACHOPOULOS et al., 2009).

Inibidores da PDE5 são análogos não hidrolisados do GMPc e exercem seus efeitos benéficos sobre o relaxamento do músculo liso (ALBERSEN et al., 2011). PDE5i inibem a hidrólise do GMPc, aumentando o fluxo de sangue para o pênis durante a estimulação sexual, permitindo que seja alcançada ou mantida uma resposta erétil (CHEW, 2006; GOOREN, 2008).

3.4 CARBONATO DE LODENAFILA

O carbonato de lodenafila (CL) é um pró-farmaco apresentado como dímero formado por duas moléculas de lodenafila ligadas por uma ponte carbonato. Após a ingestão, é cindido no organismo, liberando seu metabólito ativo, a lodenafila, um inibidor seletivo da PDE5 (TOQUE et al., 2008a; GLINA et al., 2009; GLINA et al., 2010; SILVA et al., 2010; MCNAMARA & DONATUCCI, 2011).

A síntese do carbonato de lodenafila não está disponível na literatura. Porém, no artigo publicado por TOQUE et al. (2008b) existem rotas de síntese para análogos da sildenafil e pode-se observar a estrutura da lodenafila denominada como um intermediário da síntese desses análogos. Sendo assim, a rota descrita

poderia ser uma rota de síntese para a lodenafila.

Segundo Toque et al. (2008b) é possível adquirir comercialmente a 4-amino-4,5-diidro-1-metil-3-propil-1H-pirazol-5-carboxamida (1) que reage com cloreto de 2-etoxi-benzoila (2) na presença de trietilamina (TEA)/4-(dimetilamino) piridina (DMAP), obtendo-se o 4-(2-etoxibenzamida)-1-metil-3-propil-1H-pirazol 5-carboxamida (3). A ciclização do intermediário (3), em presença de H₂O₂ a 35% e pastilhas de NaOH gera a 5-(2-etoxifenil)-1-metil-3-propil-1H-pirazol [4,3-d] pirimidina-7 (6H)-ona (4). A reação de (4) com ácido clorossulfônico gera o intermediário 4-etoxi-3-(6,7-diidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazol [4,3-d] pirimidina-5-il) benzeno-1 cloreto de sulfonila (5a). A alquilação do intermediário 5a, com e N-hidroxi-etil-piperazina produz 5-{2-etoxi-5-[(4-hidroxi-etil)-piperazinilsulfonil]fenil}-1-metil-3-N-propil-1,6-diidro-7H-pirazol [4,3-d] pirimidina-7-ona (5b) (Figura 1), com estrutura idêntica à lodenafila.

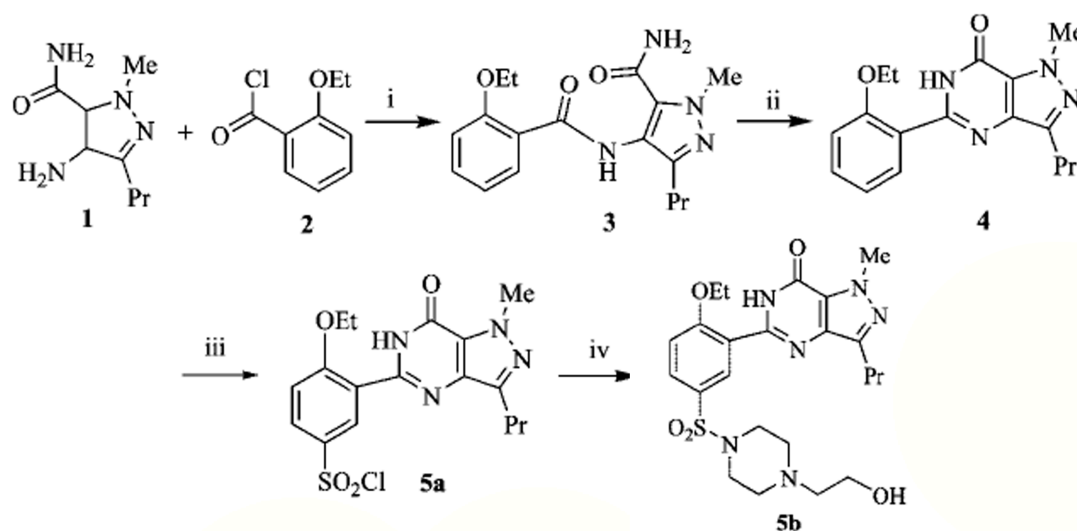


Figura 1. Provável rota de síntese da lodenafila. Reagentes e condições: (i) TEA, DMAP/anidro CH₂Cl₂; (ii) pastilhas de NaOH, H₂O₂ (35%), H₂O/ETOH; (iii) ClSO₃H, 0°C, N₂; (iv) 4-hidroxi-etil piperazina, TEA/ETOH. Adaptado de TOQUE et al., 2008b.

Camerlingo (2010), propõe que o carbonato de lodenafila é sintetizado utilizando a técnica de modificação molecular - latenciação. A proposta de síntese está representada na Figura 2, onde o início ocorre com a reação da lodenafila com

o reagente fosgênio (COCl_2), resultando na formação do cloroformato de lodenafila, o qual ao reagir com outra molécula de lodenafila forma a ligação carbonato, resultando assim no carbonato de lodenafila.

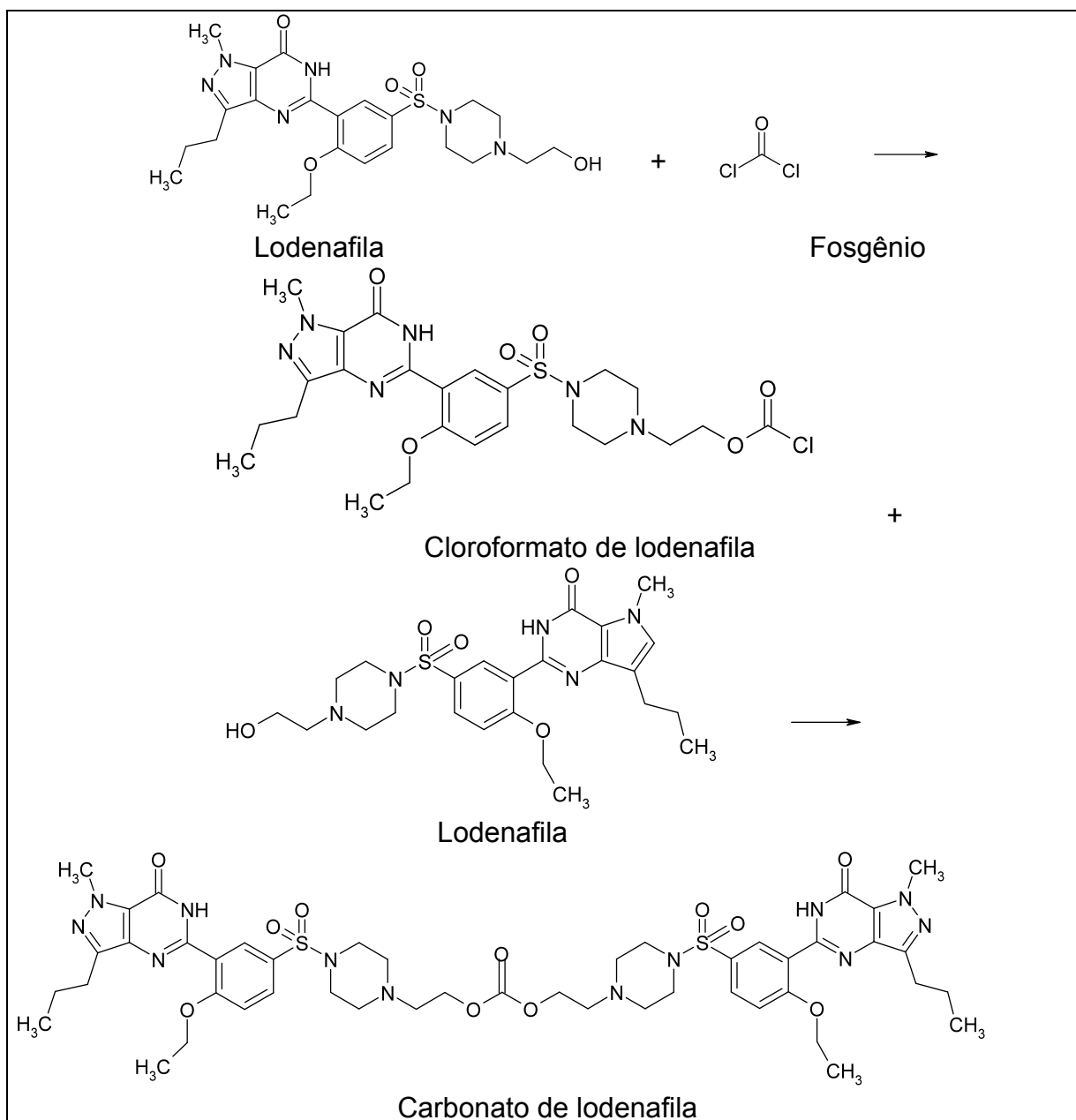


Figura 2. Proposta de síntese do carbonato de lodenafila. Fonte: CAMERLINGO 2010.

3.4.1 Descrição (WHO, 2006; BRASIL, 2007; TOQUE et al., 2008a)

Nome químico: carbonato de bis-(2-{4-[4-etoxi-3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazol[4,3-d]pirimidina-5-il)-benzenosulfonil]piperazina-1-il}-etila).

CAS: 608137-32-2.

Estrutura química: ver Figura 3.

Fórmula molecular: C₄₇H₆₂N₁₂O₁₁S₂.

Massa molecular: 1034 Daltons.

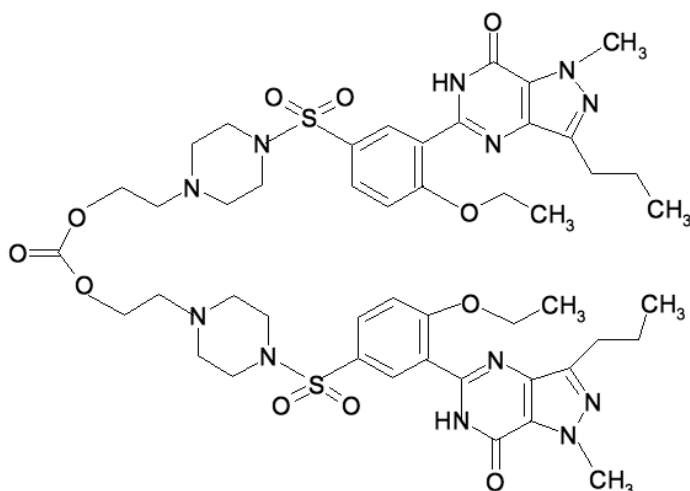


Figura 3. Estrutura química do carbonato de Iodanafilol (WHO, 2006).

3.4.2 Mecanismo de ação

A flacidez peniana é resultante de um estado relativamente elevado do tônus simpático. Os músculos lisos no corpo cavernoso estão em estado de contração, e o fluxo de sangue no corpo cavernoso é relativamente baixo (NEVES et al., 2004; SCHIAVINI & DAMIÃO, 2010). A ereção peniana é um fenômeno neurovascular modulado por fatores psicológicos e hormonais, cujo resultado final é o relaxamento

da musculatura lisa do pênis. Este fenômeno envolve complexa interação entre o sistema nervoso central e periférico, bem como a vascularização peniana (NEVES et al., 2004; BARRETT et al., 2005; MCNAMARA & DONATUCCI, 2011).

Anatomicamente, o corpo cavernoso, principal músculo envolvido no processo da ereção, é enervado por, ao menos, três vias neuroefetoras responsáveis pela modulação de seu tônus: uma via adrenérgica, uma colinérgica e uma terceira denominada não-adrenérgica e não-colinérgica (NANC). A ereção ocorre quando, após estímulo sexual, ocorre inibição do tônus simpático, aumento da neurotransmissão parassimpática e liberação de óxido nítrico (NO) pelas vias NANC e por células endoteliais das arteríolas do pênis (LA FUENTE et al., 2001; NEVES et al., 2004).

O óxido nítrico é o principal promotor do relaxamento da musculatura lisa peniana. Ele penetra nas células musculares lisas do tecido cavernoso e ativa a guanilato ciclase (GC), que se encontra dissolvida em seu citoplasma. A GC ativada promove a transformação de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc). A GMPc ativa a proteína quinase G que participa, direta ou indiretamente de diversos processos promotores do relaxamento muscular liso (TODA et al., 2005; WILLIAMS & MELMAN, 2012). A concentração intracelular de GMPc é o principal determinante do estado de ereção ou flacidez peniana. Quanto maior a concentração de GMPc maior é o relaxamento da musculatura lisa e maior a probabilidade de ocorrer ereção (SCHIAVINI & DAMIÃO, 2010). A concentração de GMPc é controlada por enzimas denominadas fosfodiesterases que hidrolisam e inativam essa molécula (PARANHOS et al., 2007; TOQUE et al., 2008a; ALBERSEN et al., 2011).

A isoenzima PDE5 é a principal isoforma responsável pela degradação de GMPc no corpo cavernoso humano (GOOREN, 2008; ALBERSEN et al., 2011). Quando o estímulo sexual promove a liberação local de óxido nítrico, a inibição da PDE5 causada pelo carbonato de lodenafila aumenta os níveis de GMPc no corpo cavernoso, resultando no relaxamento da musculatura lisa, aumento do influxo de sangue para o pênis e facilitação da ereção (PENA, 2009) (Figura 4).

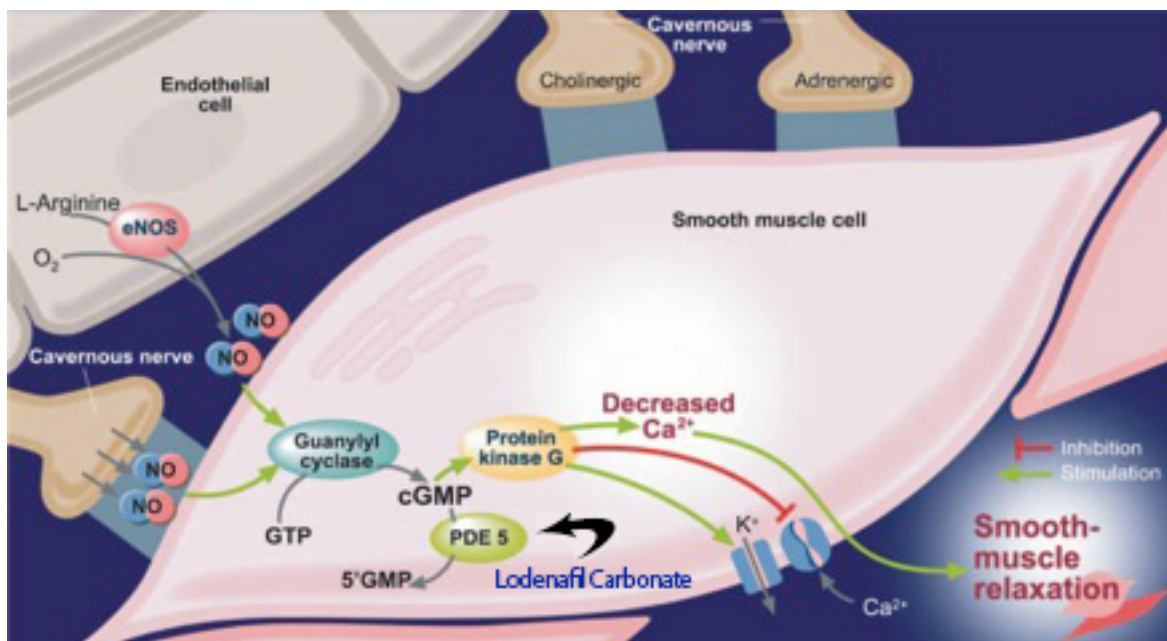


Figura 4. Mecanismo de ereção peniana e da ação dos inibidores da fosfodiesterase tipo 5. Adaptado de BARRETT et al., 2005.

3.4.3 Propriedades farmacocinéticas

A dimerização de moléculas de lodenafila com uma ponte carbonato tem a função de encobrir os radicais polares, tornando a molécula apolar e conseqüentemente, mais lipossolúvel, melhorando sua absorção (TOQUE et al., 2008a). A molécula de lodenafila é biotransformada por hidrólise no plasma onde sofre a cisão na ponte carbonato, liberando os dois monômeros de lodenafila, os quais são metabolizados por enzimas hepáticas e plasmáticas (LÚCIO et al., 2007).

O carbonato de lodenafila age liberando a lodenafila, que apresenta propriedades farmacocinéticas lineares nas doses de 40 mg, 80 mg e 160 mg, indicando comportamento dependente de dose (LÚCIO et al., 2007; GLINA et al., 2010). Os parâmetros farmacocinéticos após administração oral de 160 mg, em jejum, foram $C_{max} = 157$ ng/mL; $t_{max} = 1,2$ h; $t_{1/2} = 2,36$ h; $AUC = 530$ ng.h/mL. Quando administrado junto com refeição lipídica de 600 Kcal, os parâmetros foram $C_{max} = 148$ ng/mL; $t_{max} = 3,1$ h; $t_{1/2} = 2,63$ h; $AUC = 683$ ng.h/mL. A administração em presença de 0,5 mg/kg de álcool, altera os valores para: $C_{max} = 210$ ng/mL;

$t_{max} = 2,0$ h; $t_{1/2} = 2,84$ h; AUC = 932 ng.h/mL. A administração com lipídios ou álcool atrasa a absorção, mas aumenta a biodisponibilidade (GLINA et al., 2009; GLINA et al., 2010).

3.4.4 Efeitos adversos

Por ser um inibidor da PDE5, o carbonato de lodenafila apresenta reações adversas comuns ao grupo, como cefaléia, rubor, tontura, distúrbios visuais, rinite, dispepsia. Outras reações menos frequentes que também podem aparecer são: dor lombar, boca seca, cãimbra, fadiga, náusea, sensação de calor, agitação, hiperemia de conjuntiva, dispnéia, dor articular, dor no peito, dor ocular, gastrenterite, lacrimejamento, outros sintomas urinários (CARSON, 2007; PARANHOS et al., 2007; HELLEVA, 2008; ALBERSEN et al., 2011). Por ser metabolizado pela citocromo 450, especificamente pelas isoformas 3A4 e 2C9, inibidores destas isoformas podem retardar o metabolismo do carbonato de lodenafila (PENA, 2009).

Até o momento, não existem relatos sobre o efeito do carbonato de lodenafila em pacientes com problemas cardíacos. Em função da PDE5 ser distribuída em muitos tecidos, plaquetas, veias e músculo liso arterial (pulmonares, artérias coronárias e sistêmica), os inibidores da PDE5 afetariam o sistema cardiovascular, principalmente através da vasodilatação, muitas vezes causando pequenas diminuições na pressão arterial (SCHWARTZ & KLONER, 2012). Entretanto, os inibidores da PDE5 e a segurança cardiovascular estão bem documentados e não existem evidências que estes aumentem a incidência de infarto agudo do miocárdio e eventos cardiovasculares (mesmo em pacientes com doença arterial coronariana ou insuficiência cardíaca congestiva) (STEIN & HOHMANN, 2006; UCKERT & STIEF, 2011; SCHWARTZ & KLONER, 2012). Estes fármacos aumentariam o risco por sua ação indireta, já que ao proporcionarem a ereção, expõem o homem à atividade sexual. Durante a atividade sexual, a frequência cardíaca e a pressão arterial aumentam da mesma forma que em qualquer atividade física aeróbica,

então, a questão é se o grau de aumento é excessivo e potencialmente perigoso (STEIN & HOHMANN, 2006).

3.4.5 Validação de métodos analíticos

Através da validação de métodos analíticos é possível demonstrar a capacidade do método para a finalidade a que se destina, seja ela a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas, testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas, testes de desempenho (por exemplo: dissolução, liberação do ativo) ou testes de identificação (BRASIL, 2003; ICH, 2005; ROZET et al., 2007).

A validação é de grande importância, pois garante a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos. Sendo assim, antes de um método ser implementado para uso de rotina, deve primeiro ser validado, para demonstrar que é adequado para o propósito pretendido (ROZET et al., 2007).

Para os testes de identificação o parâmetro exigido é a especificidade, e para os testes de doseamento do princípio ativo os parâmetros são: especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005, USP 34, 2011).

3.4.6 Estudos de estabilidade

Estabilidade pode ser definida como o tempo durante o qual a matéria-prima ou a especialidade farmacêutica mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas que possuía quando da

época de sua fabricação (ANSEL et al., 2000; SILVA et al., 2009). A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Segundo Nudelman (1975), existem algumas as razões pelas quais se torna necessário estudar a estabilidade de fármacos. A primeira razão seriam os aspectos sanitários, os quais garantem que o medicamento é seguro e que contenha a quantidade de substância ativa necessária para o efeito terapêutico. Em segundo lugar razão legal, que exige que todos os medicamentos cumpram com suas condições de identidade, efetividade, potência, pureza e segurança durante o período em que se encontram disponíveis no mercado e até o momento do seu uso. E por fim, razões econômicas, que envolvem tanto o paciente como o fabricante.

Os estudos de estabilidade são considerados fundamentais, antes e após a fase de produção e desenvolvimento de formulações, tendo em vista, que estes fornecem informações relevantes a respeito da qualidade de um fármaco em função do tempo, permitindo, assim, estabelecer um período de re-teste para a substância ou a vida de prateleira do produto, recomendando, desse modo, as condições adequadas de estocagem (LACHMAN et al., 2001; ICH, 2003).

A RE nº 1/2005 da ANVISA (BRASIL, 2005) define três tipos de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos a fim de prever, determinar ou acompanhar o seu prazo de validade: estabilidade acelerada, estabilidade de longa duração e estabilidade de acompanhamento. No estudo de estabilidade acelerada são empregadas condições mais drásticas de temperatura e umidade, com o objetivo de acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas do produto farmacêutico. Visam a prever o efeito de pequenos desvios nas condições ideais de armazenamento, que poderão ocorrer durante o transporte. O estudo de estabilidade de longa duração é projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer

ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento. Os estudos de estabilidade de acompanhamento são realizados com o intuito de verificar a manutenção das características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas previstas nos estudos de estabilidade de longa duração.

A avaliação da fotoestabilidade, prevista nos estudos de degradação forçada (ICH, 2003), consiste em duas etapas: testes de degradação forçada e testes confirmatórios (ICH, 1996). O teste de degradação forçada envolve o fármaco isolado ou em suspensão/solução, disposto em recipientes transparentes e quimicamente inertes (ICH, 1996). Soluções do fármaco são mais susceptíveis e particularmente relevantes na compreensão do comportamento do produto em solução. Podem ser usadas várias condições de exposição, que dependerão da fotossensibilidade da substância e da intensidade das fontes de radiação empregadas (TØNESSEN, 2004).

O estudo da velocidade da mudança química e do modo como é influenciada por fatores como a concentração do fármaco ou do reagente, o solvente empregado, as condições de temperatura, pH, presença de catalisadores é denominado cinética de degradação. Ao considerar a estabilidade de um produto farmacêutico é preciso conhecer a ordem e a velocidade de reação. Dessa forma, na sua maioria, as reações de degradação dos fármacos ocorrem de acordo com as reações de ordem zero, primeira ordem, segunda ordem e pseudo primeira ordem (NUDELMAN, 1975; ANSEL et al., 2000; LACHMAN, 2001).

⇒ Reação de zero ordem: ocorre quando a velocidade da reação é independente da concentração da substância reativa e sim de outro fator como solubilidade ou absorção da luz em reações de fotossensibilidade. Obtém-se um gráfico de concentração (C) em função do tempo (t), cuja inclinação da reta corresponde à constante de velocidade da reação (K).

⇒ Reação de primeira ordem: ocorre quando a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração do reagente, onde o produto decompõe-se em um ou mais produtos. Esta reação pode ser representada pelo gráfico do logaritmo da concentração (log C) em função do tempo (t).

⇒ Reação de segunda ordem: ocorre quando a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração de dois reagentes, ou à segunda potência da concentração de um deles.

⇒ Reação de pseudo primeira ordem: são consideradas reações de segunda ordem que aparentam ser de primeira. Em casos onde o reagente encontra-se em excesso ou é mantido em concentração constante, a velocidade da reação é determinada em função de um dos reagentes, já que o segundo reagente não provoca alteração significativa na concentração do primeiro.

3.4.7 Determinação do carbonato de Iodenafila

A literatura científica apresenta um trabalho utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS/MS) para determinação do CL em fluidos biológicos (Tabela 2) (TOQUE et al., 2008a). Entretanto, são inexistentes métodos para determinação do carbonato de Iodenafila na forma farmacêutica, bem como método indicativo de estabilidade em presença de produtos de degradação.

Tabela 2. Resumo dos métodos analíticos cromatográficos (CLAE) para a determinação do CL em fluidos biológicos (TOQUE et al., 2008a).

Aplicação	Coluna	Fase móvel	Detecção
Sangue	C18 (100 x 2,1 mm, 4 µm, Genesis)	Água/ácido fórmico 10 mM:Acetonitrila/ácido fórmico, 80:20 (V:V)	Detector de massas
Plasma	C18 (150 x 4,6 mm, 4 µm, Genesis)	Gradiente: água/acetato de amônia 50 mM: acetonitrila/acetato de amônia 50 mM	Detector UV-Vis

3.5 REFERÊNCIAS

ABIQUIF - Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica. Um olhar sobre o mundo, n. 76, 2008. Disponível em: <http://www.abiquif.org.br/publicacoes/umolhar/um_olhar_76.pdf>. Acesso em: 01/12/2008.

ALBERSEN, M.; MWAMUKONDA, K. B.; SHINDEL, A. W.; LUE, T. F. Evaluation and treatment of erectile dysfunction. **Medical Clinics of North America**, v. 95, p. 201-212, 2011.

ALWAAL, A.; AL-MANNIE, R.; CARRIER, S. Future prospects in the treatment of erectile dysfunction: focus on avanafil. **Drug design, development and therapy**, v. 5, p. 435-443, 2011.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, J. L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ª Ed. São Paulo: Premier, 2000.

AVERSA, A.; BRUZZICHES, R.; FRANCOMANO, D.; NATALI, M.; GARERI, P.; SPERA, G. Endothelial dysfunction and erectile dysfunction in the aging man. **International Journal of Urology**, v. 17, p. 38-47, 2010.

AYTAC, I. A.; MCKINLAY, J. B.; KRANE, R. J. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. **British Journal of Urology**, v. 84, p. 50-56, 1999.

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

BARRET, T. D.; TRIGGLE, D. J.; WALKER, M. J. A.; MAURICE, D. H. Mechanism of tissue-selective drug action in the cardiovascular system. **Molecular Interventions**, v. 5, n. 2, p. 84-93, 2005.

BEROOKHIM, B. M.; BAR-CHAMA, N. Medical implications of erectile dysfunction. **Medical Clinics of North America**, v. 95, p. 213-221, 2011.

BRANT, W. O.; BELLA, A. J.; LUE, T. F. Treatment options for erectile dysfunction. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 36, p. 465-479, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação do guia para realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 25 ago. 2005.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 33, de 8 de junho de 2007. Inclusões na lista DCB publicada pela RDC nº. 211, de 17 de novembro de 2006. Diário Oficial da União, Brasília, 12 jun. 2007.

CAMERLINGO, C. E. **Carbonato de Iodenafila, um fármaco que fala português**. 2010. 122f. Trabalho de Graduação Interdisciplinar (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde) - Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2010.

CARÁ, A. M.; MATTOS JR., D.; DAMIÃO, R. Tratamento medicamentoso oral da disfunção erétil. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 29, suppl. 4, p. 35-38, 2003.

CARSON III, C. C. Phosphodiesterase type 5 inhibitors: state of the therapeutic class. **Urologic Clinics of North America**, v. 34, p. 507-515, 2007.

CHEW, K. Pharmacotherapy of erectile dysfunction: Current standards. **Indian Journal of Urology**, v. 22, p. 235-240, 2006.

CHO, H. J.; KU, W. S.; TERMSARAS, U.; YOON, I.; CHUNG, C. W.; MOON, W. T.; KIM, D. D. Development of udenafil-loaded microemulsions for intranasal delivery: in vitro and in vivo evaluations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 153-160, 2012.

CHOI, Y. H.; LEE, Y. S.; BAE, S. H.; KIM, T. K.; LEE, B. Y.; LEE, M. G. Dose-dependent pharmacokinetics and first-pass effects of mirodenafil, a new erectogenic, in rats. **Biopharmaceutical & Drug Disposition**, v. 30, p. 305-317, 2009.

EARDLEY, I. Erectile dysfunction: where are we going? **The Journal of Men's Health and Gender**, v. 3, n. 4, p. 323-325, 2006.

FORESTA, C.; CARETTA, N.; CORONA, G.; FABBRI, A.; FRANCAVILLA, S.; JANNINI, E.; MAGGI, M.; BETTOCCHI, C.; LENZI, A. Clinical and metabolic evaluation of subjects with erectile dysfunction: a review with a proposal flowchart. **International Journal of Andrology**, v. 32, p. 198-211, 2008.

GALVÃO, L. A.; PAGANI, E.; BARROS, A. J. The Iodenafil carbonate in the treatment of erectile dysfunction [Carbonato de Iodenafila no tratamento da disfunção erétil]. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 64, n. 9, p. 425-432, 2007.

GHOFRANI, H. A.; OSTERLOH, I. H.; GRIMMINGER, F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 689-702, 2006.

GLINA, S.; FONSECA, G. N.; BERTERO, E. B.; DAMIÃO, R.; ROCHA, L. C. A.; GLINA, S.; TOSCANO, I.; GOMATZKY, C.; DE GÓES, P. M.; NARDOZZA JR., A.; DE ALMEIDA CLARO, J. F.; PAGANI, E. Efficacy and tolerability of Iodenafil carbonate for oral therapy in erectile dysfunction: A phase II clinical trial. **Journal of Sexual Medicine**, v. 6. n. 2, p. 553-557, 2009.

GLINA, S.; FONSECA, G. N.; BERTERO, E. B.; DAMIÃO, R.; ROCHA, L. C. A.; JARDIM, C. R. F.; CAIROLI, C. E.; TELOKEN, C.; TORRES, L. O.; FARIA, G. E.; SILVA, M. B.; PAGANI, E. Efficacy and tolerability of Iodenafil carbonate for oral therapy of erectile dysfunction: A phase III clinical trial. **Journal of Sexual Medicine**, v. 7. n. 5, p. 1928-1936, 2010.
711

GOOREN, L. How to optimize treatment of erectile dysfunction above and beyond the beneficial effects of a phosphodiesterase type 5 inhibitor. **Journal of Men's Health**, v. 5, n. 2, p. 163-170, 2008.

GROMATZKY, C. Urologia e sexualidade. **Publicação do Núcleo Avançado de Urologia do Hospital Sírio-Libanês Maio/Junho**, 2 ed., p. 2, 2008.

HELLEVA, Monografia Cristália, Mono-UVF-HEL, n.1, 2008.

ICH – International Conference on Harmonisation. Guideline on stability testing: Photostability testing of new drug substances and products. Switzerland, 1996.

ICH – International Conference on Harmonization. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), Switzerland, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

JOHANNES, C. B., ARAUJO, A. B., FELDMAN, H. A., DERBY, C. A., KLEINMAN, K. P., MCKINLAY, J. B. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **Journal of Urology**, v. 163, p. 460-463, 2000.

KIM, B. H.; LIM, Y. S.; CHUNG, J. Y.; KIM, J. R.; LIM, K. S.; SOHN, D. R.; CHO, J. Y.; YU, K. S.; SHIN, S. G.; PAICK, J. S.; JANG, I. J. Safety, tolerability and pharmacokinetics of udenafil, a novel PDE-5 inhibitor, in healthy young korean subjects. **British Journal of Clinical**, v. 65, n. 6, p. 848-854, 2008.

KIM, H., SOHN, D. W., KIM, S. D., HONG, SH., SUH, H. J., LEE, C. B., KIM, S. W. The effect of mirodenafil on the penile erection and corpus cavernosum in the rat model of cavernosal nerve injury. **International Journal of Impotence Research**, p. 1-7, 2010.

KOTERA, J.; MOCHIDA, H.; INOUE, H.; NOTO, T.; FUJISHIGE, K.; SASAKI, T.; KOBAYASHI, T.; KOJIMA, K.; YEE, S.; YAMADA, Y.; KIKKAWA K.; OMORI, K. Avanafil, a potent and highly selective phosphodiesterase-5 inhibitor for erectile dysfunction. **Journal of Urology**, v. 188, p. 668-674, 2012.

LA FUENTE, J.; ESTEVÃO, L.; SOARES, J.; ALCINO, O.; PIMENTA, A. A família das fosfodiesterases. **Acta Urológica Portuguesa**, v. 18, n. 2, p. 17-21, 2001.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p. 1277-1355.

LEVINE, L. A. Erectile dysfunction: a review of a common problem in rapid evolution **Prim Care Update Ob/Gyns**, v. 7, n. 3, p. 124-129, 2000.

LUCIO L. A.; PAGANI, E.; AFIUNE, J. B. Carbonato de Iodenafila no tratamento da disfunção erétil. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 64, n. 9, p. 425-432, 2007.

MCVARY, K. T. Clinical practice. Erectile dysfunction. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 24, p. 2472-2481, 2007.

MCNAMARA, E.R; DONATUCCI, C. F. Newer phosphodiesterase inhibitors: Comparison with established agents. **Urologic Clinics of North America**, v. 38, p. 155-163, 2011.

MARINELLI, C.; MOREIRA JR., E. D.; ROCHA, L. C. A. Epidemiologia da disfunção erétil. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 29, n. 4, p. 5-8, 2003.

MILFONT, J. C. F.; CUNHA, P. B. Disfunção erétil e suas interfaces. **Revista de Angiologia e Cirurgia Vascular**, n. 2, p. 19-20, 2007.

MOREIRA JR., E. D., LÔBO, C. F. L., DIAMENT, A., NICOLSI, A., GLASSER, D. B. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: results from a population-based cohort study in Brazil. **Urology**, v. 61, n. 2, p. 431-436, 2003.

NEVES, G.; RATES, S. M. K.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Agentes dopaminérgicos e o tratamento da disfunção erétil. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 949-957, 2004.

NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. **The Journal of the American Medical Association**, v. 270, p. 83-90, 1993.

NISHIOKA, S. A. Como é feito o registro de medicamentos novos no Brasil. **Prática Hospitalar**, n. 45, p. 13-17, 2006.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.

ORTIZ, J.; Ortiz, S. T.; Monaco, C. G.; Yamashita, C. H.; Moreira, M. C. M.; Monaco, C. A. F. Disfunção erétil: um marcador para alterações da perfusão miocárdica? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 4, 2005.

PARANHOS, M.; ANDRADE, E.; CLARO, J. Medicamentos usados no tratamento da disfunção erétil na atualidade. Indicações, usos e complicações. **Prática Hospitalar**, n. 52, p. 188-191, 2007.

PENA, C. B. **Associação de carbonato de Iodenafil (Helleva) e treinamento físico na ereção peniana de ratos**. Campinas: UNICAMP, 2009, 87 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

PINHO, A. Cai a patente do Viagra; genérico chega em junho, 2010. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/falsificados/index.htm>> Acesso em 29/04/2010.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SCHIAVINI, J. L.; DAMIÃO, R. Abordagem da disfunção erétil. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ** Ano 9, p. 48-59, 2010.

SCHWARTZ, B. G.; KLONER, R. A. Drug interactions with phosphodiesterase-5 inhibitors used for the treatment of erectile dysfunction or pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 122, p. 88-95, 2010.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 20, n. 2, p. 1-8, 2009.

SILVA, A. C.; TOFFOLETTO, O.; LUCIO, A. G.; SANTOS, P. F.; AFIUNE, J. B.; FILHO, J. M.; TUFIK, S. Repercussão cardiovascular, com e sem álcool, do Carbonato de Lodenafila, um novo inibidor da PDE5. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 2, p. 160-167, 2010.

SINGH, S.; PRASAD, B.; SAVALIYA, A. A.; SHAH, R. P.; GOHIL, V. M.; KAUR, A. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 13-28, 2009.

STEIN, R.; HOHMANN, C. B. Sexual activity and heart. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.86, n. 1, 2006.

TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Nitric oxide and penile erectile function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, p. 233-266, 2005.

TØNNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 1-14, 2001.

TOQUE, H.A.; TEIXEIRA, C. E.; LORENZETTI, R.; OKUYAMA, C. E.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Pharmacological characterization of a novel phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor Iodenafil carbonate on human and rabbit corpus cavernosum. **European Journal of Pharmacology**, n. 591, p. 189-195, 2008a.

TOQUE, H. A. F.; PRIVIERO, F. B. M.; TEIXEIRA, C. E.; PERISSUTTI, E.; FIORINO, F.; SEVERINO, B.; FRECENTESE, F.; LORENZETTI, R.; BARACAT, J. S.; SANTAGADA, V.; CALIENDO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Synthesis and Pharmacological Evaluations of Sildenafil Analogues for Treatment of Erectile Dysfunction. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 2807-2815, 2008b.

TRAYNOR, K. FDA approves new ED remedy. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 69, n. 1, p. 906, 2012.

UCKERT, S.; STIEF, C. G. Treatment of erectile dysfunction and lower urinary tract symptoms by phosphodiesterase inhibitors. In: FRANCIS et al. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**; v. 204, Berlin: Springer-Verlag, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA, The (USP). Validation of Compendial Methods (1225), USP 34, NF 29, Rockville, 2011.

VIGNERA, S. L.; CONDORELLI, R.; VICARI, E.; D'AGATA, R.; CALOGERO, A.E. Physical activity and erectile dysfunction in middle-aged men. **Journal of Andrology**, v. 33, p. 154-161, 2012.

VLACHOPOULOS, C.; IOAKEIMIDIS, N.; ROKKAS, K.; STEFANADIS, C. Treatment options for erectile dysfunction. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 36, p. 465-479, 2009.

WILLIAMS, S. K.; MELMAN, A. Novel therapeutic targets for erectile dysfunction. **Maturitas**, v. 71, p. 20-27, 2012.

WHO Drug Information, v. 20, n. 3, 2006.

4. CAPÍTULO I

Análise qualitativa do carbonato de Iodenafila SQR e comprimidos

4.1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos medicamentos constitui um fator fundamental para assegurar a sua eficácia e minimizar a ocorrência de efeitos indesejados decorrentes da presença de impurezas e/ou produtos de degradação (MOREIRA et al., 2010). Por serem utilizadas como parâmetro de comparação, as substâncias químicas de referência devem ter elevado grau de pureza, uma vez que podem afetar a qualidade dos resultados (BRASIL, 2002; GIL et al., 2005). Para tanto, materiais de referência bem caracterizados e com pureza documentada devem ser utilizados para o estudo de validação (ICH, 2005). Segundo o FDA (2000), existem duas categorias de padrões de referência, os compendiais e não compendiais. As substâncias de referência compendiais são obtidas de fontes como Farmacopeia Brasileira, *United States Pharmacopoeia* (USP), Farmacopeia Europeia e não necessitam de caracterização posterior. As substâncias de referência não compendiais são aquelas com elevado teor de pureza, entretanto necessitam ser cuidadosamente caracterizadas.

A realização de testes de identificação do fármaco, além de sua quantificação, é necessária no controle da qualidade de formas farmacêuticas. Estes testes são realizados através de métodos instrumentais (espectrofotometria na região do UV e IV, DSC, CLAE, EC) e não instrumentais, como a CCD (GIL et al., 2005).

A substância química de referência (SQR) utilizada nesta tese é classificada como não compendial, assim o objetivo deste estudo é a caracterização da SQR do carbonato de lodenafila por calorimetria exploratória diferencial, análise de espectros de absorção nas regiões do UV, IV e RMN de ^1H e ^{13}C . Além disso, realizar a identificação dos comprimidos mediante a aplicação da cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do UV, CLAE e EC.

4.1.1 Carbonato de lodenafila – SQR

Utilizou-se como SQR a matéria-prima do carbonato de lodenafila fornecida pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. De acordo com o laudo do fabricante, o teor da matéria-prima, identificada pelo lote 0414/09, é de 100,5%.

4.1.2 Forma farmacêutica

Os comprimidos de carbonato de lodenafila, sob o nome de Helleva® (Cristália) foram adquiridos em farmácias. Cada comprimido contém: 80 mg de CL e os excipientes: fosfato de cálcio dibásico diidratado, povidona, lactose, dióxido de silício coloidal, croscarmelose sódica, celulose microcristalina e estearato de magnésio vegetal.

4.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC-*differential scanning calorimetry*) é frequentemente a técnica de análise térmica farmacêutica de escolha, devido à capacidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância (CLAS et al., 1999). É uma técnica que possibilita avaliar os fenômenos energéticos, físicos e/ou químicos produzidos durante o aquecimento (ou resfriamento) de uma substância (F. BRAS, 2010). Através da DSC se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência (termicamente estável), em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura (SILVA et al., 2007).

A DSC fornece a temperatura de fusão com a exatidão que métodos

clássicos, ocasionalmente, não permitem, além de determinar a temperatura de sublimação, evaporação e solidificação; determinação da temperatura de transição vítrea; avaliação de polimorfismo, construção de diagrama de fases, determinação da pureza (exceto as substâncias amorfas, os polimorfos instáveis na faixa da temperatura experimental, os compostos que fundem com decomposição térmica e as substâncias que possuem pureza inferior a 95%) (CLAS et al., 1999; F. BRAS., 2010).

4.2.1 Parte experimental

As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60, com integrador Thermal Analyzer TA-60WS e controlador de fluxo FC-60A, sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min e velocidade de aquecimento de 10°C/min até 300°C. A curva de DSC foi obtida sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, velocidade de aquecimento de 10 °C/min, até 300 °C, empregando porta-amostra de alumínio fechada contendo em torno de 2 mg de CL SQR. O ensaio foi realizado no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Farmacêutica (CDTF) da Faculdade de Farmácia (UFRGS).

4.2.2 Resultados e discussão

A Figura 4.1 ilustra a curva DSC do carbonato de lodenafila SQR.

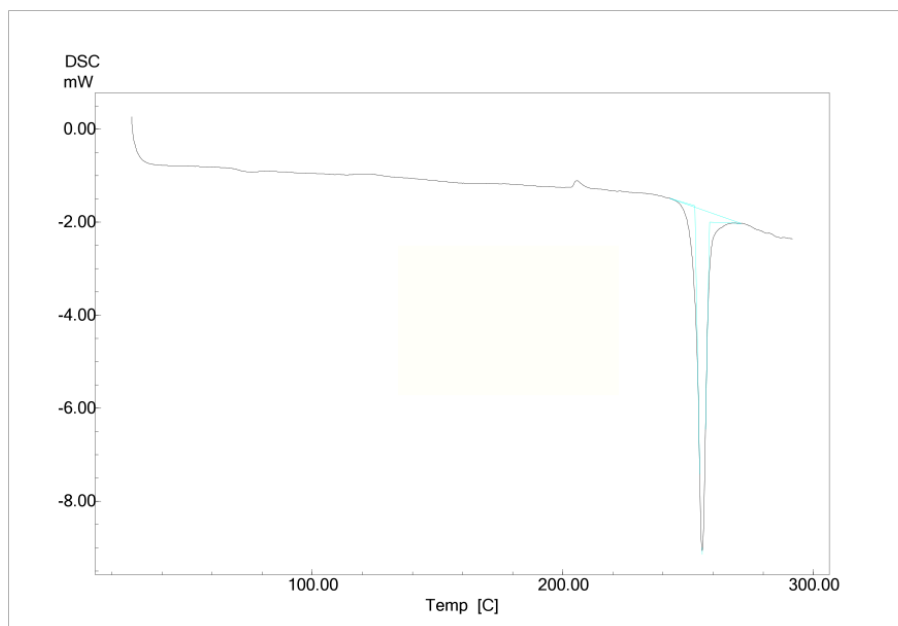


Figura 4.1 - Curva de aquecimento obtida por DSC para CL SQR.

Na literatura, não se encontram relatos sobre o ponto de fusão do carbonato de lodenafila. Com base no termograma encontrado, pode-se observar que a faixa de fusão do CL SQR foi de 252,8 °C (*onset*) a 258,5 °C (*endset*) e o pico em 255,6 °C (*peak*).

4.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A RMN pode ser aplicada na elucidação estrutural de pequenas e médias moléculas, bem como no estudo de macromoléculas, como proteínas ou ácidos nucleicos. Além de ser muito útil na elucidação da estrutura molecular, a RMN pode também ser usada para estudar processos dinâmicos de moléculas e para estudar interações/reações entre moléculas (LUZYANIN & ABRANTES, 2010). Essa técnica fornece muito mais informações sobre a estrutura molecular do que qualquer outra técnica (GIL et al., 2005; WATSON, 2005). A combinação de informações obtidas por RMN e infravermelho muitas vezes é suficiente para determinar completamente a estrutura de uma substância desconhecida (PAVIA et al., 2001).

4.3.1 Parte experimental

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do carbonato de lodenafila SQR foram realizados em equipamento Bruker, modelo DPX de 400 MHz para hidrogênio e 100 MHz para carbono, utilizando clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.3.2 Resultados e discussão

Na literatura, não se encontram disponíveis para comparação espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do carbonato de lodenafila. No entanto, sendo a vardenafila e a sildenafil congêneres da lodenafila, com estruturas químicas muito semelhantes (Figura 4.2 e Figura 4.3, respectivamente), algumas atribuições dos picos obtidos nos espectros de absorção são coincidentes, e para ambos existem dados relatados (WAWER et al., 2005; TOQUE et al, 2008; LEE et al., 2011).

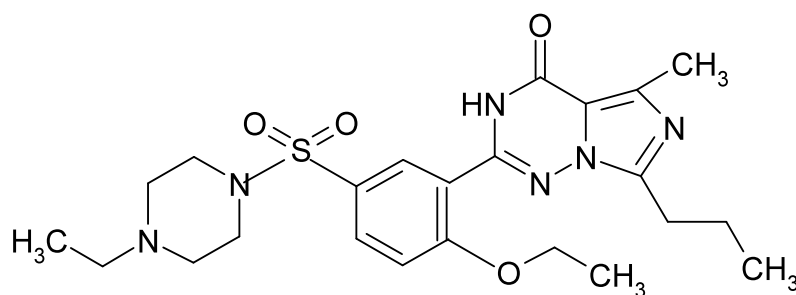


Figura 4.2. Estrutura química da vardenafila.

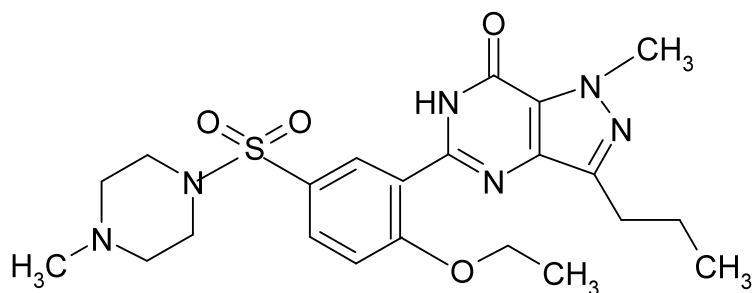


Figura 4.3. Estrutura química da sildenafil.

O espectro de RMN de ¹H do carbonato de Iodenafila SQR bem como sua estrutura química estão apresentados na Figura 4.4. O espectro ampliado encontra-se no Anexo 1. As atribuições dos picos obtidos no espectro de RMN de ¹H estão apresentadas na Tabela 4.1. A numeração das posições dos hidrogênios e carbonos não seguiu a nomenclatura química do fármaco, mas sim, foi estabelecida de modo a facilitar a sua identificação no espectro.

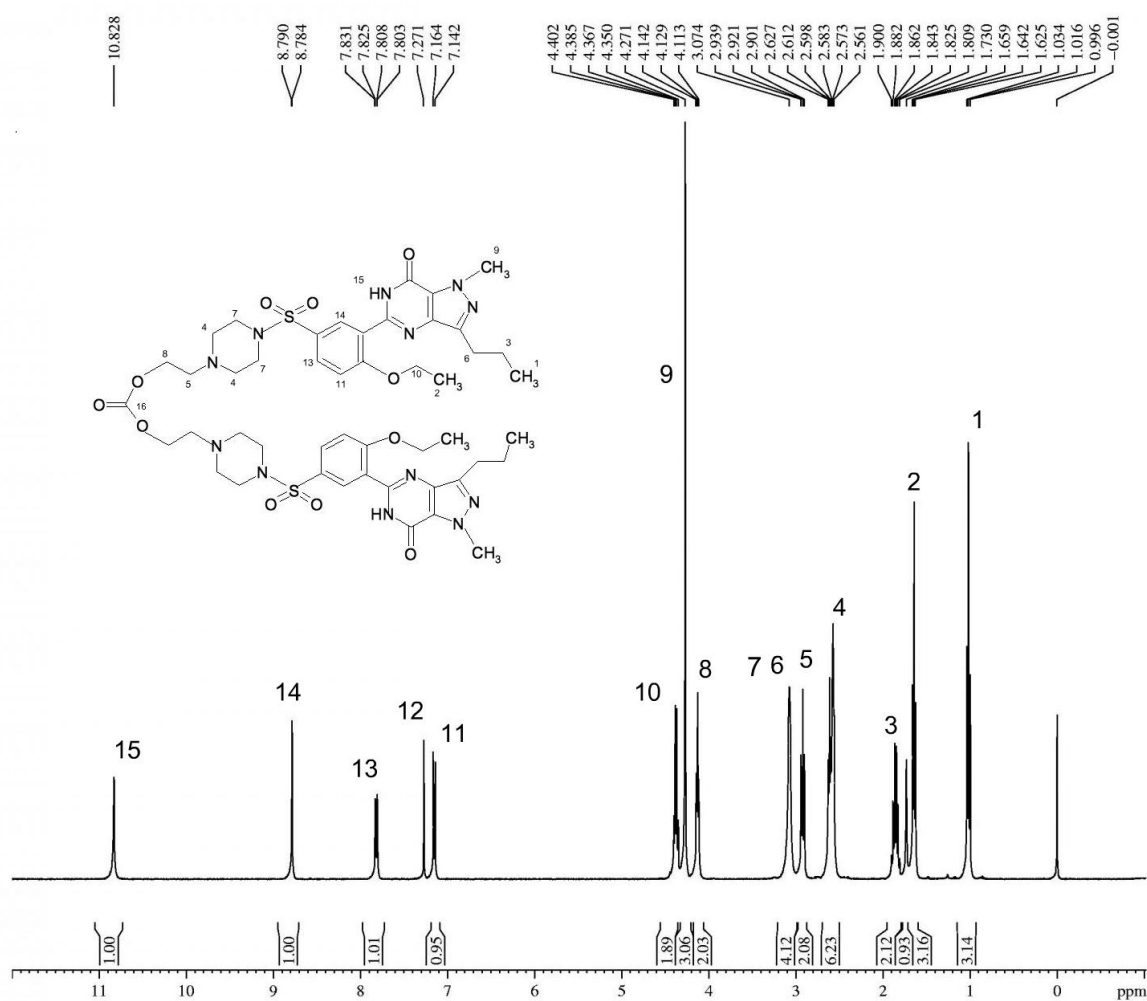


Figura 4.4. Espectro de RMN de ¹H do carbonato de lodenafila SQR (400 MHz, em CDCl₃).

Tabela 4.1. Atribuições dos picos obtidos no espectro de RMN de ^1H do carbonato de Iodenafila SQR em CDCl_3 .

Posição (H)	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade	Número (H)	Interpretação
1	1,01	triplete	6	CH_3 , cadeia n-propil da posição 3 do pirazol
2	1,64	triplete	6	CH_3 , etoxila
3	1,85	sexteto	4	CH_2 , cadeia n-propil da posição 3 do pirazol
4	2,57	multiplete	8	2 CH_2 , piperazina, vizinhas ao nitrogênio amina
5	2,60	triplete	4	CH_2 , amino etanol, ligada ao nitrogênio da piperazina
6	2,92	triplete	4	CH_2 , propila ligada ao pirazol
7	3,07	multiplete	8	2 CH_2 , piperazina, vizinhas ao nitrogênio amina
8	4,13	triplete	4	CH_2
9	4,27	singleto	6	CH_3 , posição 1 do pirazol
10	4,37	quarteto	4	CH_2 etoxila
11	7,15	duplete	2	hidrogênio aromático orto a etoxila
12	7,27	-	-	solvente (CDCl_3)
13	7,81	dd	2	hidrogênio aromático orto ao fenilsulfóxido
14	8,79	duplete	2	hidrogênio aromático a pirimidinona
15	10,83	singleto	2	NH da pirimidinona

(PAVIA et al., 2001; WAWER et al., 2005; SILVERSTEIN et al., 2007; TOQUE et al., 2008; LEE et al., 2011)

O espectro de RMN de ^{13}C do carbonato de Iodenafila SQR, bem como sua estrutura química estão apresentados na Figura 4.5. As atribuições dos picos obtidos no espectro de RMN de ^{13}C estão apresentadas na Tabela 4.2.

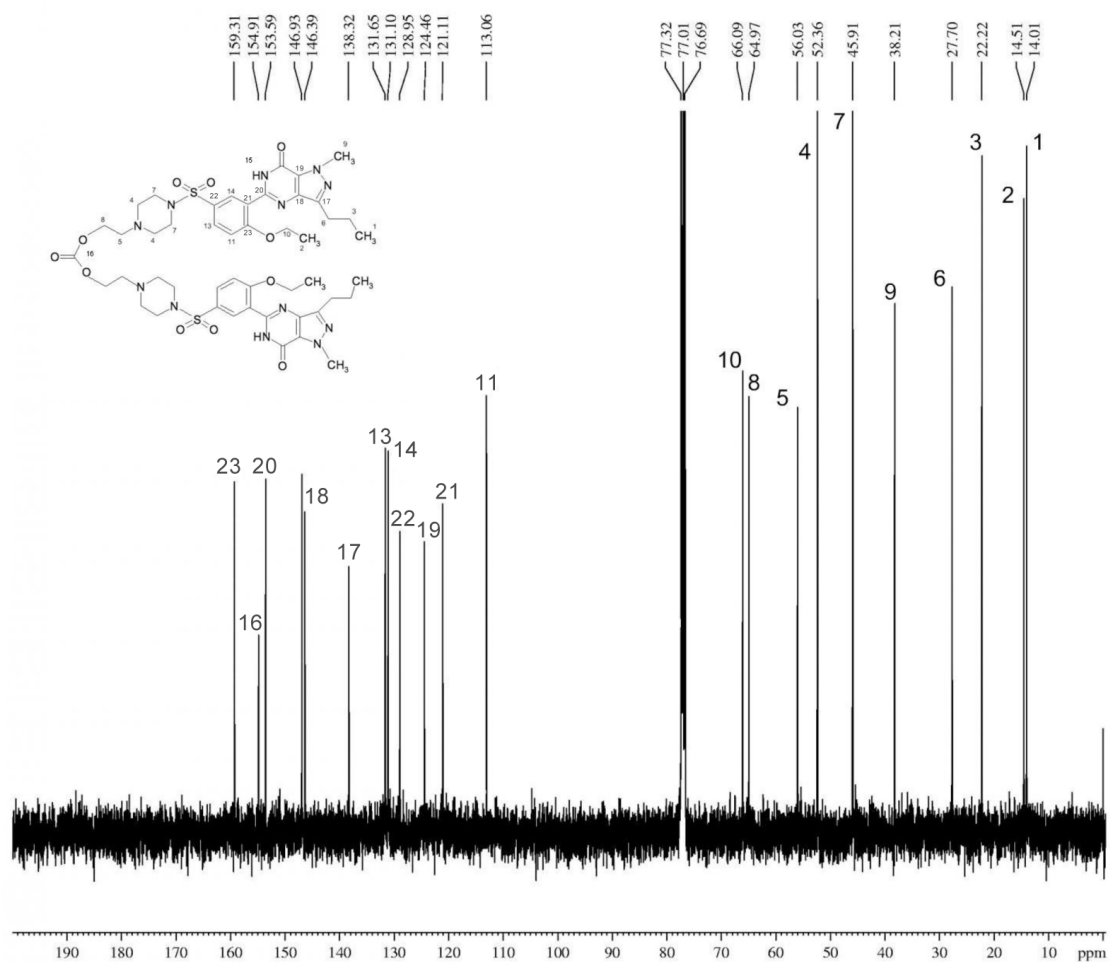


Figura 4.5. Espectro de RMN de ^{13}C do carbonato de Iodanafil SQR (100 MHz, em CDCl_3).

Tabela 4.2. Atribuições dos picos obtidos no espectro de RMN de ^{13}C do carbonato de Iodenafila SQR em CDCl_3 .

Posição (C)	Deslocamento químico (ppm)	Interpretação
1	14,0	CH_3 , cadeia n-propil da posição 3 do pirazol
2	14,5	CH_3 , etoxila
3	22,2	CH_2 cadeia n-propil da posição 3 do pirazol
4	52,4	2 CH_2 , piperazina, vizinhas ao nitrogênio amina
5	56,0	CH_2 , amino etanol, ligada ao nitrogênio da piperazina
6	27,7	CH_2 , propila ligada ao pirazol
7	45,9	2 CH_2 , piperazina, vizinhas ao nitrogênio amina
8	64,9	CH_2
9	38,2	CH_3 , posição 1 do pirazol
10	66,1	CH_2 etoxila
11	113,0	carbono aril orto a etoxila
13	131,6	carbono aril orto ao fenilsulfóxido
14	131,1	carbono aril orto a pirimidinona
16	154,9	carbono do carbonato
17	138,3	carbono quaternário do pirazol
18	146,4	carbono quaternário da pirazolopirimidinona
19	124,5	carbono quaternário da pirazolopirimidinona
20	153,6	carbono quaternário da pirimidinona
21	121,1	carbono quaternário do fenil sulfóxido
22	128,9	carbono quaternário, vizinho ao sulfóxido
23	159,3	carbono quaternário, vizinha a etoxila

(PAVIA et al., 2001; WAWER et al., 2005; SILVERSTEIN et al., 2007; LEE et al., 2011)

As atribuições dos hidrogênios e dos carbonos do carbonato de Iodenafila SQR foram estabelecidas com base em dados tabelados disponíveis em literatura específica (PAVIA et al., 2001; WAWER et al., 2005; SILVERSTEIN et al., 2007; TOQUE et al., 2008; LEE et al., 2011).

4.4 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)

Certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente do tipo de molécula. No entanto, considerando duas moléculas com o mesmo grupamento, em cada estrutura a mesma ligação estará em ambiente diferente, e, por isso, não há possibilidade de duas moléculas terem o mesmo espectro de infravermelho (PAVIA et al., 2001; WATSON, 2005; SILVERSTEIN et al., 2007). O infravermelho e demais métodos espectroscópicos modernos como a ressonância magnética nuclear, espectroscopia na região do ultravioleta-visível e espectrometria de massas constituem hoje os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas (LOPES & FASCIO, 2004).

4.4.1 Parte experimental

A caracterização do carbonato de Iodenafila SQR por espectrofotometria na região do infravermelho foi realizada através da preparação de pastilhas de brometo de potássio contendo carbonato de Iodenafila SQR. A análise foi realizada em espectrofotômetro Perkin Elmer BX FTI-IR System SN 79302. Os parâmetros instrumentais estão descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Parâmetros instrumentais para análise do carbonato de lodenafila SQR, por espectrofotometria no IV.

Faixa (cm ⁻¹)	4000 - 400
Número de <i>scans</i>	20
Resolução (cm ⁻¹)	4,0
Intervalo (cm ⁻¹)	2,0

4.4.2 Resultados e discussão

A partir da análise detalhada das bandas de absorção podem-se obter dados seguros de identificação. Porém, até o momento, não há na literatura espectro de infravermelho disponível para comparação. No entanto, da mesma forma que para a interpretação dos espectros de RMN, utilizou-se dados encontrados na literatura para a sildenafil (MELNIKOV et al., 2003), onde algumas bandas de absorção são coincidentes.

O espectro de absorção na região do IV, bem como a estrutura do CL encontram-se na Figura 4.6 e as bandas de absorção características do fármaco com as possíveis atribuições (PAVIA et al., 2001; MELNIKOV et al., 2003; SILVERSTEIN et al., 2007), encontram-se na Tabela 4.4.

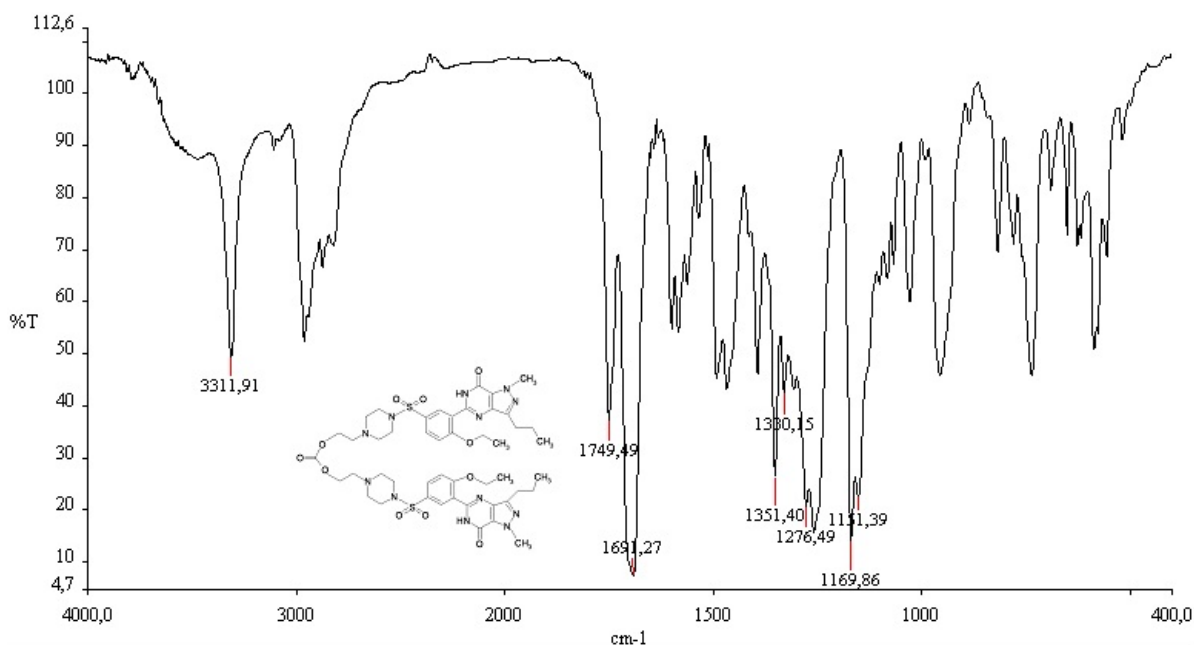


Figura 4.6. Espectro de absorção na região do IV para o carbonato de lodenafila (SQR) em KBr (4000 a 400 cm^{-1}).

Tabela 4.4. Frequências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para o carbonato de lodenafila SQR.

Frequência (cm^{-1})	Atribuições
3311,91	Vibração de deformação axial de amina secundária
1749,49	Vibração de deformação axial de C=O de éster alifático
1691,27	Vibração de deformação axial de C=O de amidas
1351,40 e 1330,15	Vibração de deformação axial assimétrica de S=O de sulfonas (SO_2)
1276,49	Vibração de deformação axial de C-N de amina aromática
1169,86 e 1151,39	Vibração de deformação axial simétrica de S=O de sulfonas (SO_2)

A espectrometria no IV possui duas importantes aplicações na caracterização de diversas moléculas: a determinação da identidade do composto por meio da comparação espectral com uma amostra autêntica e a verificação da presença de grupamentos funcionais em uma molécula desconhecida (ABDOU, 2004). O espectro obtido para carbonato de Iodenafila SQR apresenta bandas de absorção características dos grupamentos presentes na estrutura química da molécula, sendo então possível caracterizar a matéria-prima. Entretanto, não existe, na literatura, espectro de referência que permita uma confirmação da identidade do fármaco, considerando somente essa técnica.

4.5 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV)

A espectrofotometria na região do UV é um método útil na identificação de fármacos, além de ser um método fácil, preciso, barato e robusto para quantificação de fármacos, quando não há interferência dos excipientes. Vários métodos farmacopeicos utilizam a espectrofotometria no UV para determinar o ingrediente ativo em formulações (WATSON, 2005). Apresenta algumas limitações, pois depende da presença de grupamentos cromóforos na estrutura do composto a ser analisado, o que compromete também sua especificidade (SKOOG et al., 2002).

4.5.1 Parte experimental

Realizaram-se varreduras do espectro de UV, na região entre 200 e 400 nm, de soluções da SQR na concentração de 10 µg/mL e 20 µg/mL. A análise foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV-1601 PC, equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura.

Como não foram encontrados na literatura, métodos descritos para análise do carbonato de lodenafila em comprimidos, a avaliação qualitativa foi realizada através da comparação dos espectros na região do UV da SQR e dos comprimidos.

Para o preparo da solução estoque da amostra, comprimidos contendo 80 mg de carbonato de lodenafila foram pulverizados. Após determinação do peso médio conforme a Farmacopéia Brasileira V Edição (2010), a quantidade de pó equivalente a 10 mg de carbonato de lodenafila foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, com 50 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, sendo mantido em banho de ultrassom por 10 minutos. Após ajuste do volume com o mesmo solvente, filtraram-se as soluções em funil de vidro sinterizado e diluíram-se com água pH 4,0 acertado com ácido acético até a concentração final de 20 µg/mL. Para o preparo da solução estoque de CL SQR, efetuou-se o mesmo procedimento, exceto a etapa de filtração.

4.5.2 Resultados e discussão

Partiu-se de soluções estoque contendo 100 µg/mL, sendo as diluições subsequentes em: meio alcalino (pH 12,0) e ácido (pH 4,0). Para o preparo da solução estoque, realizaram-se os estudos de solubilidade conforme a Farmacopéia Brasileira V edição (2010). Com base na Tabela 4.5 observou-se que o carbonato de lodenafila é solúvel em hidróxido de sódio 0,1 M, muito pouco solúvel em ácido clorídrico 0,1 M e praticamente insolúvel em água, metanol e acetonitrila. Dessa forma, o hidróxido de sódio 0,1 M mostrou-se o solvente mais adequado para solubilizar o CL frente aos demais solventes avaliados

Tabela 4.5. Termos descritivos de solubilidade e seus significados.

Solvente	Termo descritivo
Muito solúvel	menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	mais de 10 000 partes

(F. BRAS., 2010)

A Figura 4.7 apresenta o espectro de absorção do CL SQR em meios ácido e alcalino. Observou-se que o pico em meio ácido, em 292 nm, se mostra mais intenso quando comparado ao obtido em meio alcalino na mesma região. Além disso, o meio alcalino apresenta dois picos pouco definidos nas regiões de 226 e 212 nm, enquanto o meio ácido possui apenas um pico em 227 nm. Esses picos podem ser atribuídos às transições eletrônicas dos cromóforos dos anéis pirazol, pirimidona e benzênico de sua estrutura. Dessa forma, optou-se por, após a solubilização em hidróxido de sódio 0,1 M, utilizar o meio ácido (água acidificada com ácido acético, pH 4,0) para as posteriores diluições.

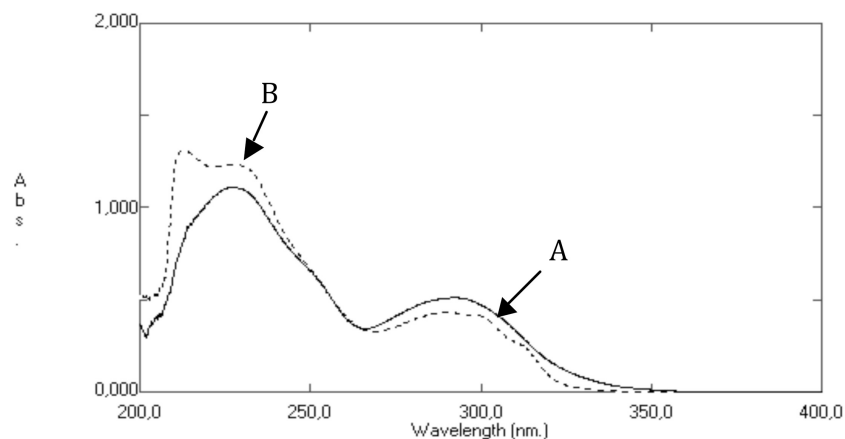


Figura 4.7. Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria de UV para soluções aquosas de 20 µg/mL de carbonato de lodenafila: A (meio ácido) e B (meio alcalino).

A fim de escolher entre as duas regiões de maior absorvância, quatro soluções diluídas de 10 µg/mL em meio ácido foram lidas nas mesmas condições instrumentais (Figura 4.8).

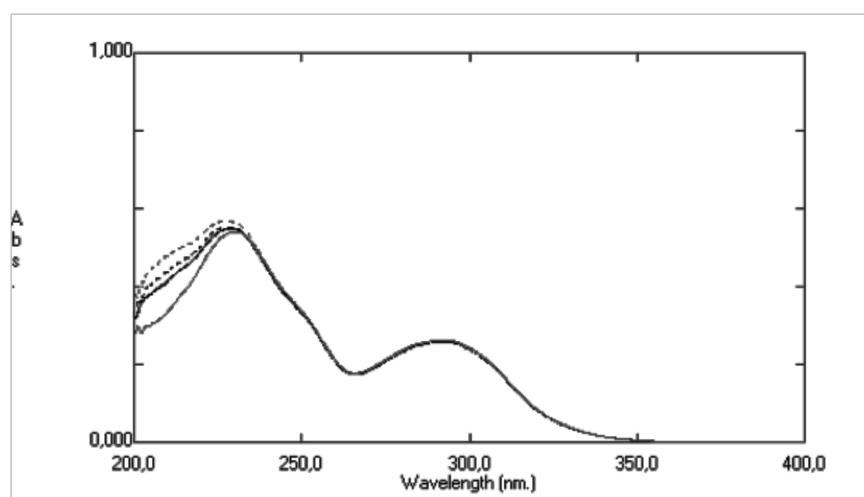


Figura 4.8. Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria na região UV, para soluções de 10 µg/mL de carbonato de lodenafila em meio ácido.

Comparando os espectros obtidos (Figura 4.8), nota-se que o carbonato de lodenafila em meio ácido não apresenta absorvância reprodutível na região próxima a 227 nm. Talvez pela proximidade da região caracteristicamente sujeita a ruídos/interferentes; também é uma região onde começam as maiores interferências dos excipientes. Portanto, o comprimento de onda de 292 nm apresenta-se como o mais indicado para análise da substância em estudo por espectrofotometria na região do UV.

A solução estoque e as soluções diluídas (20 µg/mL) em meios alcalino e ácido, em duplicata, foram mantidas sob refrigeração (2 a 8 °C) durante 17 dias. Segundo a análise de variância (ANOVA), com um nível de confiança de 95%, tanto a SQR quanto as amostras diluídas permaneceram estáveis neste período.

Através da comparação dos espectros na região do UV da SQR e dos comprimidos, realizou-se a identificação do carbonato de lodenafila na amostra avaliada (Figura 4.9).

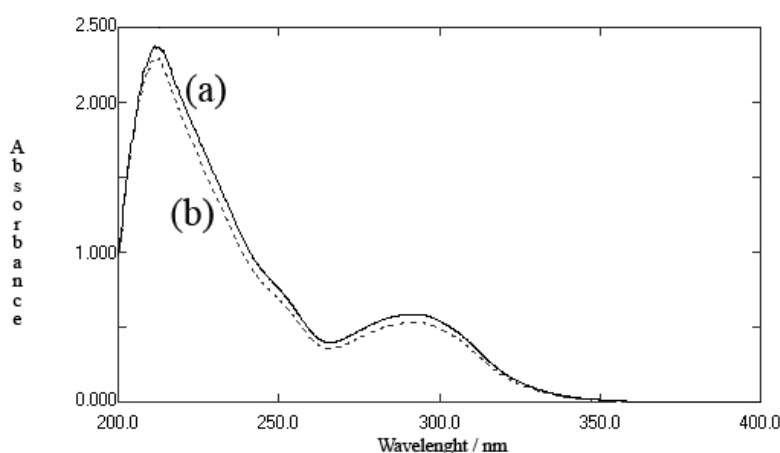


Figura 4.9. Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria na região do UV para carbonato de lodenafila: comprimidos (a) e SQR (b).

A semelhança dos espectros da SQR e dos comprimidos indicou a presença de CL na formulação avaliada, tornando o método adequado para a identificação do fármaco em comprimidos.

4.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para identificar ou quantificar substâncias é necessário, na maioria dos casos, separar o composto de interesse dos demais constituintes da amostra. A CCD é uma técnica de separação de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. Permite identificar o fármaco quando este é analisado juntamente com a substância de referência, através da comparação dos R_f (fator de retenção) obtidos. Outra aplicação da CCD refere-se à sua capacidade de detectar a presença de impurezas e produtos de degradação na amostra (GIL et al., 2005; WATSON, 2005).

4.6.1 Parte experimental

Foram preparadas soluções estoque de 1 mg/mL da SQR e dos comprimidos em hidróxido de sódio 0,1 M. Após, essas soluções foram diluídas a 500 µg/mL com metanol. A fim de verificar se o sistema proposto seria capaz de diferenciar moléculas semelhantes, empregou-se também solução metanólica de citrato de sildenafil 500 µg/mL. Várias proporções de solventes foram testadas (dados não apresentados) até que fossem estabelecidas as condições descritas a seguir.

Como fase estacionária, utilizaram-se cromatoplasmas de alumínio impregnadas com gel de sílica (Whatman AL SIL G/UV), com 12 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de espessura, (cat nº 4420222). Empregou-se fase móvel composta por clorofórmio:dietilamina:metanol (25,8:3,9:0,3, V/V/V). As soluções foram aplicadas com capilares a uma distância de 1 cm da borda inferior da placa, a qual foi transferida para cuba saturada. Após migração de 10 cm do ponto de aplicação, a placa foi retirada da cuba e mantida à temperatura ambiente até evaporação do solvente residual. A seguir, as manchas foram visualizadas com luz ultravioleta com emissão em 254 nm.

4.6.2 Resultados e discussão

Os valores de Rf para a SQR e comprimidos foram semelhantes: 0,40 e 0,41 respectivamente (média de 3 placas). Verificou-se que o sistema desenvolvido possibilitou a diferenciação do carbonato de lodenafila em relação ao citrato de sildenafil, o qual apresentou Rf de 0,66 (Figura 4.10).

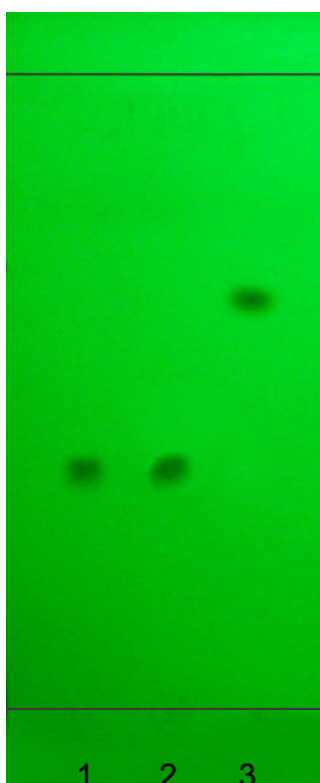


Figura 4.10. Perfil cromatográfico do CL SQR (1), CL comprimidos (2) e citrato de sildenafil (3), sob revelação com luz UV 254 nm. Condições: cromatoplasas de alumínio impregnadas com gel de sílica, 12 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de espessura. Fase móvel: clorofórmio:dietilamina:metanol (25,8:3,9:0,3, v/v/v).

O método desenvolvido demonstrou ser adequado para a identificação do carbonato de lodenafila em comprimidos, além da capacidade de separar compostos com estrutura química muito semelhante.

4.7 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DA ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A CLAE é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. Os motivos deste crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica (TONHI et al., 2002). Apesar de ser um método bastante empregado em análises quantitativas, a CLAE pode ser muito útil na identificação de fármacos. Se as substâncias são idênticas, apresentarão os mesmos tempos de retenção, quando analisadas sob as mesmas condições experimentais.

4.7.1 Parte experimental

As análises de identificação por CLAE foram realizadas através da aplicação do método previamente validado em cromatógrafo a líquido Shimadzu LC System, constituído de bomba LC-10 ADVP, detecção de arranjo de diodos (DAD) SPD-M 10AVP, controlador do sistema SCL-10AVP, auto-injetor SIL-10 ADVP e degaseificador. A aquisição e análise dos dados foram efetuadas através do programa CLASS-VP, versão 6.14.

As condições cromatográficas e o modo de preparo das soluções do carbonato de lodenafila SQR e dos comprimidos, na concentração de 40 µg/mL, encontram-se descritas detalhadamente no Capítulo II, no artigo: *Development and*

Validation of a Stability-Indicating LC Method for the Assay of Lodenafil Carbonate in Tablets. Journal of Chromatographic Science, v. 49, p. 502-507, 2011.

4.7.2 Resultados e discussão

A Figura 4.11 apresenta os cromatogramas das soluções de CL SQR e comprimidos, ambos apresentando o mesmo tempo de retenção, em aproximadamente 7,0 minutos, e pureza de 99,99%.

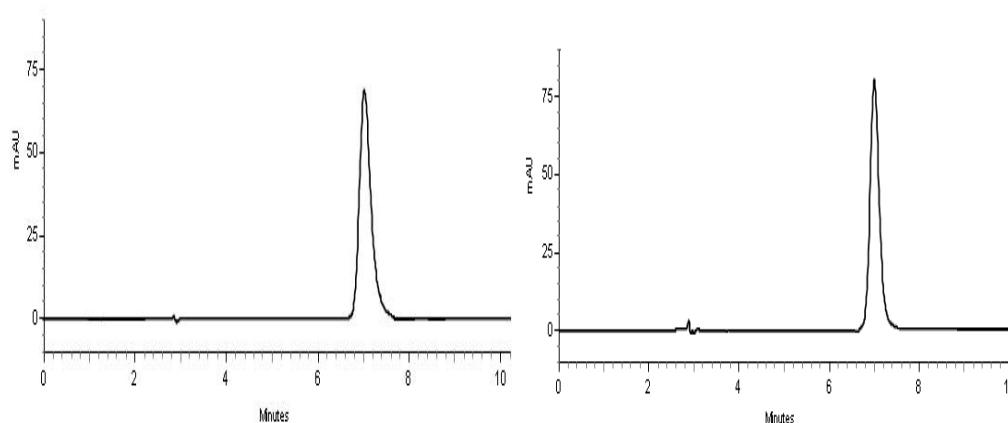


Figura 4.11. Cromatogramas do carbonato de lodenafila SQR e comprimidos, respectivamente. Concentração: 40 µg/mL. Condições: detecção em 290 nm, coluna C18, fase móvel metanol:ácido acético 0,1%, pH 4,0 (65:35, v/v), fluxo 1mL/minuto.

Dessa forma, demonstrou-se que o método por CLAE é adequado para a identificação do fármaco em comprimidos.

4.8 ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA

A eletroforese capilar é um método físico de análise baseado na migração, dentro de um capilar, de solutos carregados, dissolvidos em uma solução eletrolítica, sob a influência de uma corrente elétrica. Atualmente, a EC compreende uma família de técnicas de separação eletrocinéticas que tem emergido para a análise de uma grande variedade de misturas complexas (FURLANETTO et al., 2001; F. BRAS., 2010).

A EC provou ser uma alternativa útil e confiável, além de ser uma técnica complementar ao CLAE em muitas áreas, incluindo determinação do teor, determinação de impurezas, separações enantioméricas, confirmação de identidade e determinação de estequiometria (ZHANG et al., 2008). A eficiência de separação, o tempo de análise e o pequeno volume de amostra e consumo de reagente são vantagens dessa técnica em relação às demais (LARA et al., 2005).

Para a identificação do CL e posterior quantificação, o método empregado foi o de eletroforese capilar de zona (ECZ). A ECZ é um dos modos de separação mais utilizados na prática, provavelmente em razão da facilidade de sua implementação e otimização das condições experimentais (SPENGLER et al., 2009).

4.8.1 Parte experimental

As análises de identificação por ECZ foram realizadas em um sistema de eletroforese capilar Agilent ^{3D}CE (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com autoinjeter, detector de arranjo de diodos e controlador de temperatura. O *software* CE ChemStation foi utilizado para controle do sistema, aquisição e tratamento de dados. As condições eletroforéticas, otimização do método e o modo de preparo das soluções do carbonato de lodenafila SQR, nimesulida (padrão interno) e dos comprimidos, na concentração de 50 µg/mL, encontram-se descritas detalhadamente no Capítulo III, no artigo *Lodenafil Carbonate Tablets: Optimization*

and Validation of a Capillary Zone Electrophoresis Method. Journal of The Brazilian Chemical Society, in press.

4.8.2 Resultados e discussão

Os eletroferogramas obtidos, na concentração de 50 µg/mL de CL e 50 µg/mL de nimesulida, a partir da análise de CL SQR e comprimidos encontram-se na Figura 4.12. É possível a identificação do CL por ECZ através da comparação entre os tempos de migração para a SQR e os comprimidos. Pode-se observar que esses valores foram muito semelhantes (4,3 e 5,4 min para SQR e PI, respectivamente).

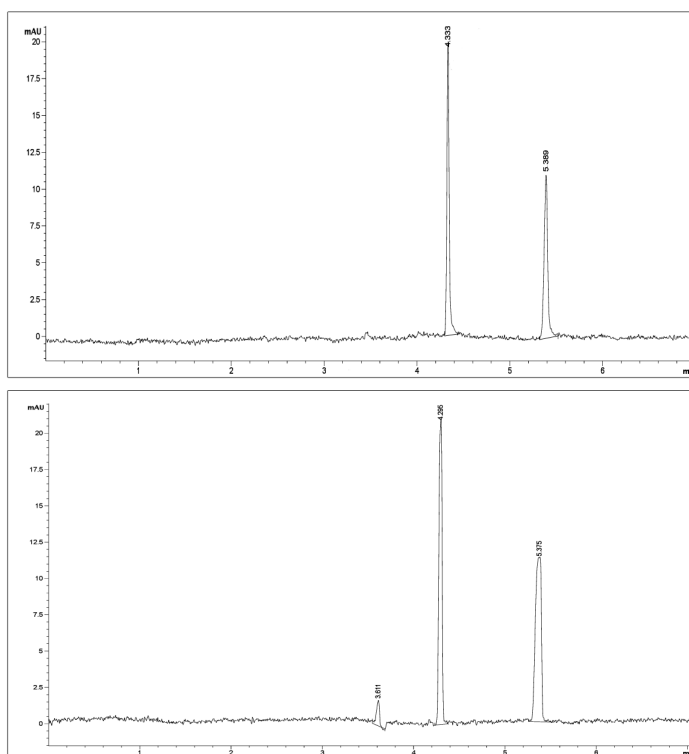


Figura 4.12. Eletroferogramas do carbonato de lodenafila SQR e comprimidos, respectivamente, na concentração de 50 µg/mL de CL (tm 4,3 min) e 50 µg/mL de PI (tm 5,4 min). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida (40 cm efetivos, 50 µm de diâmetro interno); eletrólito tampão borato 50 mM; voltagem 15 kV; detecção UV em 214 nm; temperatura de 32,5°C.

O tempo de migração encontrado para o CL nos comprimidos foi semelhante ao valor encontrado para a SQR, demonstrando que o método é adequado para identificação do fármaco nos comprimidos.

4.9 REFERÊNCIAS

ABDOU, H. M. Métodos instrumentais de análise. In: GENNARO, A.R. (Ed.). **Remington a ciência e a prática farmacêutica**, 20 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência. Brasília, 2002.

CLAS, S. D.; DALTON, C. D.; HANDCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: Applications in the drug development. **Pharmaceutical Science Technology Today**, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FDA. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation: Center for Drug Evaluation and Research. Agosto/2000.

FURLANETTO, S.; ORLANDINI, S.; MASSOLINI, G.; FAUCCI, M. T.; LA PORTA, E.; PINZAUTI, S. Optimisation and validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of diazepam and otilonium bromide. **Analyst**, v. 126, p. 1700-1706, 2001.

GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**, Campo Grande: Editora UNIDERP, 2005.

ICH – International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

LARA, F. J.; GARCIA-CAMPANA, A. M.; ALÉS-BARRERO, F.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Determination of thiazinamium, promazine and promethazine in pharmaceutical formulations using a CZE method. **Analytica Chimica Acta**, v. 535, p. 101-108, 2005.

LEE, H. M.; KIM, C. S.; JANG, Y. M.; KWONA, S. W.; LEE, B. J. Separation and structural elucidation of a novel analogue of vardenafil included as an adulterant in a dietary supplement by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 491-496, 2011.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LUZYANIN, K.; ABRANTES, M. Ressonância magnética nuclear – ferramenta versátil em química farmacêutica e imagiologia médica. **Química** 117, p. 25-30, 2010.

MELNIKOV, P.; CORBI, P. P.; CUIN, A., CAVICCHIOL, M.; GUIMARÃES, W. R. Physicochemical properties of sildenafil citrate (Viagra) and sildenafil base. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 10, p. 2140-2143, 2003.

MOREIRA, G. F.; BALBO, A.; ACHETE, C. A.; BARIN, J. S.; WOLLINGER, W.; NOGUEIRA, R.; BITTENCOURT, C. F.; RODRIGUES, J. M. Aplicação da calorimetria exploratória diferencial (DSC) para determinação da pureza de fármacos. **Produto & Produção**, v. 11, n. 1, p. 22-29, 2010.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to Spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**, 3. ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001.

SILVA, E. C.; Paola, M. V. R. V.; Matos, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 347-356, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SPENGLER, C. **Desenvolvimento de equipamento de eletroforese capilar com detecção por condutividade sem contato para a separação de íons orgânicos.** Santa Maria: UFSM, 2009, 133 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TOQUE, H. A. F.; PRIVIERO, F. B. M.; TEIXEIRA, C. E.; PERISSUTTI, E.; FIORINO, F.; SEVERINO, B.; FRECENTESE, F.; LORENZETTI, R.; BARACAT, J. S.; SANTAGADA, V.; CALIENDO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Synthesis and Pharmacological Evaluations of Sildenafil Analogues for Treatment of Erectile Dysfunction. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 2807-2815, 2008.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists.** 2ª ed. Edinburgh. Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

WAWER, I.; PISKLAK, M.; CHILMONCZYL, Z. ^1H , ^{13}C , ^{15}N NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 865–870, 2005.

ZHANG, Q.; LI, Y. F.; HUANG, C. Z. Quality control of piperazine in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis. **Talanta**, v. 76, p. 44-48, 2008.

5. CAPÍTULO II - Publicação científica - CLAE

Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method for the Assay of Lodenafil Carbonate in Tablets. Codevilla, C.F.; Lemos, A.M.; Delgado, L.S.; Rolim, C.M.B.; Adams, A.I.H.; Bergold, A.M. *Journal of Chromatographic Science*, v. 49, p. 502-507, 2011.

Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method for the Assay of Lodenafil Carbonate in Tablets

Cristiane Franco Codevilla^{1,2}; Alice Machado Lemos²; Leila Schreiner Delgado²; Clarice Madalena Bueno Rolim²; Andréa Inês Horn Adams²; Ana Maria Bergold^{1*}

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 90610-000, Porto Alegre-RS, Brasil*

²*Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria. 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil*

*Author to whom correspondence should be addressed: ana.bergold@ufrgs.br

5.1 ABSTRACT

A stability-indicating liquid chromatographic method has been developed for the quantitative determination of lodenafil carbonate in tablets. The method employs a Synergi Fusion C₁₈ column (250 x 4.6 mm, i.d., 4 µm particle size), with mobile phase consisting of a mixture of methanol:acetic acid 0.1 % pH 4.0 (65:35, v/v) and UV detection at 290 nm, using a photodiode array detector. A linear response ($r=0.9999$) was observed in the range of 10 - 80 µg.mL⁻¹. The method showed good recoveries (average 100.3 %) and also intra and inter-day precision (RSD < 2.0 %). Validation parameters as specificity and robustness were also determined. Specificity analysis showed that no impurities or degradation products were co-eluting with the lodenafil carbonate peak. The method was found to be stability-indicating and due to its simplicity and accuracy can be applied for routine quality control analysis of lodenafil carbonate in tablets.

6. CAPÍTULO III – Artigo publicado - UV

Development and Validation of a UV-Spectrophotometric Method for the Determination of Lodenafil Carbonate in Tablets and Comparison with LC-method. Codevilla, C.F; Castilhos, T.S.; Fröhlich, P.E.; Bergold, A.M. *Journal of Pharmacy Research*, v. 4, n. 7, p.2368-2370, 2011.

Development and Validation of a UV-Spectrophotometric Method for the Determination of Lodenafil Carbonate in Tablets and Comparison with the LC-method

Cristiane Franco Codevilla*¹, Tamara dos Santos Castilhos¹, Pedro Eduardo Fröhlich¹, Ana Maria Bergold¹

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

***Corresponding author.**

Cristiane Franco Codevilla

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Faculdade de Farmácia,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),

Av. Ipiranga, 2752, Cep: 90610-000, Porto Alegre - RS, Brasil

Tel: +55 51 33085313; Fax: +55 51 33085313

E-mail: cristianefc@hotmail.com

6.1 ABSTRACT

A rapid, economical, reproducible, and simple direct UV-spectrophotometric method was developed and validated to assay lodenafil carbonate in pharmaceutical formulations. Lodenafil carbonate concentration was estimated at 292 nm in water at pH 4.0. The method was validated for specificity, linearity, precision and accuracy. There was no interference of the excipients in the determination of the active pharmaceutical ingredient. The method developed was linear ($r = 0.9998$), accurate (102.1%) and precise (RSD < 2.0%). This method was compared to a previously developed and validated method for liquid chromatography and no evidence of a significant difference was observed ($p < 0.05$). The proposed method is appropriate for the determination of lodenafil carbonate in tablets and can be used in routine quality control.

Keywords: Lodenafil carbonate; UV-spectrophotometry; method validation.

7. CAPÍTULO IV – Publicação científica - ECZ

Lodenafil carbonate tablets: optimization and validation of a capillary zone electrophoresis method. Codevilla, C.F; Ferreira, P.C.L.; Sangoi, M.S.; Fröhlich, P.E.; Bergold, A.M. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, in press.

**Lodenafil Carbonate Tablets: Optimization and Validation of a Capillary Zone
Electrophoresis Method**

Cristiane F. Codevilla*, Pâmela Cristina L. Ferreira, Maximiliano S. Sangoi, Pedro Eduardo Fröhlich, Ana Maria Bergold

Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre-RS, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed: cristianefc@hotmail.com

7.1 ABSTRACT

A simple capillary zone electrophoresis (CZE) method was developed and validated for the analysis of Iodenafile carbonate in tablets. Response surface methodology was used for optimization of the pH and concentration of the buffer, applied voltage and temperature. The method employed 50 mM borate buffer at pH 10 as background electrolyte with an applied voltage of 15 kV. The separation was carried out in a fused-silica capillary maintained at 32.5 °C and the detection wavelength was 214 nm. The method was validated showing specificity, linearity ($r= 0.9995$), precision (relative standard deviation less than 2%) and accuracy (99.95%). The method proved to be robust by a fractional factorial design evaluation. The proposed CZE method was successfully applied for the quantitative analysis of Iodenafile carbonate in tablets and the results compared to the high performance liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometric methods, showing non-significant difference.

Keywords: Capillary zone electrophoresis; experimental design; Iodenafile carbonate; optimization; validation.

8. CAPÍTULO V – Artigo submetido

Photodegradation kinetics of Iodenafile carbonate, structure elucidation of two major degradation products using UPLC-MS/MS and in vitro cytotoxicity.

Codevilla, C.F; Lange, A.D.C; Andrade, J.M.M; Segalin, J.; Fröhlich, P.E.; Bergold, A.M. Submetido à *Analytica Chimica Acta*.

Photodegradation Kinetics of Lodenafil Carbonate, Structure Elucidation of Two Major Degradation Products Using UPLC-MS/MS and In Vitro Cytotoxicity

Cristiane Franco Codevilla^{a,*}, Alini Dall Cortivo Lange^a, Juliana Maria de Mello Andrade^a, Jéferson Segalin^b, Pedro Eduardo Fröhlich^a, Ana Maria Bergold^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro, Brazil

***Corresponding author.** Tel.: +55 51 33085313; fax: +55 51 33085313.

E-mail address: cristianefc@hotmail.com (C.F.Codevilla).

8.1 ABSTRACT

The photostability of lodenafil carbonate was studied and some degradation products were observed. A stability-indicating liquid chromatography method for the determination of lodenafil carbonate was used to determine the kinetics of photodegradation. The identification of two major photodegradation products was performed by an isocratic ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (UPLC-MS/MS). UPLC-MS/MS was carried out on a Waters® Acquity Ultra Performance LC system coupled to a Micromass® Quadrupole Time of Flight (Q-ToF micro) tandem mass spectrometer equipped with an electrospray ionization interface in the positive ion mode. The column applied was Acquity UPLC® BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm); the mobile phase consisted of a mixture of methanol:formic acid 0.1 % pH 4.0 (55:45, v/v) at a flow-rate of 0.4 mL.min⁻¹ and UV detection at 290 nm. The photodegradation of lodenafil carbonate followed first-order reaction kinetics and the kinetic parameters of degradation rate constant and t_{90} were calculated. Under photodegradation conditions, ion products were detected at m/z 393 (DP-1) and at m/z 377 (DP-2). The product DP-1 is 4-ethoxy-3-(1-methyl-7-oxo-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5-yl)-benzenesulfonic acid and DP-2 probably is 4-ethoxy-3-(1-methyl-7-oxo-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5-yl) benzenesulfonic acid. The degraded samples of lodenafil carbonate were also evaluated in order to determine the in vitro cytotoxicity against mononuclear cells.

Keywords: in vitro cytotoxicity, degradation products, kinetics of degradation, lodenafil carbonate, tandem mass spectrometry.

9. CAPÍTULO VI – Artigo submetido

Development and Validation of a Dissolution Test for Lodenfail Carbonate Based on In Vivo Data. Codevilla, C.F.; Castilhos, T.S.; Cirne, C A.; Fröhlich, P.E.; Bergold, A.M. Submetido à *Drug Development and Industrial Pharmacy*.

Development and Validation of a Dissolution Test for Lodenafil Carbonate Based on In Vivo Data

Cristiane Franco Codevilla*, Tamara dos Santos Castilhos, Carolina Araújo Cirne, Pedro Eduardo Froehlich, Ana Maria Bergold

Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre-RS, Brazil

***Corresponding author.** Tel.: +55 51 33085313; fax: +55 51 33085313.

E-mail address: cristianefc@hotmail.com (C.F.Codevilla).

9.1 ABSTRACT

Lodenafil carbonate is a phosphodiesterase type 5 inhibitor used for the treatment of erectile dysfunction. Currently there is no dissolution test reported for lodenafil carbonate and this drug is not listed in any pharmacopoeia. The present study focused on the development and validation of a dissolution test for lodenafil carbonate tablets, using a simulated absorption profile based on in vivo data. The appropriate conditions were determined after testing sink conditions. Different conditions as medium, surfactant concentration and rotation speed were evaluated. The percentage of dose absorbed was calculated by deconvolution, using the Wagner–Nelson method. According to the obtained results, the use of 0.1 M HCl + 1.5 % SLS (900 mL, at 37 ± 0.5 °C) as dissolution medium, paddles at 25 rpm were considered adequate. The samples were quantified by UV spectroscopy at 295 nm and the validation was performed according to international guidelines. The method showed specificity, linearity, accuracy and precision, within the acceptable range. Kinetics of drug release was better described by the first order model. The proposed dissolution test can be used for the routine quality control of lodenafil carbonate in tablets.

Keywords: lodenafil carbonate, dissolution kinetics, dissolution test.

10. DISCUSSÃO GERAL

A necessidade de se mostrar a qualidade das análises químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, devido à grande importância em garantir a segurança, qualidade e eficácia dos produtos farmacêuticos. Análises da matéria-prima e do produto acabado, bem como o controle dos processos de produção, são essenciais para a qualidade do produto. Além disso, dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irrecuperáveis (RIBANI et al., 2004; ROZET et al., 2007).

Para o desenvolvimento de um método analítico confiável é necessária a utilização de substâncias químicas de referência. Com a utilização de métodos de identificação é possível caracterizar essa substância utilizada como referência. Os testes apresentados na análise qualitativa do carbonato de lodenafila visaram à caracterização da SQR utilizada, bem como a fornecer dados que até o momento não estão disponíveis na literatura.

Na presente tese, a faixa de fusão foi determinada utilizando calorimetria exploratória diferencial. A faixa de fusão encontrada foi de 252 a 258 °C. A DSC tem sido uma técnica que permite a determinação direta da pureza de fármacos. O método é baseado no fato de que a presença de pequenas quantidades de impurezas num dado material diminui o seu ponto de fusão e alarga a sua faixa global de fusão (F. BRAS., 2010). A curva de aquecimento apresentou um sinal estreito, sem deformação e sem a presença de outros sinais, podendo ser um indicativo de pureza, mesmo não tendo sido encontrado na literatura o ponto de fusão.

A RMN permite caracterizar uma estrutura química e avaliar a presença e/ou ausência de sinais característicos da molécula. As atribuições dos sinais referentes ao espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C obtidos estão de acordo com a literatura específica e com artigos encontrados para sildenafil e vardenafila, que são compostos com estruturas muito parecidas com a do carbonato de lodenafila.

A espectrofotometria na região do infravermelho é uma técnica muito útil na identificação de fármacos e caracterização de compostos novos ou desconhecidos (GIL et al., 2005; WATSON, 2005). Através da espectrofotometria na região do

infravermelho foi possível obter bandas de absorção características dos grupamentos presentes na estrutura química da molécula. Da mesma forma que para a interpretação dos espectros de RMN, utilizou-se literatura específica e dados encontrados para a sildenafil, onde algumas bandas de absorção são coincidentes. Através da verificação da presença de determinados grupamentos, foi caracterizado o CL e definido seu espectro no IV.

Para diluição do CL, o meio que demonstrou ser mais adequado foi o hidróxido de sódio 0,1 M, no qual a substância permaneceu estável por 17 dias. Nos demais solventes o carbonato de lodenafila mostrou-se pouco solúvel ou insolúvel. A espectrofotometria na região do UV é um método muito utilizado no controle da qualidade, devido ao potencial da grande maioria dos fármacos de absorver nessa região. Além disso, é uma técnica de fácil execução, custo reduzido, que apresenta boa precisão nas análises quantitativas, desde que não ocorra interferência dos excipientes (WATSON, 2005). A espectrofotometria na região do ultravioleta mostrou que o fármaco possui dois máximos de absorção, porém o comprimento de onda na região de 292 nm demonstrou-se mais indicado para utilização em ensaios de identificação, pois apresentou maior sensibilidade.

A identificação do carbonato de lodenafila em comprimidos baseou-se na comparação dos resultados obtidos com a substância química de referência. A cromatografia em camada delgada é uma técnica de separação muito empregada para a identificação de compostos, bem como para a determinação da presença impurezas (WATSON, 2005). Para o desenvolvimento do método por cromatografia em camada delgada, testaram-se diferentes sistemas eluentes a fim de verificar qual sistema permite a identificação do fármaco em comprimidos, quando este foi analisado juntamente com a SQR, através da comparação dos valores dos fatores de retenção (R_f) obtidos. Os valores de R_f para a SQR e comprimidos foram muito semelhantes (em torno de 0,40), demonstrando a presença da substância ativa nos comprimidos. Além disso, os resultados demonstraram a capacidade do método de separar substâncias com estruturas químicas semelhantes, uma vez que a sildenafil apresentou um R_f diferente (0,66) do CL SQR e dos comprimidos contendo este fármaco. A espectrofotometria na região do ultravioleta demonstrou a identidade do fármaco em comprimidos, através da comparação dos espectros, visto

que tanto os espectros de absorção obtidos para a solução amostra de carbonato de lodenafila em comprimidos quanto os da solução da SQR apresentaram-se semelhantes.

Para identificar ou quantificar substâncias é necessário, na maioria das vezes, separar o componente de interesse dos demais constituintes da amostra. A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação, que se tornou um dos métodos analíticos mais usados para análises qualitativas e quantitativas. Através da CLAE conseguem-se separações rápidas e análises quantitativas de fácil execução e grande precisão. A combinação da CLAE com a detecção no ultravioleta origina métodos exatos, precisos e robustos para a análise de produtos farmacêuticos (WATSON, 2005). A possibilidade de variação dos mecanismos de separação pela adequada escolha da coluna, fase móvel e método de detecção, permite a utilização desta técnica nas mais diversas fases de estudo dos produtos farmacêuticos. Por CLAE, a identificação do fármaco foi realizada através da comparação dos tempos de retenção, demonstrando que tanto o fármaco quanto a SQR eluíram em torno de 7,0 minutos.

A eletroforese capilar é uma ferramenta de separação, identificação e análise para uma ampla gama de moléculas, e seu uso vem crescendo nos últimos anos. A EC pode ser considerada como complementar ou alternativa à CLAE em termos de aplicações gerais (WATSON, 2005). A eletroforese em solução livre ou de zona é o modo mais utilizado devido à simplicidade do equipamento e maior facilidade na otimização das condições experimentais (SANTOS et al., 2000). Inicialmente, realizou-se a otimização do método, onde foram testados os tampões fosfato de sódio, citrato de sódio, acetato de sódio, tetraborato de sódio, acetato de amônio e ácido bórico, na faixa de pH 5-10, em diferentes concentrações (10-50 mM). Após a realização desses ensaios, a metodologia de superfície de resposta (MSR) foi aplicada para otimizar as principais variáveis que poderiam influenciar as análises, como: pH e concentração do tampão, temperatura do capilar e voltagem. Uma superfície de resposta é um gráfico que mostra o comportamento da resposta como função de dois ou mais fatores. A superfície de resposta oferece uma maneira conveniente de visualizar como fatores afetam as medidas do sistema (BEZERRA et al., 2008), que permite selecionar a combinação de níveis ótimos na obtenção da

melhor resposta. Os experimentos foram realizados de acordo com o planejamento experimental determinado pelo *software* Minitab. Mudanças significativas no tempo de migração, simetria e eficiência foram observadas para todas as combinações. Após ser definido que o tampão borato 50 mM e pH 10 (a uma temperatura de 32,5 °C, 15 kV) resultou em melhores valores de eficiência e simetria do pico, o fármaco foi também identificado por ECZ, e tanto a SQR quanto os comprimidos de CL apresentaram os mesmos tempos de migração. Dessa forma, foi possível a identificação do fármaco na forma farmacêutica através da ECZ.

O desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis e validados é de fundamental importância durante as diversas fases de desenvolvimento farmacêutico, tais como estudo de formulação, de estabilidade e controle da qualidade. A confiabilidade dos resultados do controle da qualidade é obtida através da validação dos métodos analíticos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Diretrizes referentes à validação de procedimentos analíticos encontram-se disponíveis em alguns guias (BRASIL, 2003; ICH, 2005) e farmacopeias (USP 34, 2011), as quais indicam que entre os principais parâmetros a serem avaliados na validação de um método estão: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, robustez. Segundo esses guias, nem todos os parâmetros analíticos necessitam ser empregados na validação de um método; a escolha dependerá do tipo do método e sua aplicação. Para o doseamento do fármaco nos diferentes métodos empregados, os guias recomendam que sejam feitos os ensaios de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Para testes de identificação é necessária a realização do ensaio de especificidade. Sendo assim, é possível afirmar que os métodos por UV, CLAE e EC atendem aos critérios de validação, podendo ser utilizados para identificação do CL em comprimidos, foram validados (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O carbonato de lodenafila não possui monografia descrita nos códigos oficiais, nem trabalhos científicos sobre a determinação quantitativa; por essa razão

um dos objetivos deste estudo foi desenvolver e validar métodos por CLAE, UV e EC para determinação quantitativa do fármaco.

Os métodos por CLAE, UV e EC demonstraram-se específicos, nas condições testadas, uma vez que não houve interferência dos excipientes da formulação. Além disso, o método por CLAE e EC apresentaram a capacidade de determinar o fármaco frente a produtos de degradação obtidos por estudos de degradação forçada, inferindo que o método é indicativo de estabilidade, podendo ser utilizado para verificação e monitoramento da estabilidade do fármaco nos comprimidos.

O estudo da linearidade foi realizado na faixa de 5 a 35 µg/mL, para o método por UV, 10 a 80 µg/mL para o método por CLAE e 20 a 80 µg/mL para EC com o preparo de três curvas analíticas, em dias distintos. Os três métodos apresentaram relação linear entre as concentrações utilizadas e as respectivas respostas obtidas, apresentando coeficientes de correlação próximos à unidade.

A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a curva analítica foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), cujo resultado é apresentado na Tabela 13.1, do Anexo 2 para o método por CLAE, na Tabela 13.2 para o método por UV e na Tabela 13.3 para o método por EC. A ANOVA, em todos os casos, indicou que a regressão linear foi significativa e não houve desvio de linearidade para um nível de significância de 5%.

A precisão dos métodos foi avaliada pelo estudo da repetibilidade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (precisão entre dias), a partir de múltiplas análises do mesmo lote de comprimidos. Os resultados foram expressos como o desvio padrão relativo (DPR). Observou-se que para os testes realizados os resultados são inferiores a 2%, demonstrando a precisão dos métodos analíticos.

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação pela adição de quantidades conhecidas da SQR na amostra, em três diferentes níveis de concentração. Para o método por CLAE a recuperação foi de 100,3%, para o método por UV foi de 102,1% e para EC 99,7%.

A robustez do método por CLAE foi determinada através de pequenas e deliberadas modificações, observando se ocorriam modificações nos parâmetros

cromatográficos, bem como, se o teor de amostras avaliadas em cada condição sofria alterações, e pelo estudo da estabilidade de soluções estoque da SQR e de soluções de trabalho das amostras. Os resultados demonstraram que o método foi robusto nas condições testadas. As soluções de trabalho das amostras se mantiveram estáveis por 24 horas à temperatura ambiente e a solução estoque de SQR por 18 dias, quando mantida à temperatura de 2-8 °C.

A determinação da robustez para o método de EC, foi realizada estudando a variação simultânea de fatores e como estes influenciariam as respostas. Foi escolhido um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , sendo quatro fatores estudados em dois níveis (alto e baixo). As respostas são as porcentagens de CL nos comprimidos, obtidas quando analisadas em comparação com a solução referência, em cada condição. Para avaliar os efeitos dos fatores, empregou-se o diagrama de Pareto e o gráfico de probabilidade normal dos resíduos. O diagrama de Pareto é um gráfico de barras que ordena as frequências das ocorrências de maneira decrescente, permitindo uma fácil visualização e identificação dos fatores mais importantes. No gráfico da probabilidade normal, a normalidade é identificada quando os pontos estão localizados, aproximadamente, ao longo de uma reta. Pela análise destes dois gráficos, foi possível observar a robustez do método por EC, uma vez que não houve alterações significativas no teor encontrado de CL, em todas as condições experimentais.

Na tabela 10.1 é possível verificar a comparação dos resultados das validações para os três métodos propostos.

Tabela 10.1. Resultados comparativos da validação dos métodos por UV, CLAE e EC.

Método	Parâmetro				
	Especificidade	Linearidade	Precisão	Exatidão	Robustez
Espectrofotometria no UV	Sim	5-35 µg/mL (r = 0,9998)	1,5%	102,1%	-
Cromatografia líquida de alta eficiência	Sim	10-80 µg/mL (r = 0,9999)	0,9%	100,3%	Sim
Eletroforese capilar	Sim	20-80 µg/mL (r = 0,9995)	1,4%	99,97%	Sim

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos para a determinação de carbonato de lodenafila em comprimidos, realizou-se a análise estatística comparativa entre os teores médios obtidos nos diferentes métodos, através da análise de variância (Tabela 13.4, Anexo 2). A avaliação estatística demonstrou não haver diferença significativa entre os métodos propostos, para um nível de significância de 5%. Sendo assim, os métodos podem ser considerados equivalentes e intercambiáveis. Porém, deve-se destacar que os métodos por CLAE e EC podem ser empregados para verificação e monitoramento da estabilidade de fármacos. O método por UV não possui essa característica, pois não promove a separação dos compostos, sendo influenciado pelos produtos de degradação formados que possuem cromóforos com absorção no comprimento de onda empregado.

Os estudos de estabilidade de medicamentos são eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante

seu prazo de validade. Através dos estudos de estabilidade também é possível avaliar segurança e a eficácia, através do monitoramento da formação de produtos de degradação, que podem gerar perda de atividade terapêutica e/ou toxicidade.

A avaliação da estabilidade pode ser realizada pelos ensaios de degradação forçada, onde são utilizadas condições mais severas de temperatura, umidade, oxidação, e ampla faixa de pH (ICH, 2003; BRASIL, 2005). Os resultados obtidos são usados para assegurar a estabilidade do fármaco e da forma farmacêutica, fornecendo informações sobre possíveis rotas de degradação, a estabilidade intrínseca do fármaco, além de demonstrar a especificidade ao desenvolver um método indicativo de estabilidade, sobretudo quando poucas informações estão disponíveis sobre os possíveis produtos de degradação (KLICK et al., 2005; SILVA et al., 2009).

Durante o teste de especificidade no processo de validação do método por CLAE, a degradação forçada da SQR do carbonato de Iodenafila frente à hidrólise ácida e básica, oxidação, temperatura e luz UV demonstrou que o fármaco é mais susceptível à luz UV. A luz UV 254 nm vem sendo cada vez mais utilizada por laboratórios para estudos de estabilidade. Apresenta baixo custo, é de fácil aquisição e proporciona irradiação de número elevado de amostras ao mesmo tempo (TØNESSEN, 2004). Levando-se em conta os resultados, optou-se pelo estudo da cinética de fotodegradação para a solução de comprimidos de carbonato de Iodenafila. O teste de degradação forçada envolve o fármaco isolado ou em suspensão/solução, disposto em recipientes transparentes e quimicamente inertes (ICH, 1996). Soluções do fármaco são mais susceptíveis e particularmente relevantes na compreensão do comportamento do produto em solução (TØNESSEN, 2004). Pelos resultados obtidos, sugere-se que a cinética siga a primeira ordem, o que demonstra que a velocidade da reação de fotodegradação é dependente da concentração da substância. Calcularam-se então os parâmetros cinéticos de constante de velocidade de reação (k) e tempo de vida útil ($t_{90\%}$), sendo os valores encontrados de $0,01118 \text{ min}^{-1}$ e 9,5 minutos, respectivamente.

Nos estudos de fotodegradação dos comprimidos de CL, dois produtos majoritários foram encontrados. Para identificação destes produtos, empregou-se a

cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-MS/MS). A CLUE é o avanço mais recente das técnicas de separação, que baseia-se nos mesmos princípios da CLAE, porém utiliza fases estacionárias com partículas menores que 2 μm (MALDANER & JARDIM, 2009). A espectrometria de massa proporciona um método altamente específico para a determinação ou confirmação da identidade ou da estrutura do fármaco e das matérias-primas (WATSON, 2005). Algumas condições utilizadas em CLAE foram alteradas, a fim de adequarem-se ao sistema. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e a coluna foi mantida a 40 °C com o propósito de diminuir a viscosidade, assim evitando pressão elevada na coluna. O ácido acético foi substituído por ácido fórmico e a proporção também foi alterada para melhor separação entre os picos.

Os cromatogramas obtidos por CLUE demonstraram que o tempo de retenção foi de 0,9 min para o carbonato de lodenafila, 0,53 min para o produto de degradação chamado inicialmente de DP-1 e 0,67 min para o DP-2. Pelo espectro de massas foi possível observar, para DP-1, o pico do íon molecular com m/z 393 e verificar os principais fragmentos em 365, 336 e 256. Para o DP-2 foi possível observar o pico do íon molecular com m/z 377 e verificar os principais fragmentos em 312, 284 e 256. Encontram-se, na literatura, artigos que descrevem estas rotas de fragmentação e fragmentos gerados para produtos de fotodegradação da sildenafil e também para a vardenafila (GRATZ et al, 2004; ZOU et al., 2006; ZHANG et al., 2010; EICHHORN et al., 2012). Assim, verificou-se que o carbonato de lodenafila seguiu a mesma rota de degradação e pode-se atribuir que o DP-1 é o ácido 4-etoxi-3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazol[4,3-d]pirimidina-5-il) benzenossulfônico e como DP-2 o ácido 4-etoxi-3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazol[4,3-d]pirimidina-5-il) benzenossulfínico.

O monitoramento da formação de produtos de degradação é muito importante, pois estes podem gerar perda da atividade ou serem tóxicos. Por esta razão foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* da amostra degradada de CL, frente à células mononucleares. O termo citotoxicidade significa causa de efeitos tóxicos (morte, alterações na permeabilidade da membrana celular, inibição enzimática) em nível celular. Sobretudo o teste de viabilidade celular *in vitro* é utilizado para verificar citotoxicidade aguda, tal como o ensaio de liberação da desidrogenase láctica

(PALMA et al., 2008), que é um ensaio de baixo custo, fácil de manipular e os dados obtidos são reprodutíveis (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006; JURISIC & BUMBASIREVIC, 2008). A enzima lactato desidrogenase está presente em todo o citoplasma celular, e quando a membrana é danificada há um contato com o meio externo (PALMA et al., 2008). A perda da desidrogenase láctica intracelular e sua liberação é um indicador de morte celular irreversível devido a dano da membrana celular (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). A amostra degradada de CL em diferentes concentrações não apresentou citotoxicidade *in vitro*, uma vez que os resultados encontrados são comparáveis ao controle negativo.

O teste de dissolução possibilita determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas (F. BRAS., 2010). Os estudos de dissolução são uma ferramenta indispensável nas várias etapas dos processos de desenvolvimento galênico, identificação de variáveis críticas na produção, formulação, controle de qualidade, estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* e assuntos regulamentares (MANADAS et al., 2002). Não se encontram na literatura dados referentes ao teste de dissolução do carbonato de lodenafila. Inicialmente, testou-se a solubilidade da SQR frente a diferentes meios. Os meios utilizados seguiram as recomendações encontradas nos guias (FDA, 1997; BRASIL, 2003; USP 34, 2011), onde o fármaco é considerado altamente solúvel quando a dosagem mais alta se dissolve em 250 mL de água na faixa de pH entre 1,0 e 8,0. O fármaco apresentou solubilidade em meio ácido (HCl), porém apenas na presença de tensoativo (lauril sulfato de sódio).

O uso de meio de dissolução contendo tensoativos, como polissorbato 20/80, brometo de cetiltrimetilamônio, lauril sulfato de sódio (LSS), lecitina, oleato de sódio e glicocolato de sódio tem sido relatado na literatura. Porém o LSS tem sido o agente de escolha devido ao seu baixo custo e por possuir boa capacidade de solubilização em concentrações relativamente baixas. Talvez por estes motivos o LSS seja o tensoativo mais encontrado nas farmacopeias (LEE et al., 2005; USP 34, 2011). Considerando o volume de meio de dissolução utilizado nos testes, os meios contendo HCl e lauril sulfato de sódio satisfizeram a condição *sink*. O termo condição *sink* é definido como sendo pelo menos três vezes o volume do meio

necessário para obter uma solução saturada do fármaco (BROWN et al., 2004; USP 34, 2011). A condição *sink* deve ser mantida a fim de evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste (MARQUES & BROWN, 2002).

Para desenvolvimento do teste de dissolução, construiu-se a curva de dose absorvida em função do tempo, baseada nos dados *in vivo* fornecidos pela indústria farmacêutica Cristália e na literatura (GLINA et al., 2010). A partir dessa curva, buscou-se encontrar um meio que tivesse o perfil de dissolução mais próximo possível. Com esse intuito, foi necessário utilizar uma velocidade de rotação não muito usual, porém justificável para o caso. A rotação de 25 rpm pode ser empregada quando refletir melhor os dados *in vivo* (USP 34, 2011). O meio de dissolução que melhor refletiu os dados *in vivo* foi HCl 0,1 M com 1,5 % de LSS (900 mL), a 37 ± 0.5 °C, na velocidade de 25 rpm. Após definida esta condição de dissolução, o método por espectrofotometria no UV foi validado seguindo os parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão e precisão. Também foi avaliada a estabilidade das soluções (ICH, 2005; USP 34, 2011). O método demonstrou ser específico, pois não houve interferência dos excipientes na determinação do CL, linear ($r = 0,9999$), preciso (DPR < 2 %) e exato (100,1 a 104,0 %). As soluções mantiveram-se estáveis nas condições empregadas.

Determinou-se a cinética de dissolução empregando modelos dependentes. Para tal, equações matemáticas de ordem zero, primeira ordem e Hixson-Crowell foram aplicadas (RODRIGUES et al., 2008; DASH et al., 2010). A escolha do modelo matemático que melhor expressa o perfil de dissolução de comprimidos de carbonato de lodenafila foi realizada com base no coeficiente de correlação de Pearson (r) (RODRIGUES et al., 2006; SCHESHOWITSCH et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008). O modelo de primeira ordem foi o que melhor representou a liberação *in vitro* do fármaco. No modelo de primeira ordem, a quantidade liberada *versus* tempo depende da quantidade de fármaco que permanece na formulação, sendo o modelo que melhor descreve formulações de liberação imediata (RODRIGUES et al., 2006; SCHESHOWITSCH et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; DASH et al., 2010).

11. CONCLUSÕES

- A análise por calorimetria exploratória diferencial, bem como as análises por espectrofotometria nas regiões do ultravioleta, infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , permitiram a caracterização do carbonato de lodenafila como substância química de referência;
- Os métodos propostos utilizando cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar mostraram-se adequados para identificação do carbonato de lodenafila em comprimidos, podendo ser empregados no controle de qualidade da matéria-prima e dos comprimidos deste fármaco;
- O método por espectrofotometria no UV demonstrou ser simples, rápido, linear, preciso e exato para análise quantitativa de CL em comprimidos;
- O método de doseamento por CLAE demonstrou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, sendo adequado para a identificação e quantificação do CL em comprimidos. A especificidade frente a produtos de degradação demonstrou que o método pode ser usado como indicativo de estabilidade;
- O método por EC demonstrou ser específico, exato, linear, preciso e robusto e apresenta-se como uma alternativa no controle de qualidade de comprimidos de carbonato de lodenafila;
- A análise estatística dos métodos por espectrofotometria no UV, CLAE e EC indicou que não há evidências de diferença significativa entre os teores

médios encontrados pelos três métodos, sendo caracterizada a equivalência dos mesmos;

- O estudo preliminar da estabilidade do carbonato de lodenafila SQR, para análise da especificidade do método por CLAE, demonstrou que esta molécula, quando exposta à luz, apresenta redução no teor, bem como a formação de produtos de degradação. Os ensaios realizados frente à radiação 254 nm, com os comprimidos em solução, demonstraram os mesmos resultados;
- As reações de fotodegradação do carbonato de lodenafila em solução a partir dos comprimidos apresentam cinética de primeira ordem, onde a velocidade da reação de fotodegradação é dependente da concentração da substância;
- Os produtos majoritários de degradação após exposição da solução amostra de CL à luz UV 254 nm foram identificados por CLUE-MS/MS, sendo o DP1 4-etoxi-3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazol [4,3-d] pirimidina-5-il) benzenossulfônico e o DP-2 ácido 4-etoxi-3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazol [4,3-d] pirimidina-5-il) benzenossulfínico;
- Através dos estudos de citotoxicidade *in vitro*, verificou-se que a amostra fotodegradada de carbonato de lodenafila não apresenta atividade tóxica.
- O teste de dissolução desenvolvido e validado utilizando espectrofotometria no UV para determinação da quantidade dissolvida de CL em HCl 0,1 M + lauril sulfato de sódio 1,5% foi considerado adequado para o controle de qualidade de rotina dos comprimidos;

- Através da análise dos resultados obtidos pela aplicação dos modelos matemáticos propostos, conclui-se que o CL segue cinética de dissolução primeira ordem, ou seja, a quantidade de fármaco liberada é proporcional à quantidade restante no seu interior.

12. REFERÊNCIAS

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação do guia para realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 25 ago. 2005.

BROWN, C. K.; CHOKSHI, H.P.; NICHESON, B.; REED, R. A.; ROHRS, B. R.; SHAH, P. A. Acceptable analytical practices of dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technology**, p. 56-65, 2004.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic Modeling On Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems, **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217-223, 2010.

EICHHORN, P.; PÉREZ, S.; ACEÑA, J.; GARDINALI, P.; ABAD, J. L.; BARCELÓ, D. Identification of phototransformation products of sildenafil (Viagra) and its N-demethylated human metabolite under simulated sunlight. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 701-711, 2012.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

Food and Drugs Administration (FDA). FDA Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Rockville; 1997.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, p. 171-177, 2006.

GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**, Campo Grande: Editora UNIDERP, 2005.

GLINA, S.; FONSECA, G. N.; BERTERO, E. B.; DAMIÃO, R.; ROCHA, L. C. A.; JARDIM, C. R. F.; CAIROLI, C. E.; TELOKEN, C.; TORRES, L. O.; FARIA, G. E.; SILVA, M. B.; PAGANI, E. Efficacy and Tolerability of Lodenafil Carbonate for Oral Therapy of Erectile Dysfunction: A Phase III Clinical Trial. **Journal of Sexual Medicine**, v. 7. n. 5, p. 1928-1936, 2010.

GRATZ, S. R.; FLURER, C. L.; WOLNIK, K. A. J. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC–ESI–MS and LC–UV. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 525-533, 2004.

ICH – International Conference on Harmonisation. Guideline on stability testing: Photostability testing of new drug substances and products. Switzerland, 1996.

ICH – International Conference on Harmonization. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), Switzerland, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

JURISIC, V.; BUMBASIREVIC, V. In vitro assays for cell death determination. www.onk.ns.ac.yu/Archive, v. 16, n. 3-4, p. 49-54, 2008.

KLICK, S.; MUIJSELLAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; GRIEND, C. S.; BELD, C. B.; SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. *Pharmaceutical Technology*, 2005. Disponível em: <<http://pharmtech.findpharma.com>>. Acesso em: 05/01/11.

LEE, H.; PARK, S. A.; SAH, H. Surfactant effects upon dissolution patterns of carbamazepine immediate release tablet. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 1, p. 120-126, 2005.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O Estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-400, 2002.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Analytica**, v. 1, p. 48-51, 2002.

PALMA, M. B. S.; CORAT, E. J.; SOARES, C. P. Avaliação da citotoxicidade in vitro de superfícies recobertas por nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT). Relatório final de projeto de iniciação científica (PIBIC/CNPq/INPE), p. 1-55, 2008. Disponível em: <mtc-m17.sid.inpe.br/sid.inpe.br/mtc-m17@80/2007/11.29.19.17> Acesso em: 02 ago. 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, P. O.; STULZER, H. K.; CRUZ, A. P.; FOPPA, T.; CARDOSO, T. M.; SILVA, M. A. S. Equivalência Farmacêutica entre Comprimidos de Propranolol Comercializados no Mercado Nacional. **Infarma**, v. 18, p. 3-7, 2006.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. M.; SILVA, M. A. S.; MATO, J. R. Caracterização Termoanalítica e Estudo do Perfil de Dissolução de Comprimidos contendo Metronidazol, **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 4, p. 528-534, 2008.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SANTOS, M. R.; TAVARES, M. F. M.; RUBIM, J. C. Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 5585-589, 2000.

SCHESHOWITSCH, K.; PEREIRA, A.; CRUZ, A.; SILVA, M. A. S.; STUZLER, H. K. Avaliação da Qualidade e Perfil de Dissolução de Cápsulas Manipuladas de Piroxicam. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 645-651, 2007.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 20, n. 2, p. 1-8, 2009.

TØNNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 1–14, 2001.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA, The (USP). Validation of Compendial Methods (1225), USP 34, NF 29, Rockville, 2011.

ZOU, P.; OH, S. S. Y. ; HOU, P. ; LOW, M. Y. ; KOH, H. L. Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography- electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p. 113-122, 2006.

ZHANG, Y.; HUANG, Z.; DING, L.; YAN, H.; WANG, M.; ZHU, S. Simultaneous determination of yohimbine, sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrom. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 2109-2114, 2010.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. 2^a ed. Edinburgh. Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

ANEXO 1

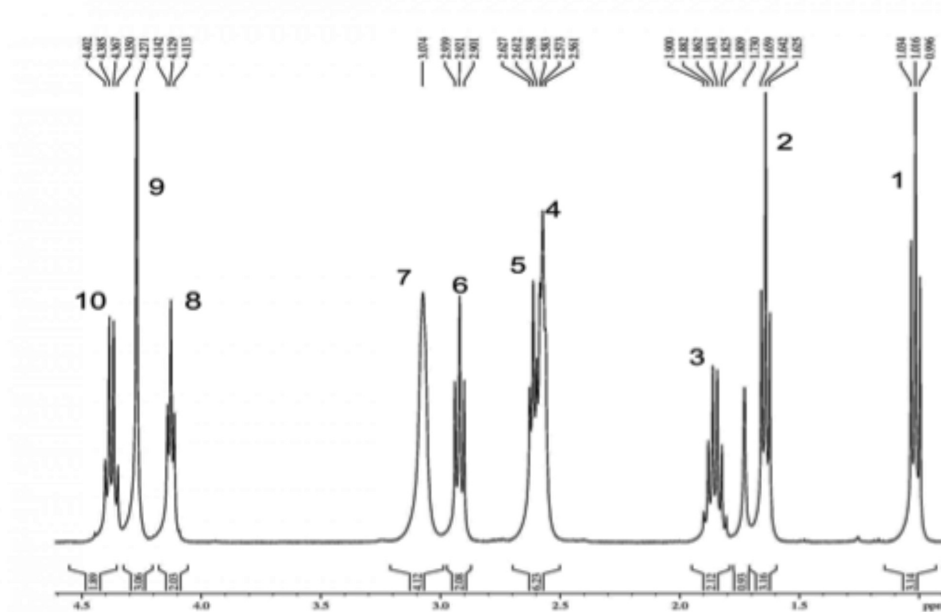


Figura 13.1. Espectro de RMN de ^1H ampliado do carbonato de Iodanafil SQR.

ANEXO 2

Tabela 13.1. Análise da variância (ANOVA) das áreas obtidas para obtenção da curva analítica do carbonato de lodenafila por CLAE.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F calc.	F tab.
Entre	7	$1,317426 \cdot 10^{13}$	$1,882037 \cdot 10^{12}$	24416,29*	2,85
Regressão linear	1	$1,317393 \cdot 10^{13}$	$1,317393 \cdot 10^{13}$	170909,77*	4,60
Desvio da linearidade	6	$3,295535 \cdot 10^8$	$5,492559 \cdot 10^7$	0,71	2,96
Dentro	16	$1,233299 \cdot 10^9$	$7,708121 \cdot 10^7$		
Total	23				

*: significativo para $p = 0,05$.

Tabela 13.2. Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas para obtenção da curva analítica do carbonato de lodenafila por espectrofotometria no UV.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F calc.	F tab.
Entre	6	1,41159	0,23527	6402,28*	2,85
Regressão linear	1	1,25282	1,25282	43034,3*	4,60
Desvio da linearidade	5	0,00002	0,00000	0,00672	2,96
Dentro	14	0,00051	0,00004		
Total	20	1,41211			

*: significativo para $p = 0,05$.

Tabela 13.3. Análise da variância (ANOVA) obtida na curva analítica do carbonato de lodenafila por eletroforese capilar.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F calc.	F tab.
Entre	6	3,01872	0,503120	1620,46*	2,85
Regressão linear	1	3,01691	3,016913	9716,95*	4,60
Desvio da linearidade	5	0,00181	0,000362	1,17	2,96
Dentro	14	0,00435	0,000310		
Total	20	3,02307			

*: significativo para $p = 0,05$.

Tabela 13.4 Análise da variância (ANOVA) dos resultados do doseamento do carbonato de lodenafila em comprimidos, pelos métodos propostos por CLAE, UV e EC.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F calc.	F tab.
Entre	2	5,174	2,587	1,2891	3,2381
Dentro	27	40,146	1,48689		
Total	29	45,32			