

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICO E
ELETROFORÉTICO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA
DE DELAPRIL E MANIDIPINO EM COMPRIMIDOS**

VÍTOR TODESCHINI

Porto Alegre, 2010.

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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICO E
ELETROFORÉTICO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA
DE DELAPRIL E MANIDIPINO EM COMPRIMIDOS**

Dissertação apresentada por
VÍTOR TODESCHINI para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Nadia Maria Volpato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19.11.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr. Simone Gonçalves Cardoso
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof^a. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

T637d Todeschini, Vítor

Desenvolvimento de métodos cromatográfico e eletroforético para determinação simultânea de delapril e manidipino em comprimidos / Vítor Todeschini – Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xxvi, 119 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Delapril. 2. Manidipino. 3. Validação : Métodos de análise de fármacos. 4. Controle de qualidade de medicamentos. 5. Cromatografia. 6. Eletroforese capilar. 7. Estabilidade. I. Volpato, Nadia Maria. II. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável:
Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*“Sonha e serás livre de espírito...
luta e serás livre na vida”*

Ernesto Che Guevara

AGRADECIMENTOS

À Profa. Nadia Maria Volpato, pela oportunidade, apoio, amizade, confiança, orientação e revisão crítica.

À Profa. Elfrides E. S. Schapoval, pelo exemplo de vida, amizade e profissionalismo.

Aos professores Célia Chaves, Tércio Oppe e, especialmente, ao Prof. Martin Steppe pela disponibilidade, amizade e auxílios prestados.

Aos amigos do LEPCQ: Aline Barth, Alini Lange, Amanda, Bárbara, Caren, Cássia, Clésio, Diogo, Fernanda, Franciele, Letícia, Marcelo, Mariana, Maximiliano, Nathalie, Patrícia e Rúbia, pelo convívio, acolhimento, auxílio e, principalmente, pelos conhecimentos adquiridos.

Às amigas do LCQFar: Leila, Lorena e Viviane, em especial à Alianise pela e colaboração ao longo do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, à Faculdade de Farmácia da UFRGS e a todos os professores e funcionários dessa Instituição.

À família Nemitz pelo carinho e em especial à Marina pelo amor, amizade e compreensão, fundamentais em todos os momentos.

Aos meus pais, Valter e Nair, e ao meu irmão Raul, pela compreensão, amor e principalmente pelo apoio incondicional na busca de todos meus sonhos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Desenvolvimento de métodos cromatográfico e eletroforético para determinação simultânea de delapril e manidipino em comprimidos

A combinação entre o delapril (DEL), um inibidor da enzima conversora de angiotensina e o manidipino (MAN), um antagonista dos canais de cálcio, produz um efeito anti-hipertensivo sinérgico, podendo ser considerado um ótimo tratamento para pacientes com hipertensão essencial leve e moderada. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos cromatográfico e eletroforético para avaliação simultânea de DEL e MAN em produto farmacêutico. As análises por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) foram executadas utilizando coluna C₈ (250 mm x 4,6 mm), mantida a 35 °C. A fase móvel foi constituída por acetonitrila e solução de trietilamina 0,3%, pH 3,0 (55:45; v/v), eluída na vazão de 1,2 mL/min com detecção a 220 nm. Paralelamente, desenvolveu-se método por eletroforese capilar, utilizando modo de separação por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) e ácido salicílico como padrão interno. Foi utilizado capilar de sílica fundida (comprimento efetivo de 72 cm) mantido a 35 °C, com solução eletrolítica composta de tampão borato 50 mM e dodecil sulfato de sódio (SDS) 5 mM, pH 9,0. Voltagem de 25 kV foi aplicada e a injeção foi de 50 mbar durante 5 s, com detecção a 208 nm. A especificidade e a capacidade dos métodos serem indicativos de estabilidade foram demonstradas através de estudos de degradação forçada dos fármacos e pela não interferência dos excipientes nas análises. Além disso, o desenho experimental Plackett-Burman foi utilizado para a avaliação da robustez, observando-se resultados adequados para ambos métodos. Os procedimentos foram validados de acordo com guias aceitos internacionalmente, observando-se resultados em uma faixa aceitável. Os métodos propostos foram aplicados com sucesso na determinação quantitativa simultânea de DEL e MAN em comprimidos, não havendo diferença significativa dos resultados ($P > 0,05$), contribuindo, portanto, para aprimorar o controle da qualidade, assegurando a eficácia terapêutica.

Palavras-chave: Cromatografia eletrocínética micelar, cromatografia líquida em fase reversa, delapril, manidipino, métodos indicativos de estabilidade, validação.

ABSTRACT

Development of the chromatographic and electrophoretic methods for the simultaneous determination of delapril and manidipine in tablets

The combination of delapril (DEL), an angiotensin converting enzyme inhibitor and manidipine (MAN), an antagonist of calcium channels, produces a synergic antihypertensive effect and may be regarded as an optimal antihypertensive drug treatment in mild to moderate essential hypertensive patients. The chromatographic and electrophoretic methods for the simultaneous evaluation of DEL and MAN in pharmaceutical product were developed and validated in the present work. The reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was carried out on a C₈ column (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μm), maintained at 35 °C. The mobile-phase consisted of acetonitrile and a solution of triethylamine 0.3% pH 3.0 (55:45; v/v), running at a flow rate of 1.2 mL/min, with detection at 220 nm. The capillary electrophoresis method was developed using the micellar electrokinetic chromatography (MEKC) as the separation mode, and salicylic acid as internal standard. The analysis were performed on a fused-silica capillary (effective length of 72 cm) maintained at 35 °C, with 50 mM of borate buffer and 5 mM of sodium dodecyl sulfate (SDS) at pH 9.0 as background electrolyte. The separation was achieved at 25 kV applied voltage and the injection was performed at 50 mbar for 5 s, with detection at 208 nm. The specificity and stability-indicating capability of the methods were demonstrated through forced degradation studies, which also show that there is no interference of the excipients in the analysis. Moreover, the Plackett-Burman experimental design was used for robustness evaluation, giving acceptable results for both methods. The procedures were validated according to International guidelines, giving results within the acceptable range. Therefore, the proposed methods were successfully applied for the simultaneous quantitative analysis of DEL and MAN in the tablet dosage form, showing non-significant difference ($P>0.05$), contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy.

Keywords: Delapril, manidipine, micellar electrokinetic capillary chromatography, reversed-phase liquid chromatography, stability-indicating methods, validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura química do cloridrato de delapril 13

Figura 3.2. Estrutura química do dicloridrato de manidipino 14

Parte Experimental. Análise qualitativa

Figura 4.1. Termograma obtido por DSC para o DEL SQR 29

Figura 4.2. Termograma obtido por DSC para o MAN SQR 29

Figura 4.3. Espectro no IV do DEL SQR 30

Figura 4.4. Espectro no IV do MAN SQR 30

Figura 4.5. Espectro de MS do DEL SQR 32

Figura 4.6. Espectro de MS do MAN SQR 32

Figura 4.7. Cromatogramas sobrepostos das soluções das SQR de DEL e MAN e amostras dos comprimidos nas concentrações de 30 e 10 µg/mL para o DEL e MAN, respectivamente 34

Figura 4.8. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do DEL: SQR e amostra dos comprimidos, obtidos pelo sistema de CL 34

Figura 4.9. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do MAN: SQR e amostra dos comprimidos, obtidos pelo sistema de CL 35

Figura 4.10. Eletroferogramas sobrepostos das soluções das SQR de DEL, MAN e PI e amostras dos comprimidos adicionados de PI nas concentrações de 60, 20 e 10 µg/mL para o DEL, MAN e PI, respectivamente 36

Figura 4.11. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do DEL: SQR e amostra dos comprimidos, obtidos pelo sistema de EC 37

Figura 4.12. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do MAN: SQR e amostra dos comprimidos, obtidos pelo sistema de EC 37

Parte Experimental. Análise quantitativa

Artigo científico: *Simultaneous Determination of Delapril and Manidipine in a Pharmaceutical Formulation by a Stability-indicating RP-LC Method using an Experimental Design.*

Figure 5.1. Overlaid UV absorption spectra and chemical structures of reference substance solution of DEL and MAN (30 µg/mL and 10 µg/mL, respectively)53

Figure 5.2. Representative RP-LC chromatogram of DEL and MAN reference substance solution. Peak 1: DEL (30 µg/mL); Peak 2: MAN (10 µg/mL). Chromatographic conditions: Shimadzu Shim-Pack CLC-C8 column (250 × 4.6 mm, 5 µm), 35 °C; mobile phase: acetonitrile/triethylamine (0.3%; pH 3.0) (55:45; v/v); flow rate: 1.2 mL.min⁻¹; detection: 220 nm54

Figure 5.3. RP-LC chromatograms for degradation studies of DEL (30 µg/mL). (a) DEL reference substance solution; (b) after acidic hydrolysis; (c) after basic hydrolysis; (d) after oxidation; (e) after exposition to UV light. Peak 1: DEL, Peak 2: degraded forms, Peak 3: hydrogen peroxide preservative. Chromatographic conditions: Shimadzu Shim-Pack CLC-C8 column (250 × 4.6 mm, 5 µm), 35 °C; mobile phase: acetonitrile/triethylamine (0.3%; pH 3.0) (55:45; v/v); flow rate: 1.2 mL.min⁻¹; detection: 220 nm55

Figure 5.4. RP-LC chromatograms for degradation studies of MAN (10 µg/mL). (a) MAN reference substance solution; (b) after acidic hydrolysis; (c) after basic hydrolysis; (d) after oxidation; (e) after exposition to UV light. Peak 1: MAN, Peak 2: degraded forms, Peak 3: hydrogen peroxide preservative. Chromatographic conditions: Shimadzu Shim-Pack CLC-C8 column (250 × 4.6 mm, 5 µm), 35 °C; mobile phase: acetonitrile/triethylamine (0.3%; pH 3.0) (55:45; v/v); flow rate: 1.2 mL.min⁻¹; detection: 220 nm.56

Figure 5.5. The full scan mass spectra of DEL (m/z 453.9) and MAN (m/z 611.9). (a) DEL reference substance solution, and after (b) basic condition: degraded products = m/z 181.23, 199.21, 214.36, 257.18, 315.22, 373.25 and 439.72; and (c) oxidative condition: additional products = m/z 467.72 and 489.79. (d) MAN reference substance solution, and after (e) oxidative condition: degraded product = m/z 290.71; additional products = m/z 628.00 and 649.93; and (f) exposure to UV light: degraded products = m/z 167.33, 443.81, 593.81 and 609.0158

Artigo científico: *Stability-indicating Micellar Electrokinetic Chromatography Technique for Simultaneous Measurement of Delapril and Manidipine from Their Combination Drug Formulation.*

Figure 5.6. Chemical structures of (a) DEL; (b) MAN; (c) IS72

Figure 5.7. Overlay UV absorption spectra of reference substance solution of DEL, MAN and IS (60 µg/mL, 20 µg/mL and 10 µg/mL respectively), obtained by PDA detector of the CE system79

Figure 5.8. MEKC electropherogram of DEL (60 µg/mL), IS (10 µg/mL) and MAN (20 µg/mL) analysed using the capillary with 40 cm of effective length. Peak 1: DEL; 2: IS; 3: MAN81

Figure 5.9. MEKC electropherograms of DEL (60 µg/mL), IS (10 µg/mL) and MAN (20 µg/mL) analysed using the capillary with 72 cm of effective length. a) DEL, IS and MAN reference substances solutions. b) after basic hydrolysis; c) after acidic hydrolysis; d) after exposition to UV light; (e) after oxidation. Peak 1: DEL; 2: IS; 3: MAN; 4: degraded forms; 5: hydrogen peroxide preservative.....83

Figure 5.10. Bars charts representing the calculated effects for quantitative determination (assay) of the investigated factors in Plackett-Burman experimental design and their critical effect, represented by the vertical line, for: a) delapril and b) manidipine. The negative effects are represented in module. Critical Effect (%) = estimate error x $t_{critical}$87

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Classificação da pressão arterial em níveis tensionais (> 18 anos) 12

Parte Experimental. Análise qualitativa

Tabela 4.1. Frequências das principais bandas de absorção do DEL e suas respectivas atribuições 31

Tabela 4.2. Frequências das principais bandas de absorção do MAN e suas respectivas atribuições 31

Tabela 4.3. Condições cromatográficas definidas para identificação de DEL e MAN por CL..... 33

Tabela 4.4. Condições eletroforéticas definidas para identificação de DEL e MAN por EC no modo MEKC 36

Parte Experimental. Análise quantitativa

Artigo científico: *Simultaneous Determination of Delapril and Manidipine in a Pharmaceutical Formulation by a Stability-indicating RP-LC Method using an Experimental Design.*

Tabela 5.1. Factors and levels investigated during robustness testing 52

Tabela 5.2. Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for delapril and manidipine in the pharmaceutical formulation..... 59

Tabela 5.3. Accuracy of RP-LC for delapril and manidipine in samples of pharmaceutical formulation..... 60

Tabela 5.4. Plackett-Burman experimental design with the obtained response to each experiment and the effects of the investigated factors..... 62

Artigo científico: *Stability-indicating Micellar Electrokinetic Chromatography Technique for Simultaneous Measurement of Delapril and Manidipine from Their Combination Drug Formulation.*

Tabela 5.5. Factors and levels investigated during robustness testing	78
Tabela 5.6. Inter-day and between-analysts precision data of MEKC for delapril and manidipine in samples of pharmaceutical formulation	84
Tabela 5.7. Accuracy of MEKC for delapril and manidipine in samples of simulated pharmaceutical formulation.....	85
Tabela 5.8. Plackett-Burman experimental design, the obtained response to each experiment and the effects of the investigated factors.....	88
Tabela 5.9. Student's t-test comparing RP-LC and MEKC methods for delapril and manidipine analysis in pharmaceutical formulation.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
ANOVA	Análise de variância;
BGE	<i>Background electrolyte</i> ;
CL	Cromatografia líquida;
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa;
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas;
CZE	<i>Capillary zone electrophoresis</i> ;
DAD	Detector de arranjo de diodos;
DEL	Delapril
DPR	Desvio padrão relativo;
DSC	Calorimetria exploratória diferencial;
EC	Eletroforese capilar;
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EM	Espectrometria de massas;
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> ;
HA	Hipertensão arterial
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> ;
IS	Internal Standard;
IV	Infravermelho;
LoQ	<i>Limit of quantitation</i> ;
LoD	<i>Limit of detection</i> ;
MAN	Manidipino
MEKC	Cromatografia eletrocínética micelar;
PA	Pressão arterial
PI	Padrão interno;
r^2	Coefficiente de determinação;
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> ;
SQR	Substância química de referência;
UV	Ultravioleta;
USP	Farmacopéia Americana.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1. Aspectos gerais	11
3.2. Delapril	13
3.3. Manidipino	14
3.4. Associação entre delapril e manidipino	15
3.5. Métodos analíticos.....	16
3.6. Validação de métodos analíticos	20
3.7. Estudos de estabilidade.....	22
4. PARTE EXPERIMENTAL. Análise Qualitativa	25
4.1. Introdução.....	27
4.2. Materiais de referência e produtos farmacêuticos	27
4.2.1. Substância química de referência	27
4.2.2. Produtos farmacêuticos	28
4.3. Caracterização das substâncias químicas de referência.....	28
4.3.1. Calorimetria exploratória diferencial	28
4.3.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho.....	29
4.3.3. Espectrometria de massas	31
4.4. Identificação dos fármacos no produto farmacêutico	33
4.4.1. Cromatografia líquida	33
4.4.2. Eletroforese capilar.....	35
4.4.3. Discussão e conclusões	38
5. PARTE EXPERIMENTAL. Análise Quantitativa	39

5.1. Introdução.....	41
5.2. Artigo científico - <i>Simultaneous Determination of Delapril and Manidipine in a Pharmaceutical Formulation by a Stability-indicating RP-LC Method using an Experimental Design</i>	43
5.2.1. Título.....	45
5.2.2. Abstract	45
5.2.3. Introduction.....	46
5.2.4. Experimental.....	47
5.2.4.1. Chemicals and reagents	47
5.2.4.2. Aparatus and analytical conditions	47
5.2.4.2.1. Liquid chromatography	47
5.2.4.2.2. Mass spectrometry	48
5.2.4.3. Solutions.....	48
5.2.4.3.1. Preparation of reference substance solution	48
5.2.4.3.2. Preparation of sample solution	49
5.2.4.4. Validation of the method.....	49
5.2.4.4.1. Specificity	49
5.2.4.4.2. Linearity	50
5.2.4.4.3. Precision and accuracy.....	50
5.2.4.4.4. Limit of detection and quantification.....	51
5.2.4.4.5. Robustness.....	51
5.2.4.5. System suitability	52
5.2.5. Results and discussion	52
5.2.5.1. Selection of the detection wavelength	52
5.2.5.2. Selection and optimization of the chromatographic conditions	53
5.2.5.3. Method validation.....	54
5.2.5.3.1. Specificity	54
5.2.5.3.2. Linearity	57
5.2.5.3.3. Precision	58
5.2.5.3.4. Accuracy.....	60
5.2.5.3.5. Limit of detection and quantification.....	60
5.2.5.3.6. Robustness.....	61

5.2.5.4. System suitability	61
5.2.6. Conclusion	63
5.2.7. Acknowledgements	63
5.2.8. References	64
5.3. Artigo científico - <i>Stability-indicating Micellar Electrokinetic Chromatography Technique for Simultaneous Measurement of Delapril and Manidipine from Their Combination Drug Formulation</i>	67
5.3.1. Título	69
5.3.2. Abstract	69
5.3.3. Introduction	70
5.3.4. Experimental	71
5.3.4.1. Chemicals and reagents	71
5.3.4.2. Aparatus	72
5.3.4.3. Preparation of reference substance solutions	73
5.3.4.4. Preparation of sample solution	73
5.3.4.5. Preparation of BGE solution	73
5.3.4.6. CE procedure	74
5.3.4.7. LC procedure	74
5.3.4.8. Validation of CE method	75
5.3.4.8.1. Specificity	75
5.3.4.8.2. Linearity	76
5.3.4.8.3. Precision	76
5.3.4.8.4. Accuracy	77
5.3.4.8.5. Limit of detection and quantification	77
5.3.4.8.6. Robustness	77
5.3.4.9. Stability	78
5.3.4.10. System suitability	78
5.3.5. Results and discussion	79
5.3.5.1. Optimization of the eletroforetic conditions	79
5.3.5.2. Method validation	82
5.3.5.2.1. Specificity and forced degradation studies	82
5.3.5.2.2. Linearity	82
5.3.5.2.3. Precision	84

5.3.5.2.4. Accuracy	85
5.3.5.2.5. Limit of detection and quantification.....	85
5.3.5.2.6. Robustness.....	86
5.3.5.3. Stability	87
5.3.5.4. System suitability	89
5.3.5.5. Analysis of pharmaceuticals formulations by MEKC and LC	89
5.3.6. Conclusion.....	90
5.3.7. Acknowledgements.....	90
5.3.8. References	91
6. DISCUSSÃO GERAL.....	93
7. CONCLUSÕES	101
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	105
9. REFERÊNCIAS	109

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é a mais freqüente das doenças cardiovasculares. Estima-se que em 2025, caso não haja uma rápida mudança no estilo de vida, mais de 1,56 bilhões da população adulta mundial tenha pressão arterial elevada (KEARNEY *et al.*, 2005). No Brasil, existem cerca de 17 milhões de hipertensos, atingindo 35% da população maior de 40 anos, constituindo, portanto, um grave problema de saúde pública.

Habitualmente, a HA é assintomática e de causa associada a vários fatores, o que dificulta o seu tratamento que deve ser individualizado. A terapia farmacológica diminui a pressão arterial atuando na resistência vascular periférica e/ou débito cardíaco. De acordo com seus locais ou mecanismos de ação, os agentes anti-hipertensivos disponíveis são classificados em diuréticos, simpatolíticos, vasodilatadores, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) e antagonistas dos receptores da angiotensina II (BRASIL, 2006; OATES *et al.*, 2006). Dentre estes, os fármacos inibidores ECA, tal como o delapril (DEL) e os bloqueadores dos canais de cálcio, como o manidipino (MAN), constituem uma importante alternativa no tratamento e controle desta patologia, podendo ser usados como monoterapia ou combinados.

Desenvolvida pelo laboratório Chiesi, Itália, e importada e comercializada pelo laboratório Farmalab Chiesi, a associação entre cloridrato de delapril e dicloridrato de manidipino (Hipertil[®]) foi liberada para uso clínico no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em março de 2006, sendo indicada para o tratamento da HA essencial.

Considerando que a HA é responsável por pelo menos 40% das mortes por acidente vascular cerebral, por 25% das mortes por doença arterial coronariana e, em combinação com o diabetes, 50% dos casos de insuficiência renal terminal (BRASIL, 2006) e devido à importância clínica, econômica e social que envolve o tratamento da HA, é fundamental possuir métodos analíticos de domínio público para a avaliação da qualidade destes medicamentos.

Os avanços tecnológicos na área farmacêutica viabilizam o desenvolvimento e produção de novos fármacos de interesse terapêutico, os quais necessitam de

métodos analíticos para sua identificação e determinação quantitativa no produto acabado. A legislação vigente determina que os medicamentos comercializados cumpram com especificações que garantam segurança ao consumidor. Dessa forma, o desenvolvimento e validação de métodos que atendam às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados torna-se imprescindível (BRASIL, 2003; ICH, 2005, USP 32, 2009).

A avaliação dos fármacos é realizada continuamente em todas as fases de desenvolvimento farmacêutico, tais como estudos de formulação e estabilidade, controle de qualidade e em testes clínicos. A falta de confiabilidade das metodologias de análise de produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos (SWARTZ & KRULL, 1998).

Neste contexto, o controle de qualidade é responsável pela avaliação de inúmeras propriedades que conferem a qualidade aos medicamentos, desde a matéria-prima até o produto acabado, atuando no desenvolvimento e validação de métodos analíticos, nos estudos de estabilidade de formulações, na análise de produtos de degradação e na padronização de procedimentos de produção.

O desenvolvimento de metodologias utilizando diferentes equipamentos e a equivalência dos resultados, possibilitam uma visão ampla de vantagens e desvantagens dos avanços analíticos. Destaca-se que a associação entre DEL e MAN não possui monografia em compêndios oficiais nem registros disponíveis para determinações quantitativas em produto acabado. Verificaram-se, também, escassos estudos publicados sobre a estabilidade das moléculas na literatura científica consultada.

Face ao exposto, justifica-se desenvolver e validar diferentes métodos, inovadores e exeqüíveis para avaliar, simultaneamente, a qualidade de DEL e MAN, matérias-primas e forma farmacêutica. Por essas razões, entende-se que a contribuição do presente trabalho será significativa, estabelecendo-se bases para progressivos trabalhos científicos na área, além de colaborar com o controle de qualidade dos medicamentos anti-hipertensivos e com a hipótese do surgimento de medicamentos genéricos ou similares desses fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e comparar métodos analíticos indicativos de estabilidade por cromatografia líquida e eletroforese capilar para determinação simultânea de delapril e manidipino em formulação farmacêutica.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver métodos qualitativos para identificação de delapril e manidipino por técnicas cromatográfica, eletroforética, espectrais e termoanalítica para o material de referência e o produto acabado;
- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida para determinação quantitativa simultânea de DEL e MAN;
- Desenvolver e validar método por eletroforese capilar para determinação quantitativa simultânea de DEL e MAN;
- Caracterizar a susceptibilidade dos fármacos frente a diferentes condições de estresse, confirmando a aplicabilidade dos métodos desenvolvidos em estudos de estabilidade.
- Realizar análise estatística comparativa entre os métodos propostos;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais

A hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica, multifatorial, altamente prevalente, de elevado custo econômico-social, com grande impacto na morbidade e mortalidade no mundo moderno. Estima-se que no mundo há mais de 1 bilhão de indivíduos hipertensos, sendo que aproximadamente 7,1 milhões de óbitos por ano podem ser atribuídos à HA ou em decorrência das suas complicações. No Brasil, estima-se que um em cada cinco habitantes seja portador dessa patologia, mais freqüentemente em indivíduos de meia-idade e idosos (KANNEL, 2000; STAESSEN *et al.*, 2003; CORRÊA *et al.*, 2005; OATES *et al.*, 2006).

Caracterizada por níveis tensionais elevados, associados a alterações metabólicas, hormonais e a hipertrofias cardíaca e vascular, a HA é geralmente diagnosticada por três diferentes leituras elevadas de pressão arterial (PA) sistólica maior que 120 mmHg e PA diastólica maior que 80 mmHg, podendo ser classificada segundo sua causa base (primária ou secundária) e de acordo com os níveis tensionais (Tabela 3.1.). A primária, essencial ou idiopática é a mais comum, representando aproximadamente 95% dos casos de hipertensão. É caracterizada por não possuir etiologia definida, havendo, normalmente, uma combinação de diversas alterações. Na HA secundária, a hemodinâmica do organismo é alterada por causas primárias e identificáveis, tais como doença renal crônica, doença renovascular, doença da tireóide ou paratireóide e também pode ser causada por medicamentos como contraceptivos orais, anti-inflamatórios não esteróides e descongestionantes nasais (STAESSEN *et al.*, 2003; WHITWORTH, 2003; CORRÊA *et al.*, 2005; HOUSTON, 2009).

Dentre os fatores de risco para a HA encontram-se os não modificáveis: sexo, idade, raça e histórico familiar de doença cardiovascular; e os modificáveis, os quais através de cuidados e precauções, reduzem os valores pressóricos, destacando-se: as dislipidemias, o uso abusivo do sal, o tabagismo, o alcoolismo, o estresse, a obesidade, o sedentarismo, o diabetes mellitus, microalbuminúria e o uso de medicamentos que possam elevar a pressão arterial (BRASIL, 2006).

Tabela 3.1. Classificação da PA em níveis tensionais (> 18 anos).

Classificação	PA sistólica (mmHg)	PA diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130–139	85–89
Nível 1 (leve)	140–159	90–99
Hipertensão Nível 2 (moderada)	160–179	100–109
Nível 3 (grave)	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

Fonte: Sociedades Brasileiras de Cardiologia, de Hipertensão e de Nefrologia, 2007.

O principal objetivo do tratamento da HA é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovascular do paciente hipertenso. Embora não exista cura, é possível um controle eficaz, utilizando-se tanto medidas não-farmacológicas, através da adoção de hábitos de vida saudáveis e redução dos fatores de risco, quanto medidas farmacológicas. Os agentes anti-hipertensivos a serem utilizados devem promover a redução não só dos níveis tensionais como também a redução de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais, respeitando-se as características individuais, a co-morbidade e a qualidade de vida dos pacientes. Esses medicamentos exercem sua ação terapêutica através de distintos mecanismos que interferem na fisiopatologia da doença e são divididos, basicamente, em diuréticos, simpatolíticos, vasodilatadores, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) e antagonistas dos receptores da angiotensina II (BERNE, 2000; BRASIL, 2006; OATES *et al.*, 2006).

A abordagem terapêutica da HA deve ser periodicamente reavaliada para definir se são necessárias mudanças para manter os níveis pressóricos desejáveis. Geralmente o tratamento é iniciado com monoterapia e depois, dependendo da resposta do paciente à terapêutica, normalmente é necessária a adoção de terapias combinadas envolvendo dois ou mais agentes anti-hipertensivos com diferentes mecanismos de ação (WENDHAUSEN *et al.*, 2004; TAVARES, 2005; BRASIL, 2006). Dentre os vários protocolos utilizados, os fármacos inibidores ECA, como o

delapril e os bloqueadores dos canais de cálcio, como o manidipino, constituem uma importante alternativa ao tratamento e controle da HA, podendo ser usados como monoterapia ou combinados.

3.2. Delapril

O delapril (cloridrato de 2-[(2*S*)-*N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)-2-[(2*S*)-1-etoxi-1-oxo-4-fenilbutan-2-il]amino}propanamido] ácido acético) (DEL) é utilizado comercialmente como cloridrato e apresenta-se na forma de comprimido de 15 mg como monoterapia e 30 mg associado ao manidipino. Possui massa molar de 489,1 g/mol e apresenta fórmula molecular $C_{26}H_{32}N_2O_5 \cdot HCl$, com a estrutura química representada na Figura 3.1 (NCBI-PUBCHEM, 2010).

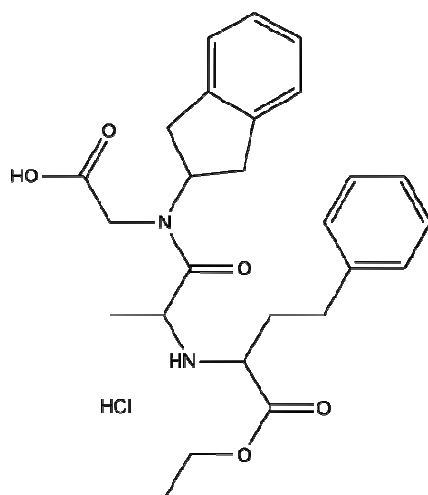


Figura 3.1. Estrutura química do cloridrato de delapril.

O DEL é um pró-fármaco que sofre rápida absorção no trato gastrointestinal, sendo metabolizado na forma ativa delapril-diácido (M-I) e 5-hidroxi-delapril-diácido (M-III). O principal metabólito sérico é o M-I, seguido do M-III, enquanto que os níveis séricos de M-II, um metabólito cíclico inativo, e de DEL inalterado são reduzidos. O metabólito M-I apresenta, com relação às outras espécies circulantes, os mais elevados valores de concentração sanguínea, com um tempo de pico de cerca de 1,3 – 1,6 h. A absorção de DEL não é influenciada pela presença de alimento no trato gastrointestinal. DEL e M-I se ligam às proteínas séricas humanas numa média superior a 95%. O fármaco é eliminado em cerca de 60% na urina em 24 horas,

prevalentemente sob a forma dos metabólitos M-I e M-III e em mínima quantidade como DEL inalterado e M-II. A excreção fecal parece complementar à urinária (TATENO, *et al.* 1986; ONOYAMA *et al.*, 1988; RAZZETTI, 1995; FOGARI *et al.*, 1997). O DEL tem seu efeito anti-hipertensivo através da inibição da enzima de conversão da Angiotensina I em Angiotensina II. Devido à característica lipofílica do composto, essa inibição ocorre principalmente ao nível da parede vascular. Além disso, esse fármaco diminui a resistência periférica e aumenta a eliminação de sódio e água por bloqueio do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Proporciona, portanto, uma diminuição da resistência vascular periférica, com mínimos efeitos sobre o débito cardíaco e volume plasmático (RAZZETTI, 1995; OTERO, 2007).

3.3. Manidipino

O manidipino (dicloridrato de 2-[4-(difenil-metil) piperazina-1-il] etil-metil-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil) -1,4-dihidropiridina -3,5-dicarboxilato) (MAN) é utilizado comercialmente como dicloridrato e apresenta-se na forma de comprimido de 20 mg como monoterapia e 10 mg quando associado ao delapril. Possui massa molar de 683,6 g/mol e apresenta fórmula molecular $C_{35}H_{38}N_4O_6 \cdot 2HCl$, com a estrutura química representada na Figura 3.2 (NCBI-PUBCHEM, 2010).

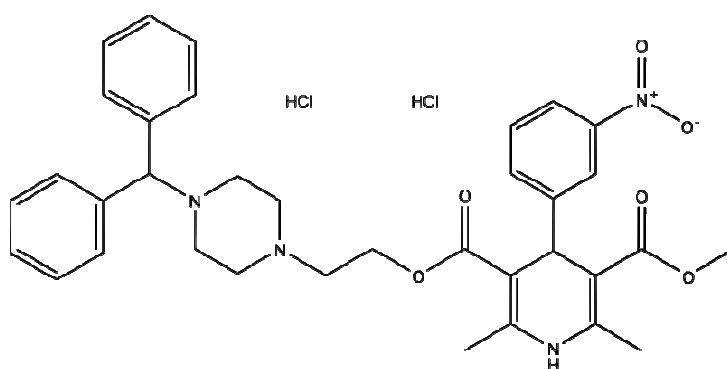


Figura 3.2. Estrutura química do dicloridrato de manidipino.

Após a administração oral, o MAN distribui-se amplamente pelos tecidos, sendo intensamente metabolizado a nível hepático. Apresenta um pico de concentração plasmática em 2 - 3,5 horas e ligação com as proteínas plasmáticas de 99%. A eliminação ocorre principalmente por via fecal (63%) e via urinária (31%). A

absorção gastrointestinal do fármaco é aumentada pela presença de alimento no trato digestivo (IIMURA, 1993).

Pertencente ao grupo dos diidropiridínicos, o MAN é um antagonista dos canais de cálcio de terceira geração. Possui alta eficácia anti-hipertensiva devido à alteração no influxo de íons Ca^{+2} (diminuindo a duração e a força de contração da musculatura lisa cardíaca e vascular) e potente ação vasodilatadora arterial, induzindo também natriurese sustentada de intensidade semelhante àquela obtida com doses habituais de diurético tiazídico. Apresenta perfil de ação de 24 horas (dose única diária), apesar de uma meia vida plasmática relativamente curta, já que, pela alta lipossolubilidade, o composto é rapidamente retirado da circulação e liberado continuamente do tecido adiposo (DEROUBAIX *et al.*, 1996; ZANCHETTI, 1996; KOHLMANN *et al.*, 2001; OTERO, 2007).

3.4. Associação entre delapril e manidipino

A associação destes fármacos, através de mecanismos de ação complementares, produz um efeito anti-hipertensivo sinérgico que, com uma dose diária, reduz a PA de modo superior aos agentes administrados isoladamente, não havendo interferência recíproca sobre as características farmacocinéticas dos componentes isolados (BACHELI *et al.*, 2002; OTERO, 2007). Além disso, o uso concomitante dos fármacos pode produzir efeitos favoráveis nas complicações decorrentes da hipertensão, tais como o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda, lesão renal, disfunção endotelial e lesões vasculares ateroscleróticas (DE LEEUW, 1997; MUGELLINI *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que a combinação entre os agentes nas concentrações de 30 mg para o DEL e 10 mg para o MAN é a posologia mais eficaz na redução da PA (BACHELLI, *et al.* 2002).

Aprovada na Itália, Alemanha, Grécia, Áustria, Espanha e liberada para uso clínico no Brasil pela ANVISA, em 2006, a associação entre cloridrato de delapril e dicloridrato de manidipino, sob o nome comercial de Hipertil[®], é indicada para o tratamento da HA essencial e quando for necessária uma redução adicional da PA, em comparação com o uso de DEL ou MAN como monoterapia, além de ser considerada uma excelente alternativa no tratamento da hipertensão associada à

diabetes mellitus (FOGARI, 2007). Entretanto, é contra-indicado, principalmente, a pessoas com hipersensibilidade aos fármacos e pacientes com insuficiência hepática e renal graves.

3.5. Métodos analíticos

A utilização de métodos analíticos é imprescindível para que o controle de qualidade possa garantir a segurança, eficácia e qualidade total de um medicamento. A escolha e o desenvolvimento de um método dependem de vários fatores, tais como: a exatidão requerida, complexidade, pureza, quantidade da amostra, natureza do fármaco e, também, da finalidade do método. Além disso, a disponibilidade de equipamentos e reagentes e os requerimentos legais também devem ser considerados (RIBANI *et al.*, 2004).

Dentre os métodos analíticos, a cromatografia líquida (CL), especialmente com detecção no ultravioleta (UV), constitui-se em um procedimento de larga utilização, principalmente em razão da sua versatilidade e disponibilidade em diversos laboratórios de análise. A possibilidade de variação dos mecanismos de separação através da escolha correta da coluna e fase móvel e do método de detecção, permite a utilização desta técnica nas diferentes fases de estudo de produtos farmacêuticos (COLLINS *et al.*, 2006; KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

A utilização da CL possui inúmeras vantagens como a análise quantitativa rápida e precisa, operação automatizada, sensibilidade de detecção, recuperação quantitativa da amostra e a aplicabilidade da técnica a diversas amostras. Entre as limitações da metodologia incluem-se ausência de detector universal, menor eficiência de separação que a cromatografia gasosa e necessidade de analistas treinados, devido à diversidade de parâmetros de análise e particularidades da técnica (WASTON, 2005; DONG, 2006; SHABIR *et al.*, 2007).

A separação cromatográfica é obtida através das interações físicas e químicas dos componentes da amostra com a fase móvel e a fase estacionária. A diferença na intensidade da retenção dos solutos na coluna determina a resolução dos mesmos (SKOOG *et al.*, 2004; DONG, 2006). Os principais mecanismos de

separação utilizados na CL incluem: cromatografia em fase normal, que é baseada na adsorção/dessorção do analito na fase estacionária polar; cromatografia em fase reversa, cuja separação é baseada no coeficiente de partição entre uma fase móvel polar e uma fase estacionária apolar; cromatografia por troca iônica que é baseada na presença de grupamentos iônicos na fase estacionária, sendo que estes podem ser trocadores de cátions ou de ânions e cromatografia por exclusão, cuja separação é baseada no tamanho das moléculas dos componentes da amostra (DONG, 2006).

Juntamente com a cromatografia em camada delgada, a CL é o principal método para a análise de impurezas orgânicas relacionadas, sendo amplamente utilizada em estudos de estabilidade de fármacos devido a sua sensibilidade, especificidade e capacidade de resolução (BAKSI & SINGH, 2002). A CL é, portanto, uma técnica muito bem estabelecida como ferramenta efetiva no controle de processo e na análise de matéria-prima e produto acabado (RAO & NAGARAJU, 2003).

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica extremamente útil para análises de pequenas moléculas, especialmente compostos farmacêuticos, além de proteínas, peptídeos, vitaminas, compostos orgânicos e inorgânicos e outros. A EC encontra-se bem estabelecida como técnica analítica, não só por ser considerada uma alternativa à CL, mas, também, por apresentar vantagens como simplicidade operacional, relativamente baixo custo de operação e de consumíveis, facilidade de automação, alta eficiência de separação, baixo consumo de amostras, reagentes e solventes, tempo de análise reduzido e vários modos de separação (ALTRIA, 1998; MORZUNOVA, 2006).

Essa técnica assume outras vantagens sobre a CL, pois problemas como alta pressão das bombas, vazamento de solventes e valor elevado das colunas são eliminados. Entretanto, a técnica apresenta algumas desvantagens, como uma menor sensibilidade devido ao baixo volume de amostra injetado, à estreita faixa de detecção devido ao pequeno diâmetro dos capilares de sílica e menor precisão de injeção (ALTRIA *et al* 1998; ALTRIA, 1999; WÄTZIG & GÜNTER, 2003; KOWALSKI *et al.*, 2005). Mesmo tornado-se técnica de rotina para análises específicas em alguns países, no Brasil a EC ainda permanece sendo utilizada majoritariamente na pesquisa.

A separação eletroforética baseia-se na migração diferenciada de compostos em um campo elétrico e possui diversas classificações de acordo com o modo de separação empregado, destacando-se a eletroforese capilar de zona (CZE) e cromatografia eletrocínética micelar (MEKC). Na CZE os compostos são separados pela combinação entre mobilidade eletroforética, definida pelo tamanho e o número de grupamentos ionizados, e a magnitude do fluxo eletrosmótico, ou seja, fluxo de solução gerado pela aplicação de voltagem no capilar preenchido com eletrólito. Na MECK, a solução tampão contendo um tensoativo forma um micro-sistema de duas fases. O eletrólito é a fase primária, a qual é transportada eletro-osmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, pseudo-estacionária, que é transportada por uma combinação de eletroforese e eletro-osmose. Dessa forma, moléculas neutras podem ser separadas em função de sua hidrofobicidade, enquanto os compostos hidrofílicos, não são solubilizados na micela, são separados de acordo com a mobilidade eletroforética (ALTRIA, 1996; TAVARES, 1996; TAVARES, 1997; SANTORO *et al*, 2000).

Em relação à determinação quantitativa simultânea de DEL e MAN em formas farmacêuticas, não foram encontradas referências na literatura pesquisada. Porém, existem artigos que relatam a determinação dos fármacos em fluidos biológicos por CL, utilizando diferentes detectores e aplicados, principalmente, a estudos de farmacocinética (ONOHAMA, *et al.*, 1988; MINAMISAWA *et al.*, 1990; DEROUBAIX *et al.*, 1998; ROSILLON *et al.*, 1998).

Para avaliação da farmacocinética de MAN e seu metabólito piridina em soro humano, um método por CL com detecção em 230 nm foi desenvolvido. Os limites de detecção foram de 0,1 ng/mL tanto para o fármaco quanto para o metabólito (MIYABAYASHI, *et al.*, 1989)

YAMAGUCHI e colaboradores (1992) desenvolveram um método por CL para a determinação enantiomérica de MAN em soro humano. O sistema de extração líquido-líquido utilizou uma mistura de hexano e éter etílico em condições alcalinas. A metodologia apresenta alta sensibilidade, com limites de detecção para ambos os isômeros de 0,2 ng/mL no soro humano, sendo adequada para os estudos de farmacocinética.

Para determinação em soro humano de MAN foi desenvolvido um método por CL com detecção eletroquímica, utilizando extração em fase sólida. Como fase móvel foi usado tampão fosfato pH 4,5 e acetonitrila (51:49, v/v), sob uma vazão de 1,0 mL/min. A metodologia mostrou-se linear na faixa de 0,5 a 10 ng/mL, apresentando um limite de detecção de 0,3 ng/mL, sendo aplicada em estudos de farmacocinética (OHKUBO *et al.*, 1996).

TSUKASA e colaboradores (1999) desenvolveram um método enantiosseletivo por CL para determinação de MAN em plasma humano. A fase móvel foi composta de uma mistura de hexano, dicloroetano, metanol e ácido trifluoroacético (250:140:12:1, v/v/v/v), eluída sob vazão de 1 mL/min. A metodologia empregou uma coluna Sumichiral OA-4500 e detecção no UV a 254 nm, sendo sugerida para estudos de farmacocinética estereosseletiva.

Para avaliação de MAN em produto acabado foi desenvolvido um método por espectrofotometria baseada na complexação do fármaco com iodo, apresentando bandas de absorção de 290 e 353 nm. O método mostrou-se exato na faixa de 3 a 11 µg/mL (DE LAURENTIS *et al.*, 2001)

A interação farmacocinética entre DEL e MAN foi avaliada através da determinação dos níveis plasmáticos dos fármacos e seus metabólitos utilizando CL acoplada à espectrometria de massas (CL-EM/EM). Os resultados demonstraram não haver diferença significativa nos parâmetros farmacocinéticos após administração oral simultânea e isolada dos fármacos (STOCKIS *et al.* 2003). Também, através da CL-EM/EM, foi avaliada a bioequivalência entre o medicamento contendo a associação dos fármacos e os medicamentos com os fármacos individualmente (STOCKIS *et al.* 2003).

JING e colaboradores (2007) desenvolveram um método por CL-EM/EM com ionização por electrospray para determinação de MAN em plasma humano utilizando felodipino como padrão interno. As amostras foram extraídas empregando n-hexano e então eluídas em coluna Hypersil ODS com fase móvel composta por metanol e acetato de amônio contendo 0,1% de ácido acético (85:15, v/v). O método apresentou-se linear na faixa de 0,2 a 20 ng/mL e foi aplicado em estudo de farmacocinética.

LAKSHMI e colaboradores (2009) desenvolveram e validaram três métodos por espectrofotometria na região do visível para quantificação de MAN em matéria-prima. Após diferentes reações, os complexos formados foram determinados em 436, 550 e 480 nm, mostraram-se lineares na faixa de 25-125 µg/ml.

3.6. Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos é um processo constante e dinâmico que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal (RIBANI *et al.*, 2004; SHABIR *et al.*, 2007). Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências objetivas de que o sistema e o método atendem às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2003; ERMER & MILLER, 2005; ICH, 2005; ROZET *et al.*, 2007).

Os principais parâmetros a serem avaliados no processo de validação são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. A especificidade indica a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito mesmo na presença de outros constituintes da amostra que poderiam interferir na sua determinação, como excipientes, impurezas, produtos de degradação ou mesmo outra substância ativa. A linearidade de uma metodologia analítica pode ser definida como a habilidade de se obter medidas que são diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra dentro de uma determinada faixa de concentrações. A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio, sendo medida através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada através de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. A precisão intermediária expressa o efeito das variações devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo. A precisão normalmente é expressa

através de coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR). A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico. Pode ser determinada através do ensaio de quantidade conhecida da substância sob análise adicionada em meio preparado com excipientes da formulação e também através da adição de padrão (substância de referência) ao medicamento (amostra com analito). O limite de detecção corresponde à menor concentração da substância em análise que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade, porém não necessariamente quantificada com valor exato, utilizando o procedimento experimental. O limite de quantificação representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. A robustez descreve a reprodutibilidade do método analítico, frente a pequenas e deliberadas variações nas condições experimentais, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, entre outros (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004 ICH, 2005). Além de ensaios pontuais, a robustez pode ser avaliada através da realização de estudos fatoriais, utilizando o desenho experimental de Plackett-Burman, que permite a variação de um número relativamente grande de fatores em um número relativamente pequeno de experimentos (HEYDEN *et al.*, 2001). Além disso, a capacidade de um método analítico de separar, detectar e quantificar impurezas ou produtos de degradação também é parâmetro que deverá ser avaliado durante a validação (RAO & NAGARAJU, 2003; ICH, 2006).

É importante destacar que não há um modelo único para executar a validação de métodos analíticos aplicados a fármacos e medicamentos. Assim sendo, fica sob a responsabilidade do analista definir de que forma os parâmetros serão avaliados, visto que, o tipo de método e o seu propósito é que irão determinar o desenvolvimento do processo (SWARTZ & KRULL, 1998; ERMER, 2001; ERMER & MILLER, 2005).

3.7. Estudos de estabilidade

A estabilidade é definida como a capacidade de uma determinada formulação ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, manter as mesmas características que possuía quando da época de sua fabricação, ou seja, suas especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas, durante um período de tempo, em um material de acondicionamento específico (BRASIL, 2005).

Diversos fatores podem afetar os parâmetros de estabilidade de um produto farmacêutico, podendo levar à perda parcial ou total da atividade, alteração da biodisponibilidade, perda da uniformidade de conteúdo, perda da qualidade microbiológica, formação de produtos tóxicos, entre outros (CARSTENSEN & RHODES, 2000). Além dos fatores extrínsecos à formulação, como umidade, incidência de luz, temperatura, processo de produção, embalagem e armazenamento e os fatores químicos, tais como, oxidação, redução e hidrólise é necessário também avaliar a influência dos excipientes, bem como conhecer os produtos de degradação que eventualmente podem se formar durante o tempo de utilização do medicamento (MATTHEUS, 1999; KOMMANABOYNA & RHODES, 1999; USP 32, 2009)

O estudo de estabilidade tem, portanto, o objetivo de fornecer evidência de como a qualidade de um fármaco varia com o passar do tempo e estabelecer um período de re-teste para a substância ou a vida de prateleira do produto, recomendando as condições de estocagem. Essa previsão é realizada através de testes de estabilidade acelerada ou degradação forçada e longa duração ou confirmatórios (ICH, 2003; BRASIL, 2005).

Os testes acelerados de estabilidade são projetados para aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância em condições forçadas de armazenamento. Tem o intuito de identificar os principais fatores que provocam a degradação do fármaco, selecionar os critérios de condução dos testes e para avaliar a adequabilidade das técnicas analíticas a serem utilizados nos testes confirmatórios. Nesses ensaios as condições de degradação aos quais os fármacos são submetidos são a degradação térmica, hidrólise ácida e básica,

decomposição oxidativa e fotolítica. É um recurso também utilizado para a pesquisa de mecanismos de degradação dos fármacos e avaliar possíveis produtos de degradação. Os estudos de longa duração objetivam propiciar informações sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos e para verificar se as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto se mantêm durante e, opcionalmente, após prazo de validade (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN & RHODES, 2000; ICH, 2003; BRASIL, 2005).

O acompanhamento da estabilidade de fármacos e medicamentos está condicionado ao emprego de métodos de análise específicos, que não sofram interferência dos produtos de degradação, e que estejam validados para tal utilização. Uma metodologia que não garanta esta diferenciação não deve ser utilizada, ou seja, não é adequado para verificar se o medicamento é estável (CARSTENSEN & RHODES, 2000; BAKSHI & SINGH, 2002). Um método indicativo de estabilidade é definido como um método analítico que quantifica exatamente o fármaco sem interferência de produtos de degradação, impurezas, excipientes ou outras impurezas em potencial e deve cumprir com todos os parâmetros de validação requeridos em cada estágio do desenvolvimento do fármaco e na análise do produto final (ICH, 2003; ICH, 2006; ALSANTE *et al.*, 2007).

Em relação à estabilidade do DEL, não foram encontradas referências na literatura pesquisada. Entretanto, foram encontrados registros sobre a instabilidade do MAN quando exposto à luz (RAGNO *et al.*, 2003; MIELCAREK *et al.*, 2005; IOELE *et al.*, 2009; MIELCAREK *et al.*, 2009; MIELCAREK *et al.*, 2010).

4. PARTE EXPERIMENTAL – Análise Qualitativa

4.1. Introdução

A confiabilidade dos resultados no desenvolvimento e validação de métodos analíticos depende de diversos fatores, dos quais, as substâncias utilizadas como referência são de extrema relevância.

O FDA (*Food and Drug Administration*, 1997) classifica as substâncias químicas de referência (SQR) em duas categorias: compendiais, obtidas de fontes como a Farmacopéia Americana ou Brasileira, que não necessitam de caracterização posterior e não compendiais, também com elevado teor de pureza, mas que devem ser caracterizadas para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1998).

Métodos adequados de identificação são muito importantes, pois permitem caracterizar a substância utilizada como referência. Da mesma forma, a identificação dos fármacos nos produtos acabados é fundamental no controle de qualidade dos mesmos. São várias as metodologias e técnicas analíticas utilizadas na identificação e caracterização de substâncias, sendo escolhidas avaliando-se fatores relativos à substância (propriedades químicas, físicas e biológicas) como, também, ao método (disponibilidade, simplicidade, adequação técnica e viabilidade financeira).

Neste contexto, este capítulo enfoca a análise qualitativa das SQR do DEL e MAN, através da caracterização das mesmas, utilizando a análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC), a espectrofotometria na região do infravermelho (IV) e a espectrometria de massas (EM), bem como a realização das técnicas de cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e eletroforese capilar (EC) para identificação dos fármacos no produto acabado.

4.2. Material de referência e produto farmacêutico

4.2.1. Substâncias químicas de referência

O cloridrato de delapril, caracterizado macroscopicamente como um pó cristalino branco e inodoro (teor declarado de 99,6%) e o dicloridrato de manidipino, caracterizado macroscopicamente como um pó cristalino amarelo ou levemente

amarelado (teor declarado de 99,7%) foram gentilmente doados pela empresa Chiesi *Farmaceutici* (Parma, Itália), sendo doravante denominados de DEL SQR e MAN SQR, respectivamente.

4.2.2. Produtos farmacêuticos

Os comprimidos de Hipertil[®] (Chiesi Farmacêutica Ltda, SP, Brazil), contendo 30 mg de DEL e 10 mg de MAN foram obtidos no comércio local, respeitando-se os prazos de validade. Além dos fármacos, a formulação farmacêutica é composta pelos seguintes excipientes: lactose monoidratada, hidroxipropilcelulose de baixa substituição, hidroxipropilcelulose, estearato de magnésio, riboflavina e laca de alumínio.

4.3. Caracterização das substâncias químicas de referência

4.3.1. Calorimetria exploratória diferencial

As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N₂) FC-60-A, integrador TA-60WS e software de controle e análise TA-60 versão 2.0.

Foram pesados, aproximadamente, 1,5 mg de DEL e 1,5 mg de MAN em porta amostra de alumínio, a qual foi selada e inserida no equipamento de DSC. A análise foi efetuada sob atmosfera inerte de nitrogênio mantida sob fluxo de 50 mL/min e velocidade de aquecimento de 10 °C/min até 200 °C para o DEL e 240 °C para o MAN. Esta técnica avalia e compara diferenças no fluxo de calor entre a substância em análise e uma referência (porta-amostra selado vazio), enquanto ambas são submetidas ao programa de temperatura controlada.

O termograma indicou faixa de fusão compreendida entre 176,08 °C e 185,24 °C, com pico em 179,65 °C para DEL SQR (Figura 4.1) e entre 218,57 °C e 226,88 °C, com pico em 223,47 °C para MAN SQR (Figura 4.2). Além disso, os

fármacos apresentaram transição endotérmica, ou seja, absorveram calor para fundir (-268,07 J/g para o DEL e -53,1 J/g para o MAN).

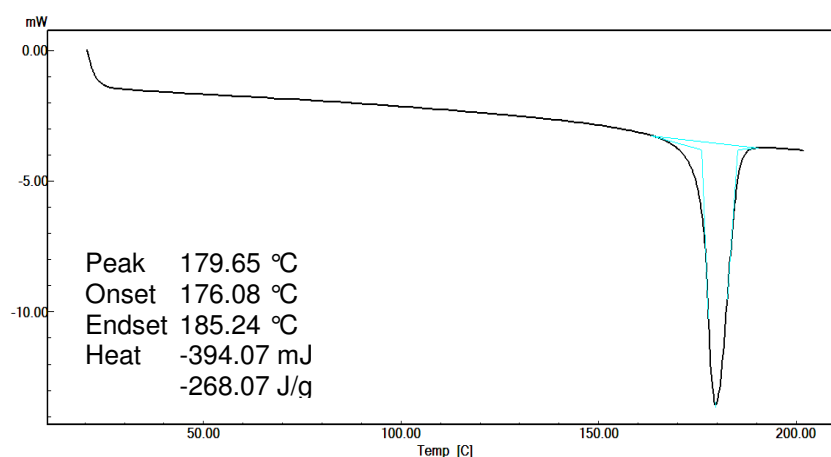


Figura 4.1. Termograma obtido por DSC para o DEL SQR.

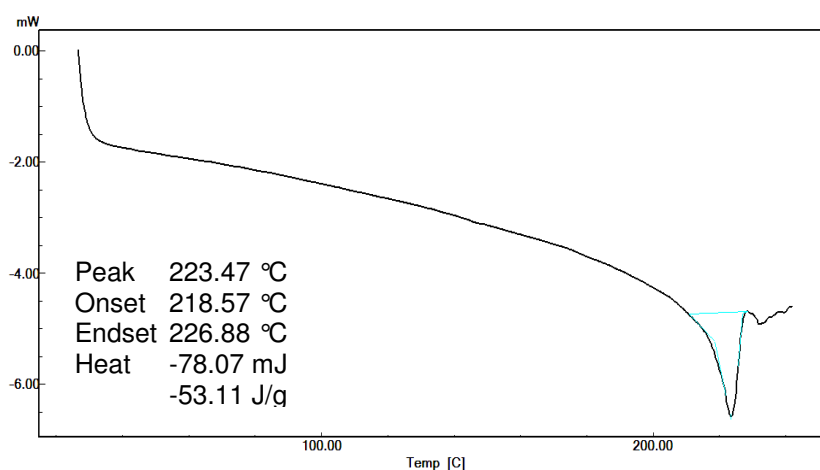


Figura 4.2. Termograma obtido por DSC para o MAN SQR.

4.3.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros IV foram obtidos através da análise das SQR de DEL e MAN, em espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer, modelo Spectrum BX. Os mesmos podem ser verificados nas Figuras 4.3 e 4.4. As atribuições para as principais bandas referentes aos grupos funcionais característicos das moléculas estão descritas nas Tabelas 4.1 e 4.2.

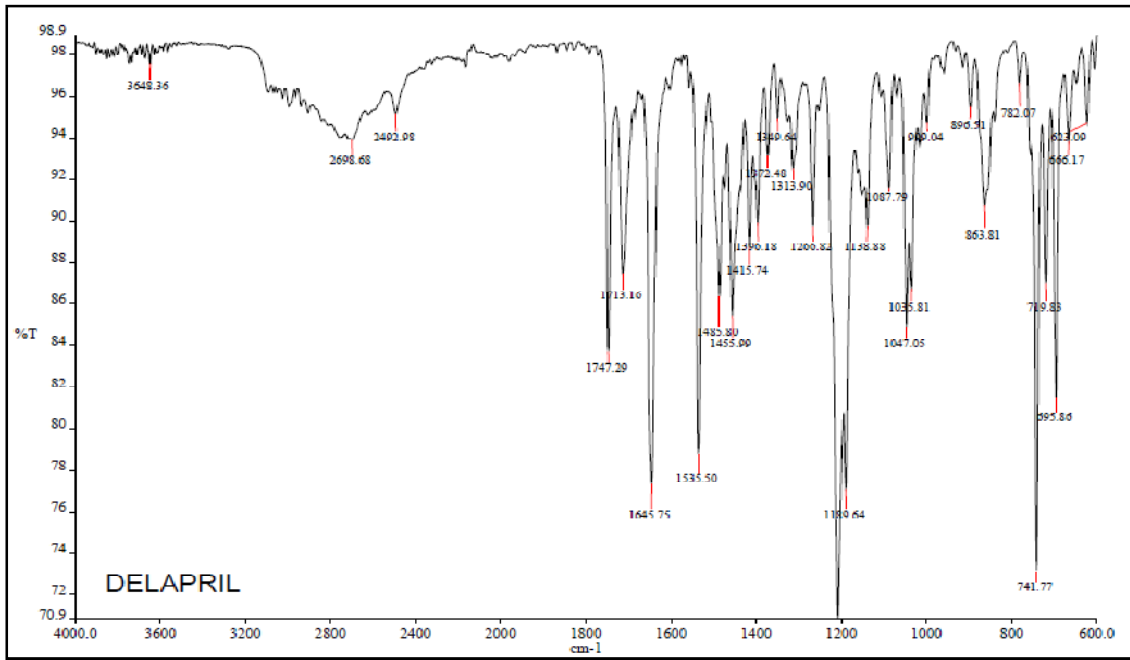


Figura 4.3. Espectro no IV de DEL SQR.

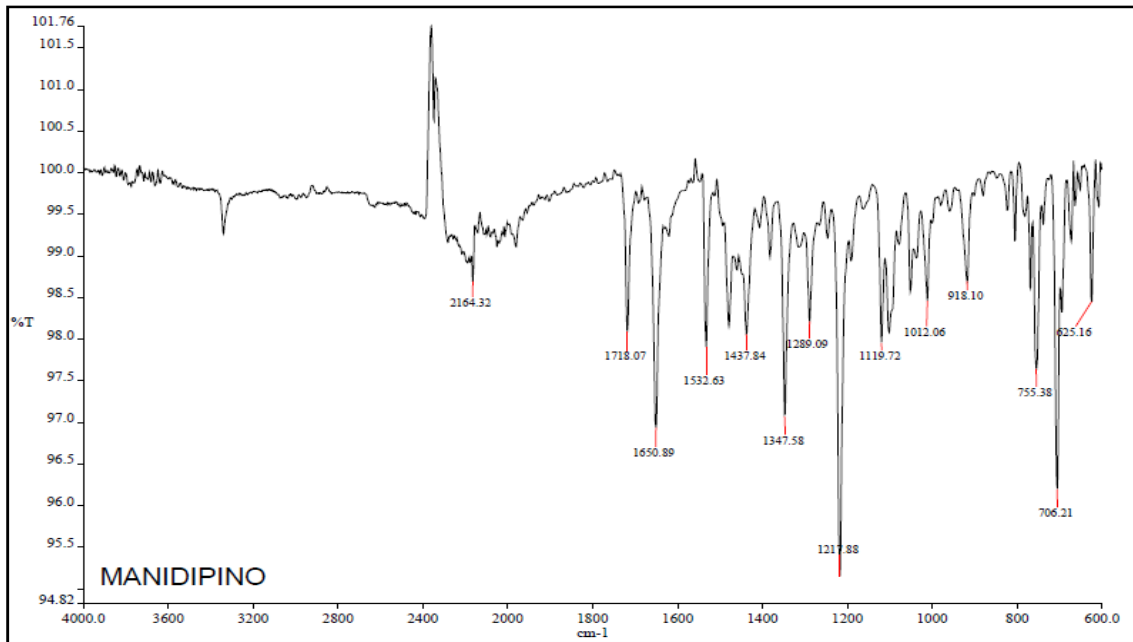


Figura 4.4. Espectro no IV de MAN SQR.

Tabela 4.1. Frequências das principais bandas de absorção de DEL e suas respectivas atribuições (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
1747	Deformação axial de C=O de ácido carboxílico
1713	Deformação axial de C=O de éster
1645	Banda forte da amida terciária
1190	Banda referente ao anel aromático orto substituído

Tabela 4.2. Frequências das principais bandas de absorção de MAN e suas respectivas atribuições (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
1718	Deformação axial de C=O de éster
1650	Estiramento assimétrico de C–NO ₂
1532	Banda referente à NH ou C=C
1347	Estiramento simétrico de C–NO ₂
1217	Banda forte referente às aminas terciárias

Os espectros obtidos para as SQR de DEL e MAN apresentam bandas de absorção características dos grupamentos presentes nas estruturas químicas das moléculas. No entanto, a ausência de espectros de referência na literatura inviabiliza a confirmação da identidade dos fármacos considerando unicamente essa técnica.

4.3.3. Espectrometria de massas

A determinação das massas moleculares das SQR de DEL e MAN, sob forma de base, foi realizada em espectrômetro de massas Micromass[®] modelo Quattro LC, equipado com triplo quadrupolo. As melhores respostas para os dois fármacos foram obtidas por ionização por *electrospray*, operado no modo positivo (ES+), com voltagem do capilar de 3,5 kV, voltagem de cone de 35 V e temperaturas da fonte de íons de 120 °C e da sonda de 300 °C.

As soluções contendo 2000 ng/mL de DEL e MAN SQR, diluídos em acetonitrila e água (1:1, v/v), foram introduzidas no EM através da infusão direta a uma vazão de 10 μ L/min. Os espectros de massas dos fármacos estão apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6, respectivamente, e suas análises possibilitaram verificar as massas de 453 m/z, referente ao íon molecular do DEL base livre e 611 m/z, referente ao íon molecular do MAN base livre, confirmando, portanto, a identidade dos mesmos (OKA, 1988; MARIMOTO & MATSUMURA, 1991; NCBI-PUBCHEM, 2010).

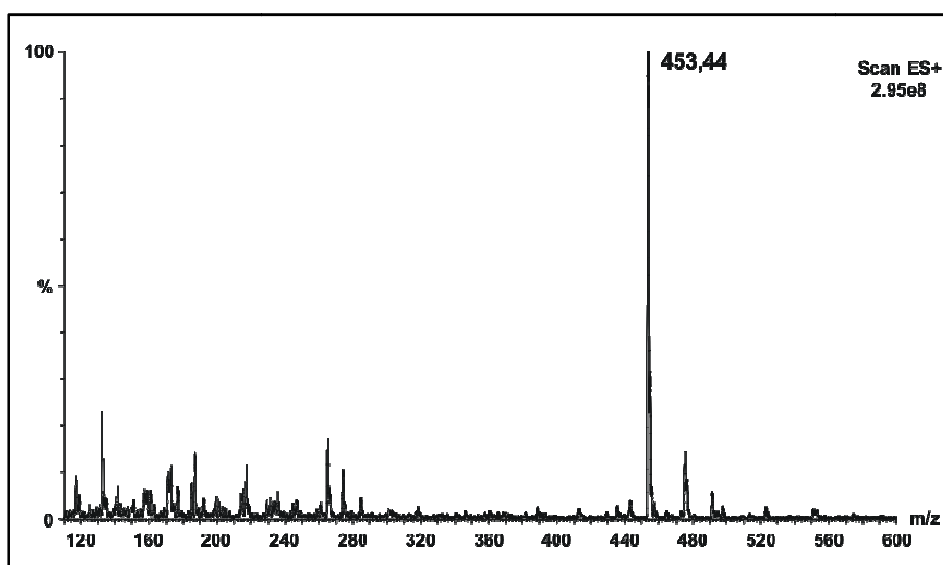


Figura 4.5. Espectro de massas de DEL SQR.

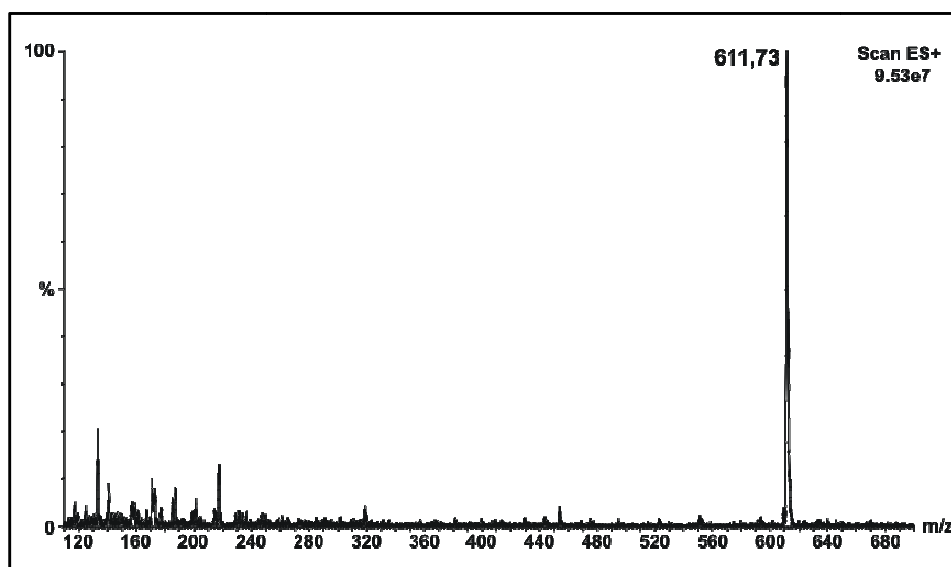


Figura 4.6. Espectro de massas de MAN SQR

4.4. Identificação dos fármacos no produto farmacêutico

4.4.1. Cromatografia líquida

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu equipado com controlador de sistema SCL10-ADvp operado pelo programa Class VP 6.12 SP2. O equipamento é composto de sistema binário de bombas LC-10ADvp, detector de arranjo de fotodiodos (DAD) SPD- M10ADvp, forno CTO-10ACvp e auto-injetor SIL-10ADvp. As condições cromatográficas definidas para identificação de DEL e MAN por CL estão apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Condições cromatográficas definidas para identificação de DEL e MAN por CL-FR.

Parâmetro	Descrição
Coluna	Shim-pack [®] Shimadzu C ₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm)
Temperatura	35 °C
Fase móvel	Trietilamina 0,3% (v/v) pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 8,5%) e acetonitrila (45:55, v/v)
Vazão	1,2 mL/min
Detecção	DAD em 220 nm
Volume de Injeção	20 µl

A identificação dos fármacos nas amostras de comprimidos foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção das amostras com aqueles da solução das SQR do DEL e MAN, bem como através da sobreposição dos espectros de absorção dos fármacos nos respectivos tempos de retenção.

Os cromatogramas obtidos a partir da análise de DEL e MAN SQR e amostras de comprimidos podem ser visualizados sobrepostos na Figura 4.7.

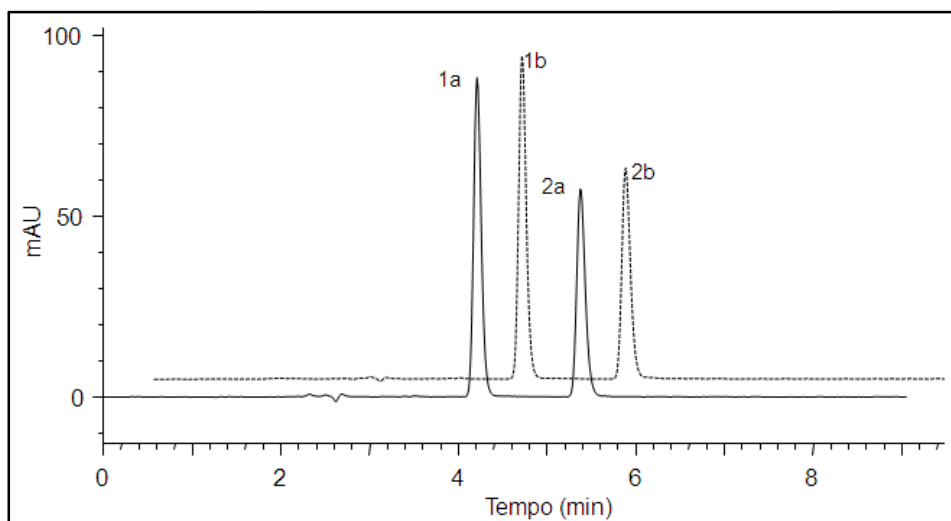


Figura 4.7. Cromatogramas sobrepostos das soluções das SQR de DEL 1 (a) e MAN 2 (a) e amostras dos comprimidos de DEL 1 (b) e MAN 2 (b) nas concentrações de 30 e 10 µg/mL para o DEL e MAN, respectivamente.

As Figuras 4.8 e 4.9 apresentam a sobreposição dos espectros de absorção na região do UV (190 a 400 nm), obtidos pelo sistema de CL, das soluções das SQR de DEL e MAN e das amostras dos comprimidos.

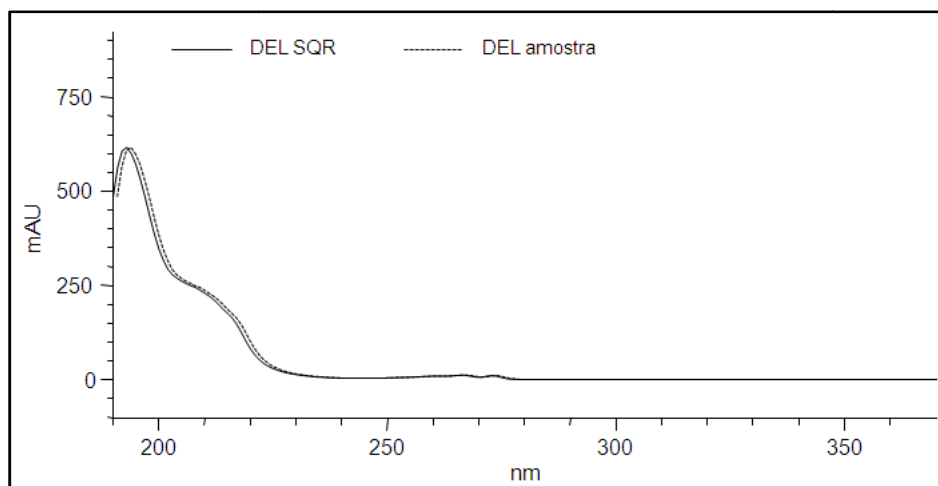


Figura 4.8. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do DEL: SQR (—) e amostra dos comprimidos, com leve deslocamento (.....), obtidos pelo sistema de CL.

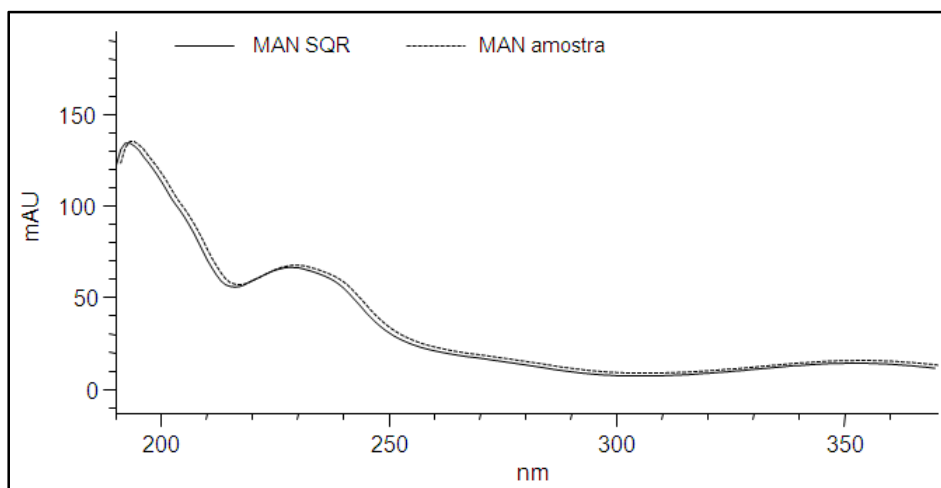


Figura 4.9. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do MAN: SQR (—) e amostra dos comprimidos, com leve deslocamento (.....), obtidos pelo sistema de CL.

A similaridade entre os tempos de retenção obtidos para os sinais cromatográficos das soluções das SQR de DEL e MAN e para as soluções amostra dos comprimidos, bem como a semelhança entre os espectros obtidos nesses tempos de retenção, demonstram a adequabilidade do método desenvolvido por CL para a análise qualitativa de DEL e MAN no produto farmacêutico em estudo.

4.4.2. Eletroforese capilar

Os experimentos por EC foram realizados em equipamento Agilent ^{3D}CE (Agilent Technologies) equipado com injetor automático, DAD e controlador de temperatura. O programa CE ChemStation foi utilizado para controle do sistema, aquisição e tratamento de dados. As condições eletroforéticas definidas para identificação de DEL e MAN por EC, utilizando o modo de separação por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), estão apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Condições eletroforéticas definidas para identificação de DEL e MAN por EC no modo MEKC.

Parâmetro	Descrição
Capilar	72 cm de comprimento efetivo; 50 μ m de d.i.
Temperatura	35 °C
Eletrólito	Tampão borato 50 mM pH 9,0 : SDS 5 mM
Tensão aplicada	25 kV (corrente aproximada de 15 μ A)
Injeção	50 mBar durante 5 s
Deteção	DAD em 208 nm
Pré-condicionamento	1 min NaOH 0,1M; 1 min água; 2 min eletrólito
Padrão interno (PI)	Ácido salicílico

Da mesma forma que no método por CL, a identificação dos fármacos nas amostras de comprimidos foi realizada através da comparação dos tempos de migração das amostras com aqueles das soluções das SQR de DEL e MAN SQR, bem como através da sobreposição dos espectros de absorção dos fármacos nos respectivos tempos de migração. Os eletroferogramas obtidos, a partir da análise das SQR de DEL, MAN e PI, e amostras de comprimidos podem ser visualizados sobrepostos na Figura 4.10.

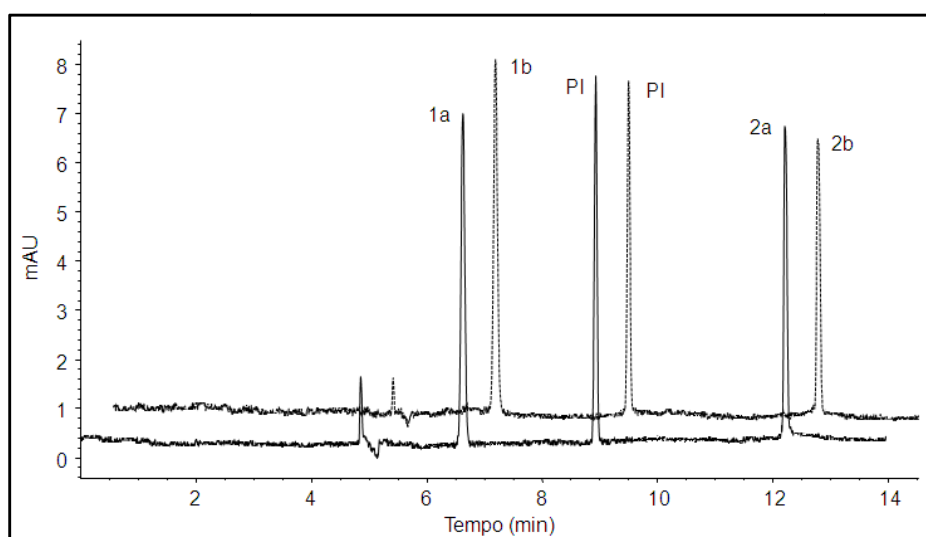


Figura 4.10. Eletroferogramas sobrepostos das soluções das SQR de DEL, MAN e PI (a) e amostras dos comprimidos adicionados de PI (b), nas concentrações de 60, 20 e 10 μ g/mL para o DEL, MAN e PI, respectivamente.

As Figuras 4.11 e 4.12 apresentam a sobreposição dos espectros de absorção na região do UV (190 a 300 nm), obtidos pelo sistema detector da EC, das soluções das SQR do DEL, MAN, PI e das amostras dos comprimidos.

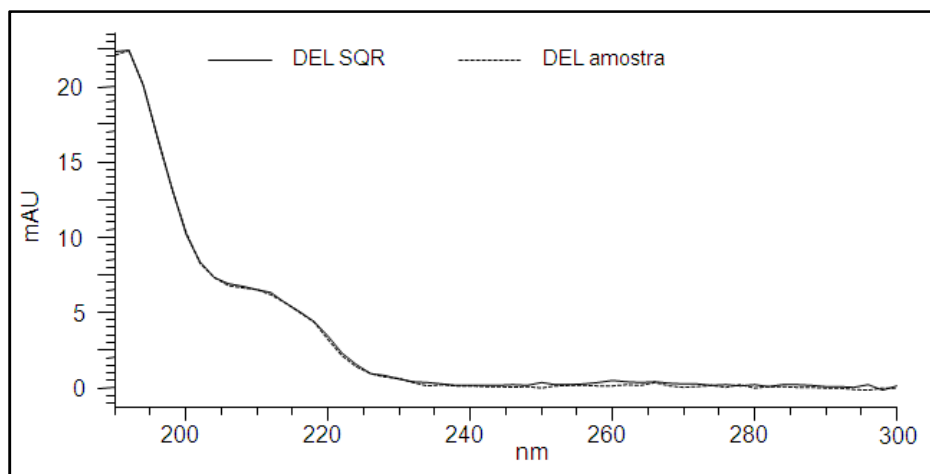


Figura 4.11. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do DEL: SQR (—) e amostra dos comprimidos (.....), obtidos pelo sistema de EC.

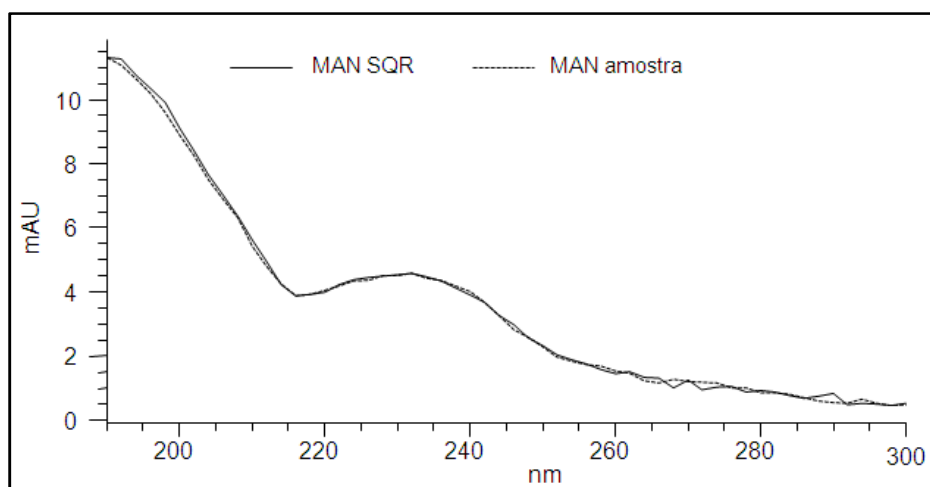


Figura 4.12. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do MAN: SQR (—) e amostra dos comprimidos (.....), obtidos pelo sistema de EC.

A similaridade entre os tempos de migração obtidos para as soluções das SQR de DEL e MAN SQR e para as soluções amostra dos comprimidos, bem como a semelhança entre os espectros obtidos nesses tempos de migração, demonstra a adequabilidade do método desenvolvido por EC para a análise qualitativa de DEL e MAN no produto farmacêutico.

4.4.5. Discussão e conclusões

A análise qualitativa é de grande importância para identificar a substância ativa em matérias-primas e em formas farmacêuticas.

De acordo com as curvas de aquecimento obtidas por DSC para os dois fármacos, verifica-se que não ocorreu uma faixa de fusão bem definida devido à decomposição das substâncias durante a fusão, inviabilizando, portanto, a identificação e verificação da pureza dos fármacos utilizando essa metodologia (MATHKAR *et al.*, 2009; MATOS *et al.*, 2009). Assim sendo, a DSC não pode ser considerada uma ferramenta adequada para determinação da faixa de fusão de DEL e MAN SQR.

Por outro lado, através da análise e interpretação das bandas de absorção do espectro IV das SQR de DEL e MAN, observaram-se sinais característicos dos grupamentos funcionais de cada composto, auxiliando na identificação dos mesmos. Além disso, os espectros massas obtidos, tanto para o DEL quanto para o MAN, demonstraram as massas características dos íons moleculares dos fármacos, confirmando suas identidades.

O conjunto de análises realizadas demonstrou a adequação de DEL e MAN SQR para os estudos descritos neste trabalho.

Para a identificação dos fármacos nos comprimidos, os resultados obtidos para os métodos cromatográfico e eletroforético apresentaram tempos de retenção/migração similares para os sinais analíticos das soluções das SQR de DEL e MAN e para as soluções amostra dos comprimidos, bem como semelhantes espectros no UV obtidos nos respectivos tempos de retenção/migração, permitindo, dessa forma, identificar os compostos no produto farmacêutico em estudo.

5. PARTE EXPERIMENTAL – Análise Quantitativa

5.1. Introdução

O desenvolvimento de métodos envolve a seleção e otimização de condições de análise, incluindo etapas de preparação da amostra, aplicação da técnica, detecção e quantificação. A escolha dos procedimentos a serem utilizados é o primeiro passo em análises quantitativas do controle de qualidade e depende de vários fatores relacionados à amostra e finalidade requerida. O custo total da análise, a disponibilidade de reagentes e equipamentos e a capacidade de aplicação em estudos de estabilidade também devem ser considerados.

Dentre os métodos propostos, a CL é a técnica analítica de escolha da indústria farmacêutica para a realização das análises de seus produtos e o método mais preconizado pelos códigos oficiais, apresentando maior sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados (WATSON, 2005). Além disso, a técnica continua em ascensão devido às constantes inovações em colunas, *softwares* de controle dos equipamentos e capacidade de hifenização com técnicas espectroscópicas.

Por sua vez, a EC tem alcançado rápido desenvolvimento e ampla aplicação, principalmente na comunidade científica. Permite a otimização de diversos modos de separação utilizando o mesmo equipamento e o mesmo capilar, com alteração apenas da solução eletrolítica, além de sua aplicação poder ser voltada para um grande número de amostras, incluindo separação de compostos quirais, e determinação de impurezas e substâncias relacionadas. A EC encontra-se bem estabelecida como técnica analítica, apresentando características como alta eficiência de separação, baixo consumo de amostras e reagentes e, principalmente, gera baixíssimo volume de resíduos (ALTRIA *et al.*, 1998; SANTORO *et al.*, 2000).

Dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões equivocadas, resultando em prejuízos financeiros para as companhias e sanitários para a população. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, deve-se submetê-lo a uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004). A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento, confirmando que o mesmo é apropriado para as aplicações analíticas pretendidas, e dessa forma, assegurando a confiabilidade dos resultados

(BRASIL, 2003). Um método deve ser validado ou revalidado sempre que as condições do método sofrerem alterações.

Os métodos desenvolvidos e validados por CL e EC para determinação simultânea de DEL e MAN em sua associação farmacêutica, bem como a comparação estatística entre ambos estão apresentados no formato de artigo científico e suas redações foram dispostas nas normas e formatos das revistas às quais foram submetidos para publicação.

**5.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Simultaneous Determination of Delapril and
Manidipine in a Pharmaceutical Formulation by a Stability-indicating RP-
LC Method using an Experimental Design**

**Submetido ao periódico Journal of Liquid Chromatography and Related
Technologies (17 de junho de 2010)**

5.2.1. Título: Simultaneous Determination of Delapril and Manidipine in a Pharmaceutical Formulation by a Stability-indicating RP-LC Method using an Experimental Design.

5.2.2. Abstract

Simple, precise and stability-indicating reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was developed and validated for simultaneous determination of delapril (DEL) and manidipine (MAN) in pharmaceutical dosage form, using the Plackett-Burman experimental design for robustness evaluation. The LC method was carried out on a C₈ column (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μm), maintained at 35 °C. The mobile-phase consisted of acetonitrile and a solution of triethylamine 0.3% pH 3.0 (adjusted with phosphoric acid) (55:45; v/v), run at a flow rate of 1.2 mL.min⁻¹ and using photodiode array (PDA) detection at 220 nm. The chromatographic separation was obtained within 7 min and was linear in the range of 3-120 μg.mL⁻¹ ($r^2 = 0.9997$) for DEL and 1-40 μg.mL⁻¹ ($r^2 = 0.9998$) for MAN. Validation parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy and robustness were evaluated, giving results within the acceptable range. Stress studies were carried out and no interference of the degradation products was detected. The proposed method was successfully applied for the simultaneous quantitative analysis of DEL and MAN in the tablet dosage form, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy.

Keywords: Delapril, experimental design, manidipine, reversed-phase liquid chromatography, stability-indicating method, validation.

5.2.3. Introduction

Delapril hydrochloride (DEL), 2 - (N - (2, 3 - dihydro - 1H - inden - 2 - yl) - 2 - (1 - ethoxy - 1 - oxo - 4 - phenylbutan - 2 - yl amino) propanamido) acetic acid hydrochloride, is a non-sulfhydryl angiotensin converting enzyme inhibitor. It is an esterified pro-drug that is converted *in vivo* to its active metabolites - delapril diacid and 5-hydroxy delapril.^[1,2] Manidipine (MAN), 3 - (2 - (4 - benzhydryl - piperazin - 1 - yl) ethyl) 5 - methyl - 2, 6 - dimethyl - 4 - (3 - nitrophenyl) - 1, 4 - dihydropyridine - 3, 5 - dicarboxylate dihydrochloride, inhibits the calcium influx to the cell by antagonism on calcium channels, with a long duration of action because of its high lipophilic nature, strong membrane binding and slow release to calcium channels.^[3,4] The chemical structures of both drugs are shown in Fig. 5.1.

The majority of the patients with hypertension require combined therapy in order to achieve treatment goals.^[5] The studied association of DEL and MAN that present complementary mechanisms of action produces a synergic antihypertensive effect, conferred by a unique daily dose without interference on the pharmacokinetic characteristics of either drugs.^[6,7]

Some of analytical methods for the determination of DEL and MAN in biological matrices were reported using liquid chromatography with UV detection (LC-UV), electrochemical detection (LC-EC) and mass coupled spectrometry (LC-MS/MS) applied to pharmacokinetic studies or enantiomeric analysis.^[8-11]

A stability-indicating method is defined as an analytical method that accurately quantifies the active ingredients without interference from degradation products, process impurities, excipients, or other potential impurities.^[12-15] This greatly contributes to the possibility of improving drug safety.^[16]

The tablet pharmaceutical dosage form is commercially available, but at the moment, there are no published methods for the quantitative analysis of DEL and MAN either bulk substances or dosage forms. Therefore, the aim of the present study was to develop and validate a simple, fast, accurate and stability-indicating reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method for simultaneous determination of DEL and MAN in solid pharmaceutical dosage forms, using an experimental design for

robustness evaluation, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy of the pharmaceutical preparations.

5.2.4. Experimental

5.2.4.1. Chemicals and reagents

The reference standards were kindly supplied by Chiesi Farmaceutici (PR, Italy) and the commercial tablets of Hipertil[®] (Chiesi Farmacêutica Ltda, SP, Brazil) containing 30 mg of DEL and 10 mg of MAN were obtained from a commercial source within their shelf life period. The excipients contained in the dosage form (lactose monohydrate, magnesium stearate, hydroxypropyl cellulose, low substituted hydroxypropyl cellulose, riboflavin and aluminum lake) were all pharmaceutical grades and acquired from different suppliers. LC grade acetonitrile was obtained from Tedia (OH, USA). All chemicals used were pharmaceutical or special analytical grade. Purified water was obtained by a Millipore[®] Direct-Q 3UV with pump (AL, France).

5.2.4.2. Apparatus and analytical conditions

5.2.4.2.1. Liquid chromatography

The liquid chromatography (LC) method was carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10Avp system controller, LC-10ADvp binary pump, SIL-10ADvp auto sampler, CTO-10ACvp column oven, SPD-M10Avp PDA detector. The CLASS-VP 6.12 manager system software was used to control the equipment and to calculate data and responses from the LC system. The experiments were performed on an analytical column Shim-pack CLC-C₈ (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) (Shimadzu, Tokyo, Japan), connected with a guard column, the Shim-pack CLC G-C8 (4.0 mm i.d., 10 mm long) (Shimadzu, Tokyo, Japan). The LC system was operated isocratically at 35 °C using a mobile-phase composed by acetonitrile and a 0.3% solution of triethylamine adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid (55:45; v/v) at a flow-rate of 1.2 mL/min, using photodiode array

(PDA) detection at 220 nm. The injection volume was 20 μL of the solutions containing 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DEL and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MAN for working standard and sample solutions.

5.2.4.2.2. Mass spectrometry

The mass spectrometry (MS) experiments were performed at a triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK), model Quattro LC, equipped with an electrospray ionization source in positive mode (ESI+), set up in scan mode, using a Masslynx (v 3.5) software program. The mass spectrometer conditions were optimized with direct injection (Baby Bee syringe pump, Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA) of DEL and MAN reference solution (2000 ng/mL for both compounds) into the system. The best response for both compounds was obtained with an ESI capillary potential of 3.5 kV, cone voltage of 35 V, RF lens voltage of 0.3 V, source temperature of 120 $^{\circ}\text{C}$, and ESI probe temperature of 300 $^{\circ}\text{C}$. Before the analysis, the samples were diluted in acetonitrile:water (50:50, v/v), and introduced into the mass spectrometer by direct infusion at a flow rate at 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. The MS data was acquired in the m/z range between 150 and 500 amu for DEL and range between 150 and 700 amu for MAN.

5.2.4.3. Solutions

5.2.4.3.1. Preparation of reference substance solutions

The stock solutions were prepared by accurately weighting 30 mg of DEL and 10 mg of MAN reference substances, transferred to individuals 20 mL volumetric flasks and diluted with methanol, obtaining the concentrations of 1.5 mg/mL and 0.5 mg/mL for DEL and MAN, respectively. The stock solutions were stored at 2-8 $^{\circ}\text{C}$ protected from light and diluted to appropriate concentrations in mobile-phase prior to the analysis.

5.2.4.3.2. Preparation of sample solution

To prepare the sample solutions, tablets containing 30 mg of DEL and 10 mg of MAN were accurately weighed and crushed to fine powder. An appropriate amount was transferred into an individual 20 mL volumetric flask, diluted with methanol, kept in vortex for 2 min, sonicated for 5 min and filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, Bedford, USA), obtaining theoretical concentrations of 1.5 mg/mL and 0.5 mg/mL of DEL and MAN, respectively. These stock solutions were stored at 2-8 °C protected from light. Working sample solutions were prepared prior to the analysis by diluting the stock solutions to the appropriate concentrations in mobile-phase.

5.2.4.4. Validation of the method

The method was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LoD), limit of quantitation (LoQ) and robustness following the International Conference on Harmonisation (ICH) guideline.^[12,13] A Plackett-Burman design with six factors was planned for robustness evaluation.^[17-19]

5.2.4.4.1. Specificity

The specificity of an analytical method may be defined as the ability to determine the analyte in the presence of additional components such as impurities, degradation products and matrix compounds. The interference of the excipients of the pharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of all the tablet excipients) and a sample containing placebo with DEL and MAN at the concentrations of 30 µg/mL and 10 µg/mL, respectively.

The stability-indicating capability of the method was determined by subjecting the reference standard solutions (300 µg/mL of DEL and 100 µg/mL of MAN) to accelerated degradation conditions such as: light exposure, acidic, basic and oxidative media to evaluate the interference in the quantification of both compounds. Hydrochloric acid was added to the sample solution to achieve the final concentration of 1 M to verify the acid hydrolysis. The addition of sodium hydroxide to the sample

solution to obtain a concentration of 0.1 M was performed for the basic hydrolysis evaluation. Both solutions were neutralized with base and acid, respectively, after a pre-determined period of time. The oxidative degradation was induced by storing the sample solutions in 20% hydrogen peroxide. All these solutions were kept in ambient temperature (25°C) and protected from light to prevent the interference of photolytic degradation. Photodegradation was induced by exposing the samples to 200 watt hours/square meter of near UV light emitting radiation at 315 nm – 400 nm in a photostability UV chamber (1.0 x 0.17 x 0.17 m) with mirrors. After these procedures, the samples were diluted in mobile-phase until the theoretical concentrations of 30 µg/mL and 10 µg/mL of DEL and MAN, respectively. All analyses were done after 15 min, 30 min, 60 min and 120 min of exposition. The stability-indicating capability of the method was established by determining the peak purity of DEL and MAN from the degraded samples using a PDA detector. Additionally, the reference substances and the most degraded samples of both compounds were analyzed by MS in full scan mode.

5.2.4.4.2. Linearity

Linearity was determined by constructing three analytical curves independently, with eight levels of concentrations for both reference substances, in the range of 3-120 µg/mL of DEL and 1-40 µg/mL of MAN, prepared in mobile-phase. Before the injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 20 min with the mobile-phase flowing through the system. The peak areas of the substances were plotted against the respective concentrations of DEL and MAN to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least square method to calculate the calibration equations and to establish the determination coefficients, followed by ANOVA for compliance of the linear model.

5.2.4.4.3. Precision and accuracy

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability (intraday) was verified by six independent sample preparations of the same concentration of DEL and MAN, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-day) and also by

other two analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was determined by the recovery of known amounts of DEL and MAN reference substances added to the samples in the beginning of the preparative process. The added levels were 25, 50 and 75% of the nominal drug concentration. The results were expressed as the percentage of DEL and MAN reference substances recovered from the sample.

5.2.4.4.4. LoD and LoQ

LoD/LoQ parameters are not a requirement for drug assay, however, it is always useful to demonstrate the sensitivity of the method and that the analysis is conducted in a region that is above of the LoQ value. The LoD and LoQ were calculated from the analytical curve and also obtained experimentally based on signal-to-noise approach. As defined by ICH guideline^[12], the LoD and LoQ were calculated according to the approach based on the standard deviation of the intercept and the mean of the slope. Experimentally, the background noise was obtained after injection of the blank, observed over a distance equal to 20 times the width at half-height of the peaks of chromatograms obtained by the injection of 30 µg/mL and 10 µg/mL of DEL and of MAN reference substances, respectively. The signal-to-noise ratio applied was 10:1 for the LoQ and 3:1 for the LoD.^[20,21]

5.2.4.4.5. Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and it provides an indication of the method reliability for the routine analysis. In order to evaluate the effects of variations of the factors on the considered responses, a multivariate approach using design of experiments is recommended in robustness testing^[17,18]. The robustness was investigated with the factors summarized in Table 5.1. The six factors selected were examined in a Plackett-Burman design (12 experiments). The DEL and MAN standards and the samples were analyzed under identical experimental conditions and for this reason no additional experiments were necessary. A half-normal probability plot for the effects in combination with the dummy factors was used to estimate the error and identify significant effects. An effect is considered significant at a given α level if $t_{\text{calculated}} > t_{\text{critical}}$ ^[19]. To assess the

stability of sample solutions of DEL and MAN, the samples were tested when maintained at 2-8 °C for 48 h and also placed into the autosampler, at room temperature, for 24 h. The stability of these solutions was studied by performing the analysis and observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

Table 5.1. Factors and levels investigated during robustness testing.

Factor	Nominal	Investigated levels (-1; +1)
pH of aqueous phase	3.0	2.9; 3.1
% of triethylamine	0.3	0.28; 0.32
% of acetonitrile	55	53; 57
Temperature (°C)	35	33; 37
Flow (mL/min)	1.2	1.1; 1.3
Column manufacturer	Shimadzu®	Merck®; Shimadzu®

5.2.4.5. System suitability

The system suitability test was also carried out to evaluate the adequacy of the system for the analysis. The parameters measured were peak area, retention time, theoretical plates, resolution between DEL and MAN, capacity factor, and peak asymmetry.

5.2.5. Results and discussion

5.2.5.1. Selection of the detection wavelength

The UV spectra of DEL and MAN in the region between 190 and 370 nm are shown in Fig. 5.1. In their pharmaceutical association, DEL is nominally three times more concentrated than MAN, but the second has better absorbing characteristics in the UV region than the first. As observed, MAN shows a maximum at 232 nm, while DEL exhibits low absorption throughout the UV region with a maximum at the range

of 200 – 220 nm. Thus, the 220 nm was chosen as the optimum detection wavelength in order to favor the simultaneous quantification of DEL and MAN, minimizing the interference of mobile-phase noise.

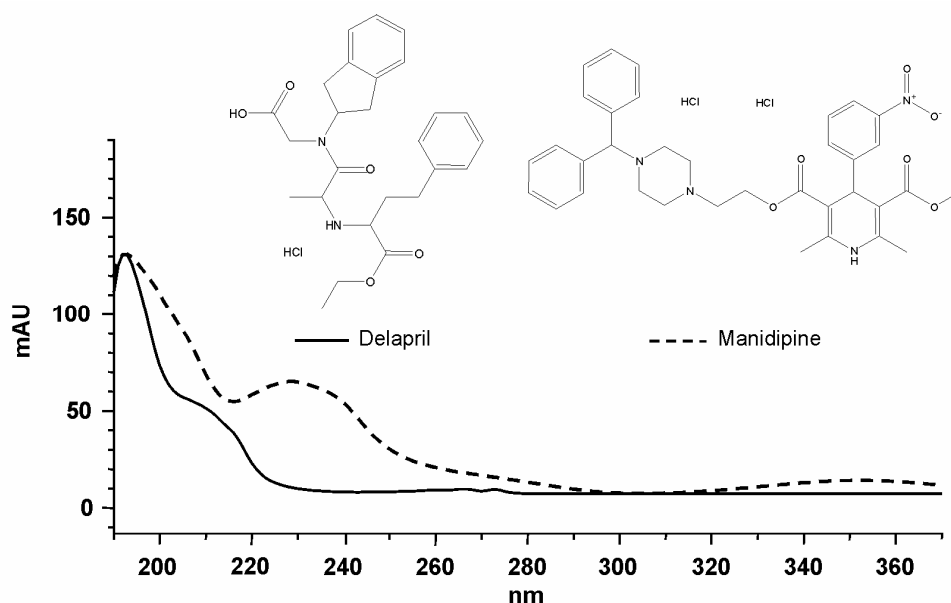


Figure 5.1. Overlaid UV absorption spectra and chemical structures of reference substance solution of DEL and MAN (30 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$, respectively).

5.2.5.2. Selection and optimization of the chromatographic conditions

The effect of the composition of the column and mobile-phase on the retention time of DEL and MAN and on its chromatographic parameters was initially investigated. The chromatographic conditions were chosen after testing different mobile-phases with distinct proportions of organic solvent (acetonitrile or methanol) and water, with and without triethylamine, in different pH values of the aqueous phases. Phosphate buffers were also tested. The adequacy of the mobile-phase was decided on basis of selectivity and sensitivity of the assay, stability studies and the separation between the drugs and degraded products formed during forced degradation studies. The use of triethylamine solution (0.3%; pH 3.0) in combination with acetonitrile (45:55; v/v), at 35 $^{\circ}\text{C}$, resulted in a relatively short retention times of 4.3 min and 5.4 min for DEL and MAN, respectively, and a simple mobile-phase (without buffer addition), as shown in the typical chromatogram (Fig. 5.2). The

optimized conditions of the RP-LC method were validated for the simultaneous analysis of DEL and MAN in pharmaceuticals formulations, in order to provide capability and application for the quality control.

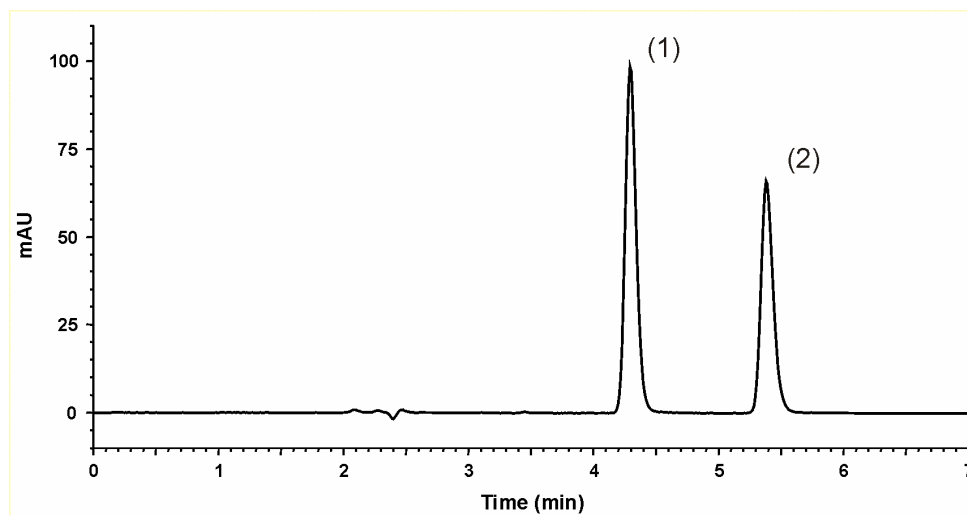


Figure 5.2. Representative RP-LC chromatogram of delapril (DEL) and manidipine (MAN) reference substance solution. Peak 1: DEL (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Peak 2: MAN (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Chromatographic conditions: Shimadzu Shim-Pack CLC- C_8 column (250 \times 4.6 mm, 5 μm), 35 $^\circ\text{C}$; mobile phase: acetonitrile/triethylamine (0.3%; pH 3.0) (55:45; v/v); flow rate: 1.2 mL/min; detection: 220 nm.

5.2.5.3. Method validation

5.2.5.3.1. Specificity

Forced degradations were performed to provide stability-indicating properties of the analytical method, as no information is available about the potential degradation products. For DEL, the oxidative and photolytic conditions resulted in significant decrease of the drug area without any additional peak, suggesting that the degradation products were not detected by UV absorption at 220 nm or present low absorptivity. Under the basic condition, significant decrease of the peak area of DEL was observed with three additional peaks eluted and detected, at 2.8, 3.8 and 5.1 min. Under the acid condition DEL content exhibited non-significant decrease of the area. However for MAN, the basic and acid conditions resulted in non-significant

reduction of the peak area, without any additional peak detected by UV. A significant decrease of the peak area and two additional peaks were detected at 5.7 and 5.9 min after the photolytic condition. Under the oxidative condition, a significant decrease of the area of MAN was measured and one additional peak was observed at 6.1 min. Moreover, no interference from formulation excipients was found, showing that the drugs peaks were free from any coeluting substance, thus demonstrating that the proposed method is specific for the simultaneous analysis of DEL and MAN. The chromatograms of forced degradation studies are shown in Fig. 5.3 for DEL and in Fig. 5.4 for MAN.

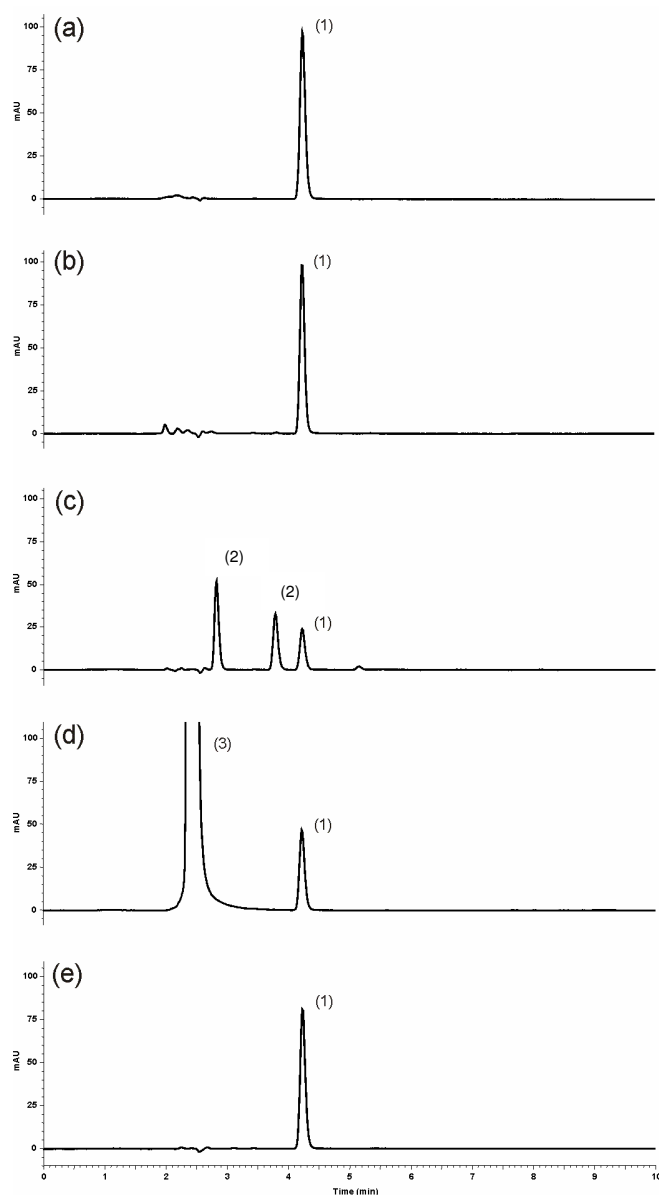


Figure 5.3. RP-LC chromatograms for degradation studies of delapril (DEL; 30 µg/mL). (a) DEL reference substance solution; (b) after acidic hydrolysis; (c) after

basic hydrolysis; (d) after oxidation; (e) after exposition to UV light. Peak 1: DEL, Peak 2: degraded forms, Peak 3: hydrogen peroxide preservative. Chromatographic conditions: Shimadzu Shim-Pack CLC-C₈ column (250 × 4.6 mm, 5 μm), 35 °C; mobile phase: acetonitrile/triethylamine (0.3%; pH 3.0) (55:45; v/v); flow rate: 1.2 mL/min; detection: 220 nm.

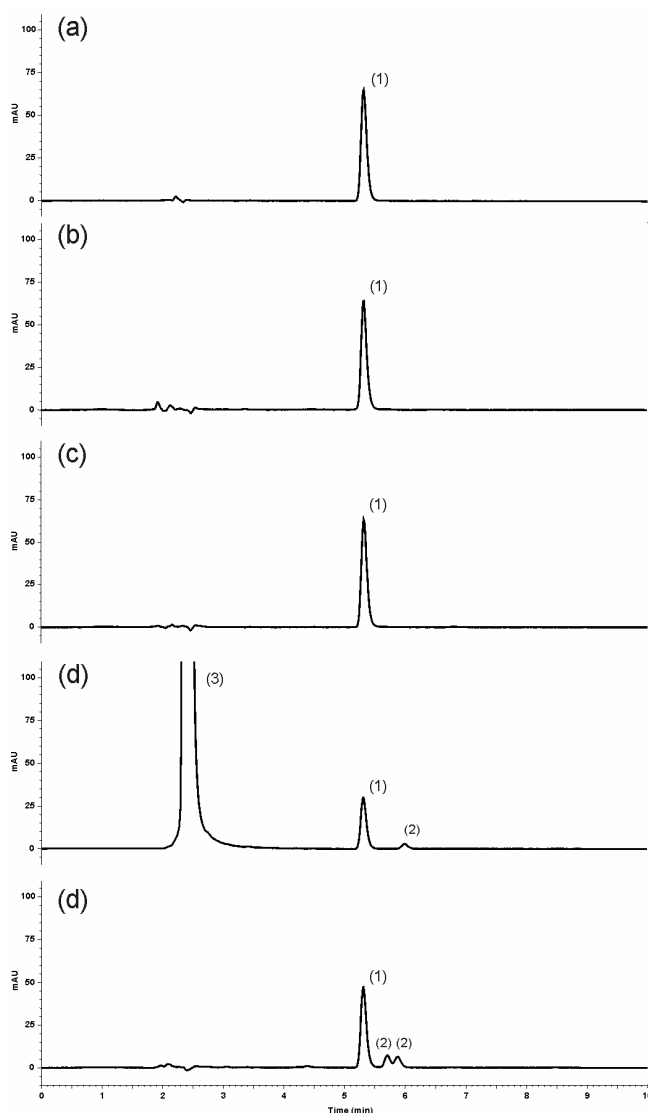


Figure 5.4. RP-LC chromatograms for degradation studies of manidipine (MAN; 10 μg/mL). (a) MAN reference substance solution; (b) after acidic hydrolysis; (c) after basic hydrolysis; (d) after oxidation; (e) after exposition to UV light. Peak 1: MAN, Peak 2: degraded forms, Peak 3: hydrogen peroxide preservative. Chromatographic conditions: Shimadzu Shim-Pack CLC-C₈ column (250 × 4.6 mm, 5 μm), 35 °C;

mobile phase: acetonitrile/triethylamine (0.3%; pH 3.0) (55:45; v/v); flow rate: 1.2 mL/min; detection: 220 nm.

To increase the knowledge about the degraded products, the DEL and MAN reference substances and degradation samples were also analyzed by MS. Both drugs were susceptible to ESI +, but some additional products were not detected by MS, as they were not ionized or their molecular weights were out of the lower mass range used in the study. For DEL, the mass spectra resulted in the identification of seven different products from the basic condition, with m/z values of 181.23, 199.21, 214.36, 257.18, 315.22, 373.25 and 439.72. Under oxidative conditions, significant decrease in signal intensity was detected for DEL, and two additional products were identified (m/z 467.72 and 489.79). For MAN, under oxidative conditions, significant decrease in signal intensity was detected and one different product was identified, with m/z values of 290.71. Moreover, two others additional products were observed (m/z 628.00 and 649.93). The mass spectra resulted in the identification of four different products (m/z 167.33, 443.81, 593.81 and 609.01) in accordance with the literature.^[22] Evaluation of the mains peaks from RP-LC showed only m/z of 453.89 and 611.90 attributable to DEL and MAN, respectively; no other mass peaks were observed. The spectra of MS studies are shown in Fig. 5.5.

5.2.5.3.2. Linearity

The analytical curves constructed for DEL and MAN were found to be linear in the 3-120 $\mu\text{g/mL}$ and 1-40 $\mu\text{g/mL}$ ranges, respectively. The value of the determination coefficient calculated (r^2) was 0.9997 ($y = 18154x + 15609$) for DEL and 0.9998 ($y = 42211x - 3306$) for MAN, indicating the linearity of the method. The variance analysis ($P = 0.05$) was performed to verify the good fitting of the method and the results showed that no deviation from linearity for DEL ($F_{\text{calculated}} = 1.05 < F_{\text{critical}} = 2.74$) neither for MAN ($F_{\text{calculated}} = 2.50 < F_{\text{critical}} = 2.74$).

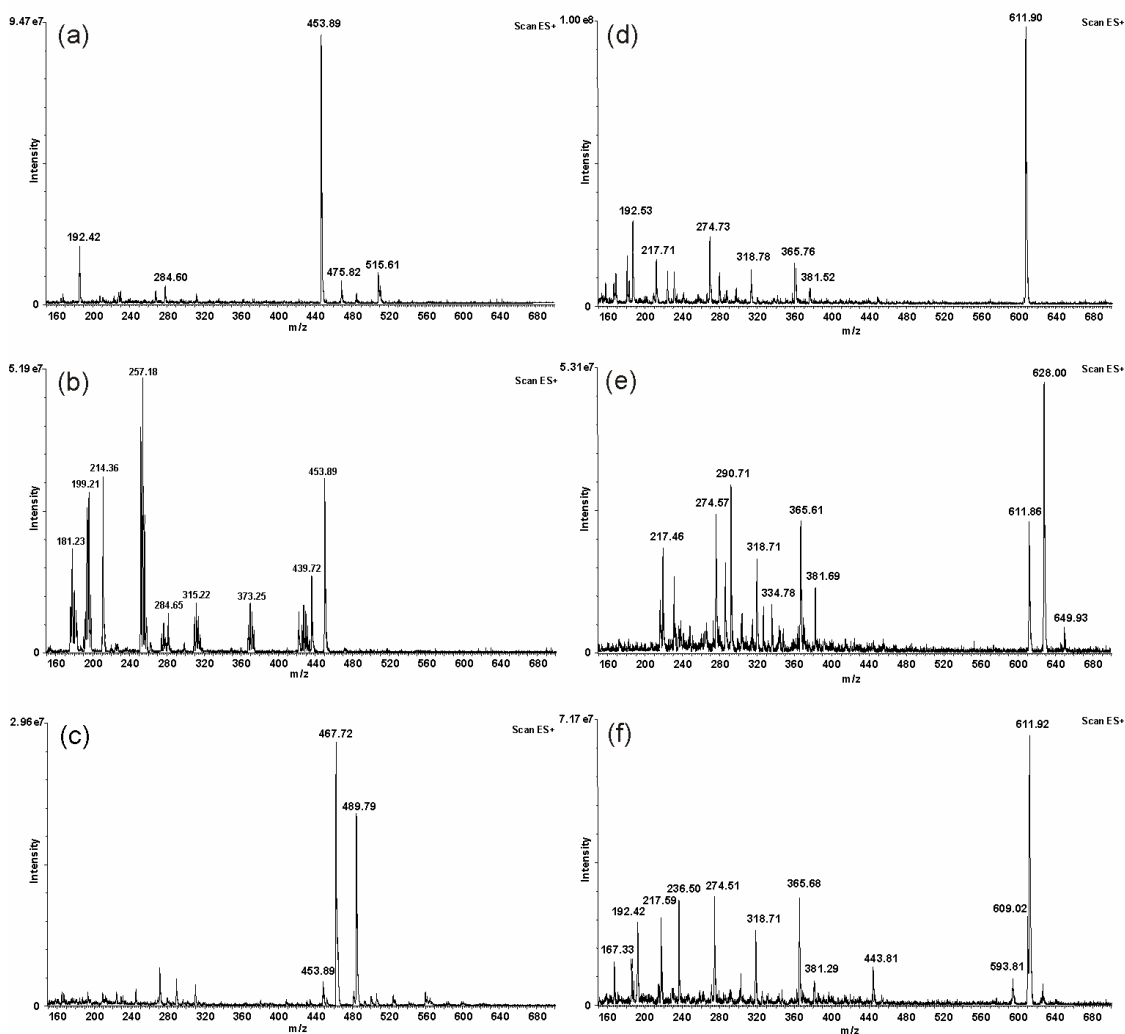


Figure 5.5. The full scan mass spectra of DEL (m/z 453.9) and MAN (m/z 611.9). (a) DEL reference substance solution, and after (b) basic condition: degraded products = m/z 181.23, 199.21, 214.36, 257.18, 315.22, 373.25 and 439.72; and (c) oxidative condition: additional products = m/z 467.72 and 489.79. (d) MAN reference substance solution, and after (e) oxidative condition: degraded product = m/z 290.71; additional products = m/z 628.00 and 649.93; and (f) exposure to UV light: degraded products = m/z 167.33, 443.81, 593.81 and 609.01.

5.2.5.3.3. Precision

The precision was evaluated as the repeatability of the method by calculating the relative standard deviation (RSD) from six independent solution containing 30

µg/mL and 10 µg/mL of DEL and MAN, respectively, performed on the same day and under the same experimental conditions. The RSD value obtained was 0.90% for DEL and 0.95% for MAN. The inter-day precision was assessed by analyzing six samples on three different days; the values obtained were 1.16% (mean assay result = 101.60%) for DEL and 0.99% (mean assay result = 101.05%) for MAN. Between analysts precision was also determined by computing results performed by three analysts; the RSD values were found to be 1.27% and 1.67% for DEL and MAN, respectively. These results are summarized in Table 5.2.

Table 5.2. Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for delapril and manidipine in the pharmaceutical formulation.

Day	Inter-day ^a (n=18)		Between-analysts (n=18)		
	Assay (%)	Assay (%)	Analysts	Assay (%)	Assay (%)
	Delapril	Manidipine		Delapril	Manidipine
1 (n=6)	100.83	100.34	A (n=6)	99.80	101.06
	102.06	101.48		100.46	101.34
	101.40	100.77		100.06	100.24
	99.76	99.26		103.12	102.08
	101.87	101.68		103.06	102.26
	102.13	101.70		103.49	102.93
2 (n=6)	102.28	100.92	B (n=6)	101.49	98.33
	102.04	100.87		101.79	102.19
	102.25	100.69		101.97	98.04
	102.05	101.15		101.91	102.50
	99.99	98.79		100.87	98.74
	102.16	101.27		98.43	100.75
3 (n=6)	99.80	101.06	C (n=6)	102.27	98.24
	100.46	101.34		102.55	100.01
	100.06	100.24		102.06	101.93
	103.12	102.08		101.24	102.78
	103.06	102.26		101.93	98.79
	103.49	102.93		102.38	101.20
Mean ^b	101.60	101.05		101.61	100.74
RSD ^c (%)	1.16	0.99		1.27	1.67

^aInter-day precision performed by analyst A

^bMean of eighteen replicates

^cRSD = Relative standard deviation

5.2.5.3.4. Accuracy

The accuracy was evaluated by the determination of the analytes in solutions prepared by the standard addition method and expressed in terms of percentage recoveries of added DEL and MAN from the real samples. The results are shown in Table 5.3. The mean recovery data, comprising the three levels added, were 99.13% (RSD = 1.42%) for DEL and 98.61% (RSD = 0.89%) for MAN, demonstrating that the method is accurate within the desired range.

Table 5.3. Accuracy of RP-LC for delapril and manidipine in samples of pharmaceutical formulation.

Drug	Added Level ($\mu\text{g/mL}$)	Nominal Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean Concentration Found ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy (%)	RSD ^b (%)
Delapril (30 $\mu\text{g/mL}$)	7.5 (25%)	37.5	37.24	99.74	1.58
	15.0 (50%)	45.0	44.78	100.13	1.91
	22.5 (75%)	52.5	51.70	97.52	0.78
Manidipine (10 $\mu\text{g/mL}$)	2.5 (25%)	12.5	11.99	98.91	0.89
	5.0 (50%)	15.0	14.48	99.29	1.17
	7.5 (75%)	17.5	16.83	97.62	1.05

^aMean of three replicates

^bRSD = Relative standard deviation

5.2.5.3.5. LoD and LoQ

Initially, the LoD and LoQ were calculated by using the mean of the slope, 18154.67 ± 233.09 for DEL and 42211.37 ± 31.21 for MAN, and the mean of the standard deviation of the intercept of the independent curves 4287.87 and 3785.88 for DEL and MAN, respectively. The LoD and LoQ obtained by this approach were 0.78 and 2.36 $\mu\text{g/mL}$ for DEL and 0.30 and 0.90 $\mu\text{g/mL}$ for MAN. Experimentally, the LoD determined was 0.66 $\mu\text{g/mL}$ for DEL and 0.35 $\mu\text{g/mL}$ for MAN. Furthermore, the LoQ, with the precision lower than 5% and accuracy within $\pm 5\%$, was found to be 2.10 $\mu\text{g/mL}$ for DEL and 1.12 $\mu\text{g/mL}$ for MAN, showing a good concordance between the two approaches.

5.2.5.3.6. Robustness

The Plackett-Burman design selected factors and the obtained response to each experiment are summarized in Table 5.4. The responses are the percentages of DEL and MAN in the commercial tablets (relative to its label claimed concentration) obtained in relation to the standard solutions in each experiment. After the calculation of the effects for each parameter, the statistical interpretation, through the *t*-test, allowed to define what is significant and what is not. No significant factors were revealed for all analyses, as *t*-calculated values were minor than the *t*-critical value ($\alpha = 0.05$). So, there were no significant changes in the chromatographic pattern regarding the percentage of drugs contents when the modifications were made according to the experimental conditions, assuring the robustness of the method. The stability of the sample solutions was also studied and the obtained data assured stability during 24 h into the autosampler and during 48 h when maintained at 2-8 °C.

5.2.5.4. System suitability

The analysis of the DEL and MAN standard, evaluated at each analysis day, provided the approximate results around: 10625 and 14348 for theoretical plates and 1.18 and 1.32 for peak asymmetry, respectively for DEL and MAN. The obtained value for capacity factor of DEL was 1.04 and of MAN was 1.57. The resolution between both compounds was 6.0. The experimental results show that the tested parameters were within the acceptable range, indicating that the system is suitable for the analysis intended.^[23,24]

Table 5.4. Plackett-Burman experimental design with the obtained response to each experiment and the effects of the investigated factors.

Assay	pH	Dummy	Temp	% Triethylamine	Dummy	Dummy	Dummy	% Acetonitrile	Column	Flow	Dummy	Assay (%) Delapril	Assay (%) Manidipine
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	100.43	99.10
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	98.94	98.70
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	100.54	97.91
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	98.60	97.96
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	101.11	100.72
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	99.05	99.89
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	100.25	98.62
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	101.79	98.49
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	99.65	99.25
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	100.13	100.48
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	98.31	98.11
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99.16	100.53
E (%) DEL	0.7	-0.1	-0.1	-0.6	-0.4	1.0	-0.7	1.1	-0.2	0.5	-0.2		
E (%) MAN	-1.1	-0.7	0.1	-0.5	-0.6	0.0	-0.8	-0.2	-0.2	1.1	-0.2		
t _{calculated} DEL	1.17		0.17	1.13				2.04	0.28	0.97			
t _{calculated} MAN	2.03		0.17	0.85				0.42	0.28	1.91			
t _{critical}	2.57												

Assay % = quantitative determination of delapril and manidipine

E (%) = calculated effects for quantitative determination

(-) = low factor level

(+) = high factor level

5.2.6. Conclusion

The discussed results show that the stability-indicating RP-LC method for DEL and MAN is specific, accurate and possesses very satisfactory linearity and precision, without any interference from the excipient components and degradation products as also demonstrated by MS studies. The robustness of the method was verified with small variations on pH, concentration of triethylamine solution and organic phase, column manufacturer, flow rate and analyses temperature, using the Plackett-Burman experimental design to examine potential sources of variability. Therefore, the proposed method can be successfully applied for the simultaneous quantitative analysis of DEL and MAN in pharmaceutical formulations, contributing to the improvement on the quality control of medicines.

5.2.7. Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support and Chiesi Group for the provision of DEL and MAN reference standards.

5.2.8. References

1. Onoyama, K.; Nanishi, F.; Okuda, S.; Oh, Y.; Fujishima, M.; Tateno, M.; Omae, T. Pharmacokinetics of a new angiotensin I converting enzyme inhibitor (delapril) in patients with deteriorated kidney function and in normal control subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1988, 43, 242–249.
2. Razzetti, R.; Acerbi, D. Pharmacokinetic and pharmacologic properties of delapril, a lipophilic nonsulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Am. J. Cardiol.* 1995, 75, 7F–12F.
3. Jimura, O.; Shimamoto, K. Efficacy and mode of action of manidipine: a new calcium antagonist. *Am. Heart J.* 1993, 125, 635–641.
4. Deroubaix, X.; Lins, R.L.; Lens, S.; Allemon, A.; Jeanbaptiste, B.; Poli, G.; Acerbi, D.; Stockis, A.; Ventura, P. Single dose pharmacokinetics of manidipine in hepatic impaired and healthy controls. *Int. J. Clin Pharmacol. Ther.* 1998, 36, 386–391.
5. Gaddam, K.K.; Verma, A.; Thompson, M.; Amin, R.; Ventura, H. Hypertension and cardiac failure in its various forms. *Med. Clin. North Am.* 2009, 93, 665–680.
6. Otero, M.L. Manidipine – Delapril combination in the management of hypertension. *Vasc. Health Risk Manag.* 2007, 3, 255–263.
7. Fogari, R. Rationale for Use of the Fixed Combination of Delapril and Manidipine in the Treatment of Hypertension in Patients with Diabetes Mellitus. *Clin. Ther.* 2007, 29, S54–S63 supplement B.
8. Jing, J.; Ren, W.; Chen, X.; He, H.; Zhou, W.; Zhu, X.; Sun, Y.; Wang, G. Determination and pharmacokinetics of manidipine in human plasma by HPLC-ESI/MS. *Biomed. Chrom.* 2007, 21, 836–840.
9. Ohkubo, T.; Uno, T.; Sugawara, K. Liquid chromatographic determination of manidipine in serum with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B.* 1996, 687, 413–418.

10. Stockis, A., De Bruyn, S.; Gengler, C.; Goethals, F.; Lens, S.; Poli, G.; Acerbi, D. Pharmacokinetics and tolerability of a new manidipine and delapril fixed oral combination in young and elderly subjects. *Arzneim.-Forsch.* 2003, 53, 554–561.
11. Stockis, A., Gengle, C.; Goethals, F.; Jeanbaptiste, B.; Lens, S.; Poli, G.; Acerbi, D. Single oral dose pharmacokinetic interaction study of manidipine and delapril in healthy volunteers. *Arzneim.-Forsch.* 2003, 53, 627–634.
12. International Conference on Harmonization (ICH). Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005, 1–13.
13. International Conference on Harmonization (ICH). Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A (R2). 2003, 1–18.
14. Alsante, K. M.; Ando, A.; Brown, R.; Ensing, J.; Hatajik, T.D.; Kong, W.; Tsuda, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2007, 59, 29–37.
15. Bakshi, M.; Singh, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 28, 1011–1040.
16. Görög, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 247–253.
17. Dejaegher, B.; Heyden, Y.V. Ruggedness and robustness testing. *J. Chromatogr. A.* 2007, 1158, 138–157.
18. Zeaiter, M.; Roger, J.M.; Bellon-Maurel, V.; Rutledge, D.N. Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: the assessment of robustness. *Trends Anal. Chem.* 2004, 23, 157–170.
19. Heyden, Y.V.; Nijhuis, A.; Smeyers-Verbeke, J.; Vandeginste, B.G.M.; Massart, D.L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 24, 723–753.

20. Carr, G. P.; Wahlich, J.C. A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1990, 8 (8-12), 613–618.
21. Ermer, J.; Burgess, C. Detection and Quantification Limit. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice.* Press: Wiley–VCH. Weinheim, 2005.
22. Mielcarek, J.; Szamburska, O. Inclusion Complexes of Manidipine with α -Cyclodextrin and Identification of Photodegradation Products. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 2005, 52, 195–200.
23. Shabir, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization J. *Chromatogr. A.* 2003, 987, 57–60.
24. Lindsay, S. *High Performance Liquid Chromatography. Analytical Chemistry by Open Learning.* Press: J. Wiley and Sons. London, 1992.

**5.3. ARTIGO CIENTÍFICO – Stability-indicating Micellar Electrokinetic
Chromatography Technique for Simultaneous Measurement of Delapril
and Manidipine from Their Combination Drug Fromulation Simultaneous**

Submetido ao periódico Journal of AOAC International (30 de agosto de 2010)

5.3.1. Título: Stability-indicating Micellar Electrokinetic Chromatography Technique for Simultaneous Measurement of Delapril and Manidipine from Their Combination Drug Formulation

5.3.2. Abstract

A stability-indicating micellar electrokinetic chromatography (MEKC) method was developed and validated for simultaneous analysis of delapril (DEL) and manidipine (MAN), using salicylic acid as internal standard. The MEKC method was performed on a fused-silica capillary (effective length of 72 cm) with 50 mM of borate buffer and 5 mM of anionic surfactant SDS at pH 9.0 as background electrolyte. The separation was achieved at 25 kV applied voltage and 35 °C. The injection was performed at 50 mbar for 5 s, with detection at 208 nm. The method was linear in the range of 15-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r^2 = 0.9966$) for DEL and 5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r^2 = 0.9985$) for MAN with adequate results for the precision ($\leq 1.87\%$) and accuracy (98.94% for DEL and 100.65% for MAN). The specificity and stability-indicating capability are demonstrated through forced degradation studies, which also show that there is no interference of the excipients. Moreover, the Plackett-Burman experimental design was used for robustness evaluation, giving results within the acceptable range. The method was successfully applied for the drugs analysis and the results were compared to the liquid chromatography method, showing non-significant difference ($P = 0.78$ and $P = 0.84$) for DEL and MAN, respectively.

Keywords: Delapril; Experimental design; Manidipine; Micellar electrokinetic capillary chromatography; Stability-indicating method; Validation.

5.3.3. Introduction

Hypertension is a powerful risk factor for fatal and nonfatal cardiovascular disease events. It is characterized by high blood pressure levels associated with metabolic and hormonal changes and by vascular and cardiac hypertrophy [1]. The majority of patients with hypertension require combination therapy in order to achieve current treatment goals [2]. The combination of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a dihydropyridine calcium antagonist show better results to control this disease. Besides exerting synergistic effect on high blood pressure, because of their different and complementary mechanisms of action, the concomitant use may produce favorable effects in hypertension complications, such as development of left ventricular hypertrophy, renal damage, endothelium dysfunction and atherosclerotic vascular lesions [3,4].

The combination of delapril and manidipine may be regarded as an optimal antihypertensive drug treatment in mild to moderate essential hypertensive patients inadequately controlled by monotherapy with either component, being capable of inducing a significant, smooth and persistent blood pressure reduction throughout the dosing interval [5-7]. Delapril hydrochloride (DEL) (Fig. 5.6a) is a highly lipophilic carboxyl-alkyldipeptide with potent angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. It is a prodrug, after administration it is converted *in vivo* by esterolysis to an active diacid derivative (M-I), which is converted in turn to an active 5-hydroxy-indane diacid (M-III). The C_{max} values for M-I and M-III are 1200 and 430 ng mL⁻¹ at 1.39 and 1.67 hours, respectively [8-10]. Manidipine (MAN) (Fig. 5.6b) is a third-generation dihydropyridine calcium channel antagonist. The drug is lipophilic, vasoselective and has strong membrane binding, which is responsible for the gradual onset (C_{max} 3.27 ng mL⁻¹; t_{max} 1.75 hours) and long duration of pharmacologic action [11-13].

The literature reported some analytical methods for the determination of DEL and MAN in biological matrices using liquid chromatography (LC) with UV detection (LC-UV), electrochemical detection (LC-EC) and coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) applied to pharmacokinetic studies and enantiomeric analysis [14-17].

The application of capillary electrophoresis (CE) has been increasing in the last few years and includes the determination of the active pharmaceutical

ingredients, drug related impurities and chiral separation [18]. CE is a versatile technique can be an alternative analytical tool with different separation mechanisms to LC [19]. In some fields, CE is currently displacing LC owing to its many advantageous features, such as extremely high efficiency, high resolution, rapid analysis and small consumption of sample and organic solvents, leading to a decrease in the cost of analysis and further minor environmental damage [20].

The combined formulation of DEL and MAN are commercially available, but at the moment, there is no published CE method for the quantitative analysis of the drugs as active pharmaceutical ingredients or finished product. In this context, the objective of this study was to develop and validate a stability indicating method by MEKC for simultaneous determination of DEL and MAN in solid pharmaceutical dosage forms, establishing comparison with the validated LC method, and contributing to the research of new advantages alternative techniques for the quality control of pharmaceutical formulations.

5.3.4. Experimental

5.3.4.1. Chemicals and reagents

The DEL and MAN reference standards were kindly supplied by Chiesi Farmaceutici (Parma, Italy) and salicylic acid (Fig. 5.6c) reference standard, used as internal standard (IS), was purchased from United States Pharmacopeia (USP, Rockville, USA). The tablets of Hipertil[®] (Chiesi Farmacêutica Ltda, SP, Brazil) containing 30 mg of DEL and 10 mg of MAN were obtained from commercial source and used within their shelf life period. The excipients contained in the dosage form (lactose monohydrate, magnesium stearate, hydroxypropyl cellulose, low substituted hydroxypropyl cellulose, riboflavin and aluminum lake) were all pharmaceutical grades and acquired from different suppliers. Sodium dodecyl sulfate (SDS) and analytical grade boric acid were acquired from Synth (São Paulo, Brazil) and Spectrum (Gardena, USA), respectively. Methanol was obtained from Tedia (Ohio, USA). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bradford, USA).

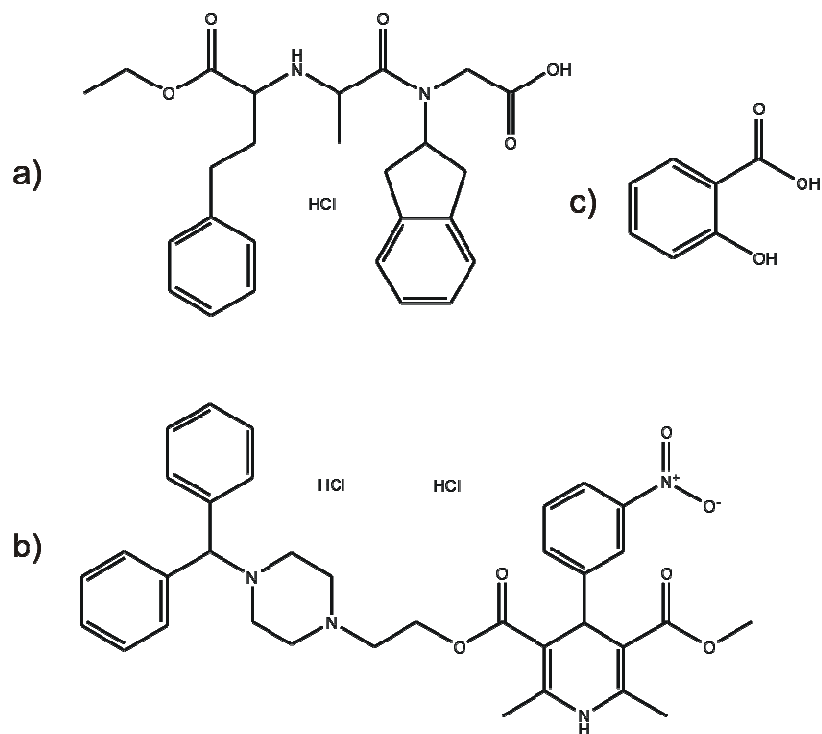


Figure 5.6. Chemical structures of (a) delapril; (b) manidipine; (c) salicylic acid (IS).

5.3.4.2. Apparatus

CE experiments were performed on an Agilent ^{3D}CE apparatus (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, a photodiode array (PDA) detector and power supply able to deliver up to 30 kV. CE ChemStation software was used for instrument control, data acquisition and analysis.

The LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10Avp system controller, LC-10ADvp binary pump, SIL-10ADvp auto sampler, CTO-10ACvp column oven, SPD-M10Avp PDA detector. CLASS-VP 6.12 manager system software was used to control the equipment and to calculate data and responses from the LC system.

For pH measurements, a pH meter Digimed DM 20 (São Paulo, Brazil) was employed. Background electrolyte (BGE) and samples were filtered through 0.45 μm Millex HV syringe filters (Millipore, Bradford, USA).

5.3.4.3. Preparation of reference substance solutions

The reference substance solutions were prepared by weighing accurately, 30 mg of DEL and 10 mg of MAN reference standards, transferred to individual 20 mL volumetric flasks and diluted to volume with methanol, obtaining the concentrations of 1.5 mg mL⁻¹ and 0.5 mg mL⁻¹, respectively, for DEL and MAN. Equally, IS solution was also prepared at a final concentration of 0.5 mg mL⁻¹ with methanol. The stock solutions were filtered and stored at 2-8 °C protected from light. For all analyses, an appropriate aliquot from DEL and MAN stock solutions, spiked with IS stock solution, were diluted to desired concentrations with BGE solution.

5.3.4.4. Preparation of sample solutions

To prepare the sample solutions, tablets containing 30 mg of DEL and 10 mg of MAN were accurately weighed and crushed to fine powder. An appropriate amount was transferred into an individual 20 mL volumetric flask, diluted to volume with methanol, kept in vortex for 2 min, sonicated for 5 min and filtered, obtaining theoretical concentrations of 1.5 mg mL⁻¹ and 0.5 mg mL⁻¹ for DEL and MAN, respectively. Working sample solutions were prepared daily, by dilution of different aliquots of DEL and MAN former solutions, spiked with IS, to the appropriate concentrations with BGE solution.

5.3.4.5. Preparation of BGE solution

The optimized BGE solution was daily prepared, weighing separately boric acid and SDS quantities, equivalent to 50 mM and 5 mM, respectively, and dissolving in 70 mL of ultrapure water. The pH was adjusted to 9.0 by adding sodium hydroxide (NaOH) 1 M and the volume completed to 100 mL with ultrapure water.

5.3.4.6. CE procedure

All experiments were carried out on an uncoated fused-silica capillary (Agilent Technologies, Germany) with 50 μm i.d. and 80.5 cm of total length (effective length 72 cm), thermostated at 35 $^{\circ}\text{C}$, and detection at 208 nm using a PDA detector. Before the first use, the capillary was conditioned by flushing 1.0 M NaOH during 30 min, then water for 15 min. At the beginning of each working day, the capillary was conditioned by rinsing with 0.1 M NaOH for 15 min, followed by water for 10 min, and then by BGE solution for 15 min. To achieve high migration time reproducibility between injections, after a serie of three sample injections the capillary was reconditionated by flushing 0.1 M NaOH (3 min), water (1 min) and BGE solution (3 min). Samples were injected using the hydrodynamic mode for 5 s at 50 mbar and a constant voltage of 25 kV (current about 15 μA) was applied during the analysis. Since electrolysis can change the electroosmotic flow (EOF) and to affect the migration time, efficiency and selectivity, after three sample injections the BGE solution was replaced, in the capillary, by a fresh solution.

5.3.4.7. LC procedure

A LC method applied for the simultaneous analysis of DEL and MAN in pharmaceutical dosage forms was previously developed and validated by our research group and the data were compared to the obtained by MEKC method in this study. The experiments were performed on an analytical column Shim-pack CLC-C8 (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) (Shimadzu, Tokyo, Japan) and a guard column, the Shim-pack CLC G-C8 (4.0 mm i.d., 10 mm long) (Shimadzu, Tokyo, Japan). The LC system was operated isocratically at 35 $^{\circ}\text{C}$ using a mobile-phase consisted of acetonitrile and a solution of triethylamine 0.3% adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid (55:45; v/v) run at a flow-rate of 1.2 mL min^{-1} , using PDA detection at 220 nm. The injection volume was 20 μL of the solutions containing 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of DEL and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of MAN for working standard and sample solutions.

5.3.4.8. Validation of the CE method

In order to demonstrate the feasibility of the method, it was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LoD), limit of quantitation (LoQ) and robustness according to the International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines [21,22]. A Plackett-Burman design with six factors was planned for robustness evaluation [23-25].

5.3.4.8.1. Specificity

The specificity of an analytical method may be defined as the ability to determine the analyte in the presence of additional components such as impurities, degradation products and matrix compounds [21,22,26,27]. The interference of the excipients of the pharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of all the tablet excipients) and a sample containing placebo added with DEL and MAN at the concentrations of 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

The stability-indicating capability of the method was determined by subjecting sample solutions (600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of DEL and 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of MAN) to accelerated degradation by acidic, basic, oxidative and photolytic conditions to evaluate the interference of these agents in the quantitation of both compounds. After the procedures, the samples were diluted in BGE solution to theoretical concentrations of 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of DEL and MAN, respectively. Sample solutions prepared in 0.1 M hydrochloric acid (HCl) were used for the acidic hydrolysis, and sample solutions in 0.1 M NaOH for the basic hydrolysis evaluation. Both solutions were neutralized with acid or base, after a pre-determined period of time, as necessary. The oxidative degradations were induced by storing the sample solutions in 15% hydrogen peroxide, at ambient temperature. Photodegradation was induced by exposing the samples to 200 watt hours/square meter of near UV light emitting radiation at 315-400 nm. All analyses were obtained after 15 min, 30 min, 1 h and 2 h of exposition, protected from light. Then, the stability-indicating capability of the method was established by determining the peak purity of DEL and MAN in the

degraded samples using a PDA detector, as well as, by monitoring the resolution among drugs and IS from additional peaks in the eletropherogram.

5.3.4.8.2. Linearity

The linearity was evaluated by the least square regression and the ANOVA (analysis of variance) ($\alpha = 0.05$) was applied for compliance of the linear model. Standard plots were constructed with six concentrations in the range of 15-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for DEL and of 5.0-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for MAN, prepared in triplicates.

5.3.4.8.3. Precision

The precision of the method for the determination of DEL and MAN was verified through repeatability (intra-day) and intermediate precision analyses. The results were expressed as relative standard deviation (RSD). The repeatability of this method was verified through the analysis of six independent sample preparations in the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-day) and also by other analyst performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The samples were prepared from stock solutions of DEL (1.5 mg mL^{-1}), MAN (0.5 mg mL^{-1}) and IS (0.5 mg mL^{-1}), whose final concentration of DEL (60 $\mu\text{g mL}^{-1}$), MAN (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and IS (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was achieved by dilution in BGE.

5.3.4.8.4. Accuracy

The accuracy of a method is expressed as the closeness of agreement between the result found and the value that is accepted as a reference value. It was evaluated by the analysis of an in-house mixture of the tablet excipients with known amounts of each drug, to obtain solutions at concentrations of 45, 60 and 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for DEL and 15, 20 and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for MAN, equivalent to 75, 100 and 125%, of the analytical concentrations, respectively. The accuracy was calculated as the

percentage of the drug recovered from the formulation matrix and by calculating the percent difference (bias %) between the measured mean concentrations and the corresponding nominal concentrations.

5.3.4.8.5. LoD and LoQ

LoD/LoQ parameters are not a requirement for drug assay, however, it is always useful to demonstrate the sensitivity of the method and that the analysis are being conducted in a region which is above of the LoQ value. The LoQ and the LoD were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept of the mean of three calibration curves, determined by a linear regression model, as defined by ICH guideline [21].

5.3.4.8.6. Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. In order to evaluate the simultaneous variations of the factors on the considered responses, a multivariate approach using design of experiments is recommended in robustness testing [23,24]. The robustness was investigated with the factors summarized in Table 5.5. The six factors selected were examined in a Plackett-Burman design (12 experiments). The DEL and MAN standards and the samples were analyzed under identical experimental conditions and for this reason no additional experiments were necessary. A half-normal probability plot for the effects in combination with the dummy factors was used to estimate the error and identify significant effects. An effect is considered significant at a given α level if $t_{\text{calculated}} > t_{\text{critical}}$ [25].

Table 5.5. Factors and levels investigated during robustness testing.

Factor	Nominal	Levels investigated (-1; +1)
pH of BGE	9.0	8.8; 9.2
Borate (mM)	50	48; 52
SDS (mM)	5	4; 6
Temperature (°C)	35	33; 37
Injection (s)	5	4; 6
Voltage (kV)	25	22; 28

5.3.4.9. Stability

The stability of the proposed method was examined by observing possible decomposition of DEL and MAN under the optimum experimental conditions. This test was carried out by monitoring the concentration of a mixed standard solution in the period of ten hours. Additionally, to assess the stability of stock solutions, the samples were tested when maintained at 2-8 °C for 48 h and also placed into the autosampler, at room temperature, for 24 h.

5.3.4.10. System suitability

System suitability tests were performed to ensure that the CE system and the developed method are capable of providing quality data, based on USP 32 requirements [28]. The system suitability was verified through the evaluation of the obtained parameters for the standard solutions of DEL and MAN, such as: theoretical plates, migration time, peak tailing and resolution. These parameters were verified daily, accessed through Agilent Chemstation software.

5.3.5. Results and discussion

5.3.5.1. Optimization of the electrophoretic conditions

In order to significantly reduce the injection-related imprecision and to ensure better reproducibility and greater control over the sample amount injected, the use of an IS in quantitative analysis is generally preferred in CE [29]. Several drugs including nimesulide, cetirizine, hydrochlorothiazide, entecapone and salicylic acid were tested as IS for validation procedures of DEL and MAN. Salicylic acid was selected as IS due to its suitable peak parameters and migration time, and its appropriate absorbance in the selected wavelength. The UV spectra of DEL, MAN and IS in the region between 200 and 300 nm, obtained by PDA detector of the CE system, are shown in Fig. 5.7.

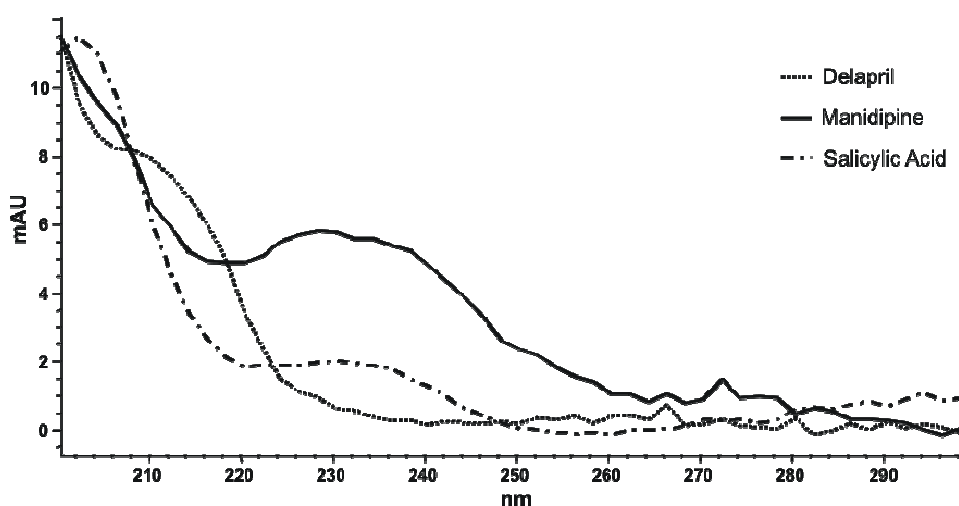


Figure 5.7. Overlay UV absorption spectra of reference substance solution of delapril, manidipine and salicylic acid (60 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$ respectively), obtained by PDA detector of the CE system.

To obtain the optimum CE conditions, several BGE solutions were tested in order to achieve the highest sensitivity, the shortest analysis time, and the best resolution and peak symmetry. Initially, the capillary zone electrophoresis (CZE) condition was tested using different buffer solution such as: sodium phosphate, sodium acetate, tris, sodium tetraborate and boric acid in different concentrations

(25-75 mM) and in the pH range from 3.0-11.0. In all situations, the peak signs were considered inappropriate for simultaneous DEL and MAN analyses. After, the MEKC conditions were tested, and the better results were obtained with borate buffer with addition of SDS as surfactant.

The pH of the BGE solution containing 50 mM of borate buffer and 5 mM SDS was evaluated in the range from 8.0-10.0, and the pH 9.0 was selected, since lower pHs resulted in increase of the migration times and peak width. The effect of BGE concentration was studied in the range from 25 to 75 mM at constant 5 mM SDS concentration at pH 9.0. The migration time increased with the increase of the borate buffer concentration, but the 50 mM borate solution was selected due to a better resolution between the drugs. The influence of the SDS concentration was also investigated in the range from 3 to 7 mM at constant 50 mM borate buffer concentration at pH 9.0. The migration time of DEL and MAN increased with the increase of the SDS concentrations, achieving better efficiency, high sensitivity combined with short analysis time with 5 mM SDS.

Incorporation of organic solvent to the electrolyte solution can lead to improvements in the method selectivity. To investigate the effect of organic modifiers, 5-15% (v/v) concentrations of methanol and acetonitrile were added to the electrolyte solution, but no improvements were observed.

The effect of the voltage was investigated from 15 to 30 kV, which showed shorter analysis time, better separation efficiencies, and higher currents when more than 25 kV was applied. The best peak parameters with acceptable current (about 15 μ A), without excessive Joule heating, led to selection of 25 kV as optimal potential. The capillary temperature was investigated within 15 and 40 °C and the temperature of 35 °C was chosen due to the best resolution of the drugs and the short analysis time. The sample solutions were hydrodynamically injected at 50 mbar changing the injection time between 3 to 8 s, showing increased peak width and deformed shape when 6 s or more were used, so 5 s was selected. The Fig. 5.8 shows the electropherogram obtained from the standard solution of the drugs analysed using the optimized conditions. The capillary with 40 cm of effective length was performed and the total running time was 5 min, with good resolution between the analytes.

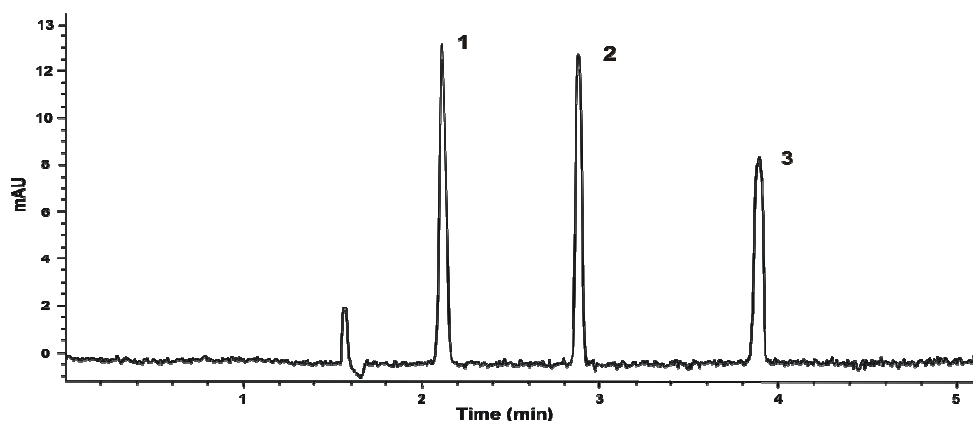


Figure 5.8. MEKC electropherogram of (1) delapril (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (2) salicylic acid (IS) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and (3) manidipine (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) analysed using the capillary with 40 cm of effective length. Peak 1: DEL; 2: IS; 3: MAN.

In the last step of optimization of the electrophoretic conditions, it was observed inadequate separation between DEL peak and the degradation products formed. Several modifications in the pH and concentration of BGE solution, as well as voltage and temperature were tested to separate them properly. In all these tests, an unsuitable resolution was observed. The effect of the different lengths of capillaries was then investigated, and the better separation efficiencies were obtained with 72 cm of effective length. Thus, the method resulted in longer analysis time, when compared with initial capillary (40 cm of effective length) but had adequate resolution between degradation products and DEL, MAN and IS peaks, proving to be effectively stability-indicating. As demonstrated, the optimal conditions of MEKC method were achieved with 50 mM borate and 5 mM SDS solution at pH 9.0 with detection at 208 nm. The electropherogram of DEL and MAN reference substances and IS with migration times of 6.6, 12.0, and 8.8 min, respectively, is shown in Fig. 5.9a.

5.3.5.2. Method validation

5.3.5.2.1. Specificity and forced degradation studies

Forced degradations were performed to provide stability-indicating properties of the analytical method, as no information is available about the potential degradation products. For DEL, the oxidative and photolytic conditions resulted in small decrease of the drug area without any additional peak detected, indicating that the degradation products were not detected by UV detector or not migrated in this system. Under the basic condition, significant decrease of the peak area of DEL was observed with two additional peaks eluted and detected, at 6.7 and 7.9 min. Under the acid condition DEL content exhibited non-significant decrease of the area. Moreover, for MAN, the basic, acid and oxidative conditions resulted in non-significant reduction of the peak area, without any additional peak detected by UV. A significant decrease of the peak area was observed after the photolytic condition without any additional peaks detected by UV. No interference from formulation excipients was found, thus demonstrating that the proposed method is specific for the simultaneous analysis of DEL and MAN. The electropherograms of forced degradation studies are shown in Fig. 5.9.

5.3.5.2.2. Linearity

The analytical curves constructed for DEL and MAN were found to be linear in the 15-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range, respectively. The value of the determination coefficient calculated (r^2) was 0.9966 ($y = 0.0227x + 0.0671$) for DEL and 0.9985 ($y = 0.0403x + 0.0172$) for MAN, indicated the linearity of the analytical curve for the method. The variance analysis ($\alpha = 0.05$) was performed to verify the good fitting of the method and the results showed that no deviation from linearity was revealed for DEL ($F_{\text{calculated}} = 0.65 < F_{\text{critical}} = 3.26$) neither for MAN ($F_{\text{calculated}} = 0.80 < F_{\text{critical}} = 3.26$).

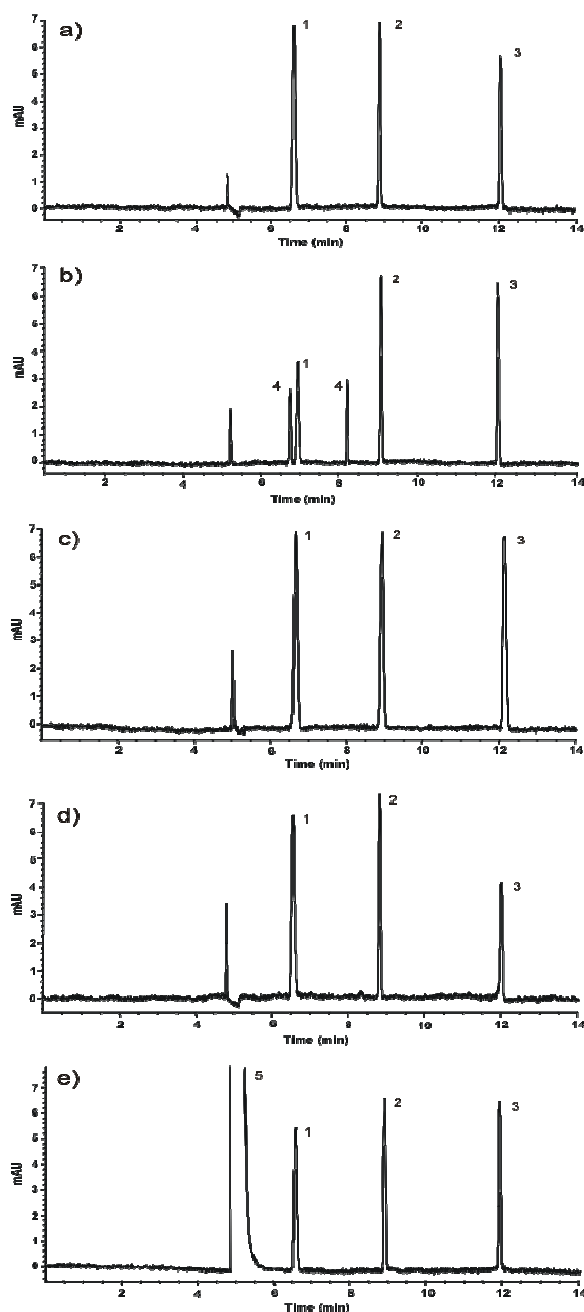


Figure 5.9. MEKC electropherograms of delapril (60 µg/mL), salicylic acid (IS) (10 µg/mL) and manidipine (20 µg/mL) analysed using the capillary with 72 cm of effective length. a) DEL, IS and MAN reference substances solutions. b) after basic hydrolysis; c) after acidic hydrolysis; d) after exposition to UV light; (e) after oxidation. Peak 1: DEL; 2: IS; 3: MAN; 4: degraded forms; 5: hydrogen peroxide preservative.

5.3.5.2.3. Precision

The precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the RSD for six determinations of DEL and MAN, performed on the same day and under the same experimental conditions. The RSD value obtained was 1.81% for DEL and 0.82% for MAN. The inter-day precision was assessed by analyzing six samples on three different days; the values obtained were 1.78% (mean assay result = 100.25%) for DEL and 1.15% (mean assay result = 101.12%) for MAN. Between analysts precision was also conducted by computing results from six samples performed by three analysts; the RSD values were found to be 1.51% (mean assay result = 98.34%) and 1.31% (mean assay result = 99.71%) for DEL and MAN, respectively. These results are summarized in Table 5.6.

Table 5.6. Inter-day and between-analysts precision data of MEKC for delapril and manidipine in samples of pharmaceutical formulation.

Day	Inter-day		Analysts	Between-analysts	
	Concentration found ^a ± SD ^b (µg mL ⁻¹)			Concentration found ^a ± SD ^b (µg mL ⁻¹)	
	Delapril	Manidipine		Delapril	Manidipine
1	29.93 ± 0.54	10.13 ± 0.08	A	29.57 ± 0.51	10.00 ± 0.08
2	30.31 ± 0.57	10.12 ± 0.11	B	29.64 ± 0.33	9.96 ± 0.14
3	29.98 ± 0.51	10.10 ± 0.16	C	29.29 ± 0.48	9.95 ± 0.17
Mean ^c (µg mL ⁻¹)	30.07	10.12		29.50	9.97
Mean assay (%)	100.25	101.12		98.34	99.71
RSD ^d (%)	1.78	1.15		1.51	1.31

^aMean of six replicates

^bSD = Standard deviation

^cMean of eighteen replicates

^dRSD = Relative standard deviation

5.3.5.2.4. Accuracy

The accuracy was assessed from three replicate assays of the three drug levels added to placebo, and the absolute means obtained for both analytes are shown in Table 5.7, with a mean value of 98.94% (bias between -0.17 and -1.66%) for DEL and 100.65% (bias between -1.75 and 1.87%) for MAN, demonstrating that the method is accurate within the desired range.

Table 5.7. Accuracy of MEKC for delapril and manidipine in samples of simulated pharmaceutical formulation.

Drug	Nominal Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mean Concentration found ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
Delapril (60 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	45 (75%)	44.92	2.37	99.82	-0.17
	60 (100%)	59.19	1.06	98.65	-1.35
	75 (125%)	73.75	1.66	98.34	-1.66
Manidipine (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	15 (75%)	15.27	0.75	101.82	1.82
	20 (100%)	20.37	2.16	101.85	1.87
	25 (125%)	24.56	0.44	98.25	-1.75

^aMean of three replicates

^bRSD = Relative standard deviation

^cBias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

5.3.5.2.5. LoD and LoQ

The LoD and LoQ were calculated by using the mean of the slope, 0.0026 ± 0.0005 for DEL and 0.0403 ± 0.017 for MAN, and the standard deviation of the intercept from the independent curves, 0.0165 and 0.0197 for DEL and MAN, respectively. The LoD and LoQ obtained were 2.19 and 7.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for DEL and 1.47 and 4.89 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for MAN.

5.3.5.2.6. Robustness

The Plackett-Burman design selected factors and the obtained response to each experiment are summarized in Table 5.8. The responses are the percentages of DEL and MAN in the commercial tablets (relative to their label claimed concentration) obtained in relation to the standard solutions in each experiment. After the calculation of the effects for each parameter (by the sums of the responses of the positive and negative levels) the statistical interpretation, through the *t*-test, allowed to define what is significant and what is not. No significant factors were revealed for all analyses, as *t*-calculated values were minor than the *t*-critical value ($\alpha = 0.05$). The represented calculated effects and their critical effect are showed in Fig. 5.10. So, there were no significant changes in the assay regarding the percentage of drugs contents under the modifications made in the experimental conditions, showing the robustness of the developed method.

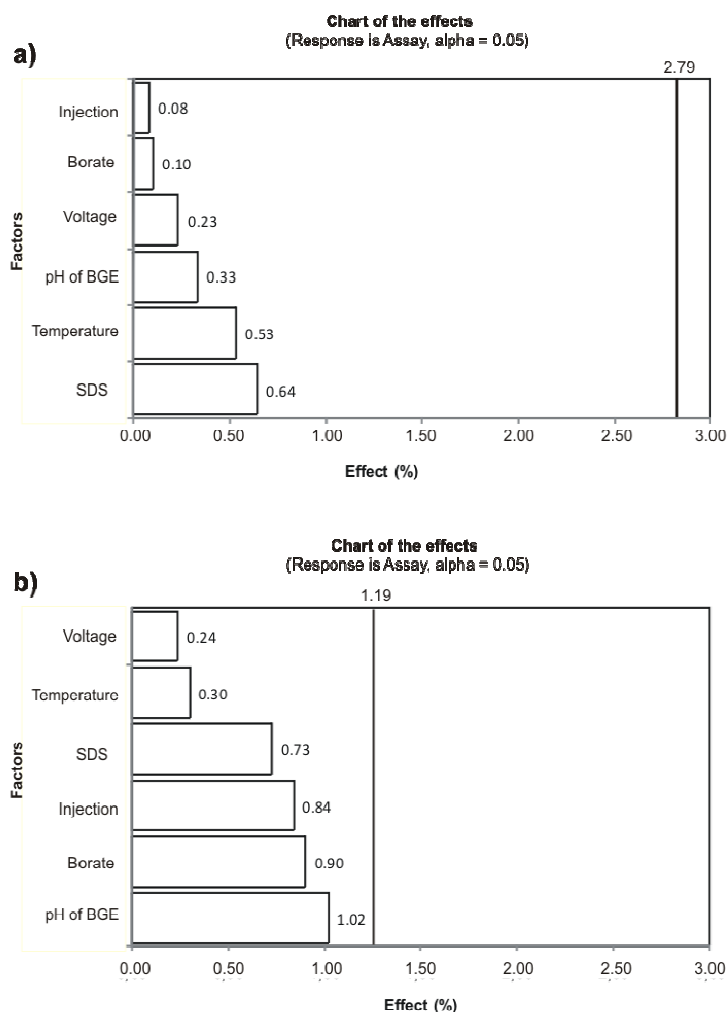


Figure 5.10. Bars charts representing the calculated effects for quantitative determination (assay) of the investigated factors in Plackett-Burman experimental design and their critical effect, represented by the vertical line, for: a) delapril and b) manidipine. The negative effects are represented in module.

Critical Effect (%) = estimate error \times $t_{critical}$.

5.3.5.3. Stability

The stability of the sample assayed for ten hours, under the optimum experimental conditions, was confirmed as no significant change occurred to the signal intensity. The stability of stock solutions was also studied and the data obtained showed no alteration change during 24 h into the autosampler and during 48 h when maintained at 2-8 °C.

Table 5.8. Plackett-Burman experimental design, the obtained response to each experiment and the effects of the investigated factors.

Assay	pH	Dummy	Borate (mM)	SDS (mM)	Dummy	Dummy	Dummy	Temperature	Injecton	Voltage	Dummy	Assay (%) Delapril	Assay (%) Manidipine
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	101.83	100.06
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	98.19	101.70
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	101.82	99.15
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	100.93	99.09
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	100.72	100.71
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	99.98	98.62
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	98.74	98.66
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	98.99	99.03
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	102.22	100.24
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	99.97	101.11
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	100.15	98.45
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	101.99	100.51
E (%) DEL	0.33	-0.21	0.10	0.64	-0.74	-0.41	-0.29	-0.53	0.08	0.23	-2.25		
E (%) MAN	1.02	0.86	0.90	-0.73	0.00	0.20	-0.40	-0.30	-0.84	0.24	-0.37		
t _{calculated} DEL	0.30		0.09	0.59				-0.49	0.07	0.21			
t _{calculated} MAN	2.21		1.94	-1.57				-0.66	-1.82	0.53			
t _{critical}	2.57												

Assay % = quantitative determination of delapril and manidipine

E (%) = calculated effects for quantitative determination

(-) = low factor level

(+) = high factor level

5.3.5.4. System suitability

The analyses of the standard substances were performed during routine under the developed experimental conditions. The approximate values of the parameters for DEL analysis were: migration time of 6.6 min, 37000 theoretical plates and 1.10 for tailing factor. The approximate values of the parameters for MAN analysis were: migration time of 12.1 min, 206000 theoretical plates and 1.15 for tailing factor. The resolution between DEL and IS peaks was 20.2 and between IS and MAN was 32.5. The parameters measured indicate that the system is suitable for the analysis intended.

5.3.5.5. Analysis of Pharmaceutical Formulations by MEKC and LC

The validated MEKC method was applied for the simultaneous determination of DEL and MAN in commercial tablets and the results compared to those obtained using a previously validated LC method. The experimental values obtained from the two methods were compared statistically by Student's *t*-test (Table 5.9), showing non-significant difference ($P = 0.78$ and $P = 0.84$) for DEL and MAN, respectively. Hence, the MEKC developed method can be applied to routine analysis of both drugs in pharmaceutical formulations.

Table 5.9. Student's *t*-test comparing RP-LC and MEKC methods for delapril and manidipine analysis in pharmaceutical formulation.

	MEKC		RP-LC	
	Delapril	Manidipine	Delapril	Manidipine
Assay ^a (mg)	30.23	9.91	30.19	10.05
RSD	0.72	0.59	0.89	0.63
Number of sample	5		5	
<i>t</i> calculated ^{b, c}	0.294		0.210	

^aMean of five replicates

^bDegrees of freedom: 8

^c*t* critical: 2.306

5.3.6. Conclusion

The results discussed show that the stability-indicating MEKC method for DEL and MAN is really specific, accurate and possesses very satisfactory linearity and precision, without any interference from the excipient components and degradation products. The robustness of the method was verified with small variations on pH, concentration of borate buffer solution and SDS, injection time, voltage applied and temperature, using the Plackett-Burman experimental design to examine potential sources of variability. The method has the additional advantages of employing aqueous system rather than the potentially toxic organic solvents, and minimum sample preparation steps. Therefore, the proposed method can be successfully applied for the simultaneous quantitative analysis of DEL and MAN in their pharmaceutical formulations, contributing to the improvement of the quality control of medicines.

5.3.7. Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support and Chiesi Group for the provision of DEL and MAN reference standards.

5.3.8. References

- (1) Wang, T.J., Vasan, R.S. (2005) *Circulation*. **112**, 1651–1662.
- (2) McCormack, P.L., Keating, G.M. (2006) *Drugs*. **66**, 961–969.
- (3) Gaddam, K.K., Verma, A., Thompsn, M., Amin, R., Ventura, H. (2009) *Med. Clin. North Am.* **93**, 527–786.
- (4) De Leeuw, P.W., Kroon, A.A. (1997) *J. Hypertens.* **15**, S39–S42, Supplement 2.
- (5) Kaplan, N.M. (2001) *Am. J. Hypertens.* **14**, 8S–11S.
- (6) Mugellini, A., Vaccarella, A., Celentano, A., Scanferla, F., Zoppi, A., Fogari, R. (2005) *Blood Press.* **14**, 6–13.
- (7) Otero, M.L. (2007) *Vas. Health. Risk Manag.* **3**, 255–263.
- (8) Onoyama, K., Nanishi, F., Okuda, S., Oh, Y., Fujishima, M., Tateno, M., Omae, T. (1988) *Clin. Pharmacol. Ther.* **43**, 242–249.
- (9) Razzetti, R., Acerbi, D. (1995) *Am. J. Cardiol.* **75**, 7F–12F.
- (10) Tateno, M., Nakamura, N. (1986) *Jpn. Pharmacol. Ther.* **14**, 4225–4231.
- (11) Iimura, O., Shimamoto, K. (1993) *Am. Heart. J.* **125**, 635–641.
- (12) Deroubaix, X., Lins, R.L., Lens, S., Allemon, A., Jeanbaptiste, B., Poli, G., Acerbi, D., Stockis, A., Ventura, P. (1998) *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **36**, 386–391.
- (13) Fogari, R. (2007) *Clin. Ther.* **29**, S54–S63, supplement B.
- (14) Jing, J., Ren, W., Chen, X., He, H., Zhou, W., Zhu, X., Sun, Y., Wang, G. (2007) *Biomed. Chrom.* **21**, 836–840.
- (15) Ohkubo, T., Uno, T., Sugawara, K. (1996) *J. Chromatogr. B.* **687**, 413–418.
- (16) Stockis, A., De Bruyn, S., Gengler, C., Goethals, F., Lens, S., Poli, P., Acerbi, D. (2003) *Arzneimittelforschung.* **53**, 554–561.

- (17) Stockis, A., Gengler, C., Goethals, F., Jeanbaptiste, B., Lens, S., Poli, G., Acerbi, D. (2003) *Arzneimittelforschung*. **53**, 627–634.
- (18) Altria, K., Marsh, A., Griend, C.S. (2006) *Electrophoresis*. **27**, 2263–2282.
- (19) Holzgrabe, U., Brinz, D., Kopec, S., Weber, C., Bitar, Y. (2006) *Electrophoresis*. **27**, 2283–2292.
- (20) Holland, L.A., Chetwyn, N. P., Perkins, M. D., Lunte, S. M. (1997) *Pharm. Res.* **14**, 372–388.
- (21) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.
- (22) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A(R2), 2003.
- (23) Dejaegher, B., Heyden, Y.V. (2007) *J. Chromatogr. A*. **1158**, 138–157.
- (24) Zeaiter, M., Roger, J.M., Bellon-Maurel, V., Rutledge, D.N. (2004) *Trends in Anal. Chem.* **23**, 157–170.
- (25) Heyden, Y.V., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G.M., Massart, D.L. (2001) *J. Pharm. Biomedical. Anal.* **24**, 723–753.
- (26) Alsante, K.M., Ando, A., Brown, R., Ensing, J., Hatajik, T.D., Kong, W., Tsuda, Y. (2007) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 29–37.
- (27) Bakshi, M., Singh, S. (2002) *J. Pharm. Biomedical Anal.* **28**, 1011–1040.
- (28) The United States pharmacopeia (2009), USP 32. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, USA.
- (29) Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele E.I. (2004) *Trends Anal Chem.* **23**, 535–552.

6. DISCUSSÃO GERAL

O crescente desenvolvimento de novos fármacos e novas formulações pela indústria farmacêutica faz com que a preocupação com a qualidade e segurança desses produtos aumente na mesma proporção, tornando-se imprescindível a realização de ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo. Nesse contexto, os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, estudos de dissolução e análises de fármacos, quer seja em produtos farmacêuticos, quer em amostras de matrizes biológicas. Nesse sentido, e devido à carência de literatura científica sobre métodos de análise de DEL e MAN, principalmente quando em dose fixa combinada, foram desenvolvidos métodos analíticos com aplicação para o controle da qualidade do produto farmacêutico, estabelecendo bases científicas e tecnológicas com possibilidade de inclusão em compêndios oficiais da área.

A discussão apresentada a seguir refere-se às análises qualitativas para caracterização e identificação dos fármacos e também à determinação quantitativa dos mesmos, baseada nos dois artigos submetidos à publicação, referenciados adequadamente no texto correspondente.

Primeiramente, a caracterização das SQR do DEL e MAN foi realizada utilizando as técnicas de análise térmica por DSC, espectroscopia na região do IV e EM. A utilização da DSC para determinação da pureza de um produto farmacêutico é realizada assumindo que a presença de impurezas diminuirá e alargará a faixa de fusão característica do produto puro (FORD & TINMINS, 1989). A faixa de fusão obtida por DSC foi de 176,08 °C a 185,24 °C para o DEL (Figura 4.1) e 218,57 °C a 226,88 °C para o MAN (Figura 4.2), resultados estes que não estão de acordo com o observado no certificado de análise fornecido pelo fabricante para ambas substâncias (168 °C e 210 °C para o DEL e MAN, respectivamente). Há necessidade, portanto, de estudos complementares, pois a decomposição dos fármacos durante a fusão não permite a utilização do DSC para esta finalidade.

Através da espectroscopia no IV pode-se obter informações estruturais sobre as substâncias em estudo. As absorções das ligações presentes na molécula são determinadas em faixas do espectro na região do IV, por meio da análise de bandas características dos grupos funcionais presentes (PAVIA *et al.*, 2001). A interpretação das bandas de absorção do espectro IV das SQR do DEL (Figura 4.3) e MAN

(Figura 4.4) possibilitou a observação de grupamentos funcionais característicos de cada composto, auxiliando na identificação das mesmas.

O EM é um analisador que permite a determinação qualitativa e quantitativa de vários componentes de uma amostra, sendo muito utilizado para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra. Os espectros obtidos, tanto para o DEL (Figura 4.5) quanto para o MAN (Figura 4.6), demonstraram as massas características dos íons moleculares dos fármacos em base livre, permitindo suas identificações.

Adicionalmente, foram desenvolvidos métodos por CL-FR e EC para identificação dos fármacos nos comprimidos através da comparação dos resultados obtidos para as SQR com os obtidos para as amostras.

A semelhança entre os tempos de retenção (4,3 min para o DEL e 5,4 min para o MAN) obtidos por CL e os tempos de migração (6,6 min para o DEL e 12,0 min para o MAN) obtidos por EC para as soluções das SQR de DEL e MAN e para a solução amostra dos comprimidos (Figura 4.7 e 4.10), bem como a similaridade entre os respectivos espectros no UV obtidos pelos detectores na CL (Figura 4.8 para o DEL e 4.9 para o MAN) e na EC (Figura 4.11 para o DEL e 4.12 para o MAN) permitiram identificar os fármacos na forma farmacêutica.

Paralelamente, desenvolveu-se e validou-se procedimento por CL-FR para a determinação simultânea de DEL e MAN em formulação farmacêutica, conforme apresentado no item **5.2 ARTIGO CIENTÍFICO**.

Durante o desenvolvimento do método, diferentes colunas cromatográficas foram testadas. O método proposto empregou coluna C_8 , de amplo uso em laboratórios de controle de qualidade de medicamentos, que forneceu adequado desempenho cromatográfico, além de proporcionar boa resolução entre os fármacos e os produtos de degradação eventualmente formados durante os estudos de degradação forçada. Também, foram realizados vários testes utilizando diferentes fases móveis, avaliando-se combinações entre solventes orgânicos e soluções tamponantes em diferentes proporções, na faixa de pH entre 3.0 a 7.0. Ótimos resultados foram obtidos com a mistura constituída por acetonitrila e solução de trietilamina 0,3%, pH 3,0 na proporção de 55:45 (v/v), portanto, sem a necessidade

de adição de sais para tamponamento da mesma. Além disso, a fase móvel foi eluída na vazão de 1,2 mL/min, permitindo a determinação qualitativa e quantitativa de uma maneira rápida e eficiente, com tempos de retenção reprodutíveis de aproximadamente 4,3 e 5,4 min para o DEL e MAN respectivamente, boa eficiência (pratos teóricos > 10000) e simetria para os dois compostos (Figura 5.2).

Na avaliação da especificidade obtiveram-se cromatogramas nos quais os sinais dos produtos de degradação encontraram-se resolvidos em relação aos sinais dos fármacos (Figuras 5.3 e 5.4) e sem interferência dos excipientes da formulação. Através da utilização do DAD, verificou-se que os compostos permaneceram com elevada pureza em todas as determinações, demonstrando especificidade e que o procedimento também pode ser usado para avaliação da estabilidade. Além disso, com o objetivo de identificar os rompimentos das moléculas e possíveis rotas de degradação dos fármacos, as amostras degradadas, após serem submetidas a condições de estresse, foram analisadas por EM e então comparadas com os espectros obtidos de DEL e MAN SQR (Figura 5.5). Os dois fármacos obtiveram adequada ionização por ESI+, entretanto os produtos de degradação observados nos espectros não foram identificados efetivamente, possivelmente devido a não ionização dos mesmos, tornando necessários estudos mais aprofundados com este intuito.

A linearidade foi validada na faixa de concentração de 3 - 120 µg/mL ($r^2 = 0,9997$) para o DEL e 1 - 40 µg/mL ($r^2 = 0,9998$) para o MAN, não apresentando desvio do modelo linear ($P > 0,05$). Os dados obtidos para a precisão apresentaram DPR inferiores a 1,67% para os dois fármacos (Tabela 5.2), o que mostra a precisão do método proposto, considerando-se adequados valores de DPR menor ou igual a 2%. O valor médio experimental do teste de exatidão foi de 99,13% para o DEL e 98,61% para o MAN, demonstrando exatidão adequada, pois o valor percentual aceito é de $100 \pm 2\%$ em relação ao valor conhecido. A robustez do método foi avaliada utilizando-se o desenho experimental proposto por Plackett-Burman, através da modificação de fatores tais como o pH, composição e vazão da fase móvel, coluna cromatográfica e temperatura a que foi mantida (Tabela 5.1). Os resultados demonstraram não haver diferença significativa ($\alpha = 0,05$) nas determinações quantitativas dos fármacos (Tabela 5.4).

Concluiu-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura, podendo ser empregado para análise simultânea de DEL e MAN.

Paralelamente, para determinação simultânea de DEL e MAN em produtos farmacêuticos, desenvolveu-se e validou-se método por EC, conforme apresentado no item **5.3 ARTIGO CIENTÍFICO**.

São vários os parâmetros que devem ser cuidadosamente estabelecidos no desenvolvimento de método por EC, dentre eles, a escolha correta do eletrólito (concentração e força iônica), adição de modificador orgânico, pH da solução e o comprimento do capilar são os fatores determinantes, além do tempo de injeção da amostra, temperatura de análise e tensão aplicada. A utilização do tensoativo SDS para a otimização do modo de separação por MEKC, do tampão borato e de um capilar de 40 cm de comprimento efetivo possibilitaram a obtenção de picos reproduzíveis, simétricos e resolvidos (Figura 5.8). Com o intuito de minimizar a variação do sistema de injeção e garantir uma boa reprodutibilidade dos resultados, vários fármacos foram testados para serem empregados como PI, incluindo cetirizina, entecapona, hidroclorotiazida, nimesulida, entre outros, e os melhores resultados foram obtidos com a utilização do ácido salicílico, apresentando adequada solubilidade no diluente utilizado e resolução em relação aos picos dos fármacos.

Na avaliação da especificidade do método não foi observada interferência dos excipientes da formulação nas análises, entretanto, durante os estudos de degradação forçada, observou-se inadequada resolução entre o sinal do DEL e os produtos formados após exposição dos fármacos à condição alcalina. Após testar diferentes parâmetros que influenciam diretamente na análise eletroforética, ótima separação foi obtida com a utilização de um capilar de 72 cm de comprimento efetivo (Figura 5.9). Dessa forma o método resultou em maior tempo de análise, com tempos de migração de 6,6; 12,0 e 8,8 min para o DEL, MAN e PI, no entanto, utilizando o DAD, verificou-se elevada pureza em todas as determinações, demonstrando a especificidade do método e sua aplicabilidade para avaliação da estabilidade dos fármacos.

O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 15 - 150 µg/mL ($r^2 = 0,9966$) para o DEL e 5 - 50 µg/mL ($r^2 = 0,9985$) para o MAN, com desvio da linearidade não significativo ($P > 0,05$). A metodologia mostrou-se precisa apresentando valores de DPR inferiores a 1,87% (Tabela 5.6) e exata, com média de recuperação de 99,94% e 100,65% para o DEL e MAN, respectivamente (Tabela 5.7). Da mesma forma que o método por CL, utilizou-se o desenho experimental proposto por Plackett-Burman para avaliação da robustez. Os valores de teor observados para o DEL e MAN não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$) (Tabela 5.5 e 5.8 e Figura 5.10), demonstrando que o método é robusto nas condições testadas. Desse modo, demonstrou-se que o método proposto cumpre os requisitos de validação, estando de acordo com os parâmetros de qualidade preconizados.

Com o objetivo de estabelecer uma comparação e verificar a capacidade de utilizar indistintamente os métodos propostos, realizou-se a análise estatística comparativa entre resultados da determinação quantitativa simultânea de DEL e MAN em amostras de comprimidos obtidos pelos métodos cromatográfico e eletroforético (Tabela 5.9). Através do teste *t* de Student observou-se diferença não significativa ($\alpha = 0,05$) entre os mesmos, demonstrando, portanto, que os métodos são intercambiáveis e adequados para análises de controle da qualidade. Contudo, deve-se salientar algumas diferenças que podem ser determinantes na escolha dos mesmos para introdução nas análises de rotina. Verificou-se que a EC possui vantagens, tais como a pequena quantidade de amostra necessária e o reduzido uso de solventes, minimizando a geração de resíduos e periculosidade ao operador, além de ser um método de baixo custo, pois utiliza capilares não onerosos (principalmente se comparados às colunas cromatográficas). Em contrapartida, a CL possui a vantagem de ser um método mais rápido para verificação e monitoramento da estabilidade dos fármacos em comparação ao método por EC, podendo ser facilmente utilizada na indústria farmacêutica já que é uma técnica amplamente difundida neste meio.

No que se refere aos estudos preliminares de estabilidade, os resultados obtidos possibilitaram verificar a instabilidade do DEL após exposição à condição alcalina, inclusive observando-se sinais dos produtos de degradação formados tanto

no método cromatográfico quanto eletroforético. Por outro lado, a instabilidade do MAN foi constatada após exposição à condição fotolítica, observando-se sinal apenas no método por CL. No entanto mais estudos são necessários para caracterizar a suscetibilidade dos fármacos a estas condições e identificação desses produtos.

Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho constituem-se, portanto, em procedimentos importantes para o controle da qualidade de medicamentos contendo DEL e MAN, contribuindo para garantir a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponíveis no País.

7. CONCLUSÕES

- O método por EM mostrou-se adequado para a identificação das SQR de delapril e manidipino, enquanto a espectroscopia no IV possibilitou a identificação dos principais grupamentos funcionais presentes nas moléculas dos fármacos;
- Os métodos por CL e EC mostraram-se adequados para a identificação dos fármacos na forma farmacêutica;
- O método desenvolvido e validado por CL, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se específico, sensível, linear, preciso, exato e robusto para identificação e análise quantitativa simultânea de delapril e manidipino em comprimidos, sugerindo sua aplicação para a área de controle da qualidade;
- O método desenvolvido e otimizado por EC, utilizando modo MEKC, cumpriu os parâmetros de validação preconizados para métodos analíticos e apresenta-se como alternativa na determinação dos fármacos em comprimidos, além de produzir baixos níveis de resíduos tóxicos, promovendo benefícios à saúde pública e ao meio ambiente;
- Os métodos validados por CL e por EC podem ser aplicados em estudos de estabilidade do delapril e manidipino, pois possibilitam separação com resolução adequada das substâncias ativas e dos produtos de degradação formados;
- A análise estatística comparativa dos métodos propostos para a determinação quantitativa de delapril e manidipino demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) dos resultados obtidos, caracterizando, portanto, a intercambialidade dos mesmos.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando os resultados obtidos até o momento e a visualização de possibilidades de estudos mais aprofundados sobre os fármacos, além da existência de poucos trabalhos na literatura sobre os mesmos, as propostas para continuidade do trabalho são:

- Desenvolver e validar método analítico por espectrofotometria UV-derivada para determinação simultânea de delapril e manidipino na formulação farmacêutica;
- Desenvolver e validar método analítico por CL acoplada à espectrometria de massas para determinação simultânea de delapril e manidipino na formulação farmacêutica;
- Desenvolver e validar método de dissolução, buscando, se possível, o estabelecimento de uma correlação entre os dados *in vivo* e os obtidos *in vitro*;
- Realizar o isolamento e identificação dos possíveis produtos de degradação formados em determinadas condições de estresse.

9. REFERÊNCIAS

ALSANTE, K.M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T.D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 29-37, 2007.

ALTRIA, K.D. *Capillary electrophoresis Guidebook*. Totowa: Humana Press, 1996.
ALTRIA, K.D.; KELLY, M.A.; CLARK, B.J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 17, n. 4, p. 204-214, 1998.

ALTRIA, K.D. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 856, p. 443-463, 1999.

BACHELI, S.; DEGLI, E.D.; ALBERRICI, M. Effects of the combination of different doses of manidipine and delapril in hypertensive patients. *American Journal of Hypertension*, v. 15, p. 45-46, 2002.

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

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. *Fisiologia*. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. *Diário Oficial da União*, Brasília, Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. *Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade*. *Diário Oficial da União*, Brasília, Poder Executivo, de 01 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Hipertensão arterial sistêmica*, 2006.

CARSTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. *Drug Stability Principles and Practices*. 3ed. Revised and Expanded, Ed. Marcel Dekker, New York, 2000.

CORRÊA T.D.; NAMURA, J.J.; SILVA, C.A.P.; CASTRO, M.G.; MENECHINI, A.; FERREIRA, C. Systemic hypertension: latest information on its epidemiology, diagnosis and treatment. *Arquivo de Medicina*, v. 31, p. 91-101, 2005.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas, SP: Ed. da UNICAMP, 2006.

DE LAURENTIS, N.; LOSACCO, V.; MILILLO, M.A.; ZARRILLI, A. Spectrophotometric determination of manidipine dihydrochloride based on formation of charge-transfer complex with iodine. *Bollettino chimico farmaceutico*, v. 140, n. 1, p. 15-9, 2001.

DE LEEUW, P.W.; KROON, A.A. Fixed low-dose combination of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel blocker drug in the treatment of essential hypertension. *Journal of Hypertension*, v. 15, p. S39-S42, Supplement 2, 1997.

DEROUBAIX, X.; LINS, R.L.; LENS, S.; ALLEMON, A.; JEANBAPTISTE, B.; POLI, G.; ACERBI, D.; STOCKIS, A. Single dose pharmacokinetics of manidipine in hepatic impaired and healthy controls. *International Journal of Clinical Pharmacology Therapy*, v. 36, p. 386-391, 1998.

DONG, M.W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2006.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part 1: An integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 755-767, 2001.

ERMER, J.; MILLER, J.H.M. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, p. 101-119.

FDA. Food and Drug Administration. Reviewer Guidance: *Validation of chromatographic methods*. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), November, 1994.

FOGARI, R. *et al.* Efficacy of delapril in the treatment of mild to moderate essential hypertension: evaluation by 24-hour ambulatory blood pressure monitoring. *Advances in Therapy*, v. 14, p. 254-261, 1997.

FOGARI, R. Rationale for Use of the Fixed Combination of Delapril and Manidipine in the Treatment of Hypertension in Patients with Diabetes Mellitus. *Clinical Therapeutics*, v. 29, p. S54-S63, supplement B, 2007.

FORD, J.; TINMINS, T. *Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and Applications*. New York: Ellis Hor Wood Limited, 1989. p.108-135.

HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.; MASSART, D. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 723-753, 2001.

HOUSTON, M.C. *Handbook of Hypertension*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2009.

ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: *Guideline on Stability Testing of New Drug Substance and Products Q1(R2)*, 2003.

ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: *Guideline on validation of analytical procedure: Text and Methodology*, 2005.

ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: *Guideline on impurities in new drug substances*, 2006.

IIMURA, O.; SHIMAMOTO, K.; SAPPORO, M.D. Efficacy and mode of action of manidipine: a new calcium antagonist. *American Heart Journal*, v. 125, p. 635-641, 1993.

IOELE, G.; DE LUCA, M.; OLIVERIO, F.; RAGNO, G. Prediction of photosensitivity of 1,4-dihydropyridine antihypertensives by quantitative structure-property relationship. *Talanta*, v. 79, n. 5, p. 1418-1424, 2009.

JING, J.; REN, W.; CHEN, X.; HE, H.; ZHOU, W.; ZHU, X.; SUN, Y.; WANG, G. Determination and pharmacokinetics of manidipine in human plasma by HPLC/ESIMS. *Biomedical Chromatography*, v. 21, p. 836-840, 2007.

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

KANNEL, W. B. Elevated Systolic Blood Pressure as a Cardiovascular Risk Factor. *The American journal of cardiology*, v. 81, p. 251-255, 2000.

KEARNEY, P.M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P.K.; HE, J. Global Burden of hypertension: Analysis of worldwide data. *Lancet*, v. 365, p. 217-223, 2005.

Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005;365(9455): 217-223.

KOHLMANN, O; RIBEIRO, A.B. Manidipina no tratamento da hipertensão arterial essencial estágio I e II do paciente com sobrepeso ou obesidade andróide. Estudo multicêntrico brasileiro de eficácia, tolerabilidade e efeitos metabólicos. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 77, p. 463-70, 2001.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, p. 857-868, 1999.

KOVALSKI, P. *et al.* Comparative evaluation between capillary electrophoresis and High-performance liquid chromatography for analysis of florfenicol in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 39, n. 5, p. 983-989, 2005.

LAKSHMI, S.; MANIKANDAN, K.; VENKATESAN, M.; LAKSHMI, K. S. Quantitative analysis of Manidipine dihydrochloride in bulk and synthetic mixtures by visible spectrophotometry. *Journal of Young Pharmacists*, v. 1, n. 2, p. 175-179, 2009.

MATHKAR, S; KUMAR, S.; BYSTOL, A.; OLAWOORE, K.; MIN, D.; MARKOVICH, R.; RUSTUM, A. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 49, p. 627-631, 2009.

MORIMOTO. S.; MATSUMURA, Y. *Cardiovascular Drug Reviews*. v. 9, p. 207-222, 1991.

MATOS, J.R.; MERCURI, L.P.; BARROS, G. *Análise Térmica Aplicada a Fármacos e Medicamentos*. Biofarmacotécnica. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

MATTHEUS, B.R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, p. 831-856, 1999.

MIELCAREK, J.; SZAMBURSKA, O. Inclusion Complexes of Manidipine with α -Cyclodextrin and Identification of Photodegradation Products. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 52, p. 195-200, 2005.

MIELCAREK, J.; OSMAŁEK, T.; KRUSZYŃSKA, M. Photodegradation Products of New Dihydropyridine Derivatives. *Chromatographia*, v. 69, p. 503-506, 2009.

MIELCAREK, J.; GROBELNY, P.; OSMALEK, T. Indigotine, azorubine, and cochineal red as photoprotectors of manidipine. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 36, n. 3, p. 302-306, 2010.

MINAMISAWA, K.; SHIONOIRI, H.; SUGIMOTO, K.; UEDA, S.; ASHINO, K.; EBINA, T.; GOTOH, E.; ISHII, M. Depressor effects and pharmacokinetics of single and consecutive doses of delapril in hypertensive patients with normal or impaired renal function. *Cardiovascular drugs and therapy*, v. 4, n. 5, p. 1417-1423, 1990.

MIYABAYASHI, T.; YAMASHITA, K.; AOKI, I.; MOTOHASHI, M.; YASHIKI, T.; YATANI, K. Determination of manidipine and its pyridine metabolite in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and column switching. *Journal of Chromatography B*, v. 494, p. 209-17, 1989.

MORZUNOVA, T.G. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 40, p. 158-170, 2006.

MUGELLINI, A.; VACCARELLA, A.; CELENTANO, A.; SCANFERLA, F.; ZOPPI, A.; FOGARI, R. Fixed combination of manidipine and delapril in the treatment of mild to moderate essential hypertension: Evaluation by 24-hour ambulatory blood pressure monitoring. *Blood Pressure*, v. 14, p. 6-13, 2005.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5362115&loc=ec_rcs> Acesso em 26/10/2010.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=150762&loc=ec_rcs> Acesso em 26/10/2010.

NUDELMAN, N.S. *Estabilidade de Medicamentos*. 1ed. Buenos Aires: El Atheneo, 1975, pp. 5 – 22.

OATES, J.A. *et al.* Goodman & Gilman. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

OHKUBO, T.; UNO, T.; SUGAWARA, K. Liquid chromatographic determination of manidipine in serum with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, v. 687, p. 413-418, 1996.

ONOHAMA, K.; NANISHI, F.; OKUDA, S.; OH, Y.; FUJISHIMA, M.; TATENO, M.; OMAE, T. Pharmacokinetics of a new angiotensin I converting enzyme inhibitor (delapril) in patients with deteriorated kidney function and in normal control subjects. *Clinical Pharmacology Therapy*, v. 43, p. 242-249, 1988.

OKA, Y.; NISHIKAWA, K.; KITO, G.; MAYAHARA, H.; TANAYAMA, G.; MUTO, H.; HIRAGA, K. *Cardiovascular Drug Reviews*. v. 6, p. 192-205, 1988.

OTERO, M.L. Manidipine – Delapril combination in the management of hypertension. *Vascular Health and Risk Management*, v. 3, p. 255-263, 2007.

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

RAGNO, G.; AIELLO, F.; GAROFALO, A.; IOELE, G.; SINICROPI, M.S. Multivariate least squares regression applied to the spectrophotometric analysis of manidipine and its main photoproduct. *Il Farmaco*, v. 58, p. 909-915, 2003.

RAO, R.N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 335-377, 2003.

RAZZETTI R., ACERBI, D. Pharmacokinetic and pharmacologic properties of delapril, a lipophilic nonsulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor. *American Journal of Cardiology*, v. 75, 7F - 12F, 1995.

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, p. 771-780, 2004.

ROSILLON, D.; STOCKIS, A.; POLI, G.; ACERBI, D.; LINS, R.; JEANBAPTISTE, B. Food effect on the oral bioavailability of Manidipine: single dose, randomized, crossover study in healthy male subjects. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, v. 23, n. 2, p. 197-202, 1998.

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.

SANTORO, M.I.R.M.; PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.36, n.1, p.97-107, 2000.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G.A.; LOUGH, W.J.; ARAIN, S.A.; BRADSHAW, T.K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 30, p. 311-333, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. *Spectrometric identification of organic compounds*. 7ed. John Wiley & Sons Inc., 2005.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8ed. Belmont: Brooks/Cole- Thompson Learning, 2004.

Sociedade Brasileira de Cardiologia; Sociedade Brasileira e Hipertensão; Sociedade Brasileira de Nefrologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 89, n.3, p. 24-79, 2007.

STOCKIS, A.; DE BRUYN, S.; GENGLER, C.; GOETHALS, F.; LENS, S.; POLI, P.; ACERBI, D. Pharmacokinetics and tolerability of a new manidipine and delapril fixed oral combination in young and elderly subjects. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, v. 53, p. 554-561, 2003.

STOCKIS, A.; GENGLER, C.; GOETHALS, F.; JEANBAPTISTE, B.; LENS, S.; POLI, G.; ACERBI, D. Single oral dose pharmacokinetic interaction study of manidipine and delapril in healthy volunteers. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, v. 53, p. 627 – 634, 2003.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, v. 2, p. 12-20, 1998.

STAESSEN, J.A.; WANG, J.; BIANCHI, G.; BIRKENHAGER, W.H. Essential hypertension. *The Lancet*, v. 361, p.1629-1641, 2003.

TSUKASA, U.; TADASHI, O.; KAZUNOBU, S. Enantioselective high performance liquid chromatographic determination of manidipine in human plasma. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 22, n. 8, p. 1117-1128, 1999.

TATENO, M.; NAKAMURA, N. Clinical pharmacokinetics of CV-3317. *Japanese Pharmacology Therapy*, v. 14, p. 4225-4231, 1986.

TAVARES, A. Biologia Molecular na Hipertensão Arterial. *Atualização Terapêutica - Manual Prático de Diagnóstico e Tratamento*. 22ed. São Paulo: Artes Médicas. p. 938-939, 2005.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Química Nova*, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Química Nova*, v.20, n.5, p. 493-511, 1997.

USP 32. The United States Pharmacopoeia. 32ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2009.

WATSON, G.D. *High pressure liquid chromatography*. Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. London: Churchill Livingstone, 2005, p. 237-276.

WÄTZIG, H.; GÜNTER, S. Capillary electrophoresis – A high performance analytical separation technique. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 46, n. 6, p. 724-738, 2003.

WENDHAUSEN, A.L.P.; REBELLO, B.C. As concepções de saúde - doença de portadores de hipertensão arterial . *Ciência, Cuidado e Saúde*, v. 3, p. 243-251, 2004.

WHITWORTH, J.A. World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of Hypertension*, v. 21, n. 11, p.1983-1992, 2003.

YAMAGUCHI, M.; YAMASHITA, K.; AOKI, I.; TABATA, T.; HIRAI, S.; YASHIKI, T. Determination of manidipine enantiomers in human serum using chiral chromatography and column-switching liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 575, p. 123-129, 1992.

ZANCHETTI A. Current positions of calcium antagonist in hypertension. *Journal of Hypertension*, v. 14, p. S11-S15,1996.