

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Carbonato de Iodenafila: controle de qualidade do fármaco

Tamara dos Santos Castilhos

Porto Alegre, Junho de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Carbonato de Iodenafila: controle de qualidade do fármaco

Tamara dos Santos Castilhos
Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Profª Drª Ana Maria Bergold
Orientadora
Leonardo Zanchetti Meneghini
Co-orientador

Porto Alegre, Junho de 2010

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Ana Maria Bergold, pelo estímulo, orientação, atenção, esclarecimentos e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao mestrando Leonardo Zanchetti Meneghini, pelo auxílio e pelas discussões produtivas no andamento do trabalho.

Aos colegas do LAPPS pela convivência e amizade.

À minha família pelo amor, apoio e incentivo, fundamentais na minha trajetória.

RESUMO

Carbonato de lodenafila: controle de qualidade do fármaco

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade persistente de obter e manter uma ereção firme o suficiente para permitir um desempenho sexual satisfatório. A projeção de um milhão de novos casos anualmente no Brasil aumenta a importância desse distúrbio na saúde pública. Os inibidores seletivos da fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5i) são considerados agentes de primeira escolha para o tratamento desse distúrbio. O carbonato de lodenafila é um novo PDE-5i, que possui poucas publicações, sendo estas relacionadas a estudos farmacológicos. Esse trabalho visa a contribuir com o controle qualitativo e quantitativo da matéria-prima de carbonato de lodenafila, sugerindo métodos para caracterização da amostra e determinação do teor de pureza. A substância química de referência (SQR) foi avaliada por testes físico-químicos (faixa de fusão, pKa e espectrofotometria no IV e no UV) e testes quantitativos como perda por dessecação volumétrica em meio não-aquoso e espectrofotometria na região do UV. Os ensaios qualitativos empregados constituem-se em métodos seguros e rápidos para identificação do fármaco estudado. Os métodos quantitativos investigados apresentaram-se práticos e simples, embora ainda não estejam validados.

Palavras-chave: Carbonato de lodenafila; controle de qualidade; VMNA; Espectrofotometria no UV.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO.....	6
2.1 DISFUNÇÃO ERÉTIL.....	6
2.2 INIBIDORES DA FOSFODIESTERASE TIPO 5.....	6
2.3 CARBONATO DE LODENAFILA.....	7
2.3.1 Descrição.....	8
3. OBJETIVOS.....	9
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1 MATÉRIA-PRIMA.....	10
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	10
4.2.1 Caracteres físicos.....	10
4.2.2 Constantes físico-químicas.....	10
4.2.2.1 Ponto de fusão.....	10
4.2.2.2 Constante de ionização ácido-base (pKa).....	11
4.2.3 Identificação.....	11
4.2.3.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV).....	11
4.2.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	12
4.2.4 Determinação de umidade.....	12
4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	13
4.3.1 Investigação da viabilidade da análise quantitativa por volumetria em meio não-aquoso (VMNA).....	13
4.3.2 Espectrometria na região do UV.....	14

4.3.2.1 Otimização do método.....	14
4.3.2.1.1 Preparo da solução estoque da SQR.....	14
4.3.2.1.2 Preparo das soluções diluídas.....	15
4.3.2.1.3 Investigação da estabilidade da solução estoque e das soluções diluídas de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	15
4.3.2.2 Análise quantitativa do carbonato de lodenafila SQR.....	16
4.3.2.4.1 Curva de calibração.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRI-PRIMA.....	18
5.1.1 Caracteres físicos.....	18
5.1.2 Constantes físico-químicas.....	18
5.1.2.1 Ponto de fusão.....	18
5.1.2.2 Constante de ionização ácido-base (pKa).....	19
5.1.3 Identificação.....	19
5.1.3.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV).....	19
5.1.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	21
5.1.4 Determinação da umidade.....	22
5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	23
5.2.1 Investigação da viabilidade da análise quantitativa por volumetria em meio não-aquoso (VMNA).....	23
5.2.2 Espectrometria na região do UV.....	24
5.2.2.1 Otimização do método.....	24
5.2.2.1.1 Investigação da estabilidade da solução estoque e das soluções diluídas de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	26
5.2.2.2 Curva de calibração do carbonato de lodenafila.....	27
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS.....	32

1.INTRODUÇÃO

A disfunção erétil (DE), também conhecida como impotência sexual masculina, é definida como a incapacidade persistente (por no mínimo 6 meses) de obter e manter uma ereção firme o suficiente para permitir um desempenho sexual satisfatória (ABDO *et al.*, 2006, NEVES *et al.*, 2004). Depois da ejaculação precoce, este é o comprometimento mais comum da função sexual masculina, afetando cerca de 30 milhões de indivíduos apenas nos Estados Unidos (NEVES *et al.*, 2004).

A prevalência de disfunção erétil entre homens de 40 a 70 anos no Brasil foi estimada em torno de 46,2% e se projeta o aparecimento de cerca de 1 milhão de novos casos por ano (GALVÃO *et al.*, 2007). Estudos demonstram que, embora a incidência da DE esteja associada à idade, não é um resultado inevitável do processo de envelhecimento (MOREIRA *et al.*, 2003). A identificação de fatores de risco médicos e comportamentais é essencial para a prevenção da DE. A projeção de um milhão de novos casos anualmente no Brasil aumenta a importância desse distúrbio na saúde pública (MOREIRA *et al.*, 2003; ABDO *et al.*, 2006).

O tratamento medicamentoso oral, eficaz em até 80% dos casos, consagrou-se como a principal opção terapêutica de pacientes com disfunção erétil (CARÁ *et al.*, 2003). Dentre os medicamentos estão antagonistas alfaadrenérgicos, agonista serotoninérgico, agonista dopaminérgico e inibidores da fosfodiesterase 5 (CARÁ *et al.*, 2003; NEVES *et al.*, 2004). Os inibidores da fosfodiesterase 5 foram introduzidos no mercado em 1998, através da comercialização da sildenafil e desde então vêm sendo eficientemente utilizados para o tratamento da DE. Também surgiram no mercado a vardenafila, tadalafila, udenafila, mirodenafila, avanafila e a lodenafila. Esses fármacos se assemelham no mecanismo de ação e nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (KONSTANTINOS, 2009; EARDLEY *et al.*, 2010).

O carbonato de lodenafila, um novo inibidor PDE5 desenvolvido no Brasil, sendo um dímero formado por duas moléculas de lodenafila ligadas por uma ponte de carbonato, teve registro concedido em 22 de outubro de 2007, com a conseqüente autorização do Ministério da Saúde para sua comercialização em todo

o território nacional (ABIQUIF, 2008). Produzido pelo laboratório paulista Cristália, o Helleva[®] é vendido em duas apresentações: dois e quatro comprimidos de 80 mg.

Este fármaco apresenta poucas publicações, sendo estas relacionadas a estudos farmacológicos (GALVÃO *et al.*, 2007; TOQUE *et al.*, 2007; GLINA *et al.*, 2009), porém, não existem estudos publicados quanto à determinação quantitativa, tanto como matéria-prima quanto na forma farmacêutica de comprimidos. Também são inexistentes monografias a respeito do produto. Por isso, são sugeridos nesse estudo métodos qualitativos e quantitativos, visando a contribuir para o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse medicamento.

2. REVISÃO

2.1 DISFUNÇÃO ERÉTIL (DE)

O processo fisiológico da ereção envolve a liberação de óxido nítrico (NO) dos corpos cavernosos do pênis, mediada pelo sistema parassimpático. O NO se liga aos receptores da enzima guanilato ciclase, o que resulta no aumento dos níveis de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) nas células da musculatura lisa peniana (SINGH *et al.*, 2009). Isto leva à ativação da proteína quinase dependente de cGMP (PKG), à fosforilação de várias proteínas e à redução de cálcio celular, levando ao relaxamento da musculatura lisa vascular seguido do aumento do fluxo sanguíneo e, portanto, uma ereção (EARDLEY *et al.*, 2010).

Segundo o *National Institute of Health*, as disfunções eréteis (DE) são 75% de causas orgânicas com prevalência comportamental próxima aos 100%. As lesões vasculares representam 70% das DE's de causas orgânicas. A obesidade e a dislipidemia são as principais prevalências associadas à disfunção erétil e à doença arterial coronariana, se comparadas com diabetes, hipertensão e o tabagismo (MILFONT & CUNHA, 2007).

O tratamento para a DE, cuja escolha é dependente da causa e da intensidade da mesma, pode ser através de mudança de hábitos, psicoterapia ou farmacoterapia (MILFONT & CUNHA, 2007), sendo a última a terapia inicial para muitos homens com DE. Os medicamentos aplicados para essa disfunção são divididos em agentes locais (como a papaverina injetáveis) e agentes sistêmicos (como os inibidores da fosfodiesterase tipo 5) (EARDLEY *et al.*, 2010).

2.2 INIBIDORES DA FOSFODIESTERASE TIPO 5 (PDE-5i)

Os PDE-5i melhoram a função erétil durante a estimulação sexual, penetrando nas células da musculatura lisa e inibindo a PDE-5, que é uma enzima

que degrada a cGMP. Isso resulta na diminuição da degradação de cGMP e, conseqüentemente, na manutenção dos níveis elevados de cGMP nas células dos corpos cavernosos. Isso promove o relaxamento do músculo liso, que dilata o corpo sinusóide, resultando em aumento do fluxo sanguíneo, permitindo que ocorra uma ereção. O êxito dessa reação é dependente do nível de cGMP no corpo cavernoso e da eficiência do relaxamento da musculatura lisa do tecido (EARDLEY *et al.*, 2010).

As estruturas moleculares dos PDE-5i possuem um sistema de anel duplo heterocíclico contendo nitrogênio. Essa estrutura do anel central é semelhante ao da cGMP (Figura 1) e compete com a PDE-5 pelo mesmo sítio catalítico (CARSON, 2007).

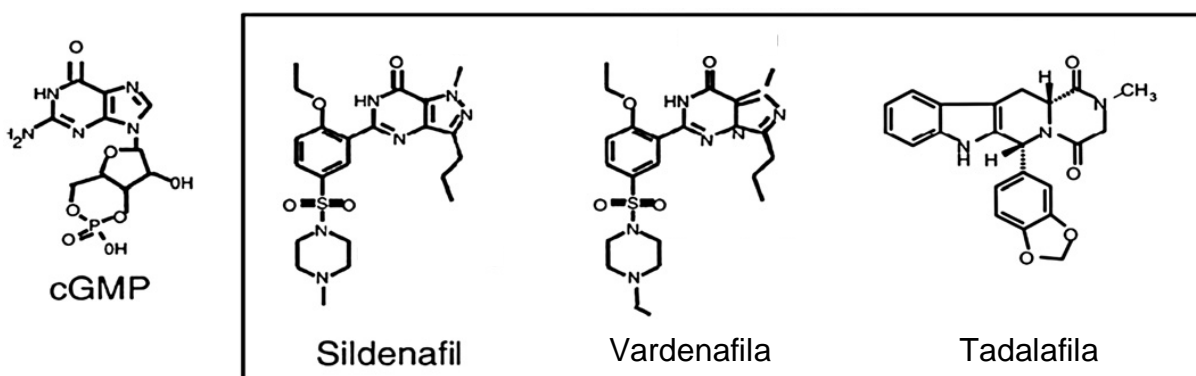


Figura 1: Estruturas moleculares de alguns inibidores da PDE-5 (CARSON, 2007).

2.3 CARBONATO DE LODENAFILA

O carbonato de lodenafila (CL) é um dímero que atua como pró-fármaco, pois, quando ingerido, é metabolizado por hidrólise no plasma onde sofre cisão na ponte carbonato, liberando monômeros de lodenafila, os quais são metabolizados por enzimas hepáticas e plasmáticas (GALVÃO *et al.*, 2007, GLINA *et al.*, 2009). A dimerização reduz a polaridade da molécula, permitindo melhor absorção (TOQUE *et al.*, 2007).

A potência da lodenafila oriunda da clivagem do CL *in vitro*, para relaxamento de corpo cavernoso humano previamente contraído com fenilefrina, foi superior à obtida para a sildenafil, promovendo maior relaxamento com menor concentração

(GALVÃO *et al.*, 2007). Em estudos clínicos, realizados até fase III, o novo PDE-5i, apresentou melhora significativa da disfunção erétil, além de baixa incidência de reações adversas (GLINA *et al.*, 2009, GLINA *et al.*, 2010).

2.3.1 Descrição

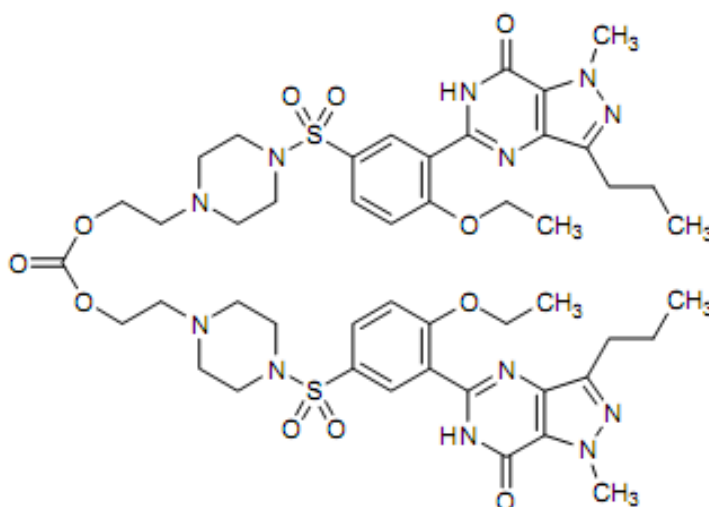


Figura 2: Fórmula estrutural do carbonato de Iodanafila (WHO, 2005).

Fórmula molecular: $C_{47}H_{62}N_{12}O_{11}S_2$

Massa molecular: 1035,35

Chemical Abstract Service (CAS): 398507-55-6 (WHO, 2005).

Nome químico: carbonato de bis-(2-{4-[4-etoxi-3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidina-5-il)-benzenesulfonil]piperazina-1-il}-etil)(TOQUE *et al.*, 2007).

Segundo especificações do fabricante, o fármaco possui aspecto de um pó amorfo branco ou levemente amarelado. É solúvel em clorofórmio e insolúvel em etanol absoluto e água (CRISTÁLIA, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Contribuir com o controle qualitativo e quantitativo da matéria-prima de carbonato de lodenafila, propondo métodos para caracterização da amostra e determinação do teor.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar a substância química de referência através da determinação do ponto de fusão, constante de ionização ácido-base (pKa), análise espectrofotométrica na região do infravermelho (IV) e do ultravioleta (UV) e determinação da umidade através da perda por dessecação;
- ✓ Investigar a viabilidade da aplicação do método de titulação de neutralização por volumetria em meio não-aquoso com ácido perclórico para determinação quantitativa do carbonato de lodenafila matéria-prima.
- ✓ Desenvolver método quantitativo por UV para determinação do carbonato de lodenafila matéria-prima.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

O carbonato de lodenafila (CL), com teor declarado de 100,50% (lote 0414/09, Val.: 09/11), utilizado como substância química de referência (SQR), foi gentilmente cedido pela empresa Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, assim como a matéria-prima lote 0751/08 (teor: 100,54%, Val.: 08/09).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

4.2.1 Caracteres físicos

Aspecto e cor do fármaco foram avaliados conforme especificações descritas no laudo fornecido pela empresa.

4.2.2 Constantes físico-químicas

4.2.2.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão do carbonato de lodenafila foi verificado através de três determinações em dois equipamentos:

- Equipamento segundo Koffler (REICHERT), em que pequena quantidade do fármaco é adicionada entre lâmina e lamínula e estas são colocadas sobre uma placa metálica aquecida. A temperatura é controlada por um reostato e a amostra é observada através de um microscópio. A temperatura de fusão é

então determinada pela observação simultânea da amostra e do termômetro acoplado à placa metálica aquecida. Para a calibração, foram utilizadas a cafeína (Mettler ME- 18872 A.4.96 Calibration Substance com ponto de fusão 236,5 °C) e a fenolftaleína (padrão secundário com ponto de fusão 262,1 °C).

- Equipamento automático METTLER TOLEDO FP90, onde o fármaco é adicionado em tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento, os quais são introduzidos verticalmente no equipamento, sendo possível a determinação simultânea de até 3 amostras. A velocidade de aquecimento é programada para 2 °C/min na faixa de temperatura situada entre 10 °C abaixo e 10 °C acima do ponto de fusão previsto. Para a calibração foram utilizados a cafeína (Mettler ME- 18872 A.4.96 Calibration Substance com ponto de fusão 236,5 °C), SQR que acompanha o equipamento, e a fenolftaleína (padrão secundário, com ponto de fusão 262,1 °C).

4.2.2.2 Constante de ionização ácido-base (pKa)

O pKa foi investigado com auxílio do aplicativo Virtual Computational Chemistry Laboratory através do ACD / PhysChem Suite, um conjunto abrangente de ferramentas que prediz propriedades físico-químicas básicas, a partir da estrutura química informada.

4.2.3 Identificação

4.2.3.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido utilizando-se pastilhas de brometo de potássio contendo, respectivamente, SQR e matéria-prima. A análise foi realizada em espectrofotômetro Perkin Elmer BX FIT-IR System SN 79302, empregando-se os parâmetros instrumentais descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros instrumentais para análise dos SQR e matéria-prima por espectrofotometria na região do IV.

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

4.2.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A identificação do carbonato de lodenafila por espectrofotometria na região do UV foi realizada com de soluções de SQR e de matéria-prima de 20 µg.mL⁻¹ de carbonato de lodenafila com pH 4, preparadas conforme item 4.3.2.1.2. Os espectros de UV foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico, entre 400 e 200 nm.

4.2.4 Determinação de umidade

Alíquotas de cerca de 0,6 g de amostra foram exatamente pesadas em pesa-filtros previamente dessecados. Estes foram levados à estufa com temperatura ajustada em 105 °C até peso constante. Após, o conjunto foi transferido para dessecador, onde foram mantidos até arrefecimento. A seguir, foram pesados novamente e a perda foi calculada.

Como alternativa, foi investigado outro método, no qual alíquotas de cerca de 0,5 g de amostra, exatamente pesadas em pesa-filtros pré-tratados, foram levadas a estufa com temperatura ajustada em 50 °C a pressão reduzida (-260 mmHg) até peso constante. Esse método foi adaptado a partir do indicado para amostras que possuem ponto de fusão menor que 105 °C (F. Bras. IV), a fim de investigar a viabilidade de usar massa de amostra menor do que a preconizada nos compêndios oficiais.

As determinações foram realizadas em estufa Tecnal TE-395 (0 a 320 °C e 0 à -760 mmHg) em duplicata.

4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA

4.3.1 Investigação da viabilidade da análise quantitativa por volumetria em meio não-aquoso (VMNA)

Nesse estudo, a SQR foi solubilizada com ácido acético e anidrido acético, em diferentes proporções, e titulada com ácido perclórico 0,05 M preparado em ácido acético. O ponto final da titulação de neutralização foi visualizado com auxílio do indicador verde malaquita SI ou violeta cristal SI, preparados em meio acético.

Devido ao coeficiente de expansão cúbica em relação à água, apresentado pela maioria dos solventes orgânicos, que resulta em uma variação da normalidade do titulante em função da temperatura, utilizou-se a seguinte equação para correção do volume gasto:

$$V_c = V [1 + (t_1 - t_2) \cdot 0,0011]$$

onde:

V_c = volume corrigido

V = volume gasto, tendo sido descontado o volume do branco

t_1 = temperatura ambiente por ocasião da padronização do titulante

t_2 = temperatura ambiente por ocasião do doseamento

0,0011 = coeficiente de expansão cúbica o ácido acético glacial

A estequiometria entre a molécula do carbonato de lodenafila e o ácido perclórico em diversas normalidades (0,1 e 0,05M) foi investigada, considerando o peso molecular da substância.

4.3.2 Espectrofotometria na região do UV

4.3.2.1 Otimização do método

Testes de solubilidade da SQR foram realizados, a fim de definir o preparo da solução estoque e visualizar as possibilidades de investigação das influências dos solventes e, conseqüentemente, do pH no comportamento do carbonato de lodenafila, através de análise dos espectros obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC na região do ultravioleta (200-400 nm). O hidróxido de sódio 0,1 M mostrou-se o solvente mais adequado e eficaz frente aos demais solventes avaliados (água, metanol e ácido clorídrico 0,1 M), por isso, foi utilizado no preparo da solução estoque.

4.3.2.1.1 Preparo da solução estoque da SQR

A solução estoque foi preparada utilizando quantidade adequada de carbonato de lodenafila, exatamente pesada, a qual foi solubilizada com hidróxido de sódio 0,1 M em balão volumétrico, de modo a obter uma solução com concentração final de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3.2.1.2 Preparo das soluções diluídas

Soluções diluídas de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de carbonato de lodenafila foram preparadas a partir de quantidades adequadas da solução estoque de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em meio alcalino e ácido, conforme Tabela 2.

Os balões foram completados com água destilada. Todas as soluções sofreram verificação do valor do pH com auxílio de um peagômetro Denver, modelo UB10.

Tabela 2: Preparo das soluções diluídas em meio alcalino e ácido.

Meio	Volume de solução estoque (mL)	Balão Volumétrico (mL)	Quantidade de ácido acético glacial (mL)	Concentração final ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Alcalino (pH 12)	20	100 mL contendo 50mL de H_2O	-	20
	10	100 mL contendo 50mL de H_2O	-	10
Ácido (pH 4)	20	100 mL contendo 50mL de H_2O	0,4	20
	10	100 mL contendo 50mL de H_2O	0,2	10

4.3.2.1.3 Investigação da estabilidade da solução estoque e das soluções diluídas de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

As soluções estoque e diluídas de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em meios alcalino e ácido, em duplicata, foram analisadas quantitativamente em espectrofotômetro na região do ultravioleta, 290 nm, empregando-se cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico, durante 17 dias. Durante o estudo, as soluções foram armazenadas sob refrigeração (2 a 8 °C).

4.3.2.2 Análise quantitativa do carbonato de lodenafila SQR

A análise quantitativa foi realizada por espectrofotometria no UV, após a escolha do melhor solvente e comprimento de onda (item 4.2). Para garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a

confiabilidade dos resultados, foi avaliado um dos parâmetros essenciais para a validação do método: a linearidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 31, 2008).

Sete níveis de concentração foram avaliados em três diferentes dias. A partir das três curvas de SQR desenvolvidas, a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. A linearidade do método foi verificada através da análise de variância (ANOVA).

4.3.2.4.1 Curva de calibração

Alíquotas da solução estoque (SQR) de $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de carbonato de lodenafila, preparada segundo item 4.2.1, foram transferidas, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 50 mL, aos quais foram adicionadas quantidades adequadas de ácido acético glacial para obtenção de pH 4, conforme Tabela 3. O volume foi ajustado com água destilada, resultando em concentrações finais de 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0 e $35,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Foram realizadas três leituras para cada solução, utilizando como branco uma solução aquosa de NaOH 0,02 M acidificada com ácido acético glacial, para obtenção do pH 4. A curva foi obtida a partir dos valores das absorvâncias em função das concentrações de carbonato de lodenafila nas soluções correspondentes, obtendo-se o coeficiente de correlação e a equação da reta.

Tabela 3: Alíquotas de solução estoque de $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de carbonato de lodenafila e ácido acético glacial necessárias para cada nível de concentração da curva padrão.

$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Volume de solução estoque (mL)	Volume de ácido acético glacial (mL)
5,0	2,5	0,05
10,0	5,0	0,10
15,0	7,5	0,15
20,0	10,0	0,20
25,0	12,5	0,25
30,0	15,0	0,30
35,0	17,5	0,35

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

5.1.1 Caracteres físicos

O fármaco apresenta-se como pó branco com grãos muito pequenos nos dois lotes analisados, resultado que indica conformidade com a especificação apresentada no laudo do fornecedor.

5.1.2 Constantes físico-químicas

5.1.2.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão do carbonato de lodenafila foi determinado em dois equipamentos de acordo com o item 4.2.2.1. As médias obtidas para três determinações do ponto de fusão do fármaco são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Valores obtidos para o ponto de fusão do carbonato de lodenafila.

Equipamento	Média (°C)	DPR (%)
Koffler (Reichert)	248,3	0,62
Mettler Toledo FP 90	248,0	0,45

Observou-se que em temperatura acima de 105 °C ocorre alteração da substância em estudo, apresentada na forma de gotículas castanhas, o que pode interferir na análise em equipamentos que determinam o ponto de fusão por medidas de transmitância. Esse comportamento pode levar a um resultado equivocado.

5.1.2.2 Constante de ionização ácido-base (pKa)

A constante de ionização ácido-base (pKa) foi calculada considerando temperatura abaixo de 25 °C e força iônica nula em meio aquoso. Os valores obtidos foram 7,2 e 8,3 a um nível de confiança de 95%.

5.1.3 Identificação

5.1.3.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A espectrofotometria no IV é ensaio de identificação por excelência (F. Bras. IV). A análise espectrofotométrica da SQR e da matéria prima na região do infravermelho foi realizada de acordo com o item 4.2.3.1 e o espectro está ilustrado na Figura 3.

As bandas de absorção características do fármaco e as possíveis atribuições, com base em bibliografia de referência (PAVIA *et al.*, 2009; SILVERSTEIN *et al.*, 2007), encontram-se na Tabela 5.

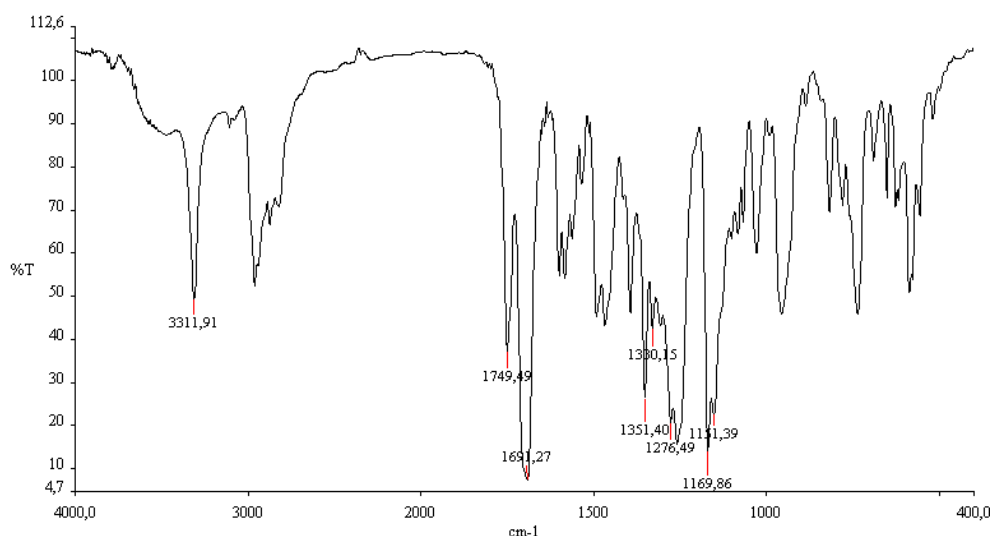


Figura 3: Espectro de absorção na região do IV para o carbonato de lodenafila (SQR) em KBr (4000 a 400 cm^{-1}).

Tabela 5: Freqüências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para o carbonato de lodenafila.

Freqüência (cm ⁻¹)	Atribuições *
3311,91	Vibração de deformação axial de amina secundária
1749,49	Vibração de deformação axial de C=O de éster alifático
1691,27	Vibração de deformação axial de C=O de amidas
1351,40 e 1330,15	Vibração de deformação axial assimétrica de S=O de sulfonas (SO ₂)
1276,49	Vibração de deformação axial de C-N de amina aromática
1169,86 e 1151,39	Vibração de deformação axial simétrica de S=O de sulfonas (SO ₂)

*PAVIA *et al.*, 2009; SILVERSTEIN *et al.*, 2007.

A Figura 4 apresenta a comparação dos espectros na região do infravermelho (4000 a 400 cm⁻¹) obtidos para os lotes 0414/09 (SQR) e 0751/08 (matéria-prima) de carbonato de lodenafila. As principais bandas de absorção, características do fármaco, estão presentes em ambos os lotes não havendo diferenças entre os espectros.

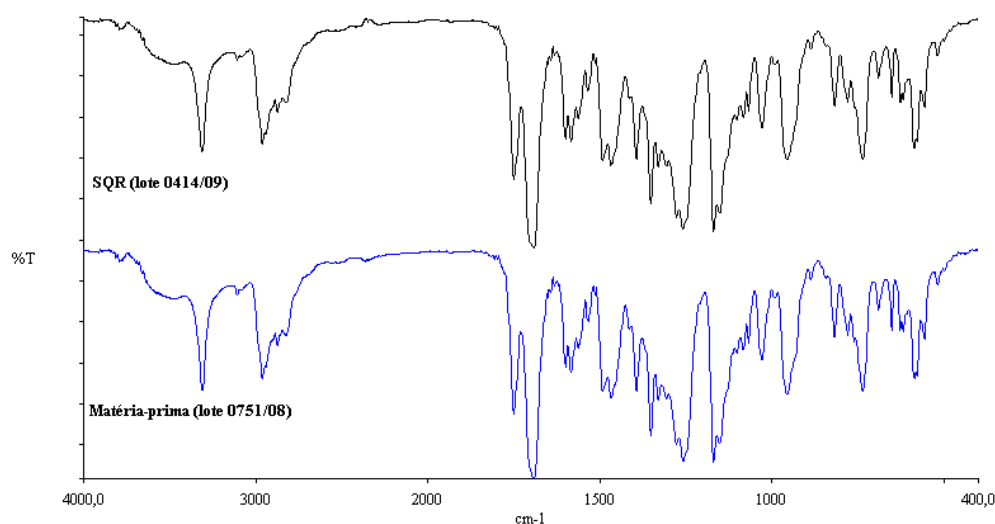


Figura 4: Espectros de IV para os lotes 0414/09 (SQR) e 0751/08 (matéria-prima) de carbonato de lodenafila em KBr (4000 a 400 cm⁻¹).

5.1.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A análise espectrofotométrica das soluções de carbonato de lodenafila SQR e matéria-prima na região do UV foi realizada conforme descrito no item 4.2.3.2.

Os espectros obtidos com as soluções de carbonato de lodenafila ($20\mu\text{g.mL}^{-1}$) em meio ácido na região do ultravioleta estão ilustrados na Figura 5. O carbonato de lodenafila apresenta máximos de absorção nos comprimentos de onda próximos a 225 e 292 nm no meio empregado no estudo.

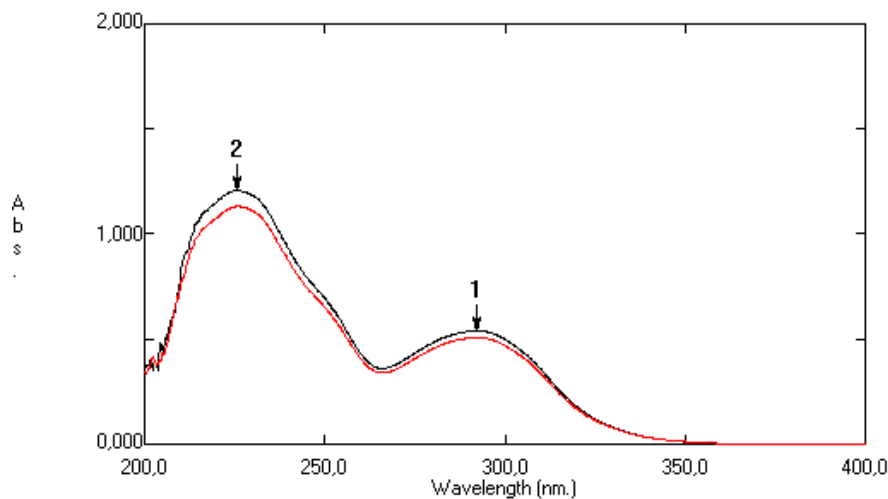


Figura 5: Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria na região do UV para carbonato de lodenafila em meio ácido: SQR (—) e amostra de matéria-prima (—).

Os espectros obtidos para análise do carbonato de lodenafila SQR e matéria-prima por espectrofotometria na região do UV apresentam o mesmo perfil, apontando a mesma identidade para ambas as soluções. Esse método pode ser usado adequadamente para identificar matérias-primas quando realizado concomitantemente a outros métodos de identificação.

5.1.4 Determinação da umidade

A água está presente em muitos fármacos como água absorvida, solvente ou como água de cristalização e seu teor deve ser determinado, a fim de avaliar a conformidade frente aos limites especificados para o fármaco. Os métodos oficiais mais utilizados são o volumétrico, pelo processo de Karl-Fischer, e o gravimétrico.

Devido à incompatibilidade de fármacos que possuem grupamento carbonato com o titulante empregado no primeiro método, a determinação de umidade na matéria-prima do carbonato de lodenafila foi realizada através da perda por dessecação. Esse método consiste em dessecar o fármaco, a fim de eliminar quaisquer substâncias voláteis presentes na amostra (F. Bras. IV). Por tratar-se de um método muito simples, pode ser utilizado como alternativa na determinação de umidade de vários fármacos, desde que estes não sejam termolábeis.

A SQR foi submetida aos ensaios de acordo com o item 4.2.4. A determinação gravimétrica avalia a quantidade de substância volátil presente na amostra. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Teor de água da SQR de carbonato de lodenafila determinado por métodos gravimétricos.

Método	Tempo (h)	Teor de água (%)*	DPR (%)
50 °C (Pressão reduzida)	3	0,65	0,76
105 °C (Pressão normal)	2	0,64	25,65

*Média obtida para duas replicatas.

Os teores encontrados para ambos os métodos foram em conformidade com a especificação apresentada pelo fornecedor (máximo 1%), apesar da imprecisão apresentada para o método farmacopéico (105 °C) representada pelo alto valor de DPR. Esse valor pode ser atribuído à baixa quantidade de amostra utilizada em cada replicata, não obedecendo à alíquota mínima de 1 g preconizada pelas farmacopéias.

5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA

5.2.1 Investigação da viabilidade da análise quantitativa por volumetria em meio não-aquoso (VMNA)

A titulação em meio não-aquoso é o procedimento mais comum entre os métodos farmacopéicos para ensaios em amostras com caráter ácido ou básico muito fraco, que, conseqüentemente, não podem ser doseados em meio aquoso (WATSON, 2005; F. Bras. IV). Além de permitir o uso de solventes orgânicos apropriados para a solubilização da amostra, esse método é muito rápido, exato (F. Bras. IV) e não requer confronto da amostra com padrões primários para determinação do teor.

Com base em estudos preliminares realizados a fim de conhecer a relação estequiométrica entre o ácido perclórico e o carbonato de lodenafila e os pK_a s determinados foi verificado que são necessários 4 moles de titulante para neutralizar um mol de CL. As relações encontradas foram as seguintes:

7,72 mL de HClO_4 0,05 M equivalem a 100 mg de CL

1 mL de HClO_4 0,05 M equivale a 12,95 mg de CL

A partir da relação acima, foram usados diferentes misturas de solventes, a fim de distinguir aquele que proporcionaria melhores resultados (Tabela 9), com auxílio do indicador cristal violeta. O ácido acético em uma proporção de 100%, além dos baixos teores, apresentou precipitação, dificultando a visualização do ponto final da reação. A adição de anidrido acético ao ácido acético na proporção de 1:1 solucionou o problema da precipitação e aumentou a sensibilidade do método, apresentando o melhor resultado.

Tabela 9: Resultados obtidos por VMNA do carbonato de lodenafila com diferentes misturas de solventes.

Solvente	Proporção	Teor (%)
ácido acético	1	92,36
ácido acético: anidrido acético	3:7	94,63
ácido acético: anidrido acético	1:2	96,60
ácido acético: anidrido acético	4:1	97,04
ácido acético: anidrido acético	1:1	98,00

O solvente considerado mais adequado foi empregado em análises com outro indicador: verde malaquita. O teor encontrado foi de 96,8%, considerando a mudança de cor de azul para verde escuro como ponto de viragem, diferindo do obtido com indicador cristal violeta (98,0%, n=3) com viragem detectada pela mudança de violeta para verde esmeralda. Embora ambos os métodos tenham apresentado teores abaixo do declarado, o indicador cristal violeta mostrou-se o mais adequado por apresentar mudança de cor mais facilmente perceptível.

Tendo em vista que os teores encontrados por VMNA não correspondem ao teor informado pelo fabricante, um método para análise de carbonato de lodenafila por espectrofotometria na região do ultravioleta foi iniciado.

5.2.2 Espectrofotometria na região do UV

5.2.2.1 Otimização do método

As soluções diluídas de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em meios alcalino e ácido, preparadas conforme item 4.3.2.1.2, foram analisadas na região do UV entre 200 e 400 nm, obtendo-se o espectro apresentado na Figura 6. Nele é possível observar que o pico em meio ácido, em 292 nm, se mostra mais intenso quando comparado ao obtido em meio alcalino na mesma região. Além disso, o meio alcalino apresenta dois picos pouco definidos nas regiões de 226 e 212 nm, enquanto o meio ácido possui apenas um pico em 227 nm.

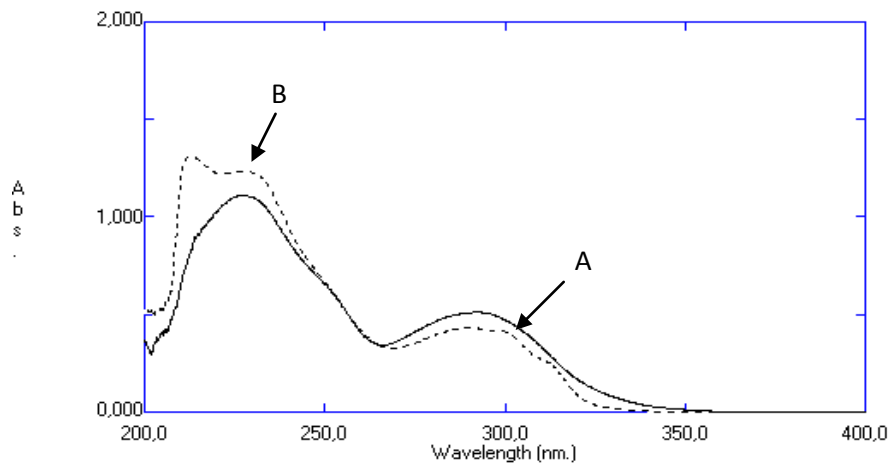


Figura 6: Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria de UV para soluções aquosas de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de carbonato de lodenafila: A (ácida) e B (alcalina); 400 a 200 nm.

Frente ao comportamento do meio alcalino, as soluções diluídas de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram avaliadas nas mesmas condições, a fim de elucidar o perfil do carbonato de lodenafila na região entre 250 e 200 nm. Conforme Figura 7, não há diferenças entre os perfis obtidos para as duas concentrações, indicando que o meio ácido se mostra mais adequado em ambas as regiões investigadas.

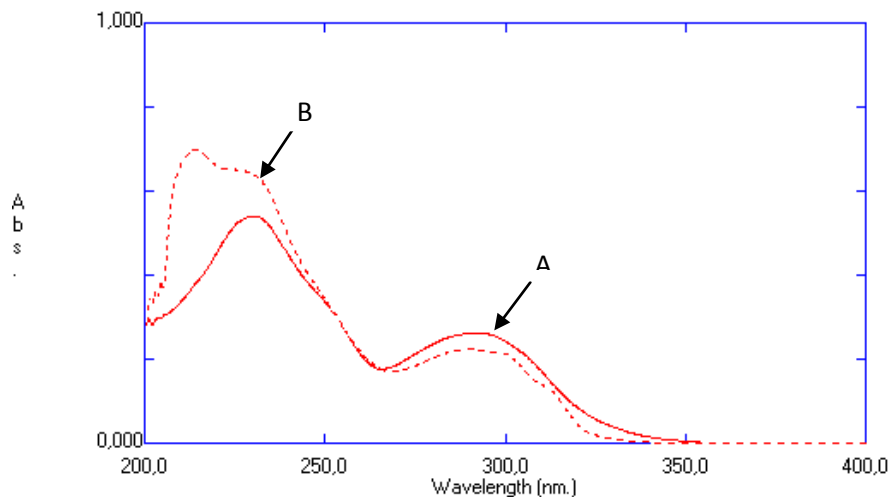


Figura 7: Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria na região UV, para soluções de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de carbonato de lodenafila: A (ácida) e B (alcalina); 400 a 200 nm.

A fim de escolher entre as duas regiões de maior absorvância, diversas soluções diluídas de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio ácido foram lidas nas mesmas condições instrumentais, variando apenas o tempo de leitura após a preparação das mesmas.

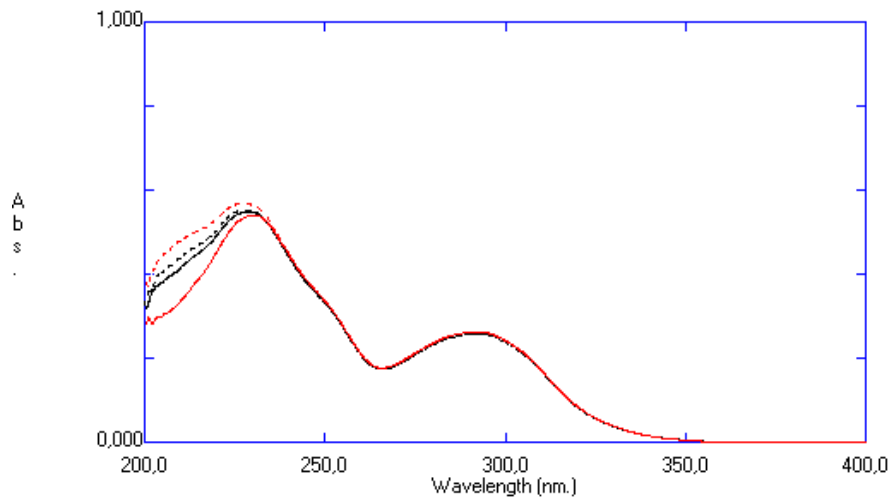


Figura 8: Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria na região UV, para soluções de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de carbonato de lodenafila em meio ácido; 400 a 200 nm.

Comparando os espectros obtidos (Figura 8), nota-se que o carbonato de lodenafila em meio ácido não apresenta absorvância reproduzível na região próxima a 227 nm. Portanto, a região entre 290 e 292 nm apresenta-se como a mais indicada para análise da substância em estudo por espectrofotometria na região do UV.

5.2.2.1.1 *Investigação da estabilidade da solução estoque e das soluções diluídas de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$*

Para a solução estoque de SQR, apesar de esta apresentar absorvância mais intensa na região entre 250 e 200 nm (Figura 9), não houve diferença significativa entre as absorvâncias observadas nesta região e as obtidas em 290 nm. Com um nível de confiança de 99%, segundo o teste estatístico ANOVA, a solução é estável por 17 dias, armazenada entre 2 e 8 °C.

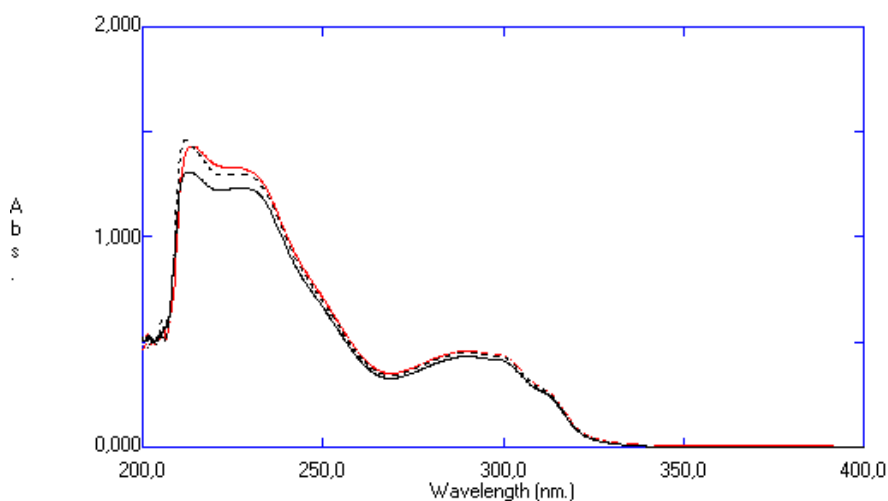


Figura 9: Comparação entre os espectros obtidos por espectrofotometria de UV para soluções aquosas alcalinas de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de carbonato de lodenafila, preparadas a partir de solução estoque: t=0 (—), t=7 dias (---) e t=17 dias (—); 400 a 200 nm.

Na análise das soluções diluídas, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos em meio alcalino após 17 dias de estudo. Também em meio ácido, os valores são semelhantes com nível de confiança variável (95 – 99%), segundo teste estatístico ANOVA. Com base nesses dados, é possível escolher ambos os meios quanto à estabilidade da solução diluída de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de carbonato de lodenafila no máximo de absorvância em 290 nm.

Confrontando os resultados obtidos nos itens 5.2.2.1 e 5.2.2.1.1, o meio ácido foi escolhido para ser usado nos demais estudos, por ser estável e apresentar maior absorvância em 292 nm.

5.2.2.2 Curva de calibração do carbonato de lodenafila

A partir de soluções de carbonato de lodenafila SQR nas concentrações de 5,0 a $35,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em água e acidificadas com ácido acético glacial (item 4.3.2.4.1), foram construídas três curva padrão.

A Tabela 8 apresenta os valores de absorvância obtidos para cada concentração da curva padrão.

Tabela 8: Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do carbonato de Iodenafila por UV.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorvância ^a	Absorbância média \pm e.p.m. ^b	DPR ^c
5,0	0,1306 0,1291 0,1294	0,1297 \pm 0,0005	0,61
10,0	0,2635 0,2602 0,2604	0,2614 \pm 0,0011	0,71
15,0	0,3930 0,3860 0,3910	0,3900 \pm 0,0021	0,92
20,0	0,5240 0,5119 0,5211	0,5190 \pm 0,0036	1,22
25,0	0,6539 0,6408 0,6511	0,6486 \pm 0,0040	1,06
30,0	0,7864 0,7697 0,7822	0,7794 \pm 0,0050	1,12
35,0	0,9142 0,8980 0,9119	0,9080 \pm 0,0051	0,97

^aResultados de três determinações em dias diferentes; ^berro padrão da média (e.p.m.); ^cdesvio padrão relativo (DPR).

A curva padrão para o método UV foi construída a partir das sete concentrações analisadas em três dias diferentes e está representada na Figura 10 juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

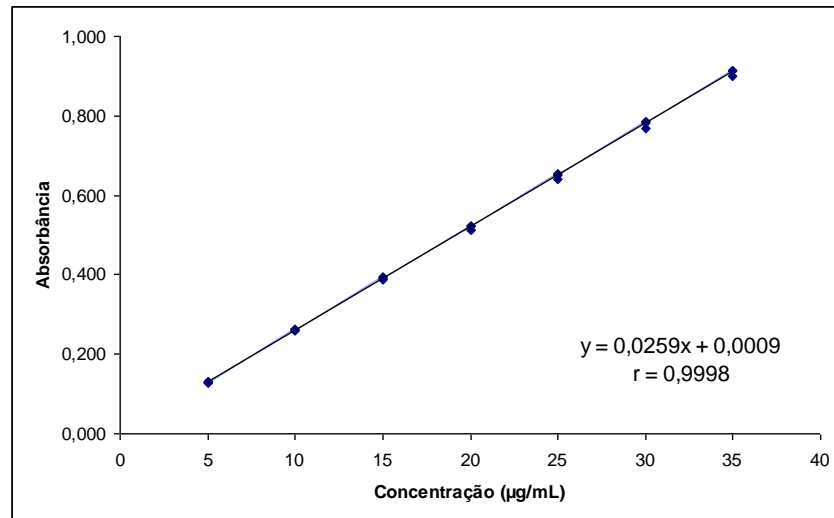


Figura 10: Representação gráfica da curva padrão média do carbonato de lodenafila para UV.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por UV (Tabela 9) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ($r = 0,9998$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as absorvâncias e as concentrações do fármaco.

Tabela 9: Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do carbonato de lodenafila SQR.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F (calculado)*	F (tabelado)
ENTRE (Tratamentos)	6	1,41159	0,23527	6402,28	2,85
Regressão linear	1	1,25282	1,25282	43034,3	4,60
Desvio da linearidade	5	0,00002	0,00000	0,00672	2,96
DENTRO (resíduo)	14	0,00051	0,00004	-	-
Total	20	1,41211	-	-	-

*Nível de significância para um valor de $p < 0,05$

Uma vez obtida a curva padrão e fazendo a posterior validação do método, amostras de carbonato de lodenafila poderão ser avaliadas pelo mesmo. Considerando que o método ainda não foi validado e que o lote de matéria-prima

(lote 0751/08) já estava com seu prazo de validade expirado, não foi realizado doseamento do mesmo por espectrofotometria no UV.

6. CONCLUSÃO

- A avaliação dos caracteres físicos da matéria-prima, (ponto de fusão, pKa) permitiram a caracterização do fármaco.
- A identificação da matéria-prima do carbonato de lodenafila foi possível através das análises espectrofotométricas na região do IV e do UV.
- A perda por dessecação da matéria-prima analisada está de acordo com o laudo fornecido pelo fabricante, para ambos os métodos investigados, mesmo com a limitação imposta pela quantidade de amostra disponível.
- O método desenvolvido por volumetria em meio não-aquoso mostrou-se adequado para aplicação em análise quantitativa da matéria-prima de carbonato de lodenafila.
- O método espectrofotométrico demonstrou linearidade para análise quantitativa da matéria-prima em um intervalo de 5,0 a 35,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de carbonato de lodenafila.

7. REFERÊNCIAS

ABIQUIF - Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica. Um olhar sobre o mundo, n.76, 2008. Disponível em: <http://www.abiquif.org.br/publicacoes/umolhar/um_olhar_76.pdf> Acesso em: 30/04/2010.

ABDO, C. H. N.; OLIVEIRA JR., W. M.; SCANAVINO, M. T.; MARTINS, F. G. Disfunção erétil - resultados do estudo da vida sexual do brasileiro. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.52, n.6, p. 424-429, 2006.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003.

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

CARSON, C. C. Phosphodiesterase type 5 inhibitors: state of the therapeutic class. **Urol Clin N Am**, v. 34, p. 507-515, 2007.

CRISTÁLIA PRODUTOS. QUIMICOS. FARMACÊUTICOS. Certificado de análise n. 356.892, São Paulo, 2009.

EARDLEY, I.; DONATUCCI, C.; CORBIN, J.; EL-MELIEGY, A.; HATZIMOURATIDIS, K.; MCVARY, K.; MUNARRIZ, R.; LEE, S. W. Pharmacotherapy for Erectile Dysfunction. **Journal of Sexual Medicine**, v.7, p. 524-540, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988-2005.

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

GLINA, S.; TOSCANO, I.; GOMATZKY, C.; DE GÓES, P. M.; NARDOZZA JR., A.; DE ALMEIDA CLARO, J. F.; PAGANI, E. Efficacy and Tolerability of Lodenafil Carbonate for Oral Therapy in Erectile Dysfunction: A Phase II Clinical Trial. **Journal of Sexual Medicine**, v. 6. n. 2, p. 553-557, 2009.

GLINA, S.; FONSECA, G. N.; BERTERO, E. B.; *et al.* Efficacy and Tolerability of Lodenafil Carbonate for Oral Therapy in Erectile Dysfunction: A Phase III Clinical Trial. **Journal of Sexual Medicine**, v. 7. n. 5, p. 1928-1936, 2010.

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

KONSTANTINOS, G.; PETROS, P. Phosphodiesterase-5 inhibitors: Future Perspectives. **Current Pharmaceutical Design**, v.15, n.30, p. 3540-3551, 2009.

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

MILFONT, J. C. A.; CUNHA, P. B. Disfunção erétil e suas interfaces. **Revista de Angiologia e Cirurgia Vascular**, MARÇO/ABRIL, nº 2, 2007.

NEVES, G.; RATES, S. M. K.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Agentes Dopaminérgicos e o Tratamento da Disfunção Eretil. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 949-957, 2004.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. A. **Spectroscopy** : international edition. 4 ed. Belmonte: Brooks/Cole, 2009.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINGH, S.; PRASAD, B.; SAVALIYA, A. A.; SHAH, R. P.; GOHIL, V. M.; KAUR, A. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 13-17, 2009.

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

USP: THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 31 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis**: a textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. 2 ed. London: Churchill Livingstone, 2005.

WHO: World Health Organization. Drug Information, v.19, n.4, 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/en/>>. Acesso em: 07/04/2010.

