

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

**MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE DELAPRIL E MANIDIPINO
APLICÁVEIS A ESTUDOS DE ESTABILIDADE E AO DESENVOLVIMENTO DE
MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA A FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS**

VÍTOR TODESCHINI

Porto Alegre, 2013.

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

**MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE DELAPRIL E MANIDIPINO
APLICÁVEIS A ESTUDOS DE ESTABILIDADE E AO DESENVOLVIMENTO DE
MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA A FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS**

Tese apresentada por **VÍTOR TODESCHINI**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a) : Profa. Dr. Nadia Maria Volpato

Porto Alegre, 2013.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Cristiane de Bona da Silva
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Gonçalves Cardoso
Universidade Federal de Santa Catarina

CIP - Catalogação na Publicação

Todeschini, Vítor

Métodos analíticos para determinação de delapril e manidipino aplicáveis a estudos de estabilidade e ao desenvolvimento de método de dissolução para a forma farmacêutica comprimidos. / Vítor Todeschini. -- 2013. 133 f.

Orientadora: Nadia Maria Volpato.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Métodos analíticos. 2. Delapril. 3. Manidipino. 4. Matérias-primas. 5. Produtos de degradação. I. Volpato, Nadia Maria, orient. II. Título.

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.

*Um sonho que você sonha sozinho é
apenas um sonho.....*

*Um sonho que você sonha junto é
realidade.....*

John Lennon

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela possibilidade de conclusão de mais esta etapa.

À Profa. Nadia Maria Volpato, pela oportunidade, orientação, dedicação, amizade e exemplo de caráter e profissionalismo.

Aos professores do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, em especial ao Prof. Martin Steppe, Profa. Cássia V. Garcia e Profa. Elfrides E. S. Schapoval pelo carinho, amizade e confiança demonstrada durante todo este período de convívio.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico pela amizade, momentos de descontração, auxílios prestados, discussões científicas e conhecimentos adquiridos.

Aos grandes amigos Maximiliano S. Sangoi, Clésio S. Paim e Paulo R. Oliveira, pelo incentivo, motivação e importante colaboração neste trabalho.

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

À família Nemitz pelo apoio e em especial à Marina pelo amor, amizade e suporte, imprescindíveis em mais esta etapa vencida juntos.

Aos meus pais, Valter e Nair, e ao meu irmão Raul, pelo carinho, amor, apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim.

À CAPES pelo apoio financeiro.

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

RESUMO

A associação entre os fármacos delapril (DEL) e manidipino (MAN) apresenta um efeito anti-hipertensivo sinérgico de longa duração, sendo considerada uma importante alternativa no tratamento e controle da hipertensão arterial. O presente trabalho faz referência à utilização de diversas técnicas instrumentais para avaliar a qualidade de DEL e MAN na forma farmacêutica e matérias-primas. Neste sentido, amostras de matérias-primas dos fármacos provenientes de diferentes fornecedores foram analisadas utilizando a calorimetria diferencial exploratória, termogravimetria, difração de raios X, espectrofotometria no infravermelho, espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados permitiram observar inconsistências entre as amostras de DEL, provavelmente devido à presença de uma impureza em uma das substâncias, demonstrando a importância da pesquisa e controle dos insumos farmacêuticos, bem como de programas de qualificação de fornecedores. Além disso, metodologias analíticas por espectrofotometria derivada, cromatografia líquida com detecção no ultravioleta (CL-UV) e CL acoplada à espectrometria de massas (EM) foram desenvolvidas objetivando a determinação de DEL e MAN nos comprimidos. Os procedimentos foram validados, cumprindo com os requisitos internacionalmente aceitos para especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação, além de demonstrarem diferença não significativa ($p > 0,05$) entre si na quantificação simultânea dos fármacos. A estabilidade dos fármacos nas condições alcalina e fotolítica (para o DEL e MAN, respectivamente) também foi investigada. Através dos métodos por CL-UV e CL-EM pode-se propor a identidade dos principais produtos de degradação formados, os quais não apresentaram evidências de citotoxicidade em estudo utilizando células mononucleares humanas. Além disso, os estudos de cinéticas de degradação indicaram que o DEL segue uma cinética de primeira ordem ($R^2 = 0,9991$) enquanto o MAN segue uma reação de ordem zero ($R^2 = 0,9867$). De forma adicional, foi desenvolvido e validado um método de dissolução para avaliação de comprimidos contendo DEL e MAN. O uso de tampão citrato pH 3,2 como meio de dissolução e dispositivo pá a 75 rpm demonstrou resultados satisfatórios para a avaliação da liberação simultânea dos fármacos do produto farmacêutico, bem como capacidade de simular o comportamento *in vivo* do MAN a

partir de dados da literatura. Desse modo, estabeleceram-se procedimentos analíticos que podem ser aplicados para aprimorar o controle da qualidade dos medicamentos a serem comercializados, bem como contribuir para garantir a segurança e eficácia no uso terapêutico.

Palavras-chave: Caracterização do estado sólido, cromatografia líquida, delapril, dissolução, espectrometria de massas, espectrofotometria derivada, manidipino, matérias-primas, produtos de degradação, validação.

ABSTRACT

The association of delapril (DEL) and manidipine (MAN) has a synergic antihypertensive effect and may be regarded as an important alternative to arterial hypertension treatment. The present study refers to use of some instrumental techniques to assess the quality of DEL and MAN in pharmaceutical formulation and raw materials. In this context, samples of the drugs raw materials, obtained from different suppliers, were evaluated using differential scanning calorimetry, thermogravimetry, X-ray powder diffraction, infrared spectroscopy, Raman spectroscopy and scanning electron microscopy. Inconsistent results were observed between DEL samples, probably due to an impurity presence in some substance, demonstrating the importance of research and control of pharmaceutical ingredients, as well as the quality programs of pharmaceuticals suppliers. In addition, a derivative spectrophotometric, liquid chromatography (LC) and LC coupled to mass spectrometry (MS) methods were developed for simultaneous analysis of DEL and MAN in commercial tablets. The procedures were validated and the results were in accordance with internationally accepted requirements by specificity, linearity, precision, accuracy, robustness and detection and quantitation limits. Therefore, the methods were successfully applied for the simultaneous quantitative analysis of DEL and MAN in the tablet dosage form, showing non-significant difference ($p > 0.05$). The drugs stability in alkaline and photolytic conditions (for DEL and MAN, respectively) was also investigated. The main degradation products formed were analyzed by LC-UV and LC-ESI-MS methods and its identity could be suggested, without isolation or purification processes. Additionally, the degradation kinetic of both drugs and the cytotoxicity of the degraded samples were also studied. The kinetics results could be best described as first-order process for DEL ($R^2 = 0.9991$) and zero-order process for MAN ($R^2 = 0.9867$). No evidence of cytotoxicity in human mononuclear cells was observed for drugs degraded samples. Furthermore, the present study also conducted the development and validation of a dissolution method for DEL and MAN combination tablets. The use of citrate buffer pH 3.2 as dissolution medium in combination with paddle at rotation of 75 rpm, resulted in an appropriate dissolution profile of both drugs, allowing the simultaneous quality control of DEL and MAN in combination tablets, as well as the ability to simulate the *in vivo* behavior of

MAN from literature data. Then, the established procedures can be applied to improve the quality control of the products that will be marketed, as well as to contribute for assure the safety and therapeutic efficacy of the drugs.

Keywords: Delapril, degradation products, derivative spectrophotometry, dissolution, liquid chromatography, manidipine, mass spectrometry, raw materials, solid-state characterization, validation.

LISTA DE FIGURAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 3.1. Estrutura química do cloridrato de delapril.....	14
FIGURA 3.2. Delapril (a) e seus metabolitos: M-I (b); M-III (c); M-II (d)	15
FIGURA 3.3. Estrutura química do dicloridrato de manidipino	17
FIGURA 3.4. Manidipino (a) e seu principal metabolito (b)	18

LISTA DE TABELAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

TABELA 3.2. Classificação biofarmacêutica de fármacos 35

TABELA 3.3. Classificação dos testes analíticos, segundo sua finalidade 37

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
ANOVA	Análise da variância;
CE	<i>Capillary electrophoresis</i> - Eletroforese capilar;
IVIVC	<i>in vitro-in vivo correlation</i> - correlação <i>in vitro-in vivo</i> ;
DAD	Detector de arranjo de diodos;
DEL	Delapril;
DRIFT	<i>Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy</i> - Reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier;
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> – Calorimetria diferencial exploratória
DTG	<i>Differential thermogravimety</i> - Termogravimetria diferencial;
ECA	Enzima conversora de angiotensina;
ED	Espectrofotometria derivada;
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> ;
FA	<i>Fraction absorbed</i> – Fração absorvida;
FB	Farmacopeia Brasileira;
FD	<i>Fraction dissolved</i> – Fração dissolvida;
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ;
HA	Hipertensão arterial
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> ;
IS	<i>Internal Standard</i> - Padrão interno;
IV	Infravermelho;
K	Constante da velocidade de degradação;
LC	<i>Liquid chromatography</i> - Cromatografia líquida;
LC-MS	<i>Liquid chromatography coupled with mass spectrometry</i> - CL acoplada à espectrometria de massas;
LoD	<i>Limit of detection</i> ; - limite de detecção;
LoQ	<i>Limit of quantitation</i> ; - limite de quantificação;
MAN	Manidipino;
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i> - Monitoramento de múltiplas reações;
MS	<i>Mass spectrometry</i> - Espectrometria de massas;
<i>m/z</i>	Relação massa/carga;
PA	Pressão arterial;

RS	<i>Raman spectroscopy</i> - Espectroscopia Raman;
RSD	<i>Relative standard deviation</i> - Desvio padrão relativo
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> - microscopia eletrônica de varredura;
SIR	<i>Selected ion recording</i> - monitoramento seletivo de íons;
SQR	Substância química de referência;
TG	<i>Thermogravimety</i> - termogravimetria;
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> - Farmacopeia Americana;
UV	Ultravioleta;
XRPD	<i>X-ray powder diffraction</i> - Difração de raio-X de pós.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1. Hipertensão arterial	11
3.2. Delapril	14
3.3. Manidipino	16
3.4. Associação entre delapril e manidipino	19
3.5. Literatura analítica envolvendo delapril e manidipino	20
3.6. Técnicas para avaliação de insumos farmacêuticos no estado sólido	23
3.6.1. Termogravimetria	24
3.6.2. Calorimetria diferencial exploratória	25
3.6.3. Difração de raio X.....	25
3.6.4. Espectroscopia no infravermelho	26
3.6.5. Espectroscopia Raman.....	27
3.6.6. Microscopia eletrônica de varredura.....	27
3.7. Métodos analíticos para avaliação quantitativa de fármacos.....	28
3.7.1. Cromatografia líquida	28
3.7.2. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	29
3.7.3. Espectrofotometria derivada.....	31
3.8. Estudos de estabilidade.....	32
3.9. Ensaio de dissolução.....	34
3.10. Validação de métodos analíticos	36
4. PARTE 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS À AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS DE DELAPRIL E MANIDIPINO	41
4.1. Introdução.....	43
4.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Delapril and manidipine: characterization and purity evaluation in raw materials	45
4.2.1. Abstract	47

5. PARTE 2 – DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE DELAPRIL E MANIDIPINO POR CL-EM/EM	49
5.1. Introdução.....	51
5.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Delapril and manidipine measurements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in pharmaceutical formulation.....	53
5.2.1. Resumo	55
6. PARTE 3 – AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE DELAPRIL E MANIDIINO POR CL-UV E CL-EM, CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO E ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE	57
6.1. Introdução.....	59
6.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Main degradation products of delapril and manidipine evaluated by LC-UV and LC-MS, decay kinetic and in vitro cytotoxicity studies.....	61
6.2.1. Resumo	63
7. PARTE 4 – DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE DELAPRIL E MANIDIPINO POR ED-1	65
7.1. Introdução.....	67
7.2. ARTIGO CIENTÍFICO – First-order derivative UV spectrophotometric method for simultaneous measurement of delapril and manidipine in tablets.....	69
7.2.1. Resumo	71
8. PARTE 5 – MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA AVALIAÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO DELAPRIL E MANIDIPINO	73
8.1. Introdução.....	75
8.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Proposal of a dissolution method for delapril and manidipine combination tablets based on absorption profile of manidipine	77
8.2.1. Resumo	79
9. DISCUSSÃO GERAL	81
10. CONCLUSÕES	95
11. REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. É a doença cardiovascular mais frequente e, devido à alta prevalência e baixas taxas de controle, considerada um grave problema de saúde pública. Além do diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com suspeita de HA, a mudança no estilo de vida e o uso de medicamentos anti-hipertensivos são necessários para a redução de sua morbidade e mortalidade (Sociedade Brasileira de Cardiologia, Hipertensão e Nefrologia, 2010; RUILOPE, 2012).

Diversas são as abordagens farmacológicas usadas no tratamento e controle da HA. Dentre os medicamentos orais disponíveis estão os fármacos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), tal como o delapril (DEL) e os bloqueadores dos canais de cálcio, como o manidipino (MAN), podendo ser usados individualmente ou de forma combinada. Neste sentido, a associação entre cloridrato de delapril e dicloridrato de manidipino (Hipertil[®]), comercializada pelo laboratório Farmalab Chiesi e liberada para uso clínico no Brasil pela ANVISA em 2006, constitui uma importante alternativa na terapia farmacológica desta patologia.

A constante evolução na área farmacêutica possibilita o desenvolvimento e produção de novos medicamentos, os quais necessitam atender a requisitos regulamentares e cumprir com especificações que garantam a sua qualidade, segurança e eficácia. Diante disso, o monitoramento e a avaliação dos fármacos devem ser realizados continuamente em todas as fases de desenvolvimento farmacêutico (SWARTZ & KRULL, 1998). Para tal, o desenvolvimento e a 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 35, 2012).

Neste contexto, o controle de qualidade é encarregado das análises de diversas propriedades que conferem qualidade aos medicamentos, desde a matéria-prima até o produto acabado. Além disso, o desenvolvimento e validação de metodologias qualitativas e quantitativas e aplicáveis à avaliação biofarmacotécnica *in vitro*, visando prever o desempenho *in vivo* de formulações, bem como o controle de processos durante a etapa produtiva também estão sob sua responsabilidade. Outra atribuição de fundamental importância e cada vez mais exigida por órgãos

reguladores é o estudo dos fatores inerentes à estabilidade dos fármacos. O conhecimento das rotas e velocidades de degradação, assim como a identificação dos produtos de degradação podem garantir a administração terapêutica do medicamento de maneira segura e eficaz, evitando efeitos adversos e diminuição da atividade farmacológica (ICH, 2003; BRASIL, 2005).

Considerando que a HA atinge grande parcela da população mundial e devido ao grande impacto médico, social e econômico que envolve seu tratamento, é essencial possuir métodos analíticos de domínio público para a avaliação da qualidade destes medicamentos. A utilização de diversas técnicas instrumentais e a interpretação conjunta de seus resultados pode ser, portanto, uma estratégia considerada, além de possibilitar uma visão ampla das vantagens e desvantagens dos avanços analíticos. Destaca-se que não foram encontrados métodos de análise de DEL e MAN em compêndios oficiais, além de serem poucos os registros disponíveis para determinações quantitativas em produto acabado e avaliação da qualidade de matérias-primas. Verificaram-se, também, escassos estudos na literatura pesquisada sobre a estabilidade das moléculas, bem como inexistentes condições para avaliar a dissolução dos comprimidos.

Com base no exposto, o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para a determinação dos fármacos em comprimidos, os estudos de estabilidade através da análise de produtos de degração e rotas de decomposição, a caracterização de matérias-primas provenientes de diferentes fornecedores, bem como o ensaio de dissolução justificam a realização deste trabalho. Por essas razões, entende-se que este estudo contribuirá para o domínio tecnológico e científico, aprimorando a área de controle da qualidade e garantindo a segurança e a eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponibilizados para a população.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver métodos analíticos para a determinação de DEL e MAN na forma farmacêutica e aplicáveis à avaliação da estabilidade dos mesmos, bem como estabelecer condições para a avaliação do perfil de dissolução dos comprimidos e analisar comparativamente matérias-primas dos fármacos provenientes de diferentes fornecedores.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar estudos comparativos e de caracterização de diferentes matérias-primas de DEL e MAN envolvendo técnicas termoanalíticas, espectrais e morfológicas;
- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial (CL-EM/EM) para determinação simultânea de DEL e MAN na formulação farmacêutica;
- Desenvolver e validar método analítico por espectrofotometria derivada para determinação simultânea de DEL e MAN na formulação farmacêutica;
- Realizar análise estatística comparativa para determinação quantitativa dos fármacos entre os métodos propostos;
- Caracterizar a susceptibilidade dos fármacos frente a condições de estresse e determinar suas cinéticas de degradação nestes ambientes;
- Propor a identidade e a rota de fragmentação dos principais produtos de degradação dos fármacos através de métodos por CL-UV e CL-EM;
- Avaliar o potencial citotóxico das amostras contendo os fármacos após degradação frente às amostras dos fármacos íntegros;
- Desenvolver e validar método de dissolução para os comprimidos de DEL e MAN, cujas condições preferencialmente possuam analogia com dados *in vivo*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Hipertensão arterial

As doenças cardiovasculares possuem papel de destaque entre as principais causas de morte em todo mundo e, dentre estas, a hipertensão arterial (HA) é a mais freqüente. Estima-se que a cada ano 7,6 milhões de pessoas vem a óbito devido a esta patologia ou em decorrência das suas complicações. Além disso, em torno de 80% dessas mortes ocorrem em países em desenvolvimento, sendo que mais da metade das vítimas têm entre 45 e 69 anos (CHOBANIAN *et al.*, 2003; BRASIL, 2006; LAWES *et al.*, 2008). No Brasil, da mesma forma, a HA afeta uma grande parcela da população, sendo responsável por um percentual significativo das mortes por acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana e insuficiência renal terminal (BRASIL, 2006; Sociedade Brasileira de Cardiologia, Hipertensão e Nefrologia, 2010). Além dessa alta prevalência, a HA é uma doença crônica de difícil controle e, portanto, com um elevado custo econômico-social. Trata-se de uma enfermidade de início silencioso com grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, bem como para os indicadores de saúde da população (CORRÊA *et al.*, 2005; OATES *et al.*, 2006).

A HA é definida como a elevação sustentada da pressão arterial (PA) sistêmica, ou seja, pela persistência dos níveis tensionais fora dos valores considerados normais. A medida adequada da PA é, portanto, o requisito mais importante para o diagnóstico e definição do tratamento de pacientes hipertensos e com suspeita de hipertensão. Esta avaliação deve ser realizada de forma repetida e em pelo menos três ocasiões, considerando valores de PA sistólica ≥ 140 mmHg e/ou de PA diastólica ≥ 90 mmHg como referência para definição da doença (Sociedade Brasileira de Cardiologia, Hipertensão e Nefrologia, 2010; RUILOPE, 2012).

Neste contexto, a HA pode 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, antiinflamatórios não esteróides e descongestionantes nasais (STAESSEN *et al.*, 2003; WHITWORTH, 2003; CORRÊA *et al.*, 2005).

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: Sociedade Brasileira de Cardiologia, Hipertensão e Nefrologia, 2010.

O caráter multifatorial da HA dificulta sua identificação e tratamento. Dentre os diversos fatores de risco para seu desenvolvimento encontram-se os não modificáveis, tais como: sexo, idade, etnia e genética; e os modificáveis, os quais através de cuidados e precauções, podem reduzir os valores pressóricos, destacando-se: o uso abusivo do sal, o tabagismo, o alcoolismo, o estresse, a obesidade e o sedentarismo (BRASIL, 2006).

Embora não exista cura, é possível um controle eficaz dos valores de PA, utilizando-se tanto medidas não-farmacológicas, através da modificação do estilo de vida e redução dos fatores de risco, quanto medidas farmacológicas. Assim, o objetivo da terapia anti-hipertensiva é a manutenção dos níveis pressóricos inferiores a 140x90 mmHg e, principalmente, reduzir a morbidade e mortalidade de pacientes que apresentam elevado risco cardiovascular (CORRÊA *et al.*, 2005; Sociedade Brasileira de Cardiologia, Hipertensão e Nefrologia, 2010).

Fatores físicos e fisiológicos podem ser determinantes na mudança dos níveis tensionais, sendo alvos de muitos fármacos. Os fatores físicos relacionam-se com as características mecânicas do líquido sanguíneo, como o volume do líquido e as

características elásticas dos vasos. Já os fatores fisiológicos relacionam-se com certas características do sistema cardiovascular, ou seja, débito cardíaco e a resistência periférica (BERNE & LEVY, 2000). Neste sentido, o tratamento pode buscar a redução do débito cardíaco por meio da inibição na contratilidade miocárdica ou diminuição da pressão de enchimento ventricular, sendo que a diminuição pode ocorrer através de ações sobre o tônus venoso ou o volume sanguíneo por meio de efeitos renais. Além disso, o tratamento pode ser direcionado na diminuição da resistência vascular periférica, através de fármacos que atuam na musculatura lisa, produzindo relaxamento dos vasos, ou que interferem na atividade de sistemas que produzem constrição dos vasos (OATES *et al.*, 2006).

Independente de protocolos e da abordagem terapêutica, os agentes anti-hipertensivos a serem utilizados devem promover a redução não só dos níveis tensionais como também a dos eventos cardiovasculares fatais e não-fatais, respeitando-se as características individuais e a qualidade de vida dos pacientes. Esses medicamentos exercem suas ações, conforme acima citado, 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).

Por tratar-se de uma doença que na maior parte do seu curso é assintomática, seu diagnóstico e tratamento são freqüentemente negligenciados, somando-se a isso a baixa adesão ao tratamento prescrito por parte do paciente. Para tal, é necessário um adequado acompanhamento deste, assim como uma reavaliação periódica da abordagem terapêutica. 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; BRASIL, 2006).

O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na HA tem possibilitado o desenvolvimento de novas moléculas visando o melhor controle da PA. Assim, novas composições farmacêuticas que contenham substâncias que

atuam de forma diferente são importantes para um tratamento mais eficaz (GRADMAN *et al.*, 2010; RUILOPE, 2012). Dentre os vários protocolos preconizados, as terapias utilizando fármacos inibidores ECA, como o delapril, e os bloqueadores dos canais de cálcio, como o manidipino, constituem uma importante alternativa no tratamento e controle da HA, podendo ser usados como monoterapia ou combinados.

3.2. Delapril

O delapril (cloridrato de 2-[(2S)-N-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-2-[[2S)-1-etoxi-1-oxo-4-fenilbutan-2-il]amino}propanamido] ácido acético) (DEL) é disponibilizado comercialmente como cloridrato e apresenta-se na forma de comprimido de 30 mg associado ao manidipino. Como monoterapia, entretanto, sua comercialização foi descontinuada (comprimido de 15 mg, sob o nome comercial de Delakete[®]).

Fisicamente, o DEL é um material cristalino incolor, altamente solúvel em metanol (399 mg/mL), solúvel em etanol (71 mg/mL) e pouco solúvel em água (13 mg/mL) (OKA *et al.*, 1988). 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, 2012). O fármaco apresenta valores de pKa de 5,56 e 3,26 (AKIYAMA *et al.*, 1994), valores estes em conformidade com $5,50 \pm 0,4$ e $3,0 \pm 0,4$, estimados através do serviço online ACD/I-Lab (acdlabs.com).

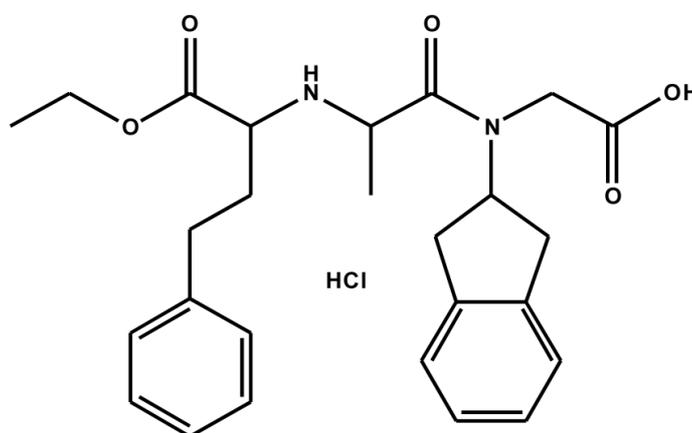


FIGURA 3.1. Estrutura química do cloridrato de delapril.

O DEL é um fármaco anti-hipertensivo com mecanismo de ação através da inibição da enzima de conversão da Angiotensina I em Angiotensina II (ECA). Como resultado do bloqueio desta enzima, ocorre uma redução dos níveis séricos de angiotensina II nos pacientes, levando a uma diminuição da secreção da aldosterona e, conseqüentemente, da atividade vasopressora (COLOMER, 2007). Uma vez que o DEL possui características lipofílicas, este tem condições de permear em vários órgãos-alvo, tais como coração, parede do vaso e rins, proporcionando uma diminuição da resistência vascular periférica, com mínimos efeitos sobre o débito cardíaco e volume plasmático, bem como aumentar a eliminação de sódio e água (RAZZETI & ACERBI 1995; OTERO, 2007).

Após a administração oral, o DEL é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, apresentando uma extensão de absorção entre 67 e 96%, não sendo afetada pela presença de alimentos (COLOMER, 2007). Por ser um pró-fármaco, é convertido nas formas ativas delapril-diácido (M-I) e 5-hidroxi-delapril-diácido (M-III) e inativa (M-II) (Figura 3.2).

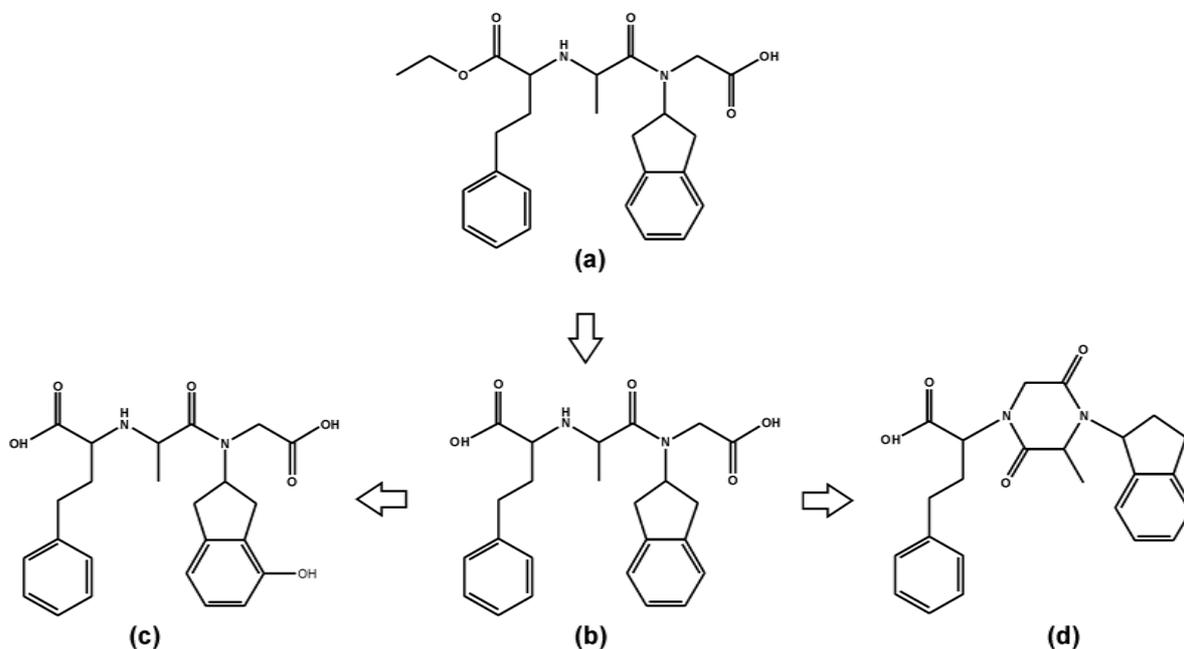


FIGURA 3.2. Delapril (a) e seus metabolitos: M-I (b); M-III (c); M-II (d). – Adaptado de SHIONOIRI *et al.*, 1987; STOCKIS *et al.*, 2003.

O principal e mais abundante metabólito sérico é o M-I, seguido do M-III, enquanto que os níveis séricos de M-II e DEL inalterado são reduzidos. As concentrações máximas observadas para M-I e M-III são em torno de 1200 e 430 ng/mL, respectivamente, sendo atingidas em, aproximadamente, 2 horas. Esses níveis séricos diminuem rapidamente com um tempo de meia-vida de 1,21 e 0,81 horas, respectivamente. Além disso, o fármaco apresenta alta ligação às proteínas plasmáticas, tendo sua excreção majoritariamente pela via urinária, com cerca de 60% do fármaco sendo eliminado em 24 horas, principalmente sob a forma dos metabólitos M-I (21,4%) e M-III (30,4%). (TATENO & NAKAMURA, 1986; ONOYAMA *et al.*, 1988; RAZZETTI & ACERBI, 1995).

Indicado para o tratamento e controle da HA leve a moderada e insuficiência cardíaca congestiva, o fármaco apresenta um perfil de reações adversas semelhante a outros inibidores da ECA sendo, em geral, bem tolerado. A maioria dos casos registrados são relacionados a tonturas, dor de cabeça, náuseas e vômitos, necessitando cuidados especiais, principalmente, com respostas hipotensoras excessivas em pacientes de risco (COLOMER, 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 disponibilizado comercialmente como dicloridrato e apresenta-se na forma de comprimido de 20 mg como monoterapia (sob o nome comercial de Manivasc[®]) e dose de 10 mg quando associado ao delapril.

Fisicamente, o MAN é um material cristalino de cor levemente amarelada, sendo solúvel em dimetilsulfóxido, mas insolúvel em água, acetato de etila e éter etílico (MORIMOTO & MATSUMURA, 1991). Neste sentido, a utilização do sal dicloridrato é realizada em função da melhor solubilidade aquosa quando comparada à base correspondente (0,38 mg/mL e 1,0 µg/mL, respectivamente) (CSABAI *et al.*, 1998). 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 3.3 (NCBI-

PUBCHEM, 2012). O fármaco apresenta valores de pKa de $1,3 \pm 0,4$, $2,3 \pm 0,4$ e $6,8 \pm 0,5$, os quais foram estimados através do serviço online ACD/I-Lab (acdlabs.com).

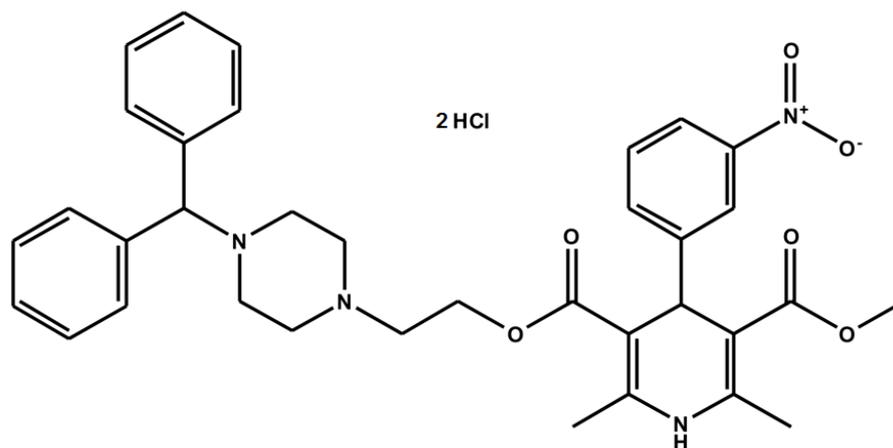


FIGURA 3.3. Estrutura química do dicloridrato de manidipino.

O MAN é um fármaco antagonista dos canais de cálcio pertencente à terceira geração do grupo dos diidropiridínicos. Apresenta alta seletividade para os vasos sanguíneos e tem seu mecanismo de ação baseado na alteração no influxo de íons Ca^{+2} , através da diminuição da duração e força de contração da musculatura lisa cardíaca e vascular. Dessa forma, possui uma potente ação vasodilatadora arterial, além da capacidade de induzir a uma natriurese sustentada de intensidade semelhante àquela obtida com doses habituais de diurético tiazídico (IIMURA, 1993; DEROUBAIX *et al.*, 1998; KOHLMANN & RIBEIRO, 2001).

Este composto tem se mostrado útil e de alta eficácia no tratamento de pacientes hipertensos com diferentes graus de severidade, pacientes idosos ou de meia idade, e mesmo em pacientes com doenças associadas, como diabetes e nefropatias. Além disso, pode beneficiar pacientes hipertensos com sobrepeso, sem acarretar alterações do metabolismo dos hidratos de carbono e dos lipídios e com excelente perfil de tolerabilidade (IIMURA, 1993; FOGARI *et al.*, 1996; KOHLMANN & RIBEIRO, 2001).

Apesar de um início de ação lento, o que diminui a possibilidade de taquicardia reflexa, o MAN possui uma longa duração do efeito terapêutico através de uma dose diária. Além disso, o fármaco possui meia vida plasmática

relativamente curta (4 a 8 horas), uma vez que é rapidamente retirado da circulação e liberado continuamente do tecido adiposo devido ao seu caráter lipossolúvel (DEROUBAIX *et al.*, 1998; KOHLMANN & RIBEIRO, 2001; OTERO, 2007).

Após a administração oral, o MAN distribui-se amplamente pelos tecidos, apresentando ligação com as proteínas plasmáticas de 99%. Em humanos sua absorção oral é rápida, com concentrações plasmáticas máximas atingidas, normalmente, após 1 a 2 horas. O decaimento plasmático é bifásico e ocorre principalmente por via fecal (63%) e via urinária (31%) (MORIMOTO & MATSUMURA, 1991; IIMURA, 1993). Como outros derivados diidropiridínicos, o MAN apresenta elevada depuração e metabolismo de primeira passagem e, portanto, uma baixa biodisponibilidade sistêmica (CSABAI *et al.*, 1998). Essa extensa metabolização hepática envolve, principalmente, a aromatização da porção diidropiridina e formação de seu principal metabólito (Figura 3.4). (MORIMOTO & MATSUMURA, 1991; STOCKIS, *et al.*, 2003).

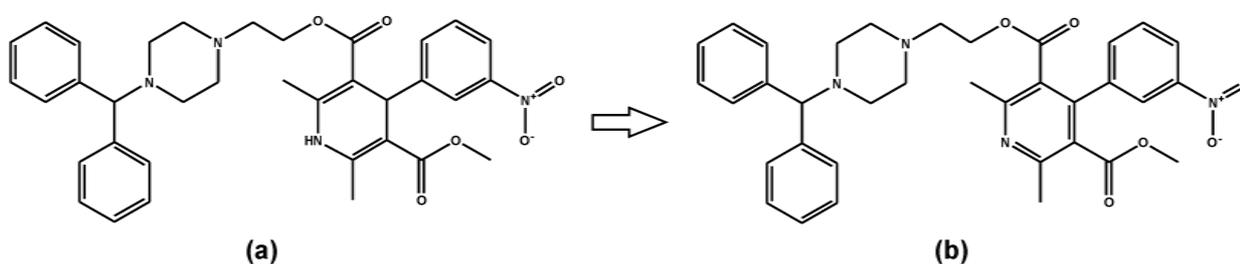


FIGURA 3.4. Manidipino (a) e seu principal metabólito (b) – Adaptado de MORIMOTO & MATSUMURA, 1991; STOCKIS *et al.*, 2003.

Destaca-se que a absorção gastrointestinal do fármaco aumenta sua extensão em cerca de 50% com a presença de alimento no trato digestivo. Essa diferenciação é devido a sua elevada lipofilicidade e pode ser explicada devido a um efeito de solubilização produzida provavelmente por secreções biliares, de modo que sua administração concomitante com alimentos é recomendada (MORIMOTO & MATSUMURA, 1991; ROSILLON, *et al.*, 1998).

3.4. Associação entre delapril e manidipino

O uso de mais de um agente anti-hipertensivo é, em geral, necessário para atingir as metas de controle da PA na maioria dos pacientes. Essas combinações fixas podem simplificar o esquema terapêutico, favorecer a adesão por parte do paciente devido à administração de apenas uma forma farmacêutica, bem como diminuir o custo do medicamento quando comparado com os fármacos prescritos separadamente. Outra vantagem importante está na capacidade de utilizar baixas doses dos componentes e assim reduzir a possibilidade de efeitos adversos. Em vários pacientes, no entanto, o controle pressórico pode não ser obtido com apenas dois fármacos associados e a combinação de três ou mais componentes se faz necessária. Em hipertensos de alto risco, os valores estimados de PA devem ser alcançados mais rapidamente, favorecendo ainda mais a terapia combinada inicial e ajuste das doses (MCCORMACK & KEATING, 2006; OTERO, 2007; GRADMAN *et al.*, 2010; RUILOPE, 2012).

Assim, a associação entre DEL e MAN, 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 parâmetros farmacocinéticos dos componentes isolados, bem como de seus principais metabólitos (BACHELI *et al.*, 2002; STOCKIS *et al.*, 2003; OTERO, 2007). Além disso, o uso concomitante dos fármacos pode produzir efeitos favoráveis em complicações decorrentes da HA, tais como o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda, lesão renal, disfunção endotelial e lesões vasculares ateroscleróticas, apresentando, ainda, resultados satisfatórios em termos de morbidade e mortalidade quando comparados com a combinação clássica de diuréticos e beta-bloqueadores (DE LEEUW, 1997; MUGELLINI *et al.*, 2005; OTERO, 2007).

Aprovada na Itália, Alemanha, Grécia, Áustria, Espanha e liberada para uso clínico no Brasil pela ANVISA, em 2006, a associação dos fármacos, 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 inibidores da ECA ou bloqueadores dos canais de cálcio como monoterapia, além de ser considerada uma excelente alternativa no tratamento da hipertensão associada à

diabetes mellitus. Entretanto, é contra-indicado, principalmente, a pessoas com hipersensibilidade aos fármacos e pacientes com insuficiência hepática e renal grave (FOGARI, 2007; MCCORMACK & KEATING, 2006). A dosagem recomendada usual do comprimido é de 30 mg para o DEL e 10 mg para o MAN, devendo ser administrada com um pouco de água, pela manhã e após o desjejum.

3.5. Literatura analítica envolvendo delapril e manidipino

O crescente desenvolvimento de novos fármacos e novas formulações pela indústria farmacêutica faz com que a preocupação com a qualidade e a segurança desses produtos aumente na mesma proporção, tornando-se imprescindível a realização de ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo. Entretanto, mesmo tratando-se de fármacos com um considerável período de mercado, não foram encontrados registros na literatura científica pesquisada em relação à caracterização do estado sólido e avaliação da qualidade de matérias-primas dos mesmos. Além disso, poucas são as referências descrevendo métodos qualitativos e quantitativos para avaliação simultânea de DEL e MAN em comprimido.

Estudos realizados recentemente por nosso grupo de pesquisa foram desenvolvidos objetivando a determinação simultânea de DEL e MAN em produtos farmacêuticos utilizando a cromatografia líquida (CL) e a eletroforese capilar (EC). As análises por CL 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. A detecção foi realizada a 220 nm utilizando o detector de arranjo de diodos e o volume de injeção foi de 20 µL (TODESCHINI *et al.*, 2012). Por outro lado, as análises por EC, utilizando modo de separação por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), foram executadas utilizando capilar de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, 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. O ácido salicílico foi usado como padrão interno (TODESCHINI *et al.*, *in press*).

Foram encontrados, também, alguns estudos para análise apenas do MAN em matéria-prima e em produtos farmacêuticos na literatura pesquisada.

Neste sentido, DE LAURENTIS e colaboradores (2001) desenvolveram 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 e foi aplicado na avaliação de MAN em comprimidos.

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, mostrando-se lineares na faixa de 25-125 µg/mL.

Um método por cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC) foi desenvolvido para avaliação de MAN em matéria-prima. O método utilizou detecção densitométrica em 230 nm, sendo sugerido para aplicação em estudos de estabilidade (KARUNANIDHI *et al.*, 2011).

SUNDARARAJAN e colaboradores (2012) desenvolveram um método por CL para determinação de MAN em comprimidos. A metodologia é descrita utilizando uma coluna Phenomenex C₁₈ (250 x 4,6 mm) e fase móvel composta por acetonitrila e água (80:20; v/v) com o pH 3,5. Os autores destacam os resultados adequados para o processo de validação sem, no entanto, avaliar a especificidade do mesmo.

O restante das metodologias encontradas na literatura refere-se, basicamente, a técnicas aplicadas a fluídos biológicos. Diversos artigos relatam a determinação dos fármacos nestas matrizes por CL, utilizando diferentes detectores e aplicados, principalmente, a estudos de farmacocinética (ONOYAMA *et al.*, 1988; MINAMISAWA *et al.*, 1990; DEROUBAIX *et al.*, 1998).

Neste sentido, 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)

Para determinação de MAN em soro humano 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, e foi aplicada em estudos de farmacocinética (OHKUBO *et al.*, 1996).

ROSILLON e colaboradores (1998) utilizaram a CL com detecção coulométrica para análise do MAN e seu principal metabólito em plasma. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna CN Spherisorb e fase móvel composta por acetonitrila, metanol e tampão fosfato 0,01 M, pH 5.5 (30:20:50; v/v/v), eluída a uma vazão de 0,8 mL/min. A detecção foi realizada por coulometria, com linearidade na faixa de 0,2-30 ng/mL para o MAN e 0,5-10 ng/mL para o metabólito.

A interação farmacocinética entre DEL e MAN foi avaliada através da determinação dos níveis plasmáticos dos fármacos e seus metabólitos utilizando 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.

Cabe ressaltar, ainda, que o DEL encontra-se disponível comercialmente como enantiômero S e o MAN como uma mistura racêmica. Neste contexto, apenas dois métodos analíticos foram encontrados na literatura para a determinação enantiosseletiva do MAN.

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 apresentou 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.

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.

3.6. Técnicas para avaliação de insumos farmacêuticos no estado sólido

A qualidade e a confiabilidade dos resultados analíticos dependem de diversos fatores, dos quais, os materiais utilizados como referência são de extrema relevância. Conforme literatura especializada, as substâncias químicas de referência (SQR) podem ser divididas em duas categorias: as compendiais e as não-compendiais. As SQR compendiais são aquelas obtidas de fontes governamentais ou oficiais, tais como a Farmacopeia Brasileira (FB) e a Farmacopeia Americana (USP), não necessitando caracterização posterior. Já as SQR não-compendiais são aquelas obtidas de fontes comerciais reconhecidas, entretanto necessitam ser cuidadosamente avaliadas (FDA, 1997; SWARTZ e KRULL, 1998). Para tal, é fundamental a utilização de instrumentos analíticos, principalmente no que diz respeito à verificação do cumprimento com especificações de qualidade.

O fornecimento dessas especificações mínimas, seja para produtos acabados ou matérias-primas utilizadas na sua fabricação, é de competência legal e exclusiva das farmacopéias, servindo, ainda, como parâmetro para as ações de vigilância sanitária (SOUZA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Neste contexto, os insumos farmacêuticos devem apresentar, além dos testes exigidos nas farmacopéias, especificações internas da indústria quanto à existência ou ausência de polimorfismo, tamanho de partícula, presença de impurezas, entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Este rigor aumenta ainda mais na ausência de testes oficiais.

A caracterização dos sólidos farmacêuticos pode ser realizada com uma grande variedade de técnicas analíticas, destacando-se as análises térmicas por termogravimetria e calorimetria diferencial exploratória, a difração de raios X, a reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier, a espectroscopia Raman e a microscopia eletrônica de varredura. Uma vez que não há um método único e inquestionável para todos os casos, a análise em conjunto dos resultados obtidos é preconizada, permitindo, assim, uma compreensão mais completa das propriedades do estado sólido (CHIENGA *et al.*, 2011).

3.6.1. Termogravimetria

A termogravimetria (TG) avalia a variação de massa da amostra em função da temperatura ou tempo de aquecimento, utilizando um programa controlado de temperatura. Através das curvas TG é possível conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa dos materiais e, assim, estabelecer a faixa de temperatura em que eles adquirem composição química fixa e constante (MATOS *et al.*, 2009; FB 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Um importante artifício a ser utilizado, principalmente quando há eventos térmicos ocorrendo em uma mesma faixa de temperatura, é a termogravimetria derivada (DTG). Esta técnica expressa a primeira derivada da variação de massa em relação ao tempo e é registrada em função da temperatura ou tempo. Como vantagem, a curva DTG apresenta as informações de forma mais facilmente visualizável, com uma melhor distinção entre os eventos térmicos, além da área do pico da curva DTG ser diretamente proporcional à variação de massa (MATOS *et al.* 2009).

Tais análises estão em crescente utilização, sendo aplicadas principalmente no controle de qualidade de medicamentos e insumos farmacêuticos, na determinação de conteúdos de umidade ou outros solventes, na determinação de água de cristalização, nos estudos de pré-formulação e avaliação de interação fármaco/excipiente, no auxílio à caracterização de polimorfos, na avaliação de equivalência composicional de medicamentos, na avaliação da estabilidade térmica e estudos de cinética de degradação (MATOS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

3.6.2. Calorimetria exploratória diferencial

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica que possibilita avaliar os fenômenos energéticos, físicos e/ou químicos produzidos durante o aquecimento ou resfriamento de uma substância. Assim sendo, as curvas DSC são obtidas através da diferença de energia entre a amostra e um material de referência termicamente inerte em função da temperatura e/ou tempo de aquecimento sob um programa controlado de temperatura (MATOS *et al.* 2009; FB 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Destaca-se que, dependendo do equipamento utilizado, os eventos endo e exotérmicos podem ser visualizados em diferentes direções no traçado gráfico, sendo necessária sua sinalização no termograma (MATOS *et al.* 2009).

Assim como a TG/DTG, a DSC vem sendo largamente utilizada na área farmacêutica, especialmente na caracterização de matérias-primas e produtos acabados, na avaliação da estabilidade térmica, nos estudos de pré-formulação e na avaliação da interação fármaco/excipientes e na avaliação da presença de polimorfismo (MATOS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, a DSC possui importante aplicação na determinação do ponto e faixa de fusão, bem como na determinação da pureza de uma substância, a qual é realizada assumindo que a presença de impurezas diminuirá e alargará a faixa de fusão característica do produto puro. Entretanto, o método não é indicado para produtos que sofrem decomposição térmica durante o processo de fusão (FORD & TINMINS, 1989; MATOS *et al.*, 2009; FB 2010).

3.6.3. Difração de raios X de pó

A difração de raios-X de pó (XRPD) é uma técnica amplamente utilizada na área farmacêutica para obtenção de informações sobre as características cristalinas de sólidos em geral, tendo fundamental importância, entre outras aplicações, na detecção e quantificação de transformações polimórficas e do estado cristalino de substâncias. É considerada a técnica mais importante e robusta para diferenciação de formas polimórficas de uma mesma substância, podendo também, ser utilizada na avaliação da estabilidade de fármacos, através da avaliação de seu grau de

crystalinidade no decorrer do tempo e em função do estresse aplicado ao mesmo (BRYN *et al.*, 1995; CHIENGA *et al.*, 2011)

É uma técnica baseada na propriedade intrínseca dos cristais em desviar, em ângulos específicos, a direção dos raios-X emitidos sobre ele. Através de um gráfico da intensidade versus esse ângulo de difração (2θ), considerado uma impressão digital da estrutura cristalina, pode-se avaliar a semelhança cristalográfica das amostras em comparação com padrões (NEWMAN & STAHL, 2002). Dessa forma, diferenças no padrão de difração podem evidenciar a presença de um polimorfo ou uma alteração na estrutura do cristal, tal como a introdução de uma ligeira perturbação ou mudança de parâmetros de rede (CHIENGA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

3.6.4. Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IV) continua sendo uma das técnicas mais importantes na análise de fármacos, podendo ser aplicada a uma grande variedade de substâncias. O princípio da técnica está relacionado à medida da quantidade de radiação IV que é absorvida por uma amostra em função do comprimento de onda. Uma vez que as baixas energias da radiação IV não são suficientes para promover transições eletrônicas, a absorção resulta em modificações na energia vibracional da molécula (espectroscopia vibracional) (FIFIELD & KEALY, 1995; SABIN *et al.*, 2004; BUNACIU *et al.*, 2010). Dessa forma, a interpretação das bandas de absorção do espectro IV possibilitam a observação de grupamentos funcionais característicos do composto em análise, auxiliando na identificação e na caracterização do mesmo (PAVIA *et al.*, 2001; BUNACIU *et al.*, 2010).

Com a evolução instrumental e de softwares, variações dos equipamentos IV, tal como a reflexão difusa com transformada de Fourier (DRIFTS) foram desenvolvidas. Nesta, a radiação entra em contato com a amostra e é dispersa por interação com as partículas. Uma fração dessa luz é refletida pela amostra e registrada pelo detector, permitindo o cálculo da intensidade da radiação absorvida (SABIN *et al.*, 2004; BUNACIU *et al.*, 2010). Esta metodologia é constantemente utilizada na análise de sólidos farmacêuticos, pois os materiais não são submetidos

à energia térmica ou mecânica durante a preparação da amostra, minimizando transformações no estado sólido. Além disso, permite avaliar interações intra e intermolecular, bem como fornecer informações estruturais (STEPHENSON *et al.*, 2001; CHIENGA *et al.*, 2011).

3.6.5. Espectroscopia Raman

Enquanto o IV é baseado na absorção da luz, a espectroscopia Raman (RS) baseia-se na sua dispersão. Após irradiação da amostra, a maior parte da luz é espalhada para o mesmo número de onda. Contudo, parte da luz pode ser dispersa em números de onda ligeiramente mais elevados ou mais baixos. A RS é capaz de detectar essa diferença entre os números de onda da radiação incidente e da radiação dispersa, a qual corresponde a transições de energia vibracional (NEWMAN & STAHLY, 2002; STRACHAN *et al.*, 2007). O espectro resultante normalmente é expresso como números de onda (cm^{-1}) e intensidade da radiação espalhada (DE BEERA *et al.*, 2011).

A técnica possui vários aspectos práticos que a tornam atraente na análise de sólidos farmacêuticos. Além de ser rápida e não-destrutiva, as amostras são analisadas diretamente e em pequenas quantidades, eliminando a necessidade de procedimentos de preparação de amostra que podem induzir alterações na forma sólida (NEWMAN & STAHLY, 2002; STRACHAN *et al.*, 2007). Além disso, é considerada uma ferramenta importante para detecção de polimorfos e para análises quantitativas, devido à menor largura das bandas de leitura quando comparada à IV (STEPHENSON *et al.*, 2001; CHIENGA *et al.*, 2011).

3.6.6. Microscopia eletrônica de varredura

Métodos de análise microscópicos como a microscopia eletrônica de varredura (SEM) possibilitam a avaliação qualitativa de fármacos, principalmente no que diz respeito aos aspectos de superfície dos mesmos (DUARTE *et al.*, 2003). Para tal, um feixe de elétrons, produzido por aquecimento de um filamento de tungstênio, incide sobre a superfície da amostra. Posteriormente, tanto os elétrons refletidos quanto os elétrons secundários emitidos são detectados, gerando a

imagem desta superfície, podendo ser visualizadas em diversas ampliações (SMART & MOORE, 2005).

Seu uso vem se tornando frequente, pois fornece informações importantes do estado de cristalização dos materiais, além de ser uma técnica extremamente útil para observação da homogeneidade da amostra e determinação do tamanho e forma das partículas, bem como na verificação de defeitos e distribuição de elementos na superfície (DUARTE *et al.*, 2003; L SMART & MOORE, 2005).

3.7. Métodos analíticos para avaliação quantitativa de fármacos

Além da avaliação das propriedades dos sólidos farmacêuticos conforme abordado anteriormente, a utilização de métodos analíticos é também imprescindível nas análises qualitativas de identificação de fármacos nos produtos acabados, bem como nas avaliações quantitativas para doseamento e dissolução de medicamentos. Neste sentido, diversas são as metodologias analíticas disponíveis para a análise farmacêutica, tais como, técnicas cromatográficas, eletroforéticas e espectrais, empregadas conforme a análise requerida (GÖRÖG, 2007). Contudo, a escolha e o desenvolvimento de um método dependem de vários fatores, tais como: a exatidão requerida, complexidade, pureza e quantidade da amostra. Além disso, o custo total da análise, a disponibilidade de reagentes e equipamentos, a capacidade de aplicação em estudos de estabilidade e a concordância com requerimentos legais também devem ser considerados (RIBANI *et al.*, 2004; GÖRÖG, 2007).

3.7.1. Cromatografia líquida

A CL é uma técnica físico-química separativa na qual as diferentes afinidades e interações entre a fase móvel e a fase estacionária determinam a migração diferencial dos componentes de uma mistura (FB, 2010). 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).

Diversas são as aplicações da CL, sendo considerada uma ferramenta bem estabelecida no controle de processo e na análise de matéria-prima e produto acabado (RAO & NAGARAJU, 2003). Além de ser uma técnica amplamente difundida no meio acadêmico e indústria farmacêutica, sua utilização na avaliação de fármacos é preconizada pela maioria dos códigos oficiais, principalmente em função de vantagens como precisão, exatidão, seletividade, operação automatizada e aplicabilidade a diversos tipos de matrizes.

Devido à possibilidade de variação dos mecanismos de separação através da escolha da coluna e composição da fase móvel, a CL torna-se uma técnica extremamente útil, podendo ser utilizada nos mais diferentes estudos farmacêuticos, como estudos pré-clínicos e clínicos, estudos de estabilidade, avaliação de impurezas e produtos de degradação (BAKSHI & SINGH, 2002; ICH, 2003; ALSANTE *et al.*, 2007). Além disso, o seu constante aprimoramento, principalmente em relação às inovações em colunas, sistemas de bombeamento, softwares de tratamento de dados e controle de sistema, bem como o acoplamento a diferentes técnicas de detecção demonstram sua grande versatilidade e aplicabilidade na área farmacêutica (WATSON, 2005; DONG, 2006).

3.7.2. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais das substâncias em análise. Basicamente, o equipamento é composto por uma fonte de ionização, os analisadores de massa e o detector, de modo que após o processo de ionização, os íons resultantes são separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z) e detectados qualitativamente e/ou quantitativamente por uma célula fotomultiplicadora (ARDREY, 2003; FB, 2010).

Uma importante etapa nas análises por EM é a introdução da amostra no sistema. Normalmente a amostra é dissolvida em mistura de água e solvente orgânico, como metanol ou acetonitrila, podendo ser infundida diretamente no equipamento ou injetada em fluxo contínuo, ou seja, contida no eluente e separada por coluna cromatográfica (NIESSEN, 2003). O desenvolvimento de interfaces de conexão entre a CL e a EM, além de permitir o adequado acoplamento das técnicas, é responsável pela transferência dos analitos da fase aquosa para a fase gasosa sob fluxo reduzido e, principalmente, a ionização das moléculas (NIESSEN, 1999; ARDREY, 2003; LEE, 2005).

Atualmente existem vários tipos de fontes de ionização que podem ser utilizadas como interface entre os dois equipamentos. Entretanto, as técnicas de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por electrospray (ESI) continuam sendo as técnicas mais utilizadas na análise de fármacos, podendo, esta última, ser utilizada no modo positivo (ES+) ou negativo (ES-). Para tal, promove-se a adição ou subtração de um elétron ao composto (DOOLEY, 2003; KORFMACHER, 2005).

Dessa forma, a CL acoplada à EM (CL-EM) tornou-se uma valiosa ferramenta analítica, uma vez que combina o potencial de separação da CL com a seletividade, sensibilidade e a capacidade de análise molecular da EM (NIESSEN, 1999; ARDREY, 2003). Diversos são os tipos de EM disponíveis para acoplamento com a CL. Dentre os mais utilizados estão os do tipo quadrupolo, podendo ser configurado com um ou dois analisadores de massas (tandem) (FB, 2010). A CL-EM sequencial ou CL-EM/EM envolve dois ou mais estágios de seleção de massas, a fim de examinar seletivamente a fragmentação dos íons. Dessa forma, esta técnica analítica torna-se ainda mais seletiva, rápida e sensível. Misturas complexas com substâncias de estruturas químicas semelhantes são facilmente identificadas utilizando esta técnica, o que a torna o método de escolha na análise bioanalítica de fármacos. Nesse sentido, a CL-EM tem sido amplamente utilizada para a determinação de fármacos em estudos clínicos e atualmente vem sendo usada de modo crescente para análise de produtos farmacêuticos devido à melhor eficiência na quantificação e reduzido tempo de análise (LEE, 2005; PEREIRA *et al.*, 2005). Além disso, é uma técnica com aplicabilidade nos estudos de estabilidade e na

análise de baixos níveis de produtos de degradação em formulações farmacêuticas (WU, 2000; KERNS, 2006).

3.7.3. Espectrofotometria derivada

Os métodos espectrofotométricos estão fundamentados na medida da quantidade de radiação ultravioleta e/ou visível (UV-VIS) absorvida por uma substância em solução, sendo dependentes tanto da concentração quanto da estrutura química da mesma (FB, 2010). Essa energia absorvida pela substância em análise provoca a excitação de seus elétrons, ocorrendo uma transição de um orbital de mais baixa energia para outro de maior energia e, como resultado, um espectro de absorção é gerado na região correspondente. O termo UV-Vis aplica-se a radiação com um comprimento de onda na faixa de 200-800 nm (ANDERSON *et al.*, 2004).

Essas técnicas continuam em destaque nas análises farmacêuticas devido à maioria dos fármacos absorverem energia nessas regiões espectrais. Mesmo apresentando seletividade dependente do grupamento cromóforo presente, os métodos apresentam aplicabilidade na quantificação de fármacos em produtos farmacêuticos, na identificação destes através da comparação do espectro de absorção com uma referência, bem como em estudos de dissolução (WATSON, 2005). No entanto, a análise de fármacos em matrizes complexas ou mistura de princípios ativos torna-se praticamente inviável devido à sobreposição das bandas de absorção.

A espectrofotometria derivada (ED) é uma técnica analítica que consiste na diferenciação do espectro normal pela transformação matemática da curva espectral em uma derivada (primeira ou mais derivadas), utilizando técnicas de processamento de dados. Nela, os máximos de absorção do espectro original correspondem à zero no espectro derivado. Dessa forma, realizando-se a análise no comprimento de onda no qual o espectro derivado dos demais componentes for zero (ponto de anulação), a medida será proporcional somente à concentração do composto de interesse (KARPINSKA, 2004; ROJAS & OJEDA, 2009).

Devido à diferenciação das bandas espectrais sobrepostas e melhor detecção de traços espectrais, a ED apresenta maior seletividade que a espectrofotometria direta (OJEDA & ROJAS, 2004). Além disso, permite tornar as bandas mais finas, individualizando melhor os constituintes da mistura e eliminando a interferência de produtos indesejáveis, como excipientes e, em alguns casos, até produtos de degradação (PASCHOAL *et al.*, 2003).

3.8. Estudos de estabilidade

Os medicamentos devem manter suas características de identidade, eficácia, potência, pureza e segurança desde sua produção e período em que se encontram no mercado até o momento de seu uso pelos consumidores (NUDELMAN, 1975; USP 35, 2012). Neste sentido, os estudos de estabilidade, além de um requisito para o registro sanitário de produtos farmacêuticos, buscam evidências de como a qualidade de um fármaco varia com o passar do tempo, objetivando o estabelecimento de um prazo de validade, bem como recomendações das condições de estocagem e armazenamento dos produtos (ICH, 2003; BRASIL, 2005).

A estabilidade pode ser definida, portanto, como o tempo durante o qual uma determinada especialidade farmacêutica ou mesmo uma matéria-prima considerada isoladamente, em um material de acondicionamento específico, mantém, dentro dos limites especificados, as mesmas condições físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas que possuía quando da época de sua fabricação (BRASIL, 2005; O'DONNELL & BOKSER, 2006).

Há, contudo, inúmeros fatores que podem estar relacionados à instabilidade dos fármacos. Além dos fatores extrínsecos à formulação, como umidade, luz e temperatura, os fatores químicos como oxidação, redução, hidrólise e racemização podem levar à perda do efeito terapêutico como também à formação de produtos de degradação (CARSTENSEN & RHODES, 2000). Diante disso, a avaliação e controle desses contaminantes eventualmente formados são de suma importância durante os estudos de estabilidade, uma vez que podem estar relacionados com reações adversas e efeitos tóxicos (ICH, 2006).

Basicamente, os estudos de estabilidade são realizados através dos testes de estresse, acelerados e confirmatórios. Os testes de estresse são projetados para aumentar a velocidade de degradação de uma substância em condições forçadas de armazenamento, permitindo assim, determinar quais os principais fatores que afetam a estabilidade do produto e em qual magnitude. Nesses ensaios as condições forçadas aos quais os fármacos são submetidos são, usualmente, a ácida, básica, térmica, oxidativa e fotolítica. Por outro lado, os estudos de curta duração ou acelerados e os de longa duração ou confirmatórios tem como intuito propiciar informações sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos, como também 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).

Independentemente do tipo do teste, um requisito fundamental para o correto acompanhamento da estabilidade de fármacos é o emprego de métodos indicativos de estabilidade, principalmente por CL ou EC. Estes métodos devem ser desenvolvidos utilizando as informações dos estudos de degradação forçada como subsídio, sendo definidos como métodos analíticos que quantificam exatamente o fármaco sem interferência de produtos de degradação, impurezas, excipientes ou outros componentes da formulação. Dessa forma, pode-se estabelecer se o fármaco contido nas amostras permanece inalterado, ou parcial alterado, quando estas forem conservadas em condições adequadas (CARSTENSEN & RHODES, 2000; BAKSHI & SINGH, 2002; ICH, 2003; ICH, 2006; ALSANTE *et al.*, 2007).

Outra importante aplicação destas metodologias é na determinação da cinética de degradação de fármacos. Tal avaliação é fundamental para os estudos de estabilidade, uma vez que permite propor mecanismos para as reações de degradação e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN & RHODES, 2000). No entanto, para definir a ordem e a velocidade de reação são necessários estudos de cinética química, sendo as reações classificadas, basicamente, em reações de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem (LACHMAN *et al.*, 2001). A reação de ordem zero ocorre quando a velocidade de reação é independente da concentração da

substância ativa. Nesse caso, um gráfico de concentração (c) em função do tempo (t) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação (k). Quando a velocidade da reação depende da concentração do reagente, a reação segue cinética de primeira ordem, obtendo-se uma reta com a representação do logaritmo da concentração ($\log c$) em função do tempo (t). A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Para esse tipo de reação, a representação do inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (t) fornece uma reta (NUDELMAN, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001). A partir da determinação da ordem e velocidade de reação, torna-se possível a obtenção de outros dados característicos de estudos de estabilidade, tais como, o $t_{1/2}$ e o $t_{90\%}$, que representam os tempos em que a concentração do fármaco atinge 50% e 90% da concentração inicial, respectivamente (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN & RHODES, 2000).

Além dos estudos preliminares de estabilidade realizados por nosso grupo de pesquisa durante a avaliação da especificidade e otimização dos métodos já citados por CL e EC, poucos são os registros disponíveis. Em relação à estabilidade do DEL, não foram observadas referências na literatura pesquisada. Entretanto, foram encontrados relatos sobre a instabilidade do MAN quando exposto à luz (RAGNO *et al.*, 2003; IOELE *et al.*, 2009; MIELCAREK *et al.*, 2009; MIELCAREK *et al.*, 2010). Neste contexto, MIELCAREK e colaboradores (2005) estudaram a suscetibilidade do MAN frente à condição fotolítica e os resultados permitiram identificar os produtos de degradação nitrofenilpiridina e derivado nitrosofenilpiridina.

3.9. Ensaio de dissolução

O processo de dissolução pode ser definido como o fenômeno em que um fármaco no estado sólido se libera de sua forma farmacêutica e entra em solução, tornando-se disponível para ser absorvido pelo organismo. A solubilização nos líquidos do trato gastrointestinal é, portanto, um parâmetro fundamental para que estes sejam capazes de transpor membranas biológicas e exercer seus efeitos terapêuticos (AMIDON *et al.*, 1995; KASIM *et al.*, 2003). Entretanto, existem inúmeras variáveis que podem alterar a dissolução de uma forma farmacêutica e,

consequentemente, a biodisponibilidade do fármaco. Fatores relacionados ao paciente, tais como fisiologia da membrana, fluxo sanguíneo e pH do trato gastrintestinal, bem como fatores relacionados ao fármaco e à formulação, como solubilidade e natureza química do fármaco, polimorfismo, coeficiente de partição, tamanho de partícula, entre outros, tornam o processo de absorção complexo e variável (SHARGEL *et al.*, 2005).

Diante disso, o estudo de dissolução é ferramenta imprescindível na indústria farmacêutica, pois permite assegurar a qualidade lote a lote do produto, orientar o desenvolvimento de formulações e monitorar o desempenho de alguns processos de fabricação. Estes testes são requisitos fundamentais na obtenção de registro para comercialização de diversos medicamentos, além de serem capazes de indicar potenciais problemas de biodisponibilidade e, em alguns casos, substituir um estudo de bioequivalência (FDA, 1997; BRASIL, 2002).

Um procedimento de dissolução bem delineado pode também fornecer informações a respeito da característica biofarmacêutica do produto, avaliando a capacidade da forma farmacêutica de liberar o fármaco e simultaneamente indicar como este irá se comportar *in vivo*. Seria desejável, portanto, o desenvolvimento de ensaios cujas condições sejam biorrelevantes e que as frações dissolvidas do fármaco se assemelhem com a fração absorvida do mesmo no organismo (FDA, 1997; DRESSMAN & LENNERNAS, 2000). Tal situação é dependente da solubilidade e da permeabilidade gastrintestinal dos fármacos. Para avaliação dos fármacos, pode-se considerar o sistema de classificação biofarmacêutica (AMIDON *et al.*, 1995), no qual as substâncias ativas farmacêuticas são classificadas em diferentes categorias (Tabela 3.2).

TABELA 3.2. Classificação biofarmacêutica de fármacos.

Classe	Solubilidade	Permeabilidade
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

Fonte: AMIDON *et al.*, 1995;

A correlação *in vivo/in vitro* (CIVIV) tem suas chances aumentadas quando a dissolução for a etapa limitante da absorção do fármaco após administração oral, ou seja, para aqueles com baixa solubilidade. Por essa razão, se o fármaco é altamente permeável e a dissolução for realmente a etapa limitante da absorção (Classe II), é muito provável o desenvolvimento de uma CIVIV (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 1997).

Os ensaios de dissolução *in vitro* possuem um papel de destaque dentre os diferentes testes de controle de qualidade requeridos para os medicamentos. No entanto, não foram encontradas condições descritas para a avaliação da dissolução de comprimidos contendo DEL e MAN na literatura pesquisada até o momento. Além disso, mesmo os fármacos possuindo baixa solubilidade em água, conforme visto anteriormente, apenas a classificação biofarmacêutica do MAN foi encontrada.

3.10. Validação de métodos analíticos

Validação é o ato documentado atestando que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente conduz aos resultados esperados (BRASIL, 2010). Para métodos analíticos, é um processo constante e dinâmico que inicia no planejamento da estratégia analítica e continua nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das condições metodológicas, bem como na qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal envolvidos (RIBANI *et al.*, 2004; SHABIR *et al.*, 2007). Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências de que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2003; ERMER & MILLER, 2005; ICH, 2005; ROZET *et al.*, 2007).

Os parâmetros a serem avaliados durante a validação de um método analítico incluem, fundamentalmente, a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Além disso, tratando-se de métodos cromatográficos e eletroforéticos, a adequabilidade do sistema também deve ser observada. No caso de métodos bioanalíticos, devem-se incluir também parâmetros de efeitos de matriz, recuperação e estabilidade do fármaco na matriz biológica após ciclos de congelamento (BRASIL, 2003; ICH, 2005, BRASIL 2012).

De acordo com a legislação brasileira vigente, os métodos analíticos são classificados em diferentes categorias (Tabela 3.3) e, para cada uma delas, diferentes parâmetros analíticos são preconizados.

TABELA 3.3. Classificação dos testes analíticos, segundo sua finalidade:

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

Fonte: BRASIL, 2003.

Entretanto, quanto à definição e execução de tais parâmetros de validação, tanto a ANVISA (2003), quanto o ICH (2005) e a USP (2012) reconhecem que não há necessidade de todos serem avaliados. Sendo assim, fica sob responsabilidade do analista definir quais parâmetros observar, visto que o tipo de método e a sua finalidade é que irão determinar o desenvolvimento do processo (SWARTZ & KRULL, 1998; ERMER, 2001; ERMER & MILLER, 2005).

A especificidade corresponde à capacidade do método analisar o composto de interesse mesmo na presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação, componentes da matriz, excipientes ou mesmo outras substâncias ativas. Dependendo da metodologia analítica empregada, ela pode ser determinada pela comparação de substâncias de referência com amostras contaminadas, amostras de excipientes e de amostras armazenadas sob condições de estresse (por exemplo, luz, calor, umidade, hidrólise ácido-básica e oxidação). 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 dentro de uma determinada faixa de concentração. Recomenda-se que sua determinação seja realizada através de um mínimo de cinco concentrações

diferentes e os resultados analisados por métodos estatísticos apropriados. A precisão é a avaliação da conformidade dos resultados individuais que foram obtidos para uma série de análises de uma mesma amostra, em idênticas condições de ensaio. Este parâmetro pode ser avaliado através da repetibilidade (precisão intradia), da precisão intermediária (precisão interdias) e da reprodutibilidade. A repetibilidade compreende a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Na precisão intermediária avalia-se a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo. A precisão normalmente é expressa através do coeficiente de variação percentual ($CV\%$) ou desvio padrão relativo (DPR). Já a exatidão da metodologia analítica descreve a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (teórico). Sua avaliação pode ser realizada através da adição de padrão (substância de referência) à solução do medicamento (amostra com analito), bem como através da adição de quantidade conhecida da substância sob análise em meio preparado com excipientes da formulação. O ensaio é normalmente realizado em três diferentes concentrações, todos dentro da faixa de linearidade. O limite de detecção corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. Por sua vez, o limite de quantificação representa a concentração mais baixa do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais especificadas. Ambos podendo ser calculados em função das curvas analíticas ou através da razão sinal/ruído obtidos experimentalmente. A robustez de um método analítico é avaliada pela sua resistência a pequenas e deliberadas modificações nas condições experimentais, como por exemplo, mudança de pH e proporção de fase móvel, temperatura de análise, entre outros (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004 ICH, 2005; USP 35, 2012).

Além dos ensaios usuais, a robustez pode ser avaliada através da realização de estudos fatoriais, como por exemplo, o desenho experimental de Plackett-Burman (HEYDEN *et al.*, 2001). A utilização dessas abordagens estatísticas aumentou consideravelmente nos últimos anos, coincidindo com a evolução dos computadores

e a disponibilização de *softwares* e aplicativos estatísticos (MONTGOMERY, 2001). A possibilidade de variação de um número relativamente grande de fatores em um número relativamente pequeno de experimentos torna este tipo de procedimento atrativo, pois conduz a diminuição do custo e tempo total de análise. Além disso, os estudos fatoriais permitem uma completa avaliação estatística dos valores obtidos, com diversos tipos de gráficos e, quando aplicados principalmente na otimização e na robustez de um método analítico, possuem vantagens em relação à metodologia clássica, que apresenta uma estatística limitada, baseada na interpretação e experiência do analista (HEYDEN *et al.*, 2001; DEJAEGHER & HEYDEN, 2011; VOGT & KORD, 2011).

Outra atribuição de destaque e que, quando aplicável, deverá ser avaliada durante o processo de validação, é a capacidade de um método analítico separar, detectar e quantificar impurezas, bem como sua aplicabilidade no monitoramento de possíveis produtos de degradação em estudos de estabilidade e avaliação da liberação de fármacos em estudos de dissolução (RAO & NAGARAJU, 2003; ICH, 2006).

Objetivando uma melhor apresentação e compreensão dos resultados obtidos, o presente trabalho foi dividido em partes experimentais, sendo: PARTE 1 – referente aos métodos analíticos aplicados à avaliação de diferentes matérias-primas de DEL e MAN; PARTE 2 – referente à determinação quantitativa de DEL e MAN por CL-EM/EM; PARTE 3 – referente à avaliação dos produtos de degradação de DEL e MAN por CL-UV e CL-EM, cinética de degradação e estudo de citotoxicidade; PARTE 4 – referente à determinação quantitativa de DEL e MAN por ED-1; PARTE 5 – referente à avaliação da dissolução dos comprimidos contendo DEL e MAN.

**4. PARTE 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS À AVALIAÇÃO DE
DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS DE DELAPRIL E MANIDIPINO**

4.1. Introdução

O departamento de garantia da qualidade na indústria farmacêutica tem o compromisso de manter, entre outros, programas de qualificação de fornecedores de matérias-primas, de validação de processos, assim como, de monitoramento da estabilidade de fármacos. Estes programas, além de necessários ao atendimento das boas práticas de fabricação, são críticos para o processo de produção de medicamentos, envolvendo um elevado custo, qualificação de pessoal, bem como metodologias adequadas (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Uma vez que variações nas propriedades físico-químicas dos fármacos podem impactar diretamente na atividade terapêutica e na tecnologia industrial, a avaliação dos insumos farmacêuticos é requisito essencial para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, bem como para garantir a qualidade entre lotes de produção (GANDHI *et al.*, 2002; TOMASSETTI *et al.*, 2005). Para tal, várias são as técnicas analíticas disponíveis para a avaliação de fármacos em suas formas farmacêuticas, bem como em matérias-primas provenientes de diferentes fornecedores, e a utilização em conjunto das mesmas permite uma compreensão das propriedades de estado sólido de forma mais abrangente, além possibilitar a identificação de parâmetros críticos a serem observados para garantir a aquisição de um insumo com qualidade (CHIENGA *et al.*, 2011).

Os estudos relativos à caracterização de diferentes amostras de matérias-primas de DEL e MAN, bem como a avaliação da sua qualidade, utilizando termogravimetria, calorimetria diferencial de varredura, difração de raios X, reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura serão apresentados no formato de artigo científico (ARTIGO CIENTÍFICO 4.2.) e sua redação foi disposta nas normas e formatos da revista à qual foi submetido.

4.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Delapril and manidipine: characterization and purity evaluation in raw materials

**Aceito para publicação no periódico Journal of Thermal Analysis and
Calorimetry**

DELAPRIL AND MANIDIPINE: CHARACTERIZATION AND PURITY EVALUATION IN RAW MATERIALS

Vítor Todeschini¹, Paulo Renato de Oliveira², Larissa Sakis Bernardi⁴, Rúbia Lazzaretti Pereira¹, Carlos Eduardo Maduro de Campos³, Marcos Antonio Segatto Silva⁴, and Nadia Maria Volpato¹

¹Post graduation in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

²Post graduation in Pharmaceutical Sciences, State University of Centro Oeste, Guarapuava-PR, Brazil

³Post graduation in Physics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brazil

⁴Post graduation in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brazil

4.2.1. RESUMO

O presente estudo descreve a avaliação e caracterização do estado sólido de diferentes matérias-primas do delapril (DEL) e do manidipino (MAN) através de diversas técnicas analíticas. Os materiais do DEL (D1 e D2) e do MAN (M1 e M2) foram obtidos de diferentes fornecedores e submetidos à calorimetria diferencial exploratória (DSC), termogravimetria (TG), difração de raios X de pó (XRPD), reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFT), espectroscopia Raman (RS) e microscopia eletrônica de varredura (SEM). Para o DEL, as análises por TG/DTG demonstraram três eventos de perda de massa entre 140 e 402 °C. Variações nas curvas DSC foram verificadas, com pontos de fusão de 182,8 °C para D1 e 170,1° C para D2. Além disso, resultados diferentes também foram observados por RS e SEM para este material. Entretanto, quando analisado por cromatografia líquida (CL), um pico adicional foi detectado, demonstrando que as alterações observadas podem estar relacionadas com uma impureza presente no material D2 e não a um possível polimorfismo (como confirmado por XRPD). Por outro lado, na avaliação do MAN, todos os resultados foram semelhantes, indicando que não há diferença significativa entre as amostras M1 e M2. É importante destacar, portanto, que além da avaliação do estado sólido, as técnicas analíticas utilizadas neste estudo também podem ser utilizadas para o controle de qualidade, estudos de estabilidade e qualificação de fornecedores de matérias-primas.

Palavras-chave: Caracterização do estado sólido; delapril; manidipino; matérias-primas; técnicas analíticas.

**5. PARTE 2 – DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE DELAPRIL E
MANIDIPINO POR CL-EM/EM**

5.1. Introdução

Características como inigualável sensibilidade, velocidade de desempenho e aquisição dos resultados e diversidade de aplicações elevaram a EM a uma posição de destaque entre os métodos de análise. Sua versatilidade e potencial analítico aumentam ainda mais quando combinada à CL, associando capacidade de separação, seletividade e possibilidade de análise molecular (NIESSEN, 1999; ARDREY, 2003).

Mesmo com um alto custo de aquisição e manutenção do instrumento, necessidade de uma estrutura laboratorial bem equipada e também de operadores qualificados, a CL-EM vem sendo utilizada de modo crescente para análise de produtos farmacêuticos, pois oferece rapidez e eficiência na quantificação, além de permitir, com alta seletividade, a avaliação de compostos que porventura possam não estar totalmente resolvidos cromatograficamente (NIESSEN, 2003; LEE, 2005). Além disso, a aplicação em estudos de estabilidade e possibilidade de identificação de produtos de degradação são vantagens a serem consideradas (BAKSHI & SINGH, 2002).

O método desenvolvido e validado por CL-EM/EM para determinação simultânea de DEL e MAN em sua associação farmacêutica será apresentado no formato de artigo científico (ARTIGO CIENTÍFICO 5.2.) e sua redação foi disposta nas normas e formatos da revista na qual foi publicado.

5.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Delapril and manidipine measurements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in pharmaceutical formulation.

European Journal of Mass Spectrometry, v. 17, p. 287-296, 2011.

DELAPRIL AND MANIDIPINE MEASUREMENTS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY IN PHARMACEUTICAL FORMULATION

Vítor Todeschini¹, Maximiliano da Silva Sangoi¹ and Nadia Maria Volpato¹

¹Post graduation in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

5.2.1. RESUMO

Para a análise simultânea de delapril (DEL) e manidipino (MAN) em sua forma farmacêutica combinada foi desenvolvido e validado um método simples, específico, rápido e sensível por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM), utilizando fesoterodina como padrão interno (PI). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se uma coluna Luna C8 (50 x 3,0 mm d.i., 3 µm) mantida à 45°C. A fase móvel foi composta por metanol e acetato de amônio 10 mM (90:10, v/v) eluída sob uma vazão de 0,25 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL de soluções contendo 450 ng/mL de DEL, 150 ng/mL de MAN e 300 ng/mL de PI. O espectrômetro de massas utilizou a ionização por Electrospray positivo (ESI+), sendo configurado no modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM). As transições avaliadas foram: m/z 453,1>234,1 para o DEL, m/z 611,1>167,0 para o MAN e m/z 412,2>223,0 para a PI. O tempo total de análise foi de 3 min e o método mostrou-se linear no intervalo de concentração de 6-1080 ng/mL e 2-360 ng/mL para o DEL e MAN, respectivamente. A validação do método foi realizada investigando-se parâmetros, tais como a especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, obtendo-se resultados em conformidade com os limites internacionalmente preconizados. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação simultânea dos fármacos nos comprimidos, contribuindo, portanto, para aprimorar o controle da qualidade, assegurando a eficácia terapêutica.

Palavras-chave: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, delapril, manidipino, validação.

**6. PARTE 3 – AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE
DELAPRIL E MANIDIPINO POR CL-UV E CL-EM, CINÉTICA DE
DEGRADAÇÃO E CITOTOXICIDADE**

6.1. Introdução

A avaliação da estabilidade fornece informações de como a qualidade dos fármacos pode ser influenciada por uma série de variáveis, tais como, temperatura, umidade, luz, gases atmosféricos, solventes, pH, contaminação microbiológica, entre outros (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999; MATTHEWS, 1999). Além disso, fatores como incompatibilidades e reações de oxidações, reduções, hidrólise e racemizações também podem ser relevantes, podendo ocasionar a degradação desses produtos (NUDELMAN, 1975). É de grande importância, portanto, a investigação da identidade destes compostos, assim como das possíveis rotas de degradação, auxiliando na compreensão de potenciais efeitos colaterais, na concepção de uma formulação mais favorável e na síntese de novos fármacos com maior estabilidade (MEHTA *et al.*, 2010; VYAS *et al.*, 2010).

Além da necessidade de utilização de métodos indicativos de estabilidade para o acompanhamento dos produtos de degradação formados em diferentes condições de estresse, metodologias que permitem o estudo e a caracterização de pequenas quantidades desses produtos estão em evidência atualmente. Assim, técnicas hífenizadas, como a CL-EM, têm sido exploradas de forma crescente, principalmente, quando comparados com processos convencionais de isolamento e análise espectral, procedimentos estes considerados onerosos e demorados (FUKUTSU *et al.*, 2006; MEHTA *et al.*, 2010; VYAS *et al.*, 2010).

Os métodos desenvolvidos por CL-UV e CL-EM para avaliação da estabilidade de DEL e MAN, bem como os estudos de citotoxicidade e cinética de degradação dos mesmos, serão apresentados no formato de artigo científico (ARTIGO CIENTÍFICO 6.2.) e sua redação foi disposta nas normas e formatos da revista à qual foi submetido para publicação.

6.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Main degradation products of delapril and manidipine evaluated by LC-UV and LC-ESI-MS, decay kinetic and in vitro cytotoxicity studies

Submetido à publicação.

MAIN DEGRADATION PRODUCTS OF DELAPRIL AND MANIDIPINE EVALUATED BY LC-UV AND LC-ESI-MS, DECAY KINETIC AND IN VITRO CYTOTOXICITY STUDIES

Vítor Todeschini¹, Maximiliano da Silva Sangoi¹, Gustavo Krumel Goelzer¹, Juliana Maria de Mello Andrade¹ and Nadia Maria Volpato¹

¹Post graduation in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre-RS, Brazil

6.2.1. RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a avaliação dos principais produtos de degradação do delapril (DEL) e do manidipino (MAN) formados sob condições alcalinas e fotolítica, respectivamente. Para tal, foi desenvolvido um método simples e indicativo de estabilidade utilizando cromatografia líquida com detecção no ultravioleta (CL-UV), compatível com estudos por espectrometria de massas (CL-EM). A separação cromatográfica de todos os compostos foi obtida em menos de 7 min e efetuada utilizando-se uma coluna Shim-pack C18 (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm) com uma fase móvel constituída por acetonitrila e acetato de amônio pH 3,3 (57:43; v/v) para ambas as técnicas. Desse modo, os principais produtos de degradação detectados foram analisados por CL-EM e, baseado nos tempos de retenção e confirmação do peso molecular, a identidade destes produtos formados puderam ser sugeridas, sem um complicado isolamento ou processo de purificação. A cinética de degradação dos fármacos nestas condições foi também avaliada e pôde ser melhor descrita como um processo de primeira ordem para DEL ($R^2 = 0,9991$) e de processo de ordem zero para o MAN ($R^2 = 0,9867$). Além disso, nenhuma evidência de citotoxicidade em células mononucleares humanas foi observada para as amostras degradadas. O método proposto por CL-UV foi validado com sucesso de acordo com as orientações de guias internacionais e, portanto, contribui para melhorar o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos.

Palavras-chave: Cinética de degradação, citotoxicidade, cromatografia líquida, delapril, espectrometria de massas, manidipino, produtos de degradação, validação.

**7.PARTE 4 – DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE DELAPRIL E
MANIDIPINO POR ED-1**

7.1. Introdução

Atualmente, apesar da análise de controle da qualidade de medicamentos ser realizada predominantemente utilizando a CL, os métodos espectrofotométricos continuam desfrutando de grande popularidade tanto no meio acadêmico quanto em indústrias farmacêuticas, não só por serem considerados alternativos à cromatografia, mas também por apresentarem vantagens em razão, principalmente, da fácil disponibilidade de instrumentação e simplicidade operacional, além do relativo baixo custo de operação e de consumíveis, baixo consumo de reagentes e solventes e tempo de análise reduzido (WATSON, 2005).

Dentre estas técnicas, a espectrofotometria utilizando a ferramenta derivada (ED) constitui uma alternativa para a determinação simultânea de princípios ativos cujas bandas de absorção estão sobrepostas, bem como para análise de fármacos que sofrem interferência do placebo e que apresentam baixa absorvidade (HACKMANN *et al.*, 1990). Uma vez que é uma técnica analítica direta, não necessita de extrações prévias ou tratamentos de separação, podendo ser aplicada para análise de rotina de forma precisa e exata (OJEDA & ROJAS, 2004).

O método desenvolvido e validado por ED-1 para a determinação simultânea de DEL e MAN em sua associação farmacêutica, bem como a comparação estatística entre os diferentes métodos propostos para a mesma finalidade, está apresentado no formato de artigo científico (ARTIGO CIENTÍFICO 7.2.) e sua redação foi disposta nas normas e formatos da revista à qual foi submetido para publicação.

7.2. ARTIGO CIENTÍFICO – First-order derivative UV spectrophotometric method for simultaneous measurement of delapril and manidipine in tablets

Submetido à publicação.

FIRST-ORDER DERIVATIVE UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF DELAPRIL AND MANIDIPINE IN TABLETS

Vítor Todeschini¹, Amanda Thomas Barden¹, Leticia Lenz Sfair¹, Maximiliano da Silva Sangoi¹ and Nadia Maria Volpato¹

¹Post graduation in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

7.2.1. RESUMO

Para a análise simultânea de delapril (DEL) e manidipino (MAN) em sua forma farmacêutica combinada foi desenvolvido um método por espectrofotometria no ultravioleta, utilizando a ferramenta derivada de primeira ordem (ED-1). Os espectros ED-1 foram obtidos utilizando $\Delta\lambda = 4,0$ nm, com as determinações sendo realizadas em 228 nm para DEL e 246 nm para o MAN. O método foi validado segundo guias internacionalmente aceitos, envolvendo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação. De acordo com os resultados obtidos o método apresenta elevada especificidade, mesmo na presença de dois fármacos e excipientes da formulação, resposta linear nas faixas de concentrações de 18-54 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9994$) para o DEL e 6-18 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9981$) para o MAN, adequada precisão ($\leq 1,47\%$) e exatidão (98,98% para o DEL e 100,50% para o MAN). Além disso, o método mostrou-se robusto quando avaliado pelo desenho experimental proposto por Plackett-Burman. O método proposto por ED-1 foi aplicado com sucesso para a análise simultânea de DEL e MAN em comprimidos, podendo, portanto, ser utilizado como um método alternativo e sustentável às técnicas de separação. Complementarmente, os resultados encontrados foram comparados estatisticamente com aqueles obtidos pelos métodos por cromatografia líquida, eletroforese capilar e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, demonstrando diferença não significativa ($p > 0,05$) na determinação quantitativa dos fármacos.

Palavras-chave: Delapril; espectrofotometria derivada; manidipino; método sustentável; validação.

**8. PARTE 5 – MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA AVALIAÇÃO DE
COMPRIMIDOS CONTENDO DELAPRIL E MANIDIPINO**

8.1. Introdução

O teste de dissolução permite avaliar a quantidade de fármaco dissolvido a partir de uma formulação, em um volume de meio, mantido à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, após determinado período de tempo, utilizando-se equipamento de agitação específico a uma dada velocidade (FB, 2010; USP 35, 2012).

É um procedimento fundamental no controle de qualidade na indústria farmacêutica, entretanto, diversos são os fatores que podem influenciar o processo de dissolução e reprodutibilidade dos resultados dos testes, principalmente aqueles relacionados ao fármaco, forma farmacêutica e método de dissolução (MARQUES & BROWN, 2002; STORPIRTIS *et al.*, 2004). Há necessidade, portanto, que todas as condições sejam cuidadosamente avaliadas durante o desenvolvimento do método e orientadas na busca de um ensaio de dissolução discriminativo, ou seja, capaz de detectar mudanças na formulação, no processo de fabricação e nas características físico-químicas do fármaco (MANADAS *et al.*, 2002; USP 35, 2012). Além disso, o teste pode ser ainda mais atrativo se as condições otimizadas proporcionarem uma correlação entre a porcentagem dissolvida do fármaco no teste *in vitro* e a porcentagem absorvida do fármaco *in vivo*, sendo indicativo do perfil de biodisponibilidade (FDA, 1997; DRESSMAN *et al.*, 1998).

O desenvolvimento e validação do método de dissolução para avaliação simultânea de DEL e MAN em sua associação farmacêutica, bem como a analogia obtida entre os dados *in vivo* e *in vitro* para o MAN, serão apresentados no formato de artigo científico (ARTIGO CIENTÍFICO 8.2.) e sua redação foi disposta nas normas e formatos da revista à qual foi submetido para publicação.

8.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Proposal of a dissolution method for delapril and manidipine combination tablets based on absorption profile of manidipine

Submetido à publicação.

PROPOSAL OF A DISSOLUTION METHOD FOR DELAPRIL AND MANIDIPINE COMBINATION TABLETS BASED ON ABSORPTION PROFILE OF MANIDIPINE

Vítor Todeschini¹, Gustavo Krumel Goelzer¹, Jaison Carlosso Machado¹, Clésio Soldateli Paim¹, Bibiana Verlindo de Araujo¹ and Nadia Maria Volpato¹

¹Post graduation in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

8.2.1. RESUMO

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar um método de dissolução para avaliação dos comprimidos contendo delapril (DEL) e manidipino (MAN), utilizando um método por cromatografia líquida para a quantificação das amostras. As condições do ensaio de dissolução foram otimizadas com base em dados de absorção *in vivo* para o MAN obtidas da literatura. A partir das avaliações da estabilidade dos fármacos nos meios de dissolução e condição SINK, um adequado perfil de dissolução *in vitro* para esta formulação foi obtido utilizando 900 mL de tampão citrato a pH 3,2 a 37 °C ± 0,5 °C como meio de dissolução e dispositivo USP 2 (pá) sob uma agitação de 75 rpm. Nestas condições, uma relação linear entre a fração dissolvida e a fração absorvida do MAN (obtida pelo método da deconvolução) foi obtida ($R = 0,997$) e, assim, uma correlação *in vivo-in vitro* pode ser estabelecida para este fármaco. O método proposto foi validado segundo diretrizes internacionais, obtendo-se resultados dentro dos limites aceitáveis para os parâmetros preconizados de especificidade, linearidade, precisão e exatidão. Portanto, o ensaio de dissolução descrito pode ser aplicado para a análise da libertação simultânea de DEL e MAN a partir da forma farmacêutica sólida, contribuindo, assim, para a melhoria do controle de qualidade de produtos farmacêuticos e para minimizar o número de estudos de biodisponibilidade.

Palavras-chave: Delapril; manidipino; método de dissolução; correlação *in vitro-in vivo*; validação.

9. DISCUSSÃO GERAL

A associação dos fármacos cloridrato de delapril (DEL) e dicloridrato de manidipino (MAN), utilizada no tratamento e controle da hipertensão arterial, embora de importância clínica na terapia medicamentosa, não apresenta monografia em compêndios oficiais e são poucos os registros na literatura científica sobre métodos para sua avaliação. Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas de análise de domínio público, aplicáveis ao controle de qualidade de insumos e produto acabado, juntamente com o estudo de estabilidade e ensaio de dissolução, possuem fundamental importância para garantir a administração segura e eficaz do medicamento, além de estabelecer bases científicas e tecnológicas para progressivos trabalhos na área.

Observa-se que a discussão apresentada a seguir refere-se às análises qualitativas para avaliação e caracterização de matérias-primas dos fármacos, à determinação quantitativa dos mesmos em comprimidos utilizando diferentes técnicas analíticas, aos estudos de estabilidade e avaliação dos principais produtos de degradação formados em diferentes condições de estresse, bem como ao estudo de dissolução, estando baseada no artigo publicado e nos quatro artigos submetidos à publicação, referenciados adequadamente no texto correspondente.

É importante destacar, ainda, que o presente estudo teve como subsídio os trabalhos desenvolvidos em projeto precedente de mestrado, intitulado “Desenvolvimento de métodos cromatográfico e eletroforético para determinação simultânea de delapril e manidipino em comprimidos” (TODESCHINI, 2010). Neste, a adequabilidade das substâncias químicas de referência (SQR) de DEL e MAN, obtidas junto à empresa produtora do medicamento, bem como a identificação dos fármacos nos comprimidos foram avaliadas utilizando as técnicas de IV, EM, CL e EC. Assim, através da análise e interpretação das bandas de absorção do espectro IV, que sinalizaram os grupamentos funcionais característicos dos compostos, juntamente com os espectros de massas de varredura, cujos resultados demonstraram as massas características dos íons moleculares dos fármacos, foram confirmadas a identidade dos mesmos. Já para a análise qualitativa no produto acabado, os resultados obtidos pelos métodos cromatográfico e eletroforético (descritos anteriormente) 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 estudado.

De forma complementar as avaliações das SQR do DEL e MAN, e devido à aquisição de outras matérias-primas dos fármacos provenientes de um diferente fornecedor, uma variedade de técnicas analíticas foram empregadas na verificação da qualidade e comparação destes materiais, conforme apresentado no item **4.2 ARTIGO CIENTÍFICO**.

As matérias-primas de DEL (nomeadas como D1 e D2) e MAN (nomeadas como M1 e M2) oriundas de diferentes fornecedores foram submetidas à calorimetria diferencial exploratória (DSC), termogravimetria (TG), difração de raios X em pó (XRPD), reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFT), espectroscopia Raman (RS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para as amostras de DEL, as curvas TG/DTG demonstraram que a decomposição térmica ocorreu em três eventos entre 140 e 402 °C, sendo que o primeiro e o segundo evento ocorrem simultaneamente. Os resultados demonstraram uma menor estabilidade térmica de D2, uma vez que tais eventos térmicos estão deslocados para temperaturas mais baixas quando comparados com D1. Além disso, observou-se tanto um alargamento de pico quanto diferenças nos valores T_{peak} nas curvas DSC (T_{peak} de 182,8 °C para D1 e 170,1 °C para D2). Estas alterações poderiam ser indicativas de polimorfismo, bem como de impurezas contidas no material. Ainda na comparação desses insumos, diferenças entre D1 e D2 também foram observados nos espectros RS e análise microscópica, reforçando a hipótese de alteração neste material.

Entretanto, a possibilidade de polimorfismo foi descartada através das análises por XRPD, uma vez que as amostras de DEL (D1 e D2) resultaram em difratogramas semelhantes. Paralelamente, as matérias-primas de DEL foram analisadas utilizando o método por CL, validado anteriormente por nosso grupo de pesquisa. Na comparação entre os cromatogramas obtidos detectou-se um sinal posterior ao pico do fármaco, provavelmente devido à presença de uma impureza na amostra e, dessa forma, corroborando com os resultados alterados obtidos pelas

técnicas mencionadas acima. Há, no entanto, necessidade de testes complementares para confirmar esta possibilidade.

Já na análise do comportamento térmico das amostras de MAN, três eventos de decomposição sobrepostos foram observados nas curvas TG/DTG, entretanto, nenhuma diferença importante foi detectada entre os intervalos de temperaturas e as porcentagens de perda de massa. Essa semelhança também pode ser observada nas curvas DSC, tanto para o primeiro quanto para o segundo evento endotérmico referentes à fusão e a decomposição, respectivamente. O restante das técnicas analíticas utilizadas também não apresentou diferença nos resultados entre as matérias-primas de MAN e, portanto, ambas podem ser consideradas adequadas em relação aos parâmetros avaliados.

Para os dois fármacos fica evidente, entretanto, a sobreposição dos eventos térmicos da fusão e decomposição, inviabilizando a utilização destas técnicas na determinação da faixa de fusão, bem como da pureza dos compostos. Por outro lado, métodos complementares, tais como DSC, podem ser mais úteis para as avaliações de pureza de compostos, uma vez que existem impurezas que não têm absorvidade no UV/VIS e, conseqüentemente, ausência de sinal em metodologias envolvendo esse detector.

Ressalta-se, assim, que além da avaliação e caracterização de substâncias no estado sólido, as técnicas empregadas neste estudo poderiam também ser usadas nos estudos de estabilidade, bem como se tornarem requisito nos programas de avaliação e qualificação de fornecedores de matérias-primas.

Objetivando a determinação simultânea de DEL e MAN em produtos farmacêuticos, desenvolveu-se e validou-se método por CL-EM/EM, conforme apresentado no item **5.2 ARTIGO CIENTÍFICO**.

No desenvolvimento do método, vários parâmetros devem ser cuidadosamente estabelecidos, dentre eles, a otimização do EM para maior sensibilidade de detecção, selecionando as corretas transições dos íons dos analitos. Primeiramente, foram identificados, através da infusão direta na fonte de ionização do equipamento, os íons principais e os íons secundários do DEL, MAN e PI utilizado nas análises, Uma vez que os fármacos obtiveram adequada ionização

por ESI+, o EM foi configurado no modo de monitoramento de múltiplas reações, avaliando-se as transições em m/z 453.1>234.1 para o DEL, m/z 611.1>167.0 para o MAN e m/z 412.2>223.0 para a PI (fesoterodina). Diferentes colunas cromatográficas foram testadas, entre elas, colunas C_8 e C_{18} de comprimentos variados. Para o método proposto, empregou-se uma coluna Luna C_8 de 5 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno, mantida a 45 °C, a qual forneceu desempenho cromatográfico e tempos de análise adequados para os fármacos em estudo. Também foram realizados testes utilizando diferentes fases móveis, avaliando-se combinações em diferentes proporções entre solventes orgânicos e soluções que modificam a ionização. A condição ótima foi estabelecida com a fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM e metanol (10:90, v/v), eluída na vazão de 0,25 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL.

Na avaliação da especificidade, a solução placebo não apresentou nenhuma interferência nos tempos de retenção dos fármacos e PI. A conformidade do modelo linear foi comprovada através do método dos mínimos quadrados e ANOVA, onde o método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 6 - 1080 ng/mL ($R^2 = 0,9954$) para o DEL e 2 - 360 ng/mL ($R^2 = 0,9972$) para o MAN, com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$). A precisão, demonstrada por meio da precisão intermediária e da repetibilidade, apresentou valores de *DPR* inferiores a 2,09% nas três concentrações analisadas para os dois fármacos. A exatidão do método apresentou resultados dentro do recomendado, com valores médios de 100,40% e 100,23%, para o DEL e MAN, respectivamente. A robustez do sistema cromatográfico foi avaliada utilizando-se o delineamento experimental proposto por Plackett-Burman, através da modificação de fatores tais como: proporção de solvente orgânico, vazão da fase móvel, temperatura em que a coluna cromatográfica foi mantida e volume de injeção. De acordo com os resultados obtidos, as modificações nos fatores estudados não interferiram na determinação quantitativa dos fármacos, demonstrando a robustez do método analítico. Desse modo, demonstrou-se que o método proposto cumpre os requisitos de validação, estando de acordo com os parâmetros de qualidade preconizados.

Paralelamente, para determinação simultânea de DEL e MAN em produtos farmacêuticos, desenvolveu-se e validou-se método por ED-1, conforme apresentado no item **7.2 ARTIGO CIENTÍFICO**.

Em estudos preliminares observou-se a sobreposição entre os espectros de absorção no UV dos fármacos e também do placebo simulado, fato este que inviabiliza a determinação simultânea dos compostos através da espectrofotometria direta. Neste sentido, o desenvolvimento do método por UV voltou-se à aplicação da ED e à determinação da ordem que ofereça melhor distinção entre os picos e maior amplitude de resposta em adequados comprimentos de onda de análise. Além disso, foram estudadas e otimizadas diferentes condições experimentais, como a janela de derivação ($\Delta\lambda$) que forneça a melhor resolução das curvas derivadas e menor sinal de ruído, bem como recursos para ampliação do sinal, uma vez que há uma redução na sensibilidade da ED em relação à UV direta. Dessa forma, adequados resultados experimentais foram obtidos utilizando a derivada de primeira ordem (ED-1) e água como diluente, com determinações realizadas em 228 nm para DEL e 246 nm para o MAN. Os espectros foram obtidos utilizando um intervalo de comprimento de onda ($\Delta\lambda$) de 4 nm na faixa de 200-300 nm. Um fator de escala de 10 foi empregado nas determinações.

A seguir procedeu-se a validação avaliando-se parâmetros preconizados por guias internacionalmente aceitos. A especificidade do método foi comprovada através da comparação dos espectros obtidos por ED-1, onde não foram observadas interações espectrais, tanto dos dois compostos quanto do placebo, em ambos os comprimentos de onda selecionados. A linearidade foi avaliada na faixa de 18 - 54 $\mu\text{g/mL}$ para o DEL e 6 - 18 $\mu\text{g/mL}$ para o MAN, obtendo-se coeficientes de determinação de 0,9994 e 0,9981 para o DEL e MAN, respectivamente. Através da ANOVA observou-se a existência de regressão linear e não existência de desvio de linearidade para os dados obtidos para ambos os fármacos, comprovando a linearidade do método analítico para $\alpha = 0,05$. Os dados obtidos para a precisão apresentaram *DPR* inferiores a 1,47% para os dois fármacos, o que demonstra a precisão do método proposto. A adequada exatidão do método foi estabelecida uma vez que o valor médio experimental do teste foi de 98,98% para o DEL e 100,50% para o MAN. Da mesma forma que o método por CL-EM/EM, utilizou-se o desenho

experimental proposto por Placket-Burman para avaliação da robustez. Foram realizadas alterações no $\Delta\lambda$, fator de escala e tempo de agitação para extração dos fármacos da forma farmacêutica. Os valores de teor observados para o DEL e MAN não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$), demonstrando que o método é robusto nas condições testadas. Os resultados obtidos indicaram que o método analítico apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, sendo considerado, portanto, adequado para a determinação quantitativa simultânea dos fármacos.

Com o intuito de estabelecer uma comparação e verificar a possibilidade de utilizar indistintamente os métodos propostos, realizou-se uma análise estatística comparativa entre os resultados da determinação quantitativa simultânea de DEL e MAN em amostras de comprimidos obtidos pelos métodos por CL-EM/EM e ED-1, juntamente com aqueles obtidos em estudos precedentes pelos métodos cromatográfico e eletroforético. Através da utilização da ANOVA, observou-se diferença não significativa ($p = 0,98$) entre os mesmos para os dois fármacos, demonstrando, portanto, que os métodos são equivalentes para tal finalidade e podem ser intercambiáveis.

Contudo, algumas diferenças podem ser determinantes na escolha das técnicas e devem ser salientadas para adoção pelo controle de qualidade de rotina. Os métodos anteriormente desenvolvidos por CL e EC têm como vantagem a possibilidade de serem empregados na verificação e monitoramento da estabilidade dos fármacos. Neste contexto, a EC possui vantagens, tais como a pequena quantidade de amostra 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, quando comparados às colunas cromatográficas. Por sua vez, a CL mostrou-se um método mais facilmente automatizado, com sistema de injeção podendo ser empregado por períodos de tempo mais longos.

O mesmo não pode ser considerado para a ED-1, que embora seja a mais econômica e simples das técnicas propostas, necessita do operador de forma constante. Além disso, sua aplicação em estudos de estabilidade torna-se limitada, quando comparada com técnicas separativas.

Em contrapartida, a CL-EM/EM, quando confrontada às outras técnicas, apresenta vantagens em relação ao tempo de análise, sensibilidade e seletividade. Além disso, necessita uma pequena quantidade de solvente para realizar a eluição cromatográfica e a ionização dos fármacos, podendo ser adaptada para utilização em amostras biológicas e estudos farmacocinéticos. Entretanto, até o momento, não é preconizada oficialmente como método analítico para quantificação de produtos farmacêuticos e seu custo de análise continua bastante oneroso.

Como anteriormente relatado, dois métodos analíticos indicativos de estabilidade utilizando o CL e a EC foram desenvolvidos e validados recentemente por nosso grupo de pesquisa, objetivando a determinação simultânea de DEL e MAN em comprimidos comerciais. As diferentes condições de estresse às quais os fármacos foram submetidos durante os estudos de especificidade evidenciaram a susceptibilidade de DEL e MAN frente a condições alcalinas e fotolítica, respectivamente.

Estas condições serviram, portanto, como subsídio para a sequência dos estudos de estabilidade, por meio do desenvolvimento de um segundo método analítico indicativo de estabilidade por CL-UV, como também para os estudos por CL-EM na caracterização dos produtos de degradação, conforme apresentado no item **6.2 ARTIGO CIENTÍFICO**.

Neste contexto, o desenvolvimento do método por CL-UV foi realizado objetivando a rápida determinação dos fármacos e ótima resolução entre os mesmos e os produtos de degradação formados, além de estabelecer uma adequada interface para a realização de estudos por CL-EM. Assim, a fase móvel foi otimizada com um tampão volátil, acetato de amônio, juntamente com um solvente orgânico para propiciar a ionização dos fármacos e dos produtos de degradação.

Baseado no método anteriormente desenvolvido por CL, as condições cromatográficas foram definidas utilizando coluna C₁₈ (15 mm x 4,6 mm), mantida a 35 °C. A fase móvel foi constituída por acetonitrila 95% e tampão acetato de amônio 20 mM, pH 3,3, na proporção de 57:43 (v/v), eluída na vazão de 1,0 mL/min. A detecção foi realizada a 206 nm utilizando o detector de arranjo de diodos (DAD), com um volume de injeção de 20 µL. O método permitiu uma análise rápida e

eficiente (total 7 min), com tempos de retenção reprodutíveis de, aproximadamente, 3,3 e 4,8 min para o DEL e MAN respectivamente, e adequados parâmetros de adequabilidade do sistema. Além disso, não foi observada interferência dos produtos de degradação em relação aos sinais dos fármacos, bem como dos excipientes da formulação. Fato este confirmado pela utilização do DAD, verificando-se uma elevada pureza de pico em todas as determinações.

A linearidade foi avaliada na faixa de concentração de 3 - 120 µg/mL ($R^2 = 0,9976$) para o DEL e 1 - 40 µg/mL ($R^2 = 0,9987$) para o MAN, não apresentando desvio do modelo linear ($p > 0,05$). A metodologia mostrou-se precisa apresentando valores de *DPR* inferiores a 1,26% e exata, com média de recuperação de 98,72% e 99,70% para o DEL e MAN, respectivamente. 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, e temperatura que foi mantida a coluna cromatográfica. Os resultados demonstraram a robustez do método analítico uma vez que não houve diferença significativa ($\alpha = 0,05$) nas determinações quantitativas dos fármacos.

Concluiu-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos de validação preconizados pela literatura, podendo ser empregado para análise quantitativa simultânea de DEL e MAN, mesmo na presença de produtos de degradação.

Além disso, o método por CL-UV também foi aplicado na avaliação da cinética de degradação dos fármacos. Durante os estudos de degradação forçada, foi possível observar aproximadamente 90% de degradação do DEL após 4 horas de exposição à condição alcalina. Para o MAN, por outro lado, verificou-se uma redução em torno de 40% de sua concentração inicial quando exposto à luz UV-A (365 nm) durante 10 horas. A partir dos dados obtidos em diferentes tempos de amostragem, pode-se atribuir uma cinética de reação de primeira ordem para o DEL e de ordem zero para o MAN. Dessa forma, parâmetros cinéticos como a constante de velocidade de reação (k) e tempo de vida útil (t_{90}) foram calculados com base nas equações matemáticas específicas de cada ordem da reação.

A seguir, procederam-se as análises por EM. Primeiramente, foram obtidos os espectros de varredura total dos íons para as soluções SQR de DEL e MAN (sem degradação), bem como das amostras degradadas. Através da comparação desses espectros, picos adicionais foram observados e suas massas moleculares puderam então ser monitoradas pelo sistema. É importante destacar que para ocorrer um eficiente acoplamento entre o CL e o EM, uma redução da vazão teve que ser empregada utilizando um divisor de canais (*split*), limitando a entrada de fase móvel para a fonte de ionização e o que proporciona uma melhora na eficiência da ESI.

Quando comparados com os cromatogramas obtidos por CL-UV, os estudos por CL-EM demonstraram picos nos mesmos tempos de retenção, tanto para os fármacos quanto para os principais produtos de degradação visualizados. Dessa forma, foi possível obter os valores de *m/z* característicos de cada produto formado e então sugerir suas identidades. Verificou-se que a maioria desses compostos possui valores de massa compatíveis com metabólitos já caracterizados, tanto do DEL quanto do MAN.

De forma complementar, realizou-se um estudo de toxicidade utilizando células mononucleares a fim de observar o potencial citotóxico das amostras degradadas, contendo os produtos de degradação, frente às amostras não degradadas. Quando comparadas com o controle negativo, diferenças não significativas ($p > 0,05$) foram observadas para as soluções de DEL e MAN, indicando que a presença dos produtos de degradação não interferiu na viabilidade celular em todas as concentrações analisadas.

Posteriormente aos estudos acima discutidos, desenvolveu-se e validou-se um método de dissolução para avaliar, simultaneamente, a liberação dos fármacos de sua forma farmacêutica, conforme apresentado no item **8.2 ARTIGO CIENTÍFICO**.

É importante destacar que, além de um teste de dissolução com condições de avaliar a qualidade do medicamento em diferentes lotes de produção, buscou-se o desenvolvimento de um método que permitisse uma analogia entre dados *in vivo* e *in vitro*. Tal situação tem suas chances aumentadas quando a dissolução for a etapa limitante do processo de absorção do fármaco no trato gastrointestinal.

Neste contexto, não foi encontrada a classificação biofarmacêutica do DEL na literatura científica pesquisada. Além disso, por ser um pró-fármaco, os dados farmacocinéticos são basicamente relacionados aos seus metabolitos ativos, dificultando uma analogia direta com os dados de dissolução *in vitro*. Assim, os estudos focaram, exclusivamente, para a avaliação dos dados *in vivo* do MAN, uma vez que este cumpre com os requisitos de baixa solubilidade e elevada permeabilidade.

A partir de dados obtidos da literatura referentes à concentração plasmática *versus* tempo do MAN, realizou-se, com auxílio de um *software* específico, a modelagem dos mesmos e a determinação dos valores das microconstantes de distribuição (k_{12} e k_{21}), utilizando modelo de dois compartimentos abertos por via oral. Dessa forma, puderam-se simular os dados de concentração plasmática intravenosa e então determinar a fração absorvida (FA) do MAN através da abordagem da deconvolução.

Durante o desenvolvimento do método de dissolução, diversas foram as condições avaliadas, incluindo vários meios de dissolução em diferentes faixas de pH, a adição de tensoativos, além da velocidade do dispositivo de agitação. Foram verificadas, também, a possível interferência dos filtros, os tempos de amostragens, a necessidade de desaeração, a estabilidade dos fármacos nos meios de dissolução, bem como a necessidade de otimização do método quantitativo por CL (TODESCHINI *et al* 2012). Além disso, atenção especial foi dada às análises da solubilidade e da condição *sink* em diferentes meios de dissolução, dados estes que auxiliaram na escolha das melhores condições de ensaio.

De acordo com os resultados obtidos, os perfis empregando HCl 0,1 M como meio de dissolução demonstram uma rápida e completa liberação de ambos os fármacos, atingindo uma taxa de dissolução superior a 80% antes dos 15 min de ensaio. Estas condições poderiam ser consideradas promissoras para avaliação dos comprimidos de diferentes lotes de produção, embora talvez não constitua ferramenta discriminativa para avaliar possíveis desvios do processo produtivo.

Assim, objetivando-se o desenvolvimento de um ensaio de dissolução potencialmente discriminativo e que possibilite a análise em conjunto com os dados

in vivo do MAN, a otimização do método foi orientada na busca de uma melhor diferenciação da quantidade dissolvida entre os diversos tempos de amostragens.

Com este propósito, a condição empregando tampão citrato pH 3,2 como meio de dissolução (900 mL) e dispositivo pá a 75 rpm mostrou-se adequada tanto para a avaliação simultânea dos fármacos na associação farmacêutica, como também para obter uma analogia com os dados de FA do MAN. Diante disso, os valores de porcentagem de MAN dissolvido em relação ao tempo foram comparados com sua FA, obtendo-se importantes valores de coeficiente de correlação (0,997) e inclinação da curva (1,00), demonstrando, portanto, uma adequada correlação entre as variáveis *in vitro* e *in vivo*.

De acordo com a legislação vigente, o ensaio de dissolução é classificado como um teste de desempenho e os parâmetros preconizados para sua validação são: especificidade, linearidade, precisão e exatidão (BRASIL 2003). A análise da especificidade demonstrou que o método analítico não sofreu interferência dos excipientes da formulação, uma vez que não há outros sinais no cromatograma, além daquele referente ao meio de dissolução junto ao volume morto, bem como pelo alto grau de pureza de pico verificado para ambos os fármacos. O método foi linear na faixa de concentração de 0,75 a 45 µg/mL para o DEL e 0,25 a 15 µg/mL para o MAN, não apresentando desvio da linearidade ($p > 0,05$). A exatidão e precisão do método foram comprovadas através da recuperação dos fármacos em três diferentes concentrações, obtendo-se valores entre 95-105% e *DPR* inferior a 5%. Dessa forma, cumprem-se os requisitos especificados para a validação, sendo o método considerado, portanto, adequado para a avaliação da liberação simultânea dos fármacos do produto farmacêutico, bem como com possibilidade de predizer o comportamento *in vivo* do MAN.

Cabe salientar que todos os métodos desenvolvidos para quantificação dos fármacos na forma farmacêutica no presente trabalho foram validados de acordo com códigos oficiais, cumprindo com parâmetros de desempenho analítico tais como: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003, ICH, 2005a; USP 35, 2012). Dentre estes, destaque especial foi dado para a robustez, que foi avaliada através da utilização de desenhos estatísticos experimentais, permitindo, dessa forma, reduzir significativamente o

número de análises e o tempo necessário para realização dos testes, além de diminuir o gasto de solventes e reagentes.

Assim sendo, os métodos propostos constituem-se em procedimentos importantes para o controle da qualidade de matérias-primas e produtos acabados contendo DEL e MAN, contribuindo, portanto, para garantir a segurança e a eficácia terapêutica dos medicamentos disponíveis no País.

10. CONCLUSÕES

- A caracterização do estado sólido de diferentes matérias-primas de DEL e MAN foram realizados por meio das técnicas de DSC, TG/DTG, DRIFT, SEM, XRPD, e RS, sugerindo suas aplicações para o controle de qualidade de insumos farmacêuticos;
- As matérias-primas de MAN avaliadas neste trabalho apresentaram homogeneidade relacionada aos parâmetros avaliados;
- As matérias-primas de DEL avaliadas neste trabalho apresentaram diferenças relacionadas ao comportamento térmico. Este fato é, provavelmente, devido à presença de um contaminante, como evidenciado pelas análises por CL, RS e SEM;
- A caracterização cristalográfica utilizando a difração de raios-X demonstrou não haver diferença em relação à constituição cristalina das matérias-primas de DEL e MAN, descartando-se, portanto, a presença de polimorfismo nos materiais analisados;
- O método quantitativo desenvolvido e validado por CL-EM/EM mostrou-se rápido, linear, específico, preciso, exato e robusto e apresenta-se como alternativa para determinação simultânea de DEL e MAN em comprimidos, podendo ser otimizado para aplicação em amostras biológicas devido sua alta sensibilidade e seletividade;
- O método desenvolvido através da ED-1, utilizando água como diluente, cumpriu com os parâmetros de validação preconizados para métodos analíticos e apresenta-se como uma alternativa simples, econômica e sustentável para a análise simultânea dos fármacos na forma farmacêutica disponível comercialmente;
- A análise comparativa dos métodos por CL-EM/EM e ED-1, juntamente com os métodos anteriormente desenvolvidos por CL e EC, demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para a determinação quantitativa dos fármacos, caracterizando, portanto, a intercambialidade dos mesmos;

- O método desenvolvido por CL-UV compatível com os estudos por CL-EM, cumpriu com os parâmetros de validação preconizados e foi satisfatoriamente aplicado para avaliação da estabilidade de DEL e MAN nas condições alcalina e fotolítica, respectivamente;
- O método CL-EM possibilitou, sem o isolamento, sugerir a identidade dos íons moleculares de três produtos de degradação do DEL e dois produtos de degradação do MAN;
- Os resultados obtidos na avaliação da cinética de degradação indicaram que o DEL segue uma cinética de primeira ordem enquanto o MAN segue uma reação de ordem zero nas condições alcalina e fotolítica, respectivamente;
- Os estudos utilizando células mononucleares não apresentaram evidências de citotoxicidade para as amostras contendo os fármacos após degradação;
- O uso de tampão citrato pH 3,2 (900 mL a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) como meio de dissolução e dispositivo pá a 75 rpm demonstrou resultados satisfatórios para a avaliação da liberação simultânea de DEL e MAN do produto farmacêutico, bem como capacidade de simular o comportamento *in vivo* do MAN a partir de dados da literatura;
- A validação do ensaio de dissolução utilizando o método por CL-UV como ferramenta quantitativa cumpriu com os parâmetros preconizados de especificidade, linearidade, precisão e exatidão, sendo sugerida sua aplicação para o controle de qualidade dos comprimidos contendo DEL e MAN;
- Os métodos desenvolvidos no presente trabalho estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos na área e procedimentos importantes para aprimorar o controle da qualidade, garantindo a segurança e a eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponíveis comercialmente.

11. REFERÊNCIAS

ACD/Labs, I-Lab 2.0. Advanced Chemistry Development, Inc, Toronto. ON, Canadá. Disponível em: <http://www.acdlabs.com/resources/ilab/>. Acesso em 18 Set. 2012.

AKIYAMA Y.; YOSHIOKA, M.; HORIBE, H.; INADA, Y.; HIRAI, S.; KITAMORI, N.; TOGUCHI, H. Anti-hypertensive Effect of Oral Controlled-release Microspheres Containing an ACE Inhibitor (Delapril Hydrochloride) in Rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 8, p. 661-665, 1994.

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.

AMIDON, G.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.; CRISON, J. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlations on in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-419, 1995.

ANDERSON, R.J.; BENDELL, D.J.; GROUNDWATER, P.W. **Organic Spectroscopic Analysis**. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House. Science Park. Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK 2004.

ARDREY, R.E. **Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003.

BACHELI, S.; DEGLI, E.D.; ALBERRICI, M. Effects of the combination of different doses of nifedipine 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 nº 901 – Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas Orais de Liberação Imediata (FFSOLI). **Diário Oficial da União**. Brasília, 29 de Março de 2003.

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 n. 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Poder Executivo, de 22 de maio de 2012.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 17, de 16 de abril de 2010. Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, Poder Executivo, de 01 de agosto de 2010.

BUNACIU, A.A.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; FLESCHEIN, S. Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical Drugs Analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, p. 206-219, 2010.

BYRN, S.; PFEIFFER, R.; GANEY, M.; HOIBERG, C.; POOCHIKIAN, G. Pharmaceutical solids: A strategic approach to regulatory considerations. **Pharmaceutical Review**, v. 12, n. 7, p. 945-954, 1995.

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

CHEER S.M.; MCCLELLAN, K. Manidipina: uma revisão de seu uso no tratamento da hipertensão. **Drugs**, v. 61, n. 12, p. 1777-1799, 2001.

CHIENGA, N.; RADESB, T.; AALTONENC, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 618-44, 2011.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R. *et al.* Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, p. 1206-1252, 2003.

COLOMER, M.C. Delapril en el tratamiento de la HTA. **Actualidad científica-Medicamentos de vanguardia**, v. 26, n. 2, p. 117-119, 2007.

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

CSABAI, K.; VIKMON, M.; SZEJTLI, J.; REDENTI E.; POLI, G.; VENTURA, P. Complexation of Manidipine with Cyclodextrins and their Derivatives. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 31, p. 169-178, 1998.

DE BEERA, T.; BURGGRAEVEA, A.; FONTEYNEA, M.; SAERENSA, L.; REMONB, J.P.; VERVAETB, C. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, p. 32-47, 2011.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y.V. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 141-158, 2011.

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.

DOOLEY, K.C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 471-481, 2003.

DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

DRESSMAN, J.B.; LENNERNAS, H. **Oral Drug Absorption Prediction and Assessment**. Marcel Dekker, Inc. New York. 2000.

DUARTE, L.C.; JUCHEM, P.L.; PULZ, G.M.; BRUM, T.M.M.; CHODUR, N.; LICCARDI, A.; FISCHER, A.C.; ACAUAN, R.B. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, v. 30, n. 2, p. 3-15, 2003.

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.

FARMACOPEIA BRASILEIRA 5 ed (FB 5). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1 e 2.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Dissolution Testing for Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1997.

FIFIELD, F.W.; KEALEY, D. Principles and Practice of Analytical Chemistry. Glasgow: Chapman & Hall, 1995, 4ed. cap 11, p. 475-503.

FOGARI, R.; ZOPPI, A.; LUSARDI, P.; MUGELLINI, A. Efficacy and tolerability of manidipine in the long-term treatment of mild to moderate essential hypertension. **Blood Pressure**, v. 5, p. 24-8, 1996.

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.

FUKUTSU, N.; KAWASAKI, T.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Application of high-performance liquid chromatography hyphenated techniques for identification of degradation products of cefpodoxime proxetil. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 153-159, 2006.

GANDHI, R.; PILLAI, O.; THILAGAVATHI, R.; GOPALAKRISHNAN, B.; KAUL, C.L.; PANCHAGNULA, R. Characterization of azithromycin hydrates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p.175-184, 2002.

GÖRÖG, S. The changing face of pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 12-17, 2007.

GRADMAN, A.H.; BASILE, J.N.; CARTER, B.L.; BAKRIS. G.L. Combination therapy in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 4, p. 42-50, 2010.

HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 51, p.7-12, 1990.

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.

ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on Stability Testing of New Drugs 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.

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

KARPINSKA, J. Derivative spectrophotometry: recent applications and directions of developments. **Talanta**, v. 64, n.4, p. 801-822, 2004.

KASIM, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A.J.; JUNGINGER, H.E.; STAVCHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2003.

KERNS, E.H. Utility of mass spectrometry for pharmaceutical profiling applications. **Current Drug Metabolism**, v. 7, n. 5, p. 457-466, 2006.

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.

KORFMACHER, W.A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p. 1357-1367, 2005.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulben Kian, 2001, v. 2, cap. 26, p. 1277-1355.

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.

LAWES, C. M.; HOORN, S. V.; RODGERS, A. International Society of Hypertension. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. **The Lancet**, v. 371, p. 1513-1518, 2008.

LEE, H. Pharmaceutical applications of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 2, n 7-8, p. 1161-1202, 2005.

MANADAS, R.; PINA, M.; VEIGA, F. Dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375-399, 2002.

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

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.

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

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

MCCORMACK, P.L.; KEATING, G.M. Delapril/Manidipine. **Drugs**, v. 66, n. 7, p. 961-969, 2006.

MEHTA, S.; SHAH, R.P.; SINGH, S. Strategy for identification and characterization of small quantities of drug degradation products using LC and LC-MS: application to valsartan, a model drug. **Drug Testing and Analysis**, v. 2, p. 82-90, 2010.

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.; KRUSZYNSKA, 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.

MONTGOMERY, D.G. **Design and Analysis of Experiments**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

MORIMOTO, S.; MATSUMURA, Y. Manidipine Hydrochloride [CV-4093(2HCl)]. **Cardiovascular Drug Reviews**. v. 9, n. 3, p. 207-222, 1991.

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.

NASCIMENTO T.G.; BASÍLIO, I.D.; MACÊDO, R.O.; MOURA, E.A.; DORNELAS, C.B.; BERNARDO, V.B.; ROCHA, V.N.; NÓVAK, C. Characterization of the indinavir raw materials stability in some pharmaceutical processes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, p. 269-275, 2010.

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 24/09/2012.

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 24/09/2012.

NEWMAN, A.W.; STAHLY, G.P. **Form Selection of Pharmaceutical Compounds**. In: Lena Ohannesian; Antony J. Streeter. Handbook of Pharmaceutical Analysis. New York : Marcel Dekker, 2002.

NIESSEN, W.M. State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 179-197, 1999.

NIESSEN, W.M. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 413-436, 2003.

NUDELMAN, N.S. **Estabilidad de Medicamentos**. 1ed. Buenos Aires: El Atheneo, 1975.

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

O'DONNELL, P. B.; BOKSER, A. D. Stability of pharmaceutical products. In: TROY, D. B. (Ed). **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 21th ed. Philadelphia: The University of the Sciences, 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.

OJEDA, C.B.; Rojas, F.S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, 1-24, 2004.

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

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. Delapril. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 6, n. 1, 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.

PEREIRA, A.S.; BICALHO, B.; LILLA, S.; DE NUCCI, G. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, p. 107-111, 2005.

PASCHOAL, L.R.; FERREIRA, W.A.; PRADO, M.R.D.; VILELA, A.P.O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p.105-113, 2003.

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.

ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008 A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 22-44, 2009.

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.

RUILOPE, L.M. Current challenges in the clinical management of hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, p. 267–275, 2012.

SABIN, J.G., FERRÃO, M.F., FURTADO, J.C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 387-396, 2004.

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.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A.B.C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

SHIONOIRI, M.D.H.; YASUDA, M.D.G.; IKEDA, A.M.D.; OHTA, M.D.T.; MIYAJIMA, M.D.E.; KANEKO, M.D.Y. Pharmacokinetics and depressor effect of delapril in patients with essential hypertension. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 41, p. 74-79, 1987.

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.

SMART, L.E.; MOORE, E.A. **Solid state chemistry: An Introduction**. Taylor & Francis Group; Boca Raton, FL (2005) pp. 118-119.

Sociedade Brasileira de Cardiologia; Sociedade Brasileira de Hipertensão; Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI diretrizes brasileiras de hipertensão. **Revista brasileira de hipertensão**, v.17, n. 1, 2010.

SOUZA, F.S.; BASILIO, I.D.; OLIVEIRA, E.J.; MACEDO, R.O. Correlation studies between thermal and dissolution rate constants of cimetidine drug and tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 72, p. 549-554, 2003.

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

STEPHENSON, G.A.; FORBES, R.A.; REUTZEL-EDENS, S.M. Characterization of solid state: quantitative issues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 67-90, 2001.

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.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F. S.; VILANOVA, C. M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, p. 51-56, 2004.

STRACHAN, C.J.; RADES, T.; GORDON, K.C.; RANTANEN, J. Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 179-192, 2007.

SUNDARARAJAN, R.; KUMAR C.V.; JAYAVEERA. Estimation of manidipine dihydrochloride by a new RP-HPLC method. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 9, p. 3375-3378, 2012.

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

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

TODESCHINI, V. **Desenvolvimento de métodos cromatográfico e eletroforético para determinação simultânea de delapril e manidipino em comprimidos**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

TODESCHINI, V.; SANGOI, M.S.; VOLPATO, N.M. Delapril and manidipine measurements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in pharmaceutical formulation. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 17, p. 287-296, 2011.

TODESCHINI, V.; MEIRA, A.S.; SANGOI, M.S.; BARTH, A.B.; PAIM, C.S.; VOLPATO, N.M. Simultaneous determination of delapril and manidipine in a pharmaceutical formulation by a stability-indicating RP-LC method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 35, p. 603-620, 2012.

TODESCHINI, V.; MEIRA, A.S.; SANGOI, M.S.; MIRON, D.; LANGE, A.D.; VOLPATO, N.M. Stability-indicating micellar electrokinetic chromatography technique for simultaneous measurement of delapril and manidipine from their combination drug formulation. **Journal of AOAC international**. (artigo aceito para publicação).

TOMASSETTI, M.; CATALANI, A.; ROSSI, V.; VECCHIO, S. Thermal analysis study of the interactions between acetaminophen and excipients in solid dosage forms and in some binary mixtures **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 949-55, 2005.

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.

USP 35. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 35th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2012.

VAN DOOREN, A.A.; MILLER, B.W. Purity determinations of drugs with differential scanning calorimetry (DSC) - a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 20, p. 217-233, 1984.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G.; GRANT, D.J.W. Crystalline solids **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 3-26, 2001.

VOGT, F.G.; KORD, A.S. Development of quality-by-design analytical methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 3, p. 797-812, 2011.

VYAS, V.K.; GHATE, M.; UKAWALA, R.D. Recent advances in characterization of impurities - Use of hyphenated LC-MS technique. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 4, p. 299-306, 2010.

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

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.

WU, Y. The use of liquid chromatography-mass spectrometry for the identification of drug degradation products in pharmaceutical formulations. **Biomedical Chromatography**, v. 14, p. 384-396, 2000.

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.