

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE BESILATO DE
ANLODIPINO EM FORMAS FARMACÊUTICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcelo Donadel Malesuik

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA ANÁLISE DE BESILATO DE ANLODIPINO EM
FORMAS FARMACÊUTICAS**

por

Marcelo Donadel Malesuik

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a Simone Gonçalves Cardoso

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
ANÁLISE DE BESILATO DE ANLODIPINO EM FORMAS
FARMACÊUTICAS**

elaborada por
Marcelo Donadel Malesuik

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Simone Gonçalves Cardoso
(Presidenta/Orientadora)

Martin Steppe (UFRGS)

Clarice Madalena Bueno Rolim (UFSM)

Santa Maria, 25 de agosto de 2005.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à minha família, que é parte essencial, com incentivo e acolhida em todos os momentos da minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Cardoso pela orientação, revisão crítica e, acima de tudo, exemplo profissional, humanidade, amizade e apoio ao longo dos anos de trabalho e no decorrer desta dissertação.

Às bolsistas de iniciação científica Fíbele Analine Lanzasova e Emanuelle Dorigoni, pelo auxílio em diversas etapas desta dissertação.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-químico, pela colaboração e amizade.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos doutorandos Volmar Alípio Severo Filho e Fabrício Vargas, do Departamento de Química da UFSM, pela realização do espectro de infravermelho e dos espectros de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), respectivamente. Ao doutorando Rogério Lourega, do Departamento de Química da UFSM, pelo auxílio na análise dos mesmos.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial.

A UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho.

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

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE BESILATO DE ANLODIPINO EM FORMAS FARMACÊUTICAS

AUTOR: MARCELO DONADEL MALESUIK
ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. SIMONE GONÇALVES CARDOSO
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de agosto de 2005.

Neste trabalho foram validadas metodologias para determinação de besilato de anlodipino em comprimidos e cápsulas. Os métodos utilizados para quantificação do fármaco foram: cromatografia líquida (CL) e espectrofotometria na região do ultravioleta. O sistema por CL foi conduzido isocriticamente em temperatura ambiente controlada com coluna de fase reversa C₁₈ (25 cm x 4.6 mm), usando fase móvel composta de ácido fosfórico 0,1% (v/v) pH 3,0 : acetonitrila (60:40, v/v) com vazão de 1,0 mL/min. A detecção foi realizada no ultravioleta a 238 nm. No método espectrofotométrico o fármaco foi extraído em 1% de ácido clorídrico 0,1N em metanol (v/v) e sua concentração foi avaliada no comprimento de onda de máxima absorção: 238 nm. Os métodos apresentaram linearidade, exatidão e precisão, não havendo diferença significativa entre eles. Desenvolveu-se e validou-se, também, método de dissolução do fármaco nas formas farmacêuticas em estudo, utilizando como meio de dissolução 500 mL de ácido clorídrico 0,01N a 37 ± 0,5°C, aparato 1 (cápsulas) e 2 (comprimidos), com rotação de 50 rpm e quantificação por cromatografia líquida e espectrofotometria na região do ultravioleta. Os resultados demonstraram linearidade, especificidade, exatidão e precisão adequadas. Posteriormente, realizou-se teste do perfil de dissolução e equivalência farmacêutica de algumas formulações disponíveis comercialmente. Os testes evidenciaram que a maioria dos produtos comerciais possui boa qualidade e são equivalentes farmacêuticos.

Palavras-chaves: besilato de anlodipino, cromatografia líquida, espectrofotometria na região do ultravioleta, dissolução.

ABSTRACT

Dissertation for obtaining the degree of Master
Program Post-Graduate in Pharmaceutical Science
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGIES FOR ANALYSIS OF AMLODIPINE BESILATE IN FARMACEUTICAL DOSAGE FORMS

AUTHOR: MARCELO DONADEL MALESUIK

ADVISER: PROF^a. DR^a. SIMONE GONÇALVES CARDOSO

Date and Local of the Defense: Santa Maria, 25th August of 2005.

In this work the quantitative methodologies for determination of amlodipine besilate in tablets and capsules were validated. The methods used for drug determination were: liquid chromatography (LC) and ultraviolet spectrophotometry. The LC system was operated isocratically at controlled-ambient temperature with reverse phase C₁₈ (250 mm x 4.6 mm), using a mobile phase composed of ortho-phosphoric acid 0.1% (v/v) pH 3.0 : acetonitrile (60:40, v/v) at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The detection was achieved with an ultraviolet detector at 238 nm. In the spectrophotometry method the drug was extracted in 1% of 0,1N hydrochloric acid in methanol (v/v) and its concentration was measured at maximum wavelength of 238 nm. These two methods showed good linearity, precision and accuracy and the results obtained were not statistically different. Moreover, a method for the dissolution of amlodipine besilate in solid dosage formulations was developed and validated. Dissolution studies were conducted by basket and paddle methods at 37 ± 0,5°C in 500 mL of 0,01N hydrochloric acid at 50 rpm. The quantification was achieved by LC and ultraviolet spectrophotometry. The data validation showed good linearity, specificity, accuracy and precision. Afterwards, tests of the dissolution rate and pharmaceutical equivalence of some available commercial formulations were developed. The tests evidenced that most of the commercial products possesse good quality and they are pharmaceutical equivalents.

Keywords: amlodipine besilate, liquid chromatography, ultraviolet spectrophotometry, dissolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química do besilato de anlodipino.....	17
Figura 2 –	Estrutura química do besilato de anlodipino marcada com as letras referentes aos deslocamentos de hidrogênio obtidos com RMN ¹ H	28
Figura 3 –	Espectro de RMN ¹ H do besilato de anlodipino SQR (400 MHz, CDCl ₃).	28
Figura 4 –	Estrutura química do besilato de anlodipino marcada com as letras referentes aos deslocamentos de carbonos obtidos com RMN ¹³ C.....	30
Figura 5 –	Espectro de RMN ¹³ C do besilato de anlodipino SQR (400 MHz, CDCl ₃)	30
Figura 6 –	Espectro na região do infravermelho do besilato da anlodipino SQR.....	31
Figura 7 –	Espectro de ultravioleta do besilato de anlodipino SQR, na concentração de 20 µg/mL, utilizando como solvente 1% de HCl 0,1N em metanol (V/V).....	32
Figura 8 –	Cromatograma obtido com a solução da SQR na concentração de 20,0 µg/mL no tempo zero. Inserido na figura está o respectivo espectro obtido por DAD. Condições cromatográficas: Coluna Luna [®] Phenomenex [®] C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:acetonitrila (60:40, V/V); Vazão: 1 mL/min.; detecção: 238 nm...	44
Figura 9 –	(A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de besilato de anlodipino após 2 horas de hidrólise ácida. (B) Espectro dos picos obtidos com a SQR e produtos formados I, II e III. Condições cromatográficas: Coluna Luna [®] Phenomenex [®] C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:acetonitrila (60:40, V/V); Vazão: 1 mL/min.; detecção: 238 nm.....	45
Figura 10 –	(A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de besilato de anlodipino após 2 horas de hidrólise básica. (B) Espectro dos picos obtidos com a SQR e produtos formados I, II e III. Condições cromatográficas: Coluna Luna [®] Phenomenex [®] C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:acetonitrila (60:40, V/V); Vazão: 1 mL/min.; detecção: 238 nm.....	46
Figura 11 –	(A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de besilato de anlodipino após 6 horas de fotólise. (B) Espectro dos picos obtidos com a SQR e produtos formados I e II. Condições cromatográficas: Coluna Luna [®] Phenomenex [®] C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:acetonitrila (60:40, V/V); Vazão: 1 mL/min.; detecção: 238 nm.....	47
Figura 12 –	Representação gráfica da curva de calibração do besilato de anlodipino obtidas através do método de cromatografia líquida.....	48

Figura 13 –	Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico no ultravioleta para o besilato de anlodipino em água a 238 nm.....	61
Figura 14 –	Representação gráfica da curva de calibração do besilato de anlodipino obtida através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta...	62
Figura 15 –	Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria no ultravioleta das soluções de SQR e amostra simulada de excipientes obtidos em água (com 20% de uma solução 1% de HCl 0,1N em metanol (V/V)), na concentração teórica de 20 µg/mL.....	65
Figura 16 –	Eficiência de dissolução (ED) (KHAN, 1975).....	74
Figura 17 –	Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio HCl 0,1N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.....	81
Figura 18 –	Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio HCl 0,1N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.....	81
Figura 19 –	Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio HCl 0,1N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.....	81
Figura 20 –	Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio HCl 0,1N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.....	81
Figura 21 –	Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio tampão fosfato pH 6,8 a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.....	81
Figura 22 –	Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio tampão fosfato pH 6,8 a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.....	81
Figura 23 –	Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio tampão fosfato pH 6,8 a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.....	82
Figura 24 –	Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio tampão fosfato pH 6,8 a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.....	82
Figura 25 –	Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.....	82

Figura 26 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.....	82
Figura 27 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.....	82
Figura 28 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.....	82
Figura 29 – Representação gráfica da curva de calibração do besilato de anlodipino obtida através de cromatografia líquida.....	84
Figura 30 – Representação gráfica da curva de calibração do besilato de anlodipino em ácido clorídrico 0,01N através de espectrofotometria no ultravioleta..	86
Figura 31 – Espectro de absorção na região do ultravioleta obtido com amostra simulada de excipiente de comprimido após dissolução em HCL 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm, com aparato 2.....	87
Figura 32 – Espectro de absorção na região do ultravioleta obtido com a amostra simulada de excipientes da cápsula, na dissolução em HCL 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm, com aparato 1.....	87
Figura 33 – Espectro de absorção na região do ultravioleta obtido com a cápsula sem conteúdo após dissolução em HCL 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm, com aparato 1.....	88
Figura 34 – Cromatogramas obtidos com a SQR, amostra simulada de excipientes da cápsula (ASE – cápsulas) e comprimido (ASE – comprimidos) e a cápsula sem conteúdo após dissolução em HCL 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm, com aparato 1 e 2.....	88
Figura 35 – Espectros de absorção na região do ultravioleta das amostras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e SQR, diluídos com a solução de 1% de HCl 0,1 N em metanol, na concentração de 20 µg/mL.....	107
Figura 36 – Representação gráfica das porcentagens dissolvidas de anlodipino nas cápsulas em meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e 50 rpm, aparato 1.....	110
Figura 37 – Representação gráfica das porcentagens dissolvidas de anlodipino nos comprimidos em meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e 50 rpm, aparato 2.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros utilizados para execução do método por cromatografia líquida.....	38
Tabela 2 –	Preparo das soluções para o teste de recuperação de besilato de anlodipino nas amostras de comprimidos por cromatografia líquida.....	43
Tabela 3 –	Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do besilato de anlodipino por cromatografia líquida.....	48
Tabela 4 –	Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método por cromatografia líquida.....	49
Tabela 5 –	Análise de variância das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva de calibração do besilato de anlodipino por cromatografia líquida..	49
Tabela 6 –	Valores experimentais referentes a determinação de besilato de anlodipino em comprimidos por cromatografia líquida.....	50
Tabela 7 –	Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em comprimidos por cromatografia líquida.....	50
Tabela 8 –	Valores experimentais referentes a determinação de besilato de anlodipino em cápsulas por cromatografia líquida.....	51
Tabela 9 –	Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em cápsulas por cromatografia líquida.....	51
Tabela 10 –	Valores experimentais obtidos para comprimidos e cápsulas, a partir das modificações nas condições cromatográficas estabelecidas.....	52
Tabela 11 –	Valores experimentais do teste de recuperação realizado em amostras de comprimidos e cápsulas de besilato de anlodipino por cromatografia líquida.....	52
Tabela 12 –	Condições experimentais utilizadas para execução do método por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	56
Tabela 13 –	Preparo das soluções para o teste de recuperação de besilato de anlodipino, nas amostras de comprimidos e cápsulas, utilizando espectrofotometria no ultravioleta.....	59
Tabela 14 –	Valores de absorvâncias obtidas na determinação da curva de calibração do besilato de anlodipino por espectrofotometria no ultravioleta.....	61

Tabela 15 – Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método espectrofotométrico no ultravioleta.....	62
Tabela 16 – Análise de variância das absorvâncias obtidas na curva de calibração do besilato de anlodipino por espectrofotometria no ultravioleta.....	63
Tabela 17 – Valores experimentais referentes a determinação de besilato de anlodipino em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.....	63
Tabela 18 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.....	64
Tabela 19 – Valores experimentais referentes a determinação de besilato de anlodipino em cápsulas através da espectrofotometria no ultravioleta.....	64
Tabela 20 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em cápsulas por espectrofotometria no ultravioleta.....	65
Tabela 21 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado em amostras de comprimidos e cápsulas de besilato de anlodipino por espectrofotometria no ultravioleta.....	66
Tabela 22 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.....	68
Tabela 23 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em cápsulas por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.....	69
Tabela 24 – Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos e cápsulas contendo besilato de anlodipino.....	76
Tabela 25 – Resultados encontrados nas avaliações dos filtros utilizados para filtração da solução da SQR e amostras de cápsulas e comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.....	83
Tabela 26 – Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade da SQR, amostra de cápsula e amostra de comprimido, por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.....	83
Tabela 27 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do besilato de anlodipino por cromatografia líquida.....	84
Tabela 28 – Resultados da curva de calibração obtida pelo método dos mínimos quadrados para o método por cromatografia líquida.....	85
Tabela 29 – Análise de variância das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva de calibração do besilato de anlodipino por cromatografia líquida..	85

Tabela 30 – Valores de absorvância obtidas na determinação da curva de calibração do besilato de anlodipino em ácido clorídrico 0,01N por espectrofotometria no ultravioleta.....	86
Tabela 31 – Resultados da curva de calibração obtida pelo método dos mínimos quadrados para o método por espectrofotometria no ultravioleta.....	86
Tabela 32 – Análise de variância das absorvâncias determinadas para obtenção da curva de calibração do besilato de anlodipino por espectrofotometria no ultravioleta.....	87
Tabela 33 – Valores experimentais referentes a determinação da percentagem dissolvida de besilato de anlodipino em comprimidos, através de espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.....	89
Tabela 34 – Análise de variância dos valores de percentagem dissolvida de besilato de anlodipino em comprimidos por cromatografia líquida em diferentes dias.....	89
Tabela 35 – Análise de variância dos valores de percentagem dissolvida de besilato de anlodipino em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta em diferentes dias.....	90
Tabela 36 – Análise de variância das percentagens dissolvidas de besilato de anlodipino em comprimidos, por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.....	90
Tabela 37 – Valores experimentais referentes a determinação da percentagem dissolvida de besilato de anlodipino em cápsulas por cromatografia líquida.....	91
Tabela 38 – Análise de variância dos valores de percentagens dissolvidas obtidas para besilato de anlodipino em cápsulas por cromatografia líquida.....	91
Tabela 39 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado na amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas de besilato de anlodipino por cromatografia líquida.....	92
Tabela 40 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado nas amostras simuladas de excipientes de comprimidos de besilato de anlodipino por espectrofotometria no ultravioleta.....	92
Tabela 41 – Parâmetros utilizados para avaliação da percentagem dissolvida de comprimidos e cápsulas.....	103
Tabela 42 – Valores individuais (mg) obtidos na determinação de peso-médio (PM), desvio padrão (DP), limites inferior e superior permitidos e peso-médio do conteúdo (PMc) para as cápsulas analisadas.....	104

Tabela 43 – Valores individuais (mg) obtidos na determinação de peso-médio (PM), desvio padrão (DP) e limite inferior e superior permitidos para os comprimidos analisadas.....	105
Tabela 44 – Tempo de desintegração encontrado cápsulas e comprimidos.....	106
Tabela 45 – Porcentagem de umidade encontrada para os produtos analisados.....	106
Tabela 46 – Valores obtidos na determinação de friabilidade e dureza dos comprimidos analisados.....	106
Tabela 47 – Valores experimentais obtidos para análise do teor de besilato de anlodipino em cápsulas por espectrofotometria no ultravioleta.....	108
Tabela 48 – Valores experimentais obtidos para análise do teor de besilato de anlodipino em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.....	108
Tabela 49 – Valores de porcentagens dissolvidas (%) de besilato de anlodipino em cápsulas obtidas por cromatografia líquida.....	109
Tabela 50 – Valores de porcentagens dissolvidas (%) de besilato de anlodipino em cápsulas obtidas por espectrofotometria no ultravioleta.....	109
Tabela 51 – Valores de eficiência de dissolução (%) obtidos para cápsulas de besilato de anlodipino, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).....	111
Tabela 52 – Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de cápsulas de besilato de anlodipino.....	112
Tabela 53 – Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para cápsulas.....	112
Tabela 54 – Valores de eficiência de dissolução (%) obtidos para comprimidos de besilato de anlodipino, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).....	113
Tabela 55 – Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução dos comprimidos comerciais de besilato de anlodipino.....	114
Tabela 56 – Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para comprimidos.....	114
Tabela 57 – Valores experimentais (%) obtidos na determinação da uniformidade de dose de besilato de anlodipino em cápsulas.....	115
Tabela 58 – Valores experimentais (%) obtidos na determinação da uniformidade de dose de besilato de anlodipino em comprimidos.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

AND	Besilato de Anlodipino
ANOVA	Análise de variância
CAS	Chemical Abstracts Service
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CL	Cromatografia líquida
CV%	Coefficiente de variação percentual
DAD	Diode array detector
ED	Eficiência de dissolução
e.p.m.	Erro padrão da média
FDA	Food and Drug Administration
GL	Graus de liberdade
HA	Hipertensão arterial
ICH	International Conference on Harmonisation
IV	Infravermelho
mL	Mililitro
r	Coefficiente de correlação de Pearson
RMN	Ressonância magnética nuclear
r.p.m.	Rotações por minuto
SQR	Substância química de referência
USP	The United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
NS	Não significativo
°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Objetivos.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Considerações Gerais.....	20
2.2 Farmacocinética.....	20
2.3 Atividades farmacológicas.....	21
2.4 Relação estrutura-atividade.....	22
2.5 Mecanismo de ação.....	23
2.6 Interações e reações adversas.....	23
2.7 Contra indicações.....	24
2.8 Descrição.....	24
2.9 Métodos de determinação e estudos de estabilidade.....	24
3. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	27
3.1 Introdução.....	27
3.2 Substância química de referência.....	27
3.3 Identificação da SRQ.....	27
3.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹ H.....	27
3.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³ C.....	29
3.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho.....	30
3.3.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	31
4. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA	33
4.1 Introdução.....	33
4.2 Produtos farmacêuticos.....	36
4.3 Solventes e reagentes.....	36
4.4 Equipamentos e acessórios.....	37
4.5 Cromatografia líquida.....	38
4.5.1 Validação do método analítico.....	38

4.5.1.1	Especificidade.....	39
4.5.1.2	Linearidade.....	40
4.5.1.3	Precisão.....	41
4.5.1.4	Robustez.....	42
4.5.1.5	Exatidão (teste de recuperação).....	42
4.5.1.6	Limite de quantificação e Limite de detecção.....	44
4.5.2	Resultados.....	44
4.5.3	Discussão.....	53
4.6	Spectrofotometria no ultravioleta.....	56
4.6.1	Validação do método analítico.....	56
4.6.1.1	Construção da curva de Ringbom.....	56
4.6.1.2	Linearidade.....	57
4.6.1.3	Precisão.....	57
4.6.1.4	Especificidade.....	59
4.6.1.5	Exatidão (teste de recuperação).....	59
4.6.1.6	Limite de quantificação e Limite de detecção.....	60
4.6.2	Resultados.....	60
4.6.3	Discussão.....	66
4.7	Comparação dos métodos propostos.....	68
5.	CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA CÁPSULA E COMPRIMIDO.....	70
5.1	Introdução.....	70
5.1.1	Ensaio de dissolução.....	70
5.1.2	Comparação de perfis de dissolução.....	72
5.2	Produtos farmacêuticos.....	74
5.3	Solventes e reagentes.....	74
5.4	Equipamentos e acessórios.....	75
5.5	Desenvolvimento do método para o teste de dissolução.....	76
5.6	Avaliação da influência do filtro.....	77
5.7	Avaliação da estabilidade de soluções da SQR e amostras no meio de dissolução.....	78
5.8	Validação do método de análise.....	79

5.8.1 Linearidade.....	79
5.8.2 Avaliação da especificidade.....	79
5.8.3 Precisão.....	80
5.8.4 Exatidão.....	80
5.9 Resultados.....	80
5.10 Discussão.....	92
6. CAPÍTULO IV – ESTUDO COMPARATIVO DE ALGUNS PRODUTOS CONTENDO BESILATO DE ANLODIPINO.....	97
6.1 Introdução.....	97
6.2 Amostras utilizadas no estudo.....	98
6.3 Solventes e reagentes.....	99
6.4 Equipamentos e acessórios.....	99
6.5 Análise dos rótulos das amostras.....	100
6.6 Determinação de peso médio das cápsulas e comprimidos.....	100
6.7 Determinação do tempo de desintegração dos comprimidos e cápsulas.....	101
6.8 Determinação da umidade por Karl-Fischer.....	101
6.9 Determinação de resistência mecânica em comprimidos.....	101
6.9.1 Friabilidade.....	101
6.9.2 Dureza.....	102
6.10 Identificação do besilato de anlodipino nas amostras.....	102
6.11 Doseamento do besilato de anlodipino nas amostras.....	102
6.12 Teste de dissolução.....	102
6.13 Perfil de dissolução.....	102
6.14 Uniformidade de dose unitária nas amostras.....	102
6.15 Resultados.....	104
6.16 Discussão.....	116
7 CONCLUSÕES.....	121
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
9 ANEXO.....	129
9.1 Artigo aceito.....	129

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é o principal fator de risco para problemas cardíacos, doenças renais, derrames e está fortemente associada com o aumento da mortalidade em todo o mundo (MUNTWYLER & FOLLATH, 2001).

No Brasil, 10 a 15% da população é hipertensa, sendo que obesos (20 a 40%), diabéticos (30 a 60%), negros (20 a 30%) e idosos (30 a 50%) constituem os principais grupos de risco. Na década de 80, as doenças cardiovasculares foram as maiores causas de mortalidade na população brasileira, ultrapassando as decorrentes de fatores externos (acidente e outros), neoplasias e moléstias respiratórias (EYE, 2005).

O desenvolvimento da HA depende da interação entre predisposição genética e fatores ambientais, embora não seja completamente conhecido, ainda, como estas interações ocorrem. Sabe-se, no entanto, que a hipertensão é acompanhada por alterações funcionais do sistema nervoso autônomo simpático, renal, do sistema renina angiotensina, além de outros mecanismos humorais e disfunção endotelial. A hipertensão resulta, assim, de várias alterações estruturais do sistema cardiovascular que tanto amplificam o estímulo hipertensivo, quanto causam dano cardiovascular (BROOK, 2004).

O besilato de anlodipino (AND), Figura 1, encontra-se entre os vasodilatadores de primeira escolha para o tratamento da HA (BISOGNANO et al., 2004). Comercialmente, encontra-se disponível nas seguintes formas farmacêuticas: comprimidos (concentrações: 2,5 mg, 5 mg e 10 mg) e cápsulas magistrais. Está, também, disponível na forma de cápsulas em associação com maleato de enalapril, losartan e ramipril, e na forma de comprimidos em associação com valsartan e ramipril.

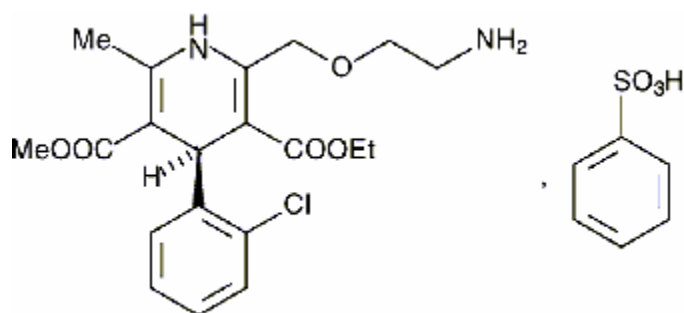


Figura 1 – Estrutura química do besilato de anlodipino (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2003).

A evolução tecnológica no desenvolvimento e produção de medicamentos exige o cumprimento de diretrizes regulamentadas para prevenir os riscos na qualidade e segurança dos produtos. A garantia da qualidade é um importante aspecto a ser considerado desde o projeto até a liberação do produto ao consumidor. Os órgãos oficiais exigem que as empresas produtoras realizem ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo de fabricação. Estas normas são dinâmicas e devem ser atualizadas para acompanhar a evolução tecnológica dos processos, novos equipamentos e gerenciamento da qualidade.

No mercado brasileiro o AND encontra-se comercializado por vários laboratórios e, em face de fatores econômicos, torna-se interessante a utilização de genéricos e similares como alternativa aos produtos inovadores, desde que se garantam segurança e eficácia equivalentes.

Os comprimidos e cápsulas, tanto magistrais como comerciais, devem cumprir com as especificações atualizadas da Farmacopéia Brasileira ou outros códigos autorizados pela legislação vigente relacionadas à identidade, pureza, potência, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução. Na ausência de monografia oficial, torna-se imprescindível o desenvolvimento e validação de métodos, para que se possa avaliar a qualidade dos produtos farmacêuticos desde a matéria-prima até a forma farmacêutica e, posterior, garantia da manutenção da estabilidade.

Encontram-se na literatura metodologias para análise AND em matéria-prima, comprimidos e fluidos biológicos, mas não existe monografia oficial para análise desse fármaco em formas farmacêuticas.

Considerando o exposto, o presente trabalho buscou desenvolver e validar metodologia analítica para determinação do AND em formas farmacêuticas, cujos resultados estão apresentados no Capítulo II. Visou, também, realizar avaliação de comprimidos e cápsulas por meio de ensaios de dissolução, apresentados no Capítulo III. Estudo comparativo de alguns produtos disponíveis no mercado nacional foi igualmente realizado e apresentado no Capítulo IV.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar metodologia para avaliar a qualidade de comprimidos e cápsulas magistrais de besilato de anlodipino.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida para determinação quantitativa de AND em comprimidos e cápsulas.
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria para determinação quantitativa de AND em comprimidos e cápsulas.
- Realizar estudo comparativo dos métodos propostos.
- Desenvolver e validar método de dissolução para comprimidos e cápsulas.
- Realizar estudo de equivalência farmacêutica para avaliar a intercambialidade de alguns produtos comerciais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações Gerais

Os bloqueadores dos canais de cálcio ou antagonistas do íon cálcio foram introduzidos na década de 70 como vasodilatadores coronários e têm, desde então, alcançado reconhecimento notável no tratamento da hipertensão arterial (LANG et al., 1990; BISOGNANO et al., 2004). A descoberta desses compostos foi realizada pelo grupo do pesquisador Albrecht Fleckenstein, que conduziu a investigação em uma classe muito heterogênea de substâncias, as quais proporcionavam inibição do fluxo de cálcio nos canais presentes na membrana celular, com posterior redução da pressão arterial (STEFFEN, 1999).

Conforme sua estrutura química, os bloqueadores dos canais de cálcio podem ser divididos em quatro grupos: fenilalquilaminas (protótipo: verapamil), dihidropiridinas (protótipo: nifedipina), benzotiazepinas (protótipo: diltiazem) e difenilalquilaminas (protótipo: cinarizina) (NAYLER, 1990; ZWIETEN & PFAFFENDORF, 1993; STEFFEN, 1999). Outros autores, no entanto, classificam apenas como dihidropiridinas e não-dihidropiridinas (TIGLE & RAMPE, 1989; MUNTWYLER & FOLLATH, 2001; EISENBERG et al., 2004; BISOGNANO et al., 2004).

Com os avanços nos estudos destes compostos, notou-se efeitos indesejáveis provenientes da terapia com alguns fármacos, tais como, interação pelo sistema citocromo P450, ação neuronal e efeito temporário. A partir disso, tentou-se obter substâncias com maior seletividade e duração do efeito. Estes estudos ocorreram, em particular, dentro da classe das dihidropiridinas, as quais obtiveram melhor resposta (PAHOR et al., 1995; STEFFEN, 1999). Chegou-se, assim, ao besilato de anlodipino, um bloqueador dos canais de cálcio classificado como dihidropiridina de terceira geração, que possui, dentre os objetivos buscados, ótima farmacocinética e farmacodinâmica, com maior seletividade e duração do efeito (STEFFEN, 1999).

2.2 Farmacocinética

O AND é absorvido no trato intestinal e alcança picos de concentração plasmáticos entre 6 a 12 horas, com biodisponibilidade de 60 a 80% (EISENBERG et al., 2004;

STEFFEN, 1999). O equilíbrio estacionário é alcançado no sétimo dia, com uma administração diária e duração de efeito de 24 horas (BURGES & DODD, 1990; FAULKNER et al., 1986).

Possui um amplo volume de distribuição, com ligação às proteínas plasmáticas em torno de 95%. O metabolismo hepático do besilato de anlodipino é lento. Menos de 10% da dose oral administrada é excretada na forma inalterada. Os metabólitos são derivados piridínicos sem propriedades bloqueadoras de cálcio, com 60% excretados pela urina e, aproximadamente, 25% nas fezes. Possui uma meia vida de eliminação muito longa, em torno de 35 – 50 horas (ALBERNETHY, 1992; STEFFEN, 1999).

Em pacientes com insuficiência renal não mostrou acúmulo, mas a eliminação foi retardada em pacientes com cirrose hepática, sendo recomendado monitorar a terapia nestes casos (ALBERNETHY, 1992).

2.3 Atividades farmacológicas

O AND está entre os fármacos de primeira escolha e representa um avanço terapêutico no tratamento da hipertensão arterial, angina e outras doenças coronárias (MUNTWYLER & FOLLATH, 2001; BISOGNANO et al., 2004).

Estudos pré-clínicos realizados em modelos animais demonstraram que o tratamento com este fármaco mantém uma pressão sanguínea baixa, sem taquicardia reflexa (BURGES & DODD, 1990). Estudo realizado em ratos, superior a trinta semanas, demonstrou que o AND impediu o aumento da pressão arterial, sem o desenvolvimento de hipertrofia no miocárdio (STEFFEN, 1999). O enriquecimento de colesterol na dieta de ratos e coelhos, com administração adicional de AND, reduziu o desenvolvimento de lesões nos vasos por arteriosclerose (FLECKESNSTEIN, et al., 1992). O pré-tratamento com o fármaco também preveniu isquemia induzida em ratos e, em um grupo de cães, mostrou redução do infarto (SOBEY et al., 1992).

Estudos clínicos realizados em 210 pacientes demonstraram que a pressão arterial, registrada em posição supina e sentado, durante as 12 e 24 horas iniciais da administração da dose oral (2,5 – 10 mg), apresentou redução em todos os casos, sem alteração significativa na taxa cardíaca (MEHTA, et al., 1993).

Os efeitos da terapia anti-angina com AND e placebo foram investigados em 136 pacientes em estado de angina pectoris, inadequadamente controlada por β -bloqueadores. Neste estudo demonstrou-se que a administração do fármaco levou a um decréscimo na freqüência dos ataques de angina em 52 a 67% dos casos. Acarretou, também, uma melhora nas condições físicas, prolongadas significativamente após 4 semanas de tratamento (DIBIANCO et al., 1992). Estudos com 825 pacientes (43% com infarto prévio do miocárdio e 65% utilizando terapia de β -bloqueadores) foram escolhidos ao acaso e seguidos por 3 anos. A terapia com AND, comparada com o placebo, reduziu a hospitalização por angina em 35 % dos pacientes e os procedimentos de re-vascularização em 46% dos casos (STEFFEN, 1999).

Segundo Muller et al. (1989), estudos têm mostrado que o infarto do miocárdio, morte súbita e isquemia silenciosa do miocárdio, apresentam maior incidência nas primeiras horas da manhã. Algumas funções fisiológicas são aumentadas nestas horas, como a taxa cardíaca e a pressão sanguínea. A elevação da atividade simpática α -receptora, associada com o aumento na resistência periférica, é observada em indivíduos normais e hipertensos nas primeiras horas da manhã (RAFTERY, 1991). Além disso, estudos clínicos têm mostrado que a farmacocinética e a farmacodinâmica de alguns fármacos usados no tratamento da hipertensão e isquemia, como, propranolol, nitratos orgânicos e nifedipina, possuem variáveis na sua concentração durante o dia (LEMMER et al., 1991). Nesta complexa situação, fármacos como o AND são recomendáveis, pois possuem baixa variação dos níveis plasmáticos e meia vida de eliminação longa (FAULKNER et al., 1986; RUDD, 1993).

2.4 Relação estrutura-atividade

O AND possui dois estereoisômeros [R(+),S(-)]. Estudos de relação estrutura-atividade demonstraram que somente o isômero S(-) possui a ação vasodilatadora (OHMORI et al., 2003).

Com o intuito de avaliar a atividade antagonista dos canais de cálcio em aorta de rato, Alker et al. (1991) desenvolveram análogos do AND. Os autores detectaram a diminuição da referida ação com o aumento da cadeia dos grupos ésteres. A potência também foi diminuída quando o C3 do éster sofreu alguma substituição.

2.5 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação do AND deve-se ao efeito relaxante direto da musculatura lisa vascular pelo bloqueio seletivo dos canais de cálcio presentes na membrana celular, com posterior redução da pressão arterial (BISOGNANO et al., 2004).

O mecanismo antiangina preciso pelo qual o AND age ainda não foi completamente elucidado, mas estudos indicam redução do grau de isquemia total. AND dilata as arteríolas periféricas e, desta forma, reduz a resistência vascular periférica total contra o trabalho cardíaco. Com a frequência cardíaca estável, esta redução da taxa diminui o consumo de energia miocárdica e, conseqüentemente, a necessidade por oxigênio. O besilato de anlodipino produz dilatação das artérias coronárias principais e arteríolas coronárias, em várias regiões, tanto normais, como isquêmicas, aumentando a liberação de oxigênio no miocárdio em pacientes com espasmo coronariano arterial (BISOGNANO et al., 2004; STEFFEN, 1999).

Experimentos com modelos animais e vasos coronários humanos *in vitro* demonstraram o bloqueio da constrição e restauração do fluxo nas artérias coronárias e arteríolas, inibindo o espasmo coronário, confirmando, assim, a ação anti-angina mencionada anteriormente (MUNTWYLER & FOLLATH, 2001).

2.6 Interações e reações adversas

A administração diária de uma dose de AND não causa efeitos colaterais de maiores preocupações, provendo um tratamento seguro e efetivo por 24 horas em pacientes com doenças coronarianas e hipertensão arterial. Estudos realizados com 100 pacientes demonstram que 13,8% apresentaram leve edema de perna como o evento mais freqüente (STEFFEN, 1999).

O AND não possui interações e reações adversas quando administrado concomitante com digoxina, cimetitina, nitroglicerina, antiinflamatórios não esteróides, antibióticos, hipoglicemiantes orais e alguns diuréticos (BURGES & DODD, 1990). Estudos farmacocinéticos evidenciam que o fármaco não altera significativamente a farmacocinética da ciclosporina e varfarina (NAYLER, 1990).

As taxas de absorção ou níveis plasmáticos não sofrem influência significativa na ingestão simultânea de alimentos (FAULKNER et al.,1989). É bem tolerado e não exerce efeitos desfavoráveis no metabolismo de carboidratos e lipídeos (STEFFEN, 1999).

2.7 Contra indicações

AND é contra-indicado somente quando o paciente possui hipersensibilidade as dihidropiridinas ou algum componente da formulação (STEFFEN, 1999).

2.8 Descrição (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2003)

- Nome químico: (4 R,S)-3-etil-5metil-2-(2-amino-etóxi-metil)-4-(2-clorofenil)1,4-diidro-6-metil piridino 3,5-dicarboxilato monobenzo sulfonato.
- Registro no Chemical Abstracts Service (CAS): 111470-99-6
- Fórmula molecular: $C_{26}H_{31}ClN_2O_8S$
- Peso molecular: 567,1
- Composição elementar: C 55,07%; H 5,51%; Cl 6,25%; N 4,94%; O 22,57%; S 5,56%.
- Apresentação e solubilidade: pó branco, pouco solúvel em água e 2-propanol, solúvel em metanol e em etanol.
- Ponto de fusão: 203 °C

2.9 Métodos de determinação e estudos de estabilidade

Na literatura há vários métodos analíticos desenvolvidos para análise de AND, sendo a espectrofotometria a técnica mais comumente utilizada.

Na Farmacopéia Britânica (2003) encontra-se descrito método para determinação de besilato de anlodipino como matéria-prima. O método indicado é a cromatografia líquida (CL) com detecção ultravioleta, empregando como fase móvel acetonitrila:metanol:triethylamina 0,7% (V/V, em água) (15:35:50), com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico.

Em 2005, foram desenvolvidos e validados, por Basavaiah et al. (2005), métodos por cromatografia líquida e espectrofotometria no visível para determinação de AND em comprimidos. O método cromatográfico utilizou coluna de fase reversa e fase móvel composta de 0,1% de ácido fosfórico (pH 3,0): acetonitrila (20:80), a uma vazão de 1 ml/min., com detecção em 238 nm. O método espectrofotométrico baseou-se na brominação do AND em um excesso conhecido de uma mistura de bromato-brometo em meio ácido, seguido pela determinação de brometo pela reação com amarelo de metanila. Mediu-se sua absorvância em 530 nm. Ambos os métodos demonstraram ser precisos e exatos, com boa sensibilidade.

Baranda et al. (2004) determinaram anlodipino em formas farmacêuticas por CL com detecção amperométrica, utilizando coluna C_{18} a $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, com fase móvel constituída de acetonitrila:tampão acetato 10 mM (72:28, V/V) eluída a uma vazão de 1 ml/min. O método foi validado levando em consideração os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e limite de detecção e quantificação.

Klinkenberg et al. (2003) utilizaram a CL para a determinação de resíduos de anlodipino em superfícies de equipamentos utilizados na indústria farmacêutica. Seu desenvolvimento foi baseado nas condições propostas pela Farmacopéia Britânica (2002), sendo que o método demonstrou ser sensível, linear, exato e preciso.

Rahman & Hoda (2003) desenvolveram métodos espectrofotométricos para análise de anlodipino em formas farmacêuticas. O primeiro método foi baseado na reação de complexação do fármaco com 2,3-dicloro 5,6-diciano 1,4-benzoquinona para produzir um produto colorido com absorção em 580 nm. O método apresentou linearidade, cumprindo com a Lei de Beer na faixa de 1-125 $\mu\text{g/ml}$. O segundo procedimento apresentado baseou-se na reação do fármaco com ácido ascórbico em N,N-dimetilformamida, formando composto com absorção em 530 nm. Os métodos foram validados estatisticamente.

Outro método espectrofotométrico, apresentado por Rahman & Azmi (2001), foi baseado na reação do grupo amino primário do fármaco com ninhidrina em N,N-dimetilformamida, produzindo um complexo colorido com máximo de absorção em 595 nm. O método foi linear de 10 – 60 $\mu\text{g/ml}$, com CV% de 0,66%. Não foram observadas interferências entre o fármaco e os excipientes presentes nas formas testadas.

Métodos colorimétricos foram igualmente apresentados por Sridhar et al. (1997) para determinação de anlodipino em matéria-prima e comprimidos. O primeiro método baseou-se na reação de complexação do fármaco com azul de bromotimol. O complexo formado foi extraído com clorofórmio e apresentou máximo de absorção em 405 nm. A reação de

formação de produto de acoplamento oxidativo entre o fármaco e 3-metil-2-benzotiazolinona-hidrazona, na presença de sulfato cérico amoniacal, com absorção máxima em 605 nm, foi utilizada para o desenvolvimento do segundo método. Ambos os métodos cumpriram a Lei de Beer entre 5-40 µg/ml.

A determinação simultânea de atenolol e anlodipino em comprimidos através de cromatografia em camada delgada de alto desempenho foi apresentada por Argekar & Powar (2000). Os autores utilizaram placas aluminizadas de sílica-gel 60F 254 como fase estacionária e cloreto de metileno:metanol:solução de amônia 25% (8,8:1,3:0,1, V/V) como fase móvel. A detecção foi realizada por densitometria utilizando detector ultravioleta em 230 nm. Os fatores de retenção foram 0,33 e 0,75 para atenolol e anlodipino, respectivamente.

Ragno et al. (2002) desenvolveram estudos sobre a fotoestabilidade de anlodipino. O método utilizado foi a espectrofotometria derivada de terceira ordem. Através do método foi possível determinar o fármaco na presença do principal fotoproduto, a piridina. Ragno et al. (2003) testaram diferentes formulações incluindo ciclodextrinas, lipossomas e microesferas para determinar, entre estas, a que proporciona maior fotoestabilidade ao produto. O melhor resultado foi encontrado utilizando microesferas.

Basavaiah et al. (2003) realizaram determinação de anlodipino e felodipino em matéria-prima e formulações por espectrofotometria no visível usando ferro(III) e ferrocianato. O método baseou-se na redução do ferro(III) em meio ácido com subsequente interação com ferro(II) e ferrocianato, proporcionando coloração característica para ambos os fármacos.

Para determinação do besilato de anlodipino em plasma ou fluídos biológicos foram apresentados os seguintes métodos: cromatografia gasosa (MONKMAN et al., 1996), cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (YASUDA et al., 1996; STREEL et al., 2002), cromatografia líquida com detecção eletroquímica utilizando coluna quiral (JOSEFSSON & NORLANDER, 1996), imunensaio (MATALKA et al., 2001) e CL com detecção por fluorescência (TATAR & ATMACA, 2001).

Estudos de dissolução *in vitro*, essenciais para avaliação das propriedades biofarmacotécnicas de forma farmacêutica de uso oral, não foram encontrados na literatura.

3. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)

3.1 Introdução

O desenvolvimento de um método analítico depende de diversos fatores para oferecer resultados apropriados. Dentre esses, a substância utilizada como referência constitui-se em fator principal. Neste sentido, a pureza da SQR é essencial para a validação de métodos analíticos. De acordo com o FDA, existem duas categorias de SQR: compendiais, as quais são obtidas de fontes como USP e não necessitam de caracterização posterior e as não compendiais, que são aquelas com elevado teor de pureza, mas que devem ser cuidadosamente caracterizados para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1998).

Métodos adequados de identificação são de fundamental importância, pois permitem caracterizar a substância utilizada como referência. No presente trabalho realizaram-se análises espectroscópicas, tais como: RMN de hidrogênio e carbono, infravermelho e ultravioleta.

3.2 Substância química de referência

Utilizou-se como SQR matéria-prima de besilato de anlodipino, com teor declarado de 101,42%, identificado pelo lote nº 260401, adquirido do laboratório Delaware[®].

3.3 Identificação da SQR

3.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H (RMN ¹H)

O espectro de RMN ¹H do besilato de anlodipino foi obtido em espectrômetro Bruker modelo DPX, registrado a 400,13 MHz, usando como solvente CDCl₃. O espectro correspondente está ilustrado na Figura 3.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios estão apresentados a seguir e estão em acordo com a literatura (KIM et al., 2002; SILVERSTEIN, 2000). As atribuições realizadas, apresentadas por letras, estão indicadas na Figura 2.

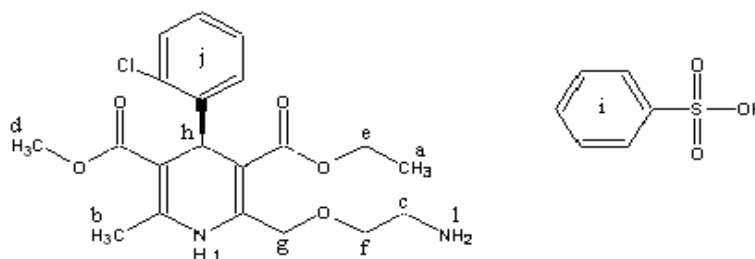


Figura 2 - Estrutura química do besilato de anlodipino marcada com as letras referentes aos deslocamentos de hidrogênios obtidos com RMN ^1H .

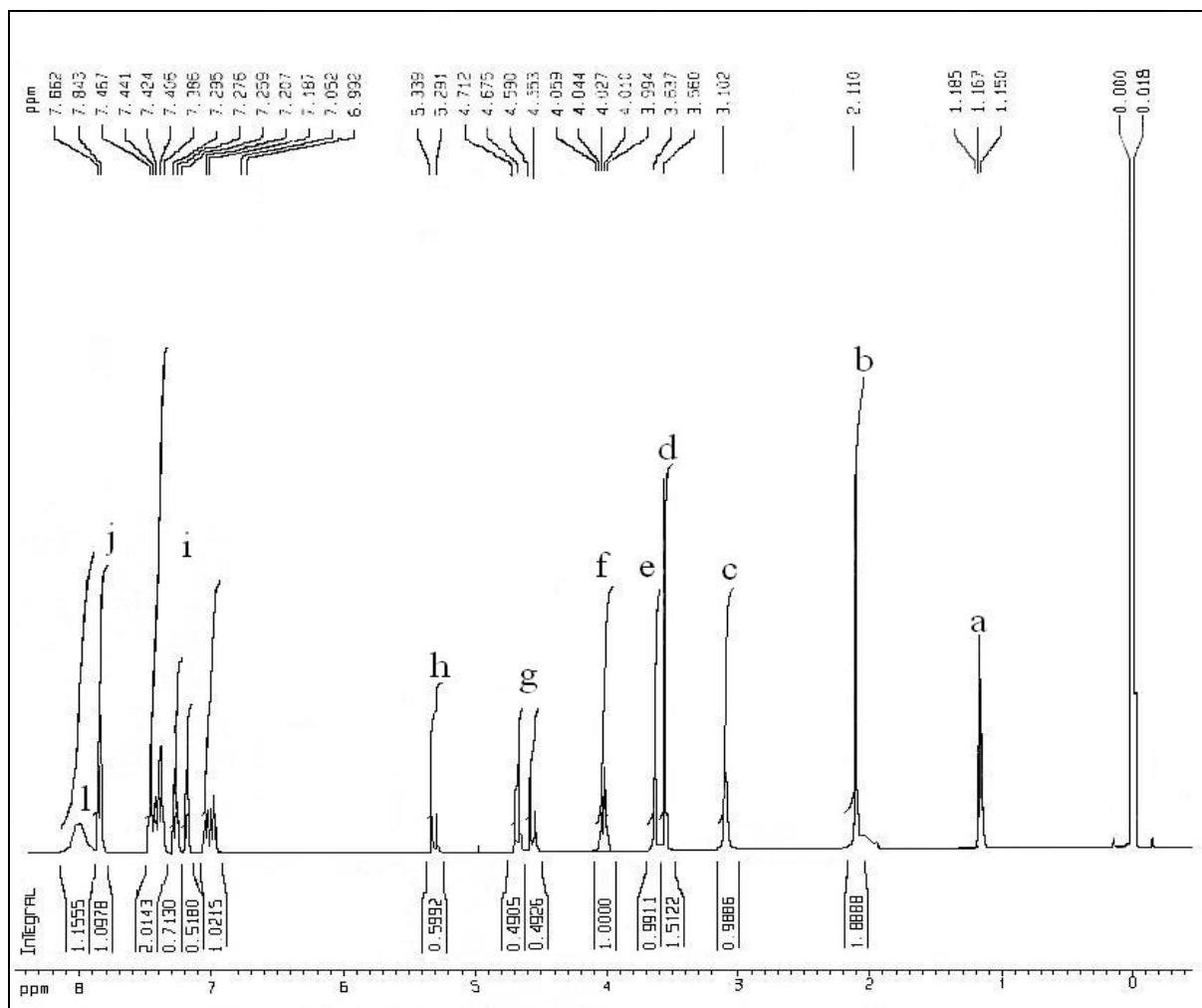


Figura 3 – Espectro de RMN ^1H do besilato de anlodipino SQR (400 MHz, CDCl_3).

O singlete apresentado em δ 7,86 pode ser atribuído aos hidrogênios amínicos. Na região de δ 7,84 – 6,99 aparecem os multipletos dos hidrogênios do anel sulfonila e fenila substituída. O singlete em δ 5,3 pode ser atribuído às ligações sp_3 da ligação dos anéis. Em δ 4,6 aparece o singlete dos hidrogênios pertencentes ao carbono do éter ligado ao anel piridínico. O tripleto em δ 4,0 pode ser atribuído aos hidrogênios do carbono do éter ligado à metila. Em δ 3,5 e 3,6 encontram-se os hidrogênios dos carbonos ligados aos oxigênios dos ésteres. O singlete em δ 2,1 representa os hidrogênios da metila ligada ao anel piridínico.

3.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C)

O espectro de RMN ^{13}C do besilato de anlodipino foi obtido em espectrômetro Bruker modelo DPX, registrado a 400 MHz, usando como solvente CDCl_3 . O mesmo encontra-se ilustrado na Figura 5.

As atribuições dos carbonos do besilato de anlodipino não foram encontradas na literatura consultada. As mesmas foram descritas baseadas nos deslocamentos químicos encontrados na literatura pertinente e estão representadas por letras na Figura 4 (SILVERSTEIN, 2000).

Entre os principais sinais pode-se destacar δ 39,6 relativo ao carbono ligado ao NH_2 e em δ 50,6 indicando a metila ligada somente ao oxigênio do éster. O sinal δ 59,8 pode ser atribuído ao carbono ligado ao anel piridínico e ao oxigênio do éter. Os sinais em δ 66,6 e 68,1 são referentes aos carbonos ligados ao oxigênio do éster e do éter, respectivamente. Os dois carbonos do anel piridínico ligados aos ésteres possuem seus respectivos sinais em δ 102,1 e 103,3. Na região dos carbonos aromáticos aparecem os sinais δ 125 – 145, sendo que em δ 125,6 e 128,7 aparecem os sinais de maior intensidade dos carbonos de dupla ligação da sulfonila. Em δ 167,2 e 167,9 aparecem os sinais referentes as duas carbonilas dos ésteres.

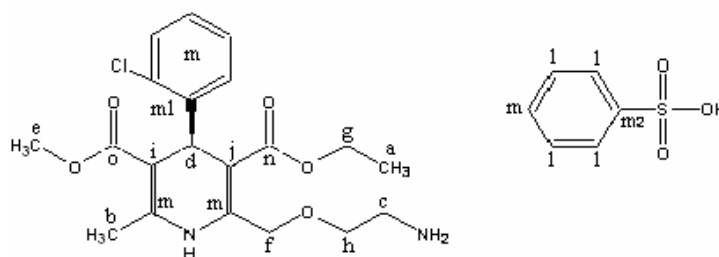


Figura 4 – Estrutura química do besilato de anlodipino marcada com as letras referentes aos deslocamentos de carbonos obtidos com RMN ^{13}C .

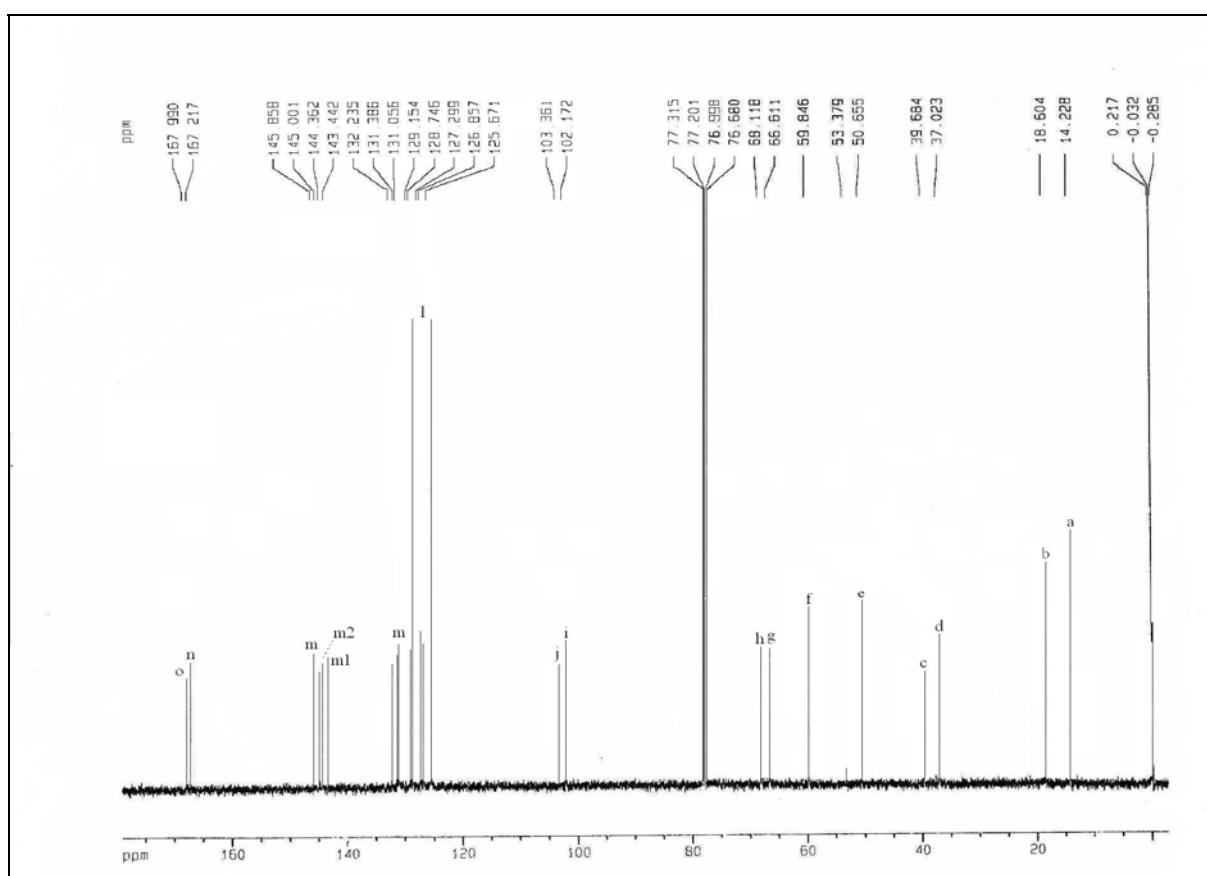


Figura 5 – Espectro de RMN ^{13}C do besilato de anlodipino SQR (400 MHz, CDCl_3).

3.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho do besilato de anlodipino SQR foi obtido em espectrofotômetro RUKER IFS28, utilizando pastilhas de brometo de potássio. Na Figura 6, verificam-se as seguintes bandas características (cm^{-1}): 3298; 3068; 2975; 2940; 1700; 1669; 1495; 1311; 1203; 1121; 1091 e 753.

As atribuições das bandas características não foram encontradas na literatura consultada. As mesmas foram descritas baseadas na literatura pertinente (SILVERSTEIN, 2000).

A banda de deformação axial na região de 3298 cm^{-1} refere-se às vibrações N – H, enquanto que em 3068 cm^{-1} refere-se à deformação axial de aromáticos C–H. Em 2975 cm^{-1} observa-se banda de deformação axial simétrica referente a CH_3 , enquanto que em 2940 cm^{-1} e 753 cm^{-1} observam-se as bandas de deformação assimétrica axial e angular de CH_2 , respectivamente. As bandas de deformação axial referentes às ligações C=O aparecem em 1700 e 1669 cm^{-1} . Em 1311 e 1203 cm^{-1} observa-se a deformação axial referente à ligação C–O e, em 1121 cm^{-1} , a deformação axial da ligação C–O–C. A banda em 1091 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação axial da ligação C–N.

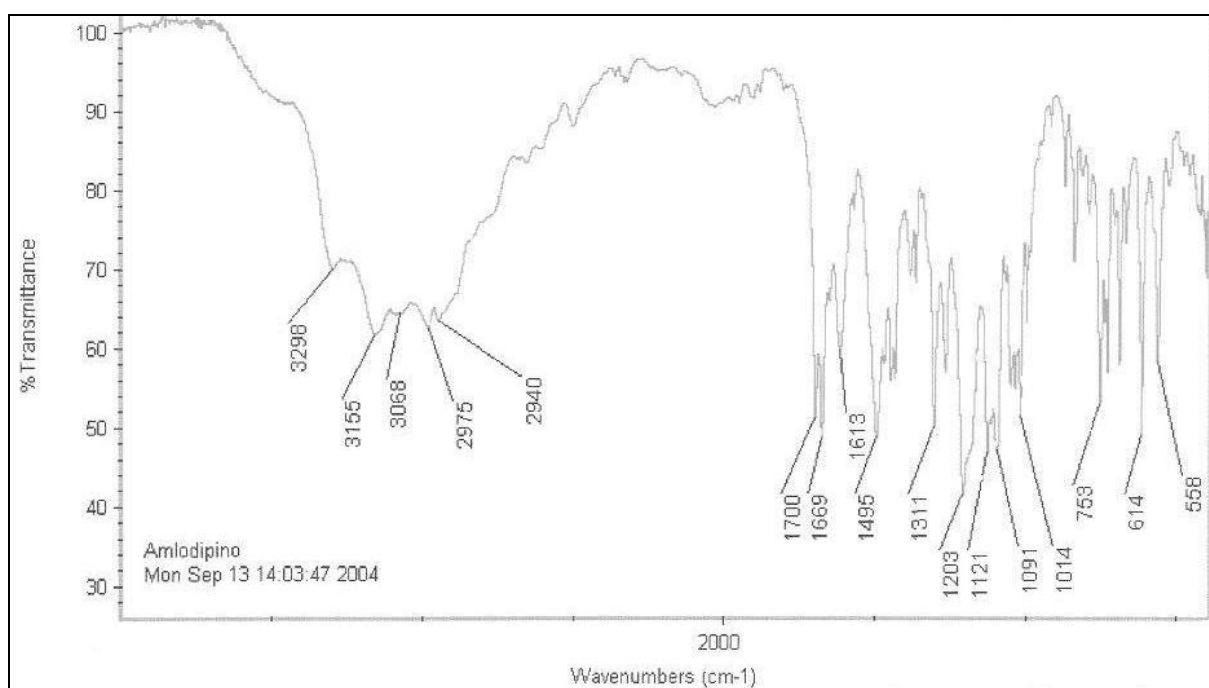


Figura 6 – Espectro na região do infravermelho do besilato da anlodipino SQR.

3.3.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta

O espectro de absorção foi traçado na região de 200 – 400 nm, utilizando como solvente 1 % de HCl 0,1N em metanol (V/V), em espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS

1601PC. Empregou-se cubetas de quartzo de 1 cm de percurso ótico e o mesmo solvente como branco.

O espectro do besilato de anlodipino na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ está apresentado na Figura 7, onde observam-se os seguintes máximos: 238 nm e 360 nm. Estes, podem ser atribuídos às transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ aromáticas e das transições dos elétrons não ligantes do oxigênio $n - \pi^*$, respectivamente. Estes máximos de absorção estão de acordo com a literatura (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2003).

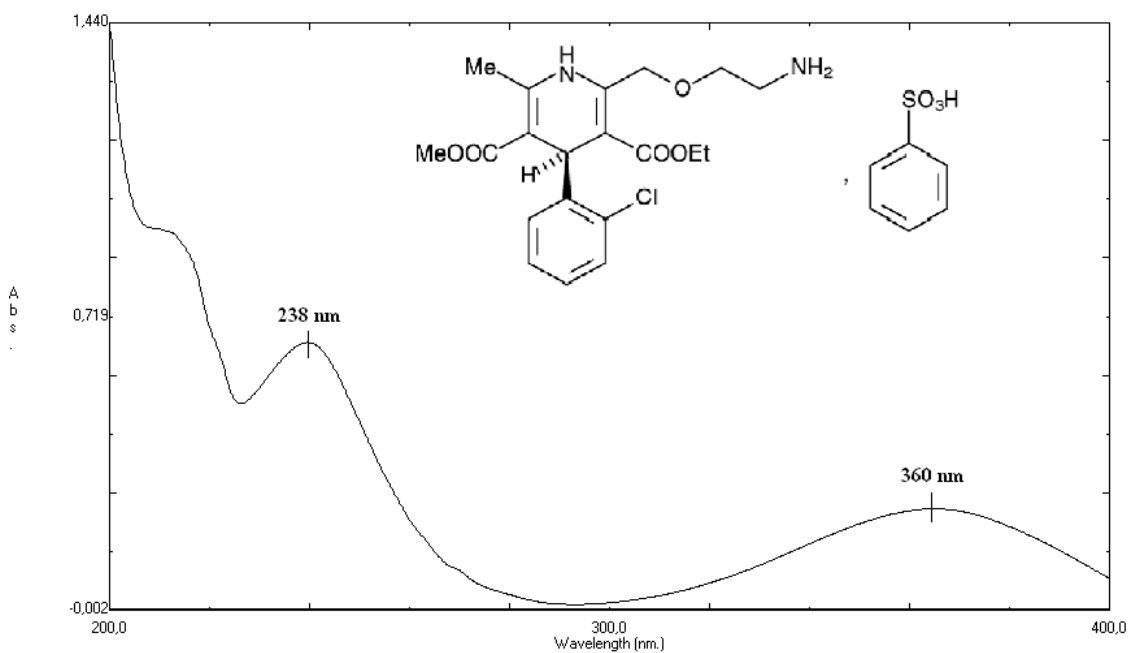


Figura 7 – Espectro de ultravioleta do besilato de anlodipino SQR, na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como solvente 1% de HCl 0,1N em metanol (V/V).

Tendo em vista os resultados obtidos nas análises espectroscópicas da matéria-prima, que garantiram a identidade do fármaco, utilizou-se a mesma como substância química de referência.

4. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA

4.1 Introdução

O crescente avanço tecnológico da indústria farmacêutica faz com que ela atue no mercado mundial como uma grande potência, produzindo novos medicamentos para atender às necessidades de uma grande parcela da população. Durante o desenvolvimento farmacêutico a análise do fármaco é necessária nas diversas fases do processo, tais como, estudo de formulação e de estabilidade, controle de qualidade e em testes farmacológicos e toxicológicos realizados em animais e humanos. A falta de métodos confiáveis de avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos (MEHTA, 1997; SWARTZ & KRULL, 1998).

O objetivo da validação de um método é demonstrar que o procedimento analítico é adequado para o propósito pretendido. Esse processo nos fornece uma evidência documentada que assegura a credibilidade do método para o qual é indicado. A escolha de um método depende, por sua vez, de vários fatores, tais como: natureza do fármaco, complexidade, pureza e quantidade de amostra, bem como, do propósito do método, ou seja, qualitativo, semi-quantitativo ou quantitativo. As disponibilidades econômicas, de equipamentos e reagentes, devem, também, ser consideradas (AVENDAÑO, 1993; MEHTA, 1997; SWARTZ & KRULL, 1998).

Diversos guias contendo diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos estão disponíveis atualmente, como ICH (1996) e a USP 28 (2004). Segundo estes guias, os principais parâmetros a serem avaliados na validação de um método são:

- **Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma variação. Os resultados correspondentes a cada diluição da SQR são plotados em gráfico da resposta absoluta *versus* concentração. A equação da reta, para a representação gráfica da curva de calibração, é

determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e validada pela análise de variância (ANOVA).

- **Especificidade**

A especificidade de um método representa sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir com a sua determinação numa mistura complexa. Corresponde ao grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação.

- **Precisão**

Apresenta o grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o método é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de testes.

A precisão pode ser medida através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada através de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser feita a partir de um mínimo de nove determinações, contemplando o limite de variação do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas cada, ou a partir de no mínimo de seis determinações a 100% da concentração teste. A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de um estudo colaborativo.

A precisão normalmente é expressa através de coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR), e pode ser avaliada através de testes estatísticos como o Teste F.

Para todos os métodos validados neste trabalho a precisão foi determinada a partir de seis determinações a 100% da concentração de trabalho em um mesmo dia, sob as mesmas condições (repetibilidade). A precisão intermediária foi realizada a partir de análises realizadas em diferentes dias, sob as mesmas condições.

- **Robustez**

A robustez corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, tempo de extração, entre outras.

- **Exatidão**

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. É expressa como o percentual de resposta (% de recuperação) que pode ser obtida através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida.

- **Limite de Detecção**

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.

- **Limite de Quantificação**

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com precisão e exatidão, utilizando um determinado procedimento experimental.

Os guias citados anteriormente reconhecem que não existe necessidade de avaliar todos os parâmetros de performance analítica. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser investigados (SWARTZ & KRULL, 1998). Para os ensaios de determinação quantitativa a especificidade, a precisão, a exatidão e a linearidade devem ser consideradas (ICH, 1996; USP 28, 2004).

No decorrer deste capítulo serão apresentados os métodos por cromatografia líquida e espectrofotometria no ultravioleta que foram desenvolvidos e validados, de acordo com ICH

(1996) e USP 28 (2004), para determinação quantitativa de besilato de anlodipino em comprimidos e cápsulas.

Além dos métodos indicados avaliou-se, também, a utilização da volumetria de neutralização em meio não aquoso. Os resultados obtidos não foram adequados para determinação quantitativa do fármaco em estudo.

4.2 Produtos farmacêuticos

- Comprimidos contendo 6,9 mg de besilato de anlodipino, com o nome comercial de Norvasc[®], fabricados pela Pfizer, lote 304-05017A, fabricação 12/2003 e validade 12/2006.

Excipientes: estearato de magnésio, amidoglicolato de sódio, fosfato de cálcio dibásico anidro, celulose microcristalina.

- Cápsulas contendo 6,9 mg de besilato de anlodipino, manipuladas pela farmácia Nova Derme, lote 8786, fabricação 24/09/2004 e validade extemporânea.

Excipientes: estearato de magnésio, amidoglicolato de sódio, amido, fosfato de cálcio dibásico, celulose microcristalina.

4.3 Solventes e reagentes

- Acetonitrila, Tedia[®]
- Ácido orto-fosfórico 85%, Merck[®]
- Ácido clorídrico, Merck[®]
- Água destilada[®]
- Água purificada[®]
- Etanol, Tedia[®]
- Gás hélio, White Martins[®]
- Hidróxido de sódio, Merck[®]
- Metanol, Tedia[®]

- Peróxido de hidrogênio, Belga Química[®]
- Trietilamina, Merck[®]

4.4 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético com aquecimento, Marconi[®]
- Agitador mecânico, Nova Ética[®]
- Balança analítica, Sartorius[®]
- Banho de ultra-sônico, Thornton[®]
- Bomba de vácuo, Primar[®]
- Centrífuga, Jouan[®]
- Coluna cromatográfica de fase reversa octadesilcilano Luna[®] (250 mm x 4,6 mm d.i.) 4 µm, Phenomenex[®]
- Coluna cromatográfica de fase reversa octadesilcilano LichroCART[®] (250 mm x 4,6 mm d.i.) 4 µm, Merck[®]
- Cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com controlador SCL-10 AD_{vp}, com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 AD_{vp}, injetor automático com “loop” variável SIL-10 AD_{vp} e integrador automático computadorizado através do software CLASS VP 5.0[®].
- Destilador, Biomatic[®]
- Espectrofotômetro UV-VIS, Shimadzu[®]
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm, Sartorius[®]
- Membrana filtrante de celulose regenerada, porosidade 0,45 µm, 13 mm, Sartorius[®]
- Lâmpada ultravioleta TUV 30W/G30 T8, 254nm, Philips[®]
- Potenciômetro, Fieldlab Schott[®]
- Termômetro de imersão, Incoterm[®]

4.5 Cromatografia líquida (CL)

As condições experimentais estabelecidas para análise do besilato de anlodipino, através do método de CL, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para execução do método por cromatografia líquida.

Características	Descrição
Coluna	Luna [®] C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm d.i.) 4 µm, Phenomenex
Fase móvel	Acetonitrila : Solução A (40:60, V/V) Solução A: Ácido fosfórico 0,1% (V/V) pH 3,0 (ajustado com trietilamina)
Vazão	1,0 mL/min.
Comprimento de onda	238 nm
Volume de injeção	20 µl

Os constituintes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de nylon com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, e desgaseificados com gás hélio durante 10 minutos. A coluna foi previamente estabilizada, através da passagem da fase móvel, durante 30 minutos, com vazão de 1 mL/min. Todas as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,45 µm, antes de serem analisadas.

4.5.1 Validação do método analítico

A validação foi conduzida de acordo com ICH (1996) e USP 28 (2004). Os parâmetros de validação utilizados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez, exatidão e limite de detecção e quantificação.

4.5.1.1 Especificidade

A especificidade do método analítico foi determinada pelo estudo da degradação forçada da SQR. O fármaco foi submetido a condições de hidrólise ácida e básica, fotólise e oxidação química (SINGH & BAKSHI, 2000). No acompanhamento do estudo de degradação forçada da SQR foram avaliados os seguintes parâmetros: pureza do pico e porcentagem de área referente ao besilato de anlodipino, realizada através do programa CLASS VP 6.14. Os espectros do AND e dos produtos formados foram obtidos por detector de arranjo de diodos (DAD) e foram traçados na faixa de 200 a 400 nm.

- Preparação da SQR nas condições normais (tempo zero)

Pesou-se, analiticamente, 10 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução com concentração de 100 µg/mL. Foi transferida alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com fase móvel, obtendo-se solução com concentração de 20 µg/mL.

- Hidrólise ácida

Pesou-se, analiticamente, 10,0 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1N, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. Deixou-se a solução em refluxo à temperatura de 80°C por 2 horas. Transferiu-se alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 50 mL, neutralizou-se com 1 mL de hidróxido de sódio 0,1N e completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se solução com concentração teórica de 20,0 µg/mL.

- Hidrólise básica

Pesou-se, analiticamente, 10,0 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume com hidróxido de sódio 0,1N, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. Deixou-se a solução em

refluxo à temperatura de 80°C por 2 horas. Transferiu-se alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 50 mL, neutralizou-se com 1 mL de ácido clorídrico 0,1N e completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se solução com concentração teórica de 20,0 µg/mL.

- Fotólise

Pesou-se, analiticamente, 10,0 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. A amostra foi irradiada por luz UV em cubetas de quartzo, a uma distância de 15 cm por 6 horas. Transferiu-se 1 mL da amostra para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se solução com concentração teórica de 20,0 µg/mL.

- Oxidação química

Pesou-se, analiticamente, 25,0 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume com H₂O₂ 30V, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. O balão foi envolto em papel alumínio e mantido à temperatura ambiente por 24 horas. Transferiu-se 2 mL dessa solução para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se solução com concentração teórica de 20,0 µg/mL.

4.5.1.2 Linearidade

Para preparar a curva de calibração pesou-se, analiticamente, 10 mg da SQR e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução com concentração de 100 µg/mL. Foram transferidas alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com fase móvel, obtendo-se soluções com concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL, respectivamente. As curvas foram preparadas em três dias diferentes.

4.5.1.3 Precisão

- Preparo da SQR

Preparou-se solução da SQR contendo 20,0 µg/mL de besilato de anlodipino, conforme descrito no item 4.5.1.2.

- Preparo das amostras

Foi determinado o peso médio de 20 comprimidos e o peso do conteúdo de 20 cápsulas, conforme a Farmacopéia Brasileira IV Edição (1998). Os comprimidos foram triturados até a formação de um pó homogêneo. Os conteúdos das cápsulas foram misturados. Pesaram-se, dos pós, quantidades equivalentes a 5,0 mg de besilato de anlodipino, transferiram-se para balões volumétricos de 50 mL, com o auxílio de 30 mL de metanol. As soluções foram submetidas a ultra-som por 15 minutos. Completaram-se os volumes com metanol, homogeneizou-se e as soluções obtidas foram submetidas à centrifugação (3.000 r.p.m.) durante 10 minutos. Transferiram-se 2 mL do sobrenadante para balões volumétricos de 10 mL e completaram-se os volumes com fase móvel, obtendo-se soluções com concentração de 20,0 µg/mL. Para ambas as amostras foram realizadas determinações no mesmo dia (n=6), em diferentes dias (n=3) e com diferente equipamento e analista (n=3).

- Cálculos

A concentração de besilato de anlodipino nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

C_A = Concentração de besilato de anlodipino na amostra

A_A = Área média absoluta da amostra

C_{SQR} = Concentração da SQR

A_{SQR} = Área média absoluta da SQR

O valor percentual de besilato de anlodipino nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Onde:

$C_A\%$ = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de besilato de anlodipino encontrada na amostra

C_T = Concentração teórica de besilato de anlodipino na amostra

4.5.1.4 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada por pequenas modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: mudança na temperatura de análise para 30 °C, utilização de coluna de diferente fabricante (Merck) com as mesmas dimensões e especificações, modificação no comprimento de onda de 238 para 230 nm, mudança na proporção de fase móvel com um decréscimo de 5% da fase orgânica e alteração no pH da fase aquosa de 3,0 para 4,0.

Para avaliar a influência desses fatores sobre o método realizou-se análise de teor (conforme descrito no item 4.5.1.3) dos comprimidos e cápsulas nas diferentes condições.

4.5.1.5 Exatidão (Teste de Recuperação)

Pesou-se, do pó preparado no item 4.5.1.3, quantidade equivalente a 8,0 mg de besilato de anlodipino e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, com o auxílio de 30 mL de metanol. A solução foi submetida a ultra-som por 15 minutos. Completou-se o volume

com metanol, homogeneizou-se e centrifugou-se (3.000 r.p.m.) durante 10 minutos. Foram transferidas alíquotas de 1,0 mL do sobrenadante para balões volumétricos de 10 mL, denominados R₁, R₂ e R₃. A cada balão volumétrico acrescentou-se, respectivamente, 1,0; 2,0 e 3,0 mL da solução metanólica de SQR contendo 20,0 µg/mL de besilato de anlodipino e completou-se o volume com fase móvel. Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 18,0; 20,0 e 22,0 µg/mL de besilato de anlodipino. Foram preparadas, simultaneamente, soluções de amostra e substância química de referência na concentração de 16,0 µg/mL de besilato de anlodipino, denominadas de A e SQR, respectivamente. A Tabela 2 representa, esquematicamente, o preparo das soluções para o teste de recuperação.

Tabela 2 – Preparo das soluções para o teste de recuperação de besilato de anlodipino nas amostras de comprimidos e cápsulas por cromatografia líquida.

Balão volumétrico de 10 mL	Volume (mL) da solução amostra (160,0 µg/mL)	Volume (mL) da solução de SQR (20,0 µg/mL)	Concentração final (µg/mL)
A	1,0	-	16,0
R ₁	1,0	1,0	18,0
R ₂	1,0	2,0	20,0
R ₃	1,0	3,0	22,0
SQR	-	8,0	16,0

- Cálculo para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação (R%) foram calculadas pela expressão:

$$R\% = [(C_A - C_{NA}) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Onde:

C_A = concentração de besilato de anlodipino encontrada na amostra adicionada de SQR

C_{NA} = concentração de besilato de anlodipino encontrada na amostra não adicionada de SQR

C_{SQR} = concentração da SQR adicionada à amostra

4.5.1.6 Limite de quantificação (LQ) e Limite de detecção (LD)

Os LQ e LD foram calculados a partir das fórmulas descritas no ICH (1996), baseadas no desvio padrão do intercepto (σ) e na inclinação da curva de calibração (IC). Os LQ e LD teóricos, calculados segundo as equações a seguir, foram preparados experimentalmente e injetados no cromatógrafo, em triplicata.

$LQ = \frac{10\sigma}{IC}$	$LD = \frac{3,3\sigma}{IC}$
----------------------------	-----------------------------

4.5.2 Resultados

Os cromatogramas das soluções submetidas à degradação forçada, na concentração teórica de 20,0 $\mu\text{g/mL}$, obtidos em condições normais (tempo zero) e após o período de degradação estão apresentados nas Figuras 8 a 11, juntamente com seus respectivos espectros.

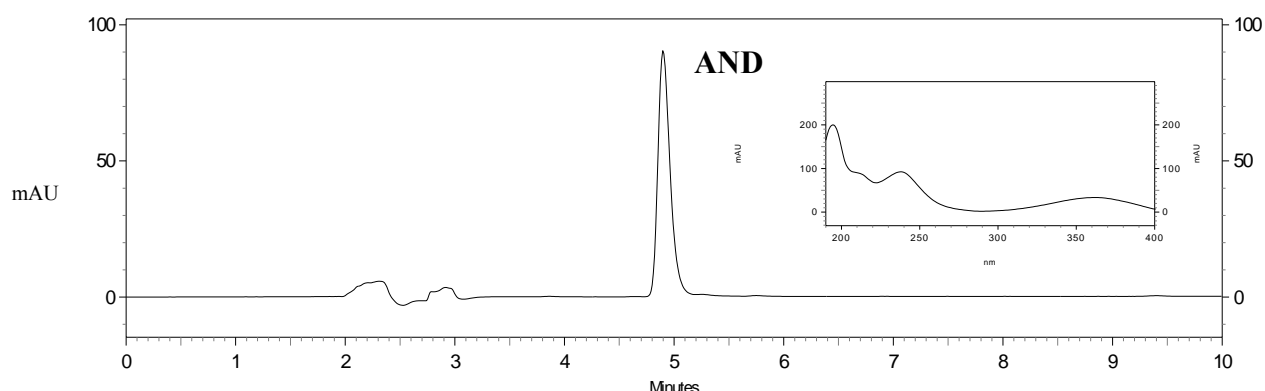


Figura 8 – Cromatograma obtido com a solução da SQR na concentração de 20,0 $\mu\text{g/mL}$ no tempo zero. Inserido na figura está o respectivo espectro obtido por DAD. Condições cromatográficas: Coluna Luna[®] Phenomenex[®] C₁₈ (25 cm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:acetonitrila (60:40, V/V); Vazão: 1 mL/min.; detecção: 238 nm.

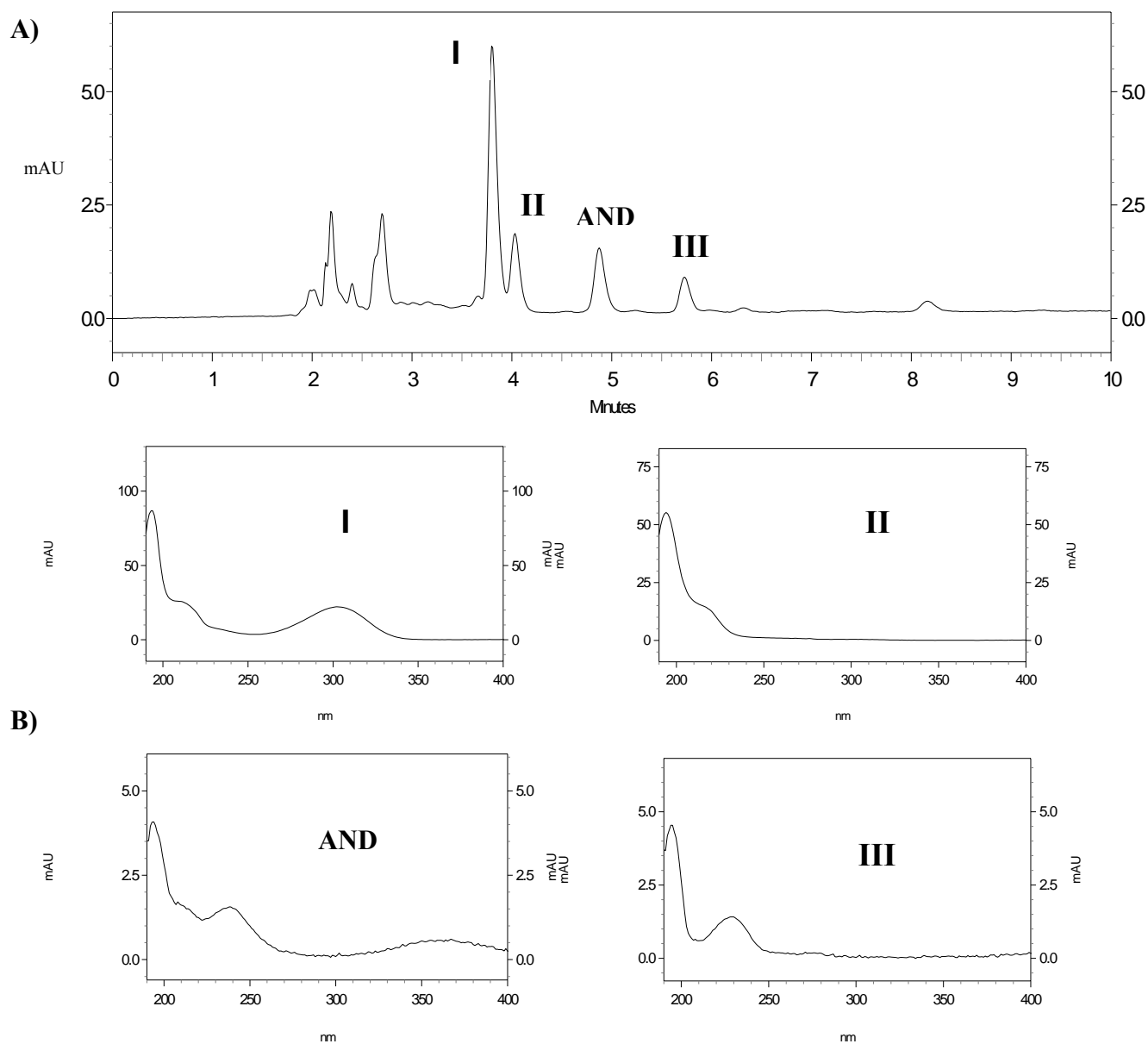


Figura 9 – (A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de besilato de anlodipino após 2 horas de hidrólise ácida. (B) Espectro dos picos obtidos com a SQR e produtos formados I, II e III. Condições cromatográficas: Coluna Luna[®] Phenomenex[®] C₁₈ (25 cm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:acetonitrila (60:40, V/V); Vazão: 1 mL/min.; detecção: 238 nm.

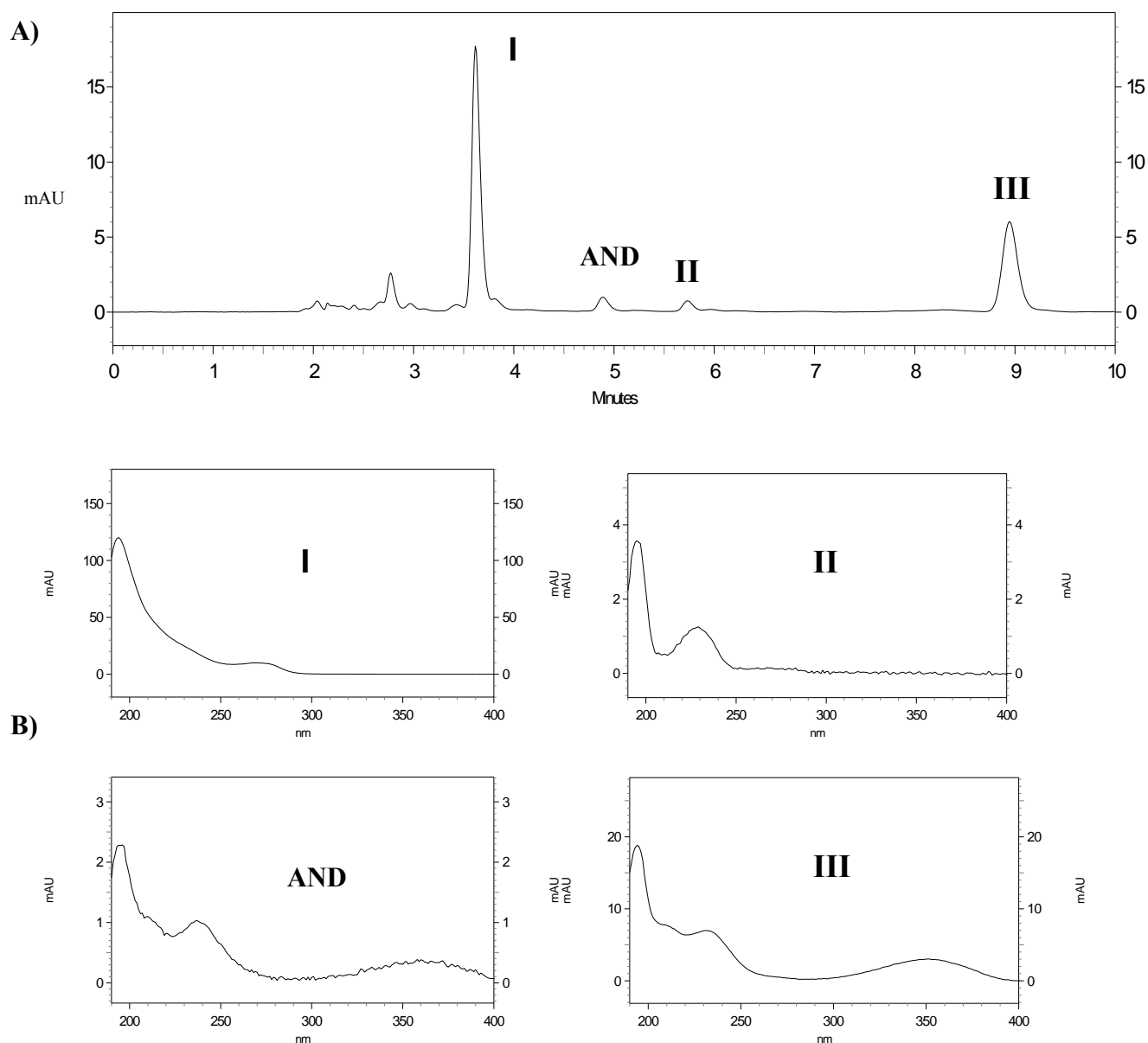


Figura 10 – (A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de besilato de anlodipino após 2 horas de hidrólise básica. (B) Espectro dos picos obtidos com a SQR e produtos formados I, II e III. Condições cromatográficas: Coluna Luna[®] Phenomenex[®] C₁₈ (25 cm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:acetonitrila (60:40, V/V); Vazão: 1 mL/min.; detecção: 238 nm.

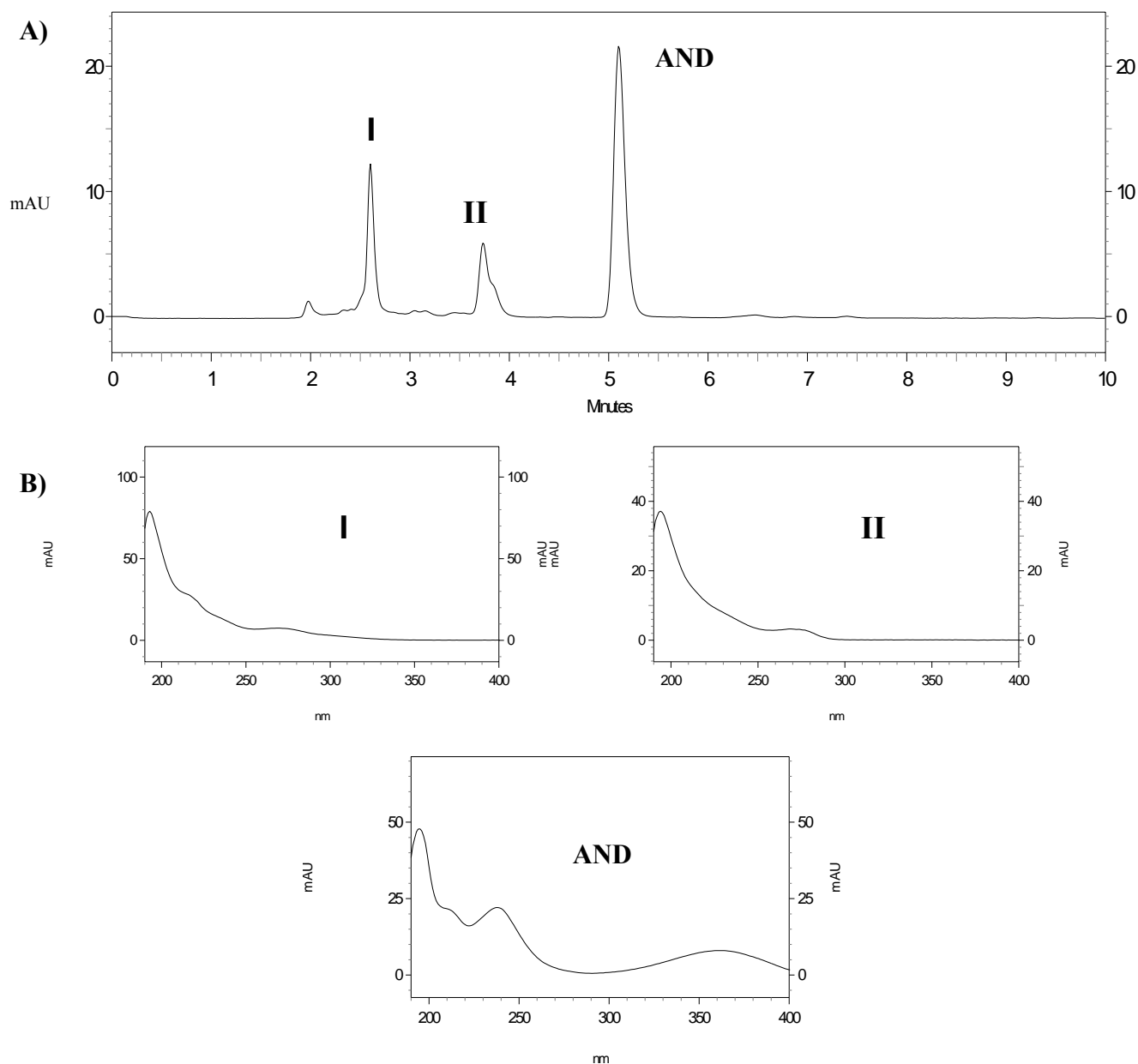


Figura 11 – (A) Cromatograma da degradação forçada da SQR de besilato de anlodipino após 6 horas de fotólise. (B) Espectro dos picos obtidos com a SQR e produtos formados I e II. Condições cromatográficas: Coluna Luna[®] Phenomenex[®] C₁₈ (25 cm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0:acetonitrila (60:40, V/V); Vazão: 1 mL/min.; detecção: 238 nm.

Na degradação por oxidação química com H₂O₂ 30%, a análise dos cromatogramas demonstrou um decréscimo na porcentagem de área do pico referente ao besilato de anlodipino sem o surgimento de picos adicionais.

A Tabela 3 apresenta os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração para o besilato de anlodipino por cromatografia líquida e, a Figura 12, a curva de

calibração correspondente. O coeficiente de variação percentual médio das áreas obtidas foi de 0,70%.

Tabela 3 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do besilato de anlodipino por cromatografia líquida.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas absolutas			Média	CV%
	1º dia	2º dia	3º dia		
10	380659	380432	382760	381284	0,34
15	564465	558919	565861	563082	0,65
20	756343	749168	761239	755583	0,80
25	948126	934311	943025	941821	0,74
30	1126621	1111219	1132796	1123545	0,99

CV% = coeficiente de variação percentual

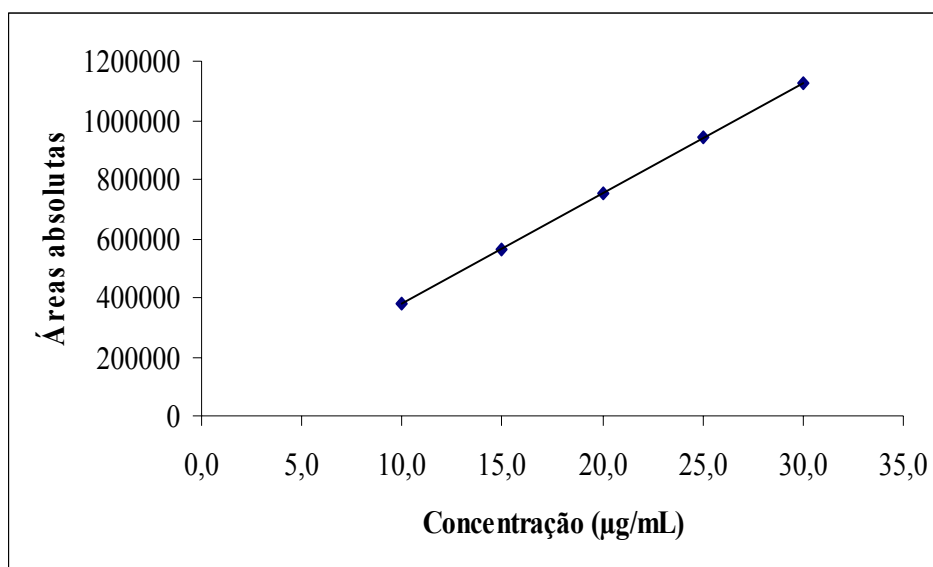


Figura 12 – Representação gráfica da curva de calibração do besilato de anlodipino obtida através do método de cromatografia líquida.

As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva de calibração.

Tabela 4 – Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método por cromatografia líquida.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	10 – 30 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 37265x + 7758$
Inclinação (b) ± desvio padrão	37265 ± 204
Intercepto (a) ± desvio padrão	7758 ± 4319
Coefficiente de correlação (r)	0,9999

Tabela 5 – Análise de variância das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva de calibração do besilato de anlodipino por cromatografia líquida.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	4	$1,042 \cdot 10^{12}$	$2,60 \cdot 10^{11}$	5.805 (3,48)
- regressão linear	1	$1,041 \cdot 10^{12}$	$1,01 \cdot 10^{11}$	23.219 (4,96)
- desvio da linearidade	3	$9,3 \cdot 10^7$	$3,11 \cdot 10^7$	0,69 (3,71)
Resíduo	10	$4,48 \cdot 10^8$	$4,48 \cdot 10^7$	
Total	14			

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos de comprimidos e cápsulas de besilato de anlodipino, referentes a precisão do método, encontram-se nas Tabelas 6 e 8, respectivamente.

Tabela 6 – Valores experimentais referentes a determinação de besilato de anlodipino em comprimidos por cromatografia líquida.

Amostras	Teor em besilato de anlodipino					
	Primeiro dia		Segundo dia		Terceiro dia (Diferente analista e equipamento)	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	6,66	96,60	6,84	99,17	6,73	97,60
2	6,80	98,63	6,81	98,73	6,77	98,18
3	6,70	97,11	6,74	97,74	6,87	99,62
4	6,77	98,15				
5	6,77	98,15				
6	6,71	97,20				
Média	6,74	97,64	6,80	98,55	6,79	98,47
CV%	0,82		0,74		1,06	

A Tabela 7 apresenta os resultados do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a precisão entre dias em comprimidos, através de análise de variância.

Tabela 7 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em comprimidos por cromatografia líquida.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	2,26	1,13	1,62 (4,26)
Resíduo	9	6,29	0,70	
Total	11	8,55		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P = 0,05$.

Tabela 8 – Valores experimentais referentes a determinação de besilato de anlodipino em cápsulas por cromatografia líquida.

Amostras	Teor em besilato de anlodipino					
	Primeiro dia		Segundo dia		Terceiro dia (Diferente analista e equipamento)	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	6,78	98,25	6,81	98,77	6,78	98,26
2	6,76	97,93	6,73	97,59	6,84	99,20
3	6,79	98,37	6,72	97,43	6,76	97,93
4	6,83	99,01				
5	6,78	98,30				
6	6,74	97,71				
Média	6,78	98,26	6,75	97,93	6,79	98,46
CV%	0,47		0,75		0,61	

A Tabela 9 apresenta os resultados do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a precisão em cápsulas, através de análise de variância.

Tabela 9 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em cápsulas por cromatografia líquida.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	0,44	0,22	0,68 (4,26)
Resíduo	9	2,93	0,33	
Total	11	3,37		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P = 0,05$.

Os resultados da robustez encontram-se na Tabela 10, onde se demonstram os teores obtidos com as modificações propostas no método cromatográfico.

Tabela 10 – Valores experimentais obtidos para comprimidos e cápsulas, a partir das modificações nas condições cromatográficas estabelecidas.

Parâmetro	Comprimidos*		Cápsulas*	
	Teor (%)	CV (%)	Teor (%)	CV (%)
Temperatura	98,03	0,08	98,75	0,17
Coluna	97,35	0,06	98,02	0,24
λ (230 nm)	100,80	2,53	102,67	3,01
Fase móvel	97,10	0,62	97,98	0,85
pH	97,95	0,50	99,45	0,67

* Média de duas determinações

Os resultados obtidos no teste de recuperação de besilato de anlodipino estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado em amostras de comprimidos e cápsulas de besilato de anlodipino por cromatografia líquida.

Amostras	Quantidade de SQR ($\mu\text{g/mL}$)		% de Recuperação	% de Recuperação Média
	Adicionada	Recuperada		
Comprimidos	2,00	1,97	98,50	99,81
	4,00	4,05	101,25	
	6,00	5,98	99,67	
Cápsulas	2,00	1,96	98,00	100,11
	4,00	4,02	100,50	
	6,00	6,11	101,83	

Na análise do limite de quantificação, que foi calculado através da equação descrita no item 4.5.1.6, o valor teórico encontrado foi de 1 $\mu\text{g/mL}$, o qual correspondeu ao obtido experimentalmente, com CV% 1,93. Para o limite de detecção o valor teórico encontrado foi de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, o qual correspondeu ao obtido experimentalmente, com CV% 3,2.

4.5.3 Discussão

Os métodos cromatográficos são normalmente utilizados em laboratórios de análise para a determinação qualitativa e quantitativa de fármacos em matérias-primas, produtos acabados e amostras biológicas (SWARTZ & KRULL, 1998). Constitui-se em procedimento de larga utilização em razão de sua versatilidade, possibilitando a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação, através da adequada escolha de parâmetros, tais como colunas, fase móvel e método de detecção.

Na literatura são encontrados alguns métodos para análise de besilato de anlodipino em formas farmacêuticas por cromatografia líquida. Nesses estudos, as condições propostas dificultam aplicação dos métodos em controle de qualidade rotineiro, tais como: extração utilizando solvente tóxico, tempo de análise elevado e detectores eletroquímicos. Procedimentos mais simples, rápidos e de fácil execução podem ser desenvolvidos e, assim, empregados (BARANDA et al., 2004; JOSEFSSON & NORLANDER, 1996)

No decorrer desse estudo foi publicado método, por Basavaiah et al. (2005), empregando condições semelhantes às desenvolvidas no presente trabalho. Os autores não demonstraram, no entanto, a especificidade do método proposto.

No desenvolvimento do método proposto às condições cromatográficas foram influenciadas pelas propriedades físico-químicas do besilato de anlodipino, tais como polaridade e solubilidade. O besilato de anlodipino é ligeiramente solúvel em água, mas bastante solúvel em metanol, possuindo, portanto, caráter polar.

Empregou-se coluna cromatográfica C₁₈ devido a seu maior uso em laboratórios de controle de qualidade. Várias fases móveis foram testadas em diferentes proporções, tais como: água:metanol, água:etanol, ácido fosfórico 0,1% (V/V):metanol, com base nas condições propostas pela Farmacopéia Britânica (2003). A fase móvel constituída de ácido fosfórico 0,1% (V/V) pH 3,0 com trietilamina:acetoneitrila (60:40), mostrou-se adequada, proporcionando um tempo de retenção reprodutível de aproximadamente cinco minutos, boa eficiência (pratos teóricos > 3000), com picos de boa resolução, seletividade e simetria (< 2%), conforme pode-se observar nas Figuras 8 a 11

Para avaliação da especificidade do método submeteu-se a SQR à degradação estresse. A Figura 8 apresenta um cromatograma, com pureza de 99,99%, obtido com a SQR antes de sofrer degradação, na concentração de 20 µg/mL.

Na hidrólise ácida, após 2 horas, houve diminuição superior a 90% da área referente ao pico da SQR, que apresentou pureza de 99,8% sem variação no tempo de retenção (Figura 9). Surgiram picos adicionais referentes aos produtos formados. Os espectros dos principais produtos foram distintos, sugerindo estruturas diferentes. Na hidrólise básica verificou-se decréscimo superior a 98% na área do pico referente à SQR, mas a pureza permaneceu elevada (99,78%) e não variou tempo de retenção, como pode ser observado na Figura 10. Ocorreu o surgimento de picos adicionais os quais sofreram varredura no ultravioleta. Constatou-se que os produtos possuem distinção de espectros, com máximos de absorção diferentes.

Frente à luz a SQR sofreu menor degradação, quando comparada com a hidrólise. Após 6 horas, a porcentagem de área foi de 26%, com alto grau de pureza (99,89%) sem variação significativa do tempo de retenção, como pode ser observado na Figura 11. Surgiram dois picos adicionais que tiveram seus espectros traçados. Verificou-se que os mesmos possuem espectros diferentes da SQR. Na literatura foi constatado que o besilato de anlodipino é fotosensível e, por exposição à luz ultravioleta, forma o produto piridina (RAGNO et al., 2002). Os produtos formados não foram, no entanto, isolados e identificados.

Na oxidação química com H₂O₂ 30%, por 24 horas, a porcentagem de degradação foi de 12,8% sem, no entanto, surgimento de picos referentes a produtos formados, nas condições estabelecidas. A SQR permaneceu com pureza adequada de 99,96% e sem variação significativa no tempo de retenção.

Como pode ser observado nos cromatogramas obtidos no estudo de degradação por estresse os picos dos produtos formados encontram-se resolvidos em relação ao besilato de anlodipino. Utilizando o detector de diodos, pode-se verificar que a SQR permaneceu com elevada pureza em todas determinações. Sugere-se que o método possui especificidade, podendo ser indicativo da estabilidade.

Na avaliação da linearidade os resultados obtidos demonstram que as soluções de besilato de anlodipino SQR apresentaram correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações, nos intervalos utilizados (Tabela 3). Gráficos de concentração *versus* área absoluta foram plotados e mostraram linearidade adequada na faixa de 10,0 a 30,0 µg/mL (Figura 12). A equação da reta para o método foi: $y = 37265 x + 7758$, com coeficiente de correlação de 0,9999. A análise de variância (ANOVA) efetuada sobre os valores de áreas absolutas das curvas de calibração de besilato de anlodipino, cujos elementos estão determinados na Tabela 4, demonstra que a regressão linear é significativa, não havendo

desvio da linearidade ($P < 0,05$), comprovando a validade do método em relação à linearidade. Para fins de quantificação a faixa de variação pode variar de 80 a 120% da concentração de trabalho. A faixa utilizada no presente estudo foi de 50 a 150% da concentração de trabalho.

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). O valor experimental obtido para a determinação do besilato de anlodipino nas amostras analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, foi de 97,64% para comprimidos e 98,26% para cápsulas. Nas análises realizadas no segundo dia obteve-se 98,55% para comprimidos e 97,93% para cápsulas e, nas análises realizadas por diferente analista e equipamento, obtiveram-se valores de 98,47% e 98,46% para comprimidos e cápsulas, respectivamente (Tabelas 6 e 8). Os coeficientes de variação obtidos ($< 2\%$) confirmam a adequada precisão do método analítico. A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as diferentes análises realizadas na avaliação da precisão do método (Tabelas 7 e 9).

Na avaliação dos resultados obtidos no teste de robustez verificou-se que, em todas as análises realizadas, os coeficientes de variação obtidos entre o teor médio das amostras para o método analítico (comprimido = 97,64%; cápsula = 98,26%) e os teores obtidos na avaliação da robustez foram inferiores a 1%, exceto quando se realizou as análises em 230 nm, onde para ambas as formas farmacêuticas verificou-se CV% superior a 2% e, além do mais, não tiveram repetibilidade, como podemos perceber nos valores da Tabela 10.

A percentagem de recuperação média obtida foi de 99,81% para comprimidos e 100,11% para cápsulas, demonstrando boa exatidão do método, uma vez que ficaram dentro dos limites de 95 – 105%, conforme representado na Tabela 11.

A sensibilidade do método cromatográfico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de AND no sistema empregado. Os valores obtidos para o LD e LQ foram de acordo com o calculado, no valor de 0,3 e 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicando boa sensibilidade com valores reduzidos.

O método proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para o controle de qualidade do AND.

4.6 Espectrofotometria no ultravioleta

As condições experimentais desenvolvidas para análise do besilato de anlodipino, através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta, encontram-se estabelecidas na Tabela 12.

Tabela 12 – Condições experimentais utilizadas para execução do método por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Características	Descrição
Diluentes	A = 1% de HCl 0,1N em metanol (V/V) B = água destilada
Cubeta	Quartzo com 1 cm de percurso ótico
Comprimento de onda	238 nm (máxima absorção)

4.6.1 Validação do método analítico

A validação foi conduzida de acordo com ICH (1996) e USP 28 (2004). Os parâmetros de validação utilizados foram: linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), especificidade, exatidão e limite de detecção e quantificação.

4.6.1.1 Construção da curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi obtida com o objetivo de estabelecer a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região do ultravioleta apresenta linearidade. Pesou-se, analiticamente, 10 mg de SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, com o auxílio de 50 mL de diluente A. A solução foi submetida a ultra-som por 15 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se, obtendo-se solução com concentração de 100 µg/mL. A partir desta foram preparadas soluções, as quais foram diluídas água destilada, obtendo-se a curva com 21 pontos, com concentrações variando de 1,0 a 40 µg/mL de SQR. Procedeu-se a leitura da transmitância em 238 nm, usando como

branco água destilada com 10% (V/V) do diluente A. A curva de Ringbom foi obtida plotando-se os valores de $100 - \%T$ versus concentração em escala logarítmica.

4.6.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através de cinco níveis de concentração, levando em consideração a curva de Ringbom.

Para obtenção da curva de calibração pesou-se, analiticamente, 10 mg de SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com diluente A, obtendo-se a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. A partir desta solução, com auxílio de bureta, foram transferidas alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com água destilada, obtendo-se soluções com concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g/mL}$. O branco foi composto de água destilada com 20% (V/V) do diluente A. As leituras foram efetuadas a 238 nm. As curvas foram preparadas em três dias diferentes.

4.6.1.3 Precisão

- Preparo da SQR

Preparou-se a solução da SQR contendo 20 $\mu\text{g/mL}$ conforme descrito no item 4.6.1.2.

- Preparo das amostras

Foi determinado o peso médio de 20 comprimidos e o peso do conteúdo de 20 cápsulas, conforme a Farmacopéia Brasileira IV Edição (1998). Os comprimidos foram triturados até a formação de um pó homogêneo. Os conteúdos das cápsulas foram misturados. Pesaram-se, dos pós, quantidades equivalentes a 5,0 mg de besilato de anlodipino de comprimidos e cápsulas, que foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL, com o auxílio de 30 mL de diluente A. As soluções foram submetidas a ultra-som por 15 minutos. Completaram-se os volume com o mesmo diluente, homogeneizou-se e as soluções obtidas

foram submetidas à centrifugação (3.000 r.p.m.) durante 10 minutos. Transferiram-se 2 mL do sobrenadante para balões volumétricos de 10 mL e completaram-se os volumes com água destilada, obtendo-se soluções com concentração de 20,0 µg/mL. Foram realizadas determinações no mesmo dia (n=6), em diferentes dias (n=3) e com diferente equipamento e analista (n=3), tanto para as amostras de comprimidos, como para cápsulas. O branco foi composto de água destilada com 20% (V/V) do diluente A.

- Cálculos

A concentração de besilato de anlodipino nas amostras foi obtida através da equação abaixo:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

C_A = Concentração de besilato de anlodipino na amostra

A_A = Absorvância absoluta da amostra

C_{SQR} = Concentração da SQR

A_{SQR} = Absorvância absoluta da SQR

O valor percentual de besilato de anlodipino nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Onde:

$C_A\%$ = Concentração da amostra em percentagem

C_A = Concentração de besilato de anlodipino encontrada na amostra

C_T = Concentração de besilato de anlodipino teórica na amostra

4.6.1.4 Especificidade

Avaliou-se a possível interferência dos excipientes na determinação do besilato de anlodipino. Soluções de amostras simuladas dos excipientes contidos nas cápsulas e comprimidos foram elaboradas em diluições equivalentes à SQR. As soluções foram comparadas quanto ao perfil dos espectros obtidos.

4.6.1.5 Exatidão (Teste de Recuperação)

Pesou-se, do pó preparado no item 4.6.1.3, quantidade equivalente a 8,0 mg de besilato de anlodipino e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, com o auxílio de 30 mL de Diluente A. A solução foi submetida a ultra-som por 15 minutos. Completou-se o volume com o mesmo diluente, homogeneizou-se e centrifugou-se (3.000 r.p.m.) durante 10 minutos. Foram transferidas alíquotas de 1,0 mL do sobrenadante para balões volumétricos de 10 mL, denominados R₁, R₂ e R₃. A cada balão volumétrico acrescentou-se, respectivamente, 1,0; 2,0 e 3,0 mL da solução metanólica de SQR contendo 20,0 µg/mL de besilato de anlodipino e completou-se o volume com água destilada. Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 18,0; 20,0 e 22,0 µg/mL de besilato de anlodipino. Foram preparadas, simultaneamente, soluções de amostra e substância química de referência na concentração de 16,0 µg/mL de besilato de anlodipino, denominadas de A e SQR, respectivamente, conforme Tabela 13. O branco foi composto de água destilada com 20% (V/V) do diluente A.

Tabela 13 – Preparo das soluções para o teste de recuperação de besilato de anlodipino, nas amostras de comprimidos e cápsulas, utilizando espectrofotometria no ultravioleta.

Balão volumétrico de 10 mL	Volume (mL) da solução amostra (160,0 µg/mL)	Volume (mL) da solução de SQR (20,0 µg/mL)	Concentração final (µg/mL)
A	1,0	-	16,0
R ₁	1,0	1,0	18,0
R ₂	1,0	2,0	20,0
R ₃	1,0	3,0	22,0
SQR	-	8,0	16,0

- Cálculo para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação (R%) foram calculadas pela expressão:

$$R\% = [(C_A - C_{NA}) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Onde:

C_A = concentração de besilato de anlodipino encontrada na amostra adicionada de SQR

C_{NA} = concentração de besilato de anlodipino encontrada na amostra não adicionada de SQR

C_{SQR} = concentração da SQR adicionada à amostra

4.6.1.6 Limite de quantificação e Limite de detecção

Os LQ e LD foram calculados a partir das fórmulas descritas no ICH (1996), baseadas no desvio padrão do intercepto (σ) e na inclinação da curva de calibração (IC). Os LQ e LD teóricos, calculados segundo as equações a seguir:

$LQ = \frac{10\sigma}{IC}$	$LD = \frac{3,3\sigma}{IC}$
----------------------------	-----------------------------

4.6.2 Resultados

A curva de Ringbom foi obtida após conversão dos valores de transmitância encontrados para um intervalo de concentração de 1,0 a 40 $\mu\text{g/mL}$ e está ilustrada na Figura 13.

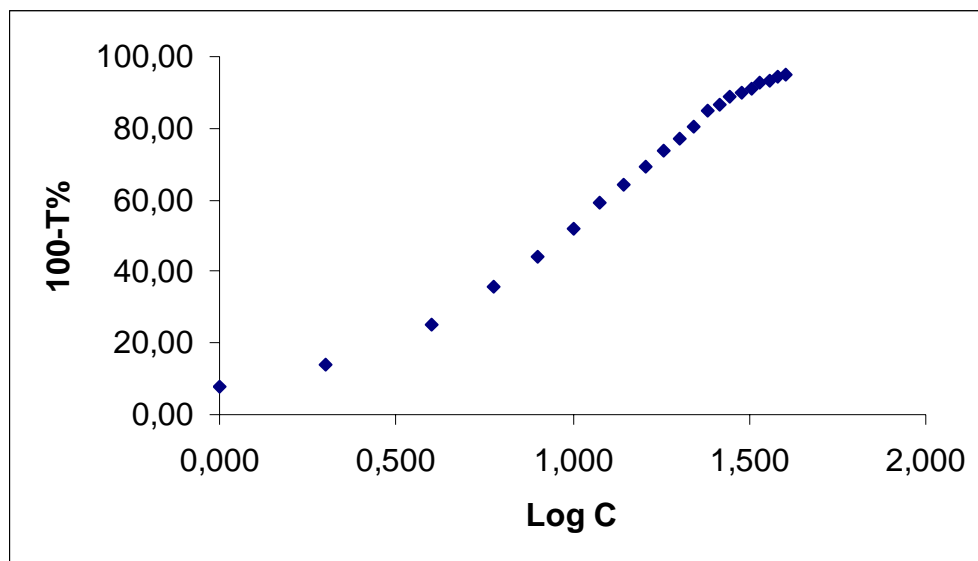


Figura 13 – Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico no ultravioleta para o besilato de anlodipino em água a 238 nm.

As absorvâncias médias correspondentes ao besilato de anlodipino, obtidas na curva de calibração, relativas a cada diluição da SQR, encontram-se na Tabela 14. O coeficiente de variação percentual médio das absorvâncias obtidas foi de 1,11%.

Tabela 14 – Valores de absorvâncias obtidas na determinação da curva de calibração do besilato de anlodipino por espectrofotometria no ultravioleta.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias			Média	CV%
	1º dia	2º dia	3º dia		
10	0,291	0,293	0,294	0,293	0,52
15	0,457	0,456	0,466	0,460	1,20
20	0,616	0,605	0,628	0,616	1,87
25	0,770	0,785	0,762	0,772	1,51
30	0,938	0,939	0,931	0,936	0,47

CV% = coeficiente de variação percentual

A representação da curva de calibração encontra-se na Figura 14.

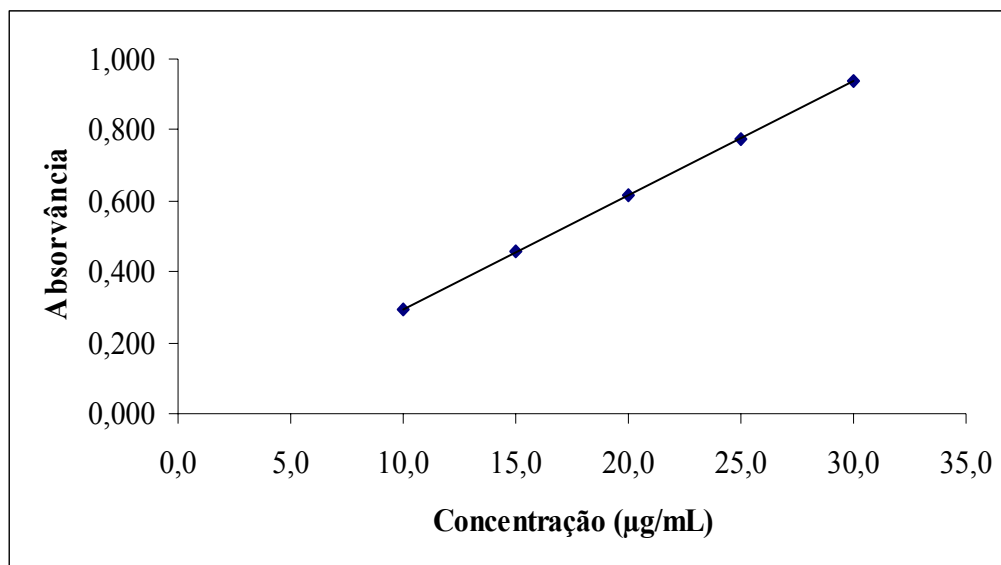


Figura 14 – Representação gráfica da curva de calibração do besilato de anlodipino obtida através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

As Tabelas 15 e 16 apresentam os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva de calibração, através de análise de variância.

Tabela 15 – Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método espectrofotométrico no ultravioleta.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	10 – 30 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0321x - 0,0243$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,032 \pm 0,0006$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$- 0,0243 \pm 0,014$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999

Tabela 16 – Análise de variância das absorvâncias obtidas na curva de calibração do besilato de anlodipino por espectrofotometria no ultravioleta.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	4	0,7675	0,1919	2.994 (3,48)
- regressão linear	1	0,7674	0,7674	11.977 (4,96)
- desvio da linearidade	3	0,0001	0,00004	0,57 (3,71)
Resíduo	10	0,00064	0,00006	
Total	14	0,77		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos de comprimidos e cápsulas de besilato de anlodipino, referentes à precisão do método, encontram-se nas Tabelas 17 e 19, respectivamente.

Tabela 17 – Valores experimentais referentes a determinação de besilato de anlodipino em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostras	Teor em besilato de anlodipino					
	Primeiro dia		Segundo dia		Diferente analista e equipamento	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	6,73	97,58	6,87	99,64	6,82	98,86
2	6,92	100,27	6,91	100,13	6,93	100,46
3	6,76	97,91	6,97	101,09	6,78	98,23
4	6,86	99,36				
5	6,71	97,25				
6	6,76	98,06				
Média	6,79	98,41	6,92	100,29	6,84	99,18
CV%	1,18		0,72		1,16	

A Tabela 18 apresenta os resultados do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a precisão em comprimidos, através de análise de variância.

Tabela 18 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	7,13	3,57	3,06 (4,26)
Resíduo	9	10,50	1,17	
Total	11	17,63		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P = 0,05$.

Tabela 19 – Valores experimentais referentes à determinação de besilato de anlodipino em cápsulas através da espectrofotometria no ultravioleta.

Amostras	Teor em besilato de anlodipino					
	Primeiro dia		Segundo dia		Diferente analista e equipamento	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	6,87	99,63	6,68	96,82	6,82	98,80
2	6,70	97,07	6,95	100,73	6,79	98,40
3	6,65	96,46	6,79	98,46	6,83	99,03
4	7,02	101,75				
5	6,84	99,17				
6	6,84	99,15				
Média	6,82	98,87	6,81	98,67	6,81	98,74
CV%	1,93		1,99		0,32	

A Tabela 20 apresenta os resultados do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a precisão em cápsulas, através de análise de variância.

Tabela 20 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em cápsulas por espectrofotometria no ultravioleta.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	0,089	0,04	0,02 (4,26)
Resíduo	9	26,002	2,89	
Total	11	26,091		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P = 0,05$.

A Figura 15 apresenta os espectros obtidos no estudo da interferência dos excipientes no método proposto.

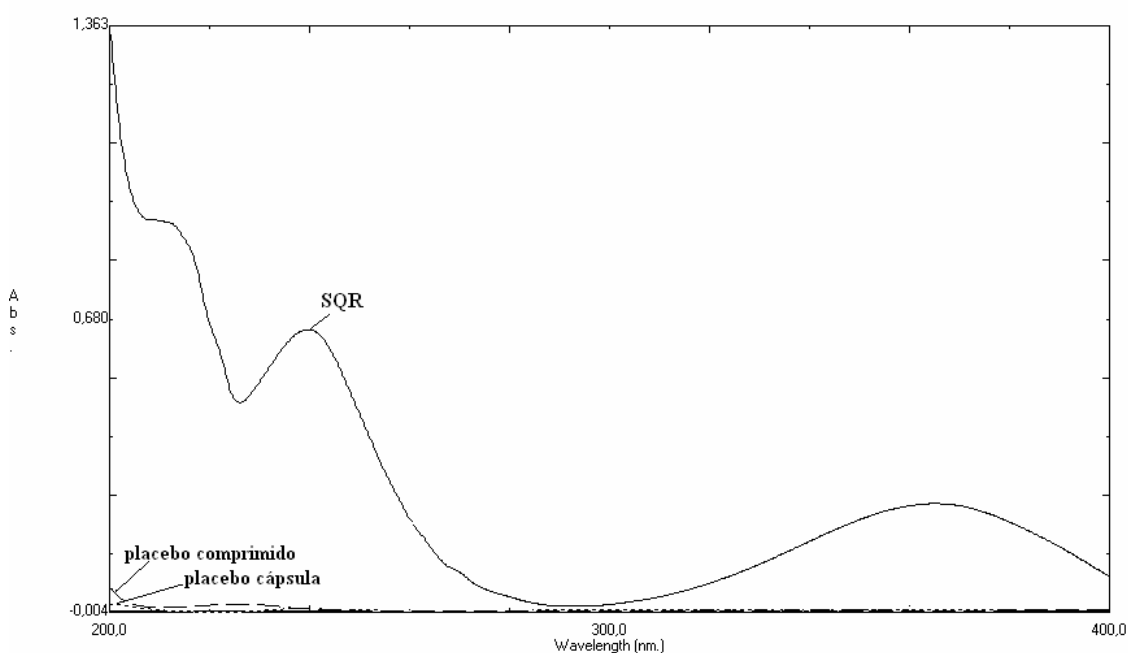


Figura 15 – Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria no ultravioleta das soluções de SQR e amostra simulada de excipientes obtidos em água (com 20% de uma solução 1% de HCl 0,1N em metanol (V/V)), na concentração teórica de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos no teste de recuperação de besilato de anlodipino, através do método por espectrofotometria no ultravioleta, estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado em amostras de comprimidos e cápsulas de besilato de anlodipino por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostras	Quantidade de SQR ($\mu\text{g/mL}$)		% de Recuperação	% de Recuperação Média
	Adicionada	Recuperada		
Comprimidos	2,00	2,05	102,5	100,73
	4,00	4,01	100,2	
	6,00	5,97	99,5	
Cápsulas	2,00	2,03	101,6	100,30
	4,00	3,99	99,7	
	6,00	5,98	99,6	

Na análise do limite de quantificação, que foi calculado através da equação descrita no item 4.6.1.6, o valor teórico encontrado foi de $4,4 \mu\text{g/mL}$. Para o limite de detecção o valor teórico encontrado foi de $1,4 \mu\text{g/mL}$.

4.6.3 Discussão

Devido a sua facilidade, rapidez e um custo relativamente baixo a espectrofotometria na região do ultravioleta tem se mostrado um método amplamente utilizado para a quantificação de fármacos (CLURCZAK, 1998).

Existem alguns métodos propostos na literatura científica para determinação de besilato de anlodipino em comprimidos envolvendo a espectrofotometria no visível, mas a maioria necessita de extração ou utiliza solventes com toxicidade elevada. Não foi encontrado método para análise desse fármaco por espectrofotometria no ultravioleta tanto para comprimidos como para cápsulas.

Muitos solventes estão disponíveis para análise na região do ultravioleta e a escolha do mesmo deve ser baseada na solubilidade da substância a ser analisada. Inicialmente, avaliou-se o emprego de etanol e metanol como solvente. Os resultados indicaram, no entanto, haver uma possível interferência dos excipientes das formulações avaliadas.

Para identificação de AND por espectrofotometria no ultravioleta em matéria-prima, a Farmacopéia Britânica (2003) indica a utilização de 1% de HCl 0,1N em metanol (V/V). Em virtude desse uso utilizou-se esse solvente para realizar a extração do fármaco das formas farmacêuticas. Com o intuito de reduzir custos e diminuir o uso de solvente orgânico realizou-se a primeira diluição com o referido solvente e a segunda diluição com água destilada, para obter a concentração final desejada.

Não foram observadas influências devido aos excipientes, solventes ou outras impurezas nas condições otimizadas, o que pode ser verificado nos espectros obtidos com a SQR e as respectivas amostras simuladas das cápsulas e comprimidos, apresentados na Figura 15, demonstrando a especificidade do método.

A intensidade de uma banda de absorção no ultravioleta é usualmente expressa como absorvidade molar a uma absorção máxima, ϵ máximo ou $\log \epsilon$ máximo. A absorvidade molar aparente calculada para o besilato de anlodipino em água a 238 nm foi $17.412 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Foi empregada a curva de Ringbom para verificar o intervalo ótimo de concentração para qual o método pode ser utilizado. Observou-se, através dessa, que houve linearidade na faixa de 10 a 30 $\mu\text{g/mL}$, conforme apresentado na Figura 13.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstram que as soluções de besilato de anlodipino SQR apresentaram correlação linear entre as absorvâncias e as concentrações, nos intervalos utilizados. Gráficos de concentração *versus* absorvância foram plotados e mostraram linearidade adequada na faixa de 10,0 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$ (Figura e Tabela 14). A equação da reta para o método foi: $y = 0,032x - 0,0243$, com coeficiente de correlação de 0,9999. A análise de variância (ANOVA) efetuada sobre os valores de absorvâncias das curvas de calibração de besilato de anlodipino, cujos elementos estão determinados na Tabela 15, demonstra que a regressão linear é significativa, não havendo desvio da linearidade ($P = 0,05$). Os resultados comprovaram a validade do método em relação à linearidade.

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). O valor experimental obtido para a determinação do besilato de anlodipino nas amostras analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, foi de 98,41% para comprimidos e 98,87% para cápsulas. Nas análises realizadas no segundo dia obteve-se 100,29% para comprimidos e 98,67% para cápsulas e nas análises realizadas por diferente analista e equipamento obtiveram-se valores de 99,18% e 98,74% para comprimidos e cápsulas, respectivamente (Tabelas 17 e 19). Os coeficientes de variação obtidos ($< 2\%$)

confirmam a adequada precisão do método analítico. A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as diferentes análises realizadas na avaliação da precisão do método (Tabelas 18 e 20).

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação. A percentagem de recuperação média obtida foi de 100,73% para comprimidos e 100,30% para cápsulas, demonstrando boa exatidão do método, uma vez que ficaram dentro dos limites de 95 – 105%, como representado na Tabela 21.

A sensibilidade do método cromatográfico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de AND no sistema empregado. Os valores obtidos para o LD e LQ foram de acordo com o calculado, no valor de 1,4 e 4,4 µg/mL, respectivamente, indicando boa sensibilidade com valores reduzidos.

O método proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para o controle de qualidade do AND.

4.7 Comparação dos métodos propostos

Os resultados obtidos com os métodos por cromatografia líquida e por espectrofotometria no ultravioleta foram comparados estatisticamente por ANOVA e estão apresentados nas Tabelas 22 e 23, para comprimidos e cápsulas, respectivamente.

Tabela 22 - Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre métodos	1	1,809	1,809	1,79 (4,30)
Resíduo	10	10,08	1,008	
Total	11	11,89		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P = 0,05$.

Tabela 23 - Análise de variância dos teores obtidos na determinação de besilato de anlodipino em cápsulas por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre métodos	1	1,116	1,116	0,59 (4,30)
Resíduo	10	19,076	1,908	
Total	11	20,192		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P = 0,05$.

Observa-se nas tabelas anteriores que a análise estatística por ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre os teores obtidos com os diferentes métodos ($P = 0,05$), tanto para cápsulas como para comprimidos.

Em virtude dos resultados obtidos neste capítulo pode-se dizer que ambos os métodos são adequados para a análise de rotina em controle de qualidade de besilato de anlodipino em comprimidos e cápsulas, pois são métodos rápidos de fácil execução e cumprem com os requisitos de validação.

Os métodos podem ser utilizados para determinação quantitativa, teste de uniformidade de conteúdo e como técnicas de identificação de AND nas formas farmacêuticas estudadas.

5. CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA CÁPSULA E COMPRIMIDO

5.1 Introdução

5.1.1 Ensaio de dissolução

O ensaio de dissolução é uma das ferramentas mais adequadas para se verificar o desempenho de um fármaco, sob a forma sólida, no que se refere à sua liberação a partir da forma farmacêutica (PITA et al., 2004). A dissolução pode ser resumidamente definida como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica, tornando-se disponível para ser absorvido pelo organismo. Alguns autores definem como taxa de dissolução, onde a quantidade de um fármaco, a partir de um estado sólido, passa para solução, por unidade de tempo, sob interface líquido/sólido, com temperatura e composição do solvente padronizados (CHOWDARY & RAJYALAKSHMI, 1987; MARCOLONGO, 2003).

O teste de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais tem se mostrado uma ferramenta importante, pois fornece informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento, como na produção e controle de qualidade. No desenvolvimento farmacotécnico permite a avaliação de novas formulações, permite verificar a estabilidade e possibilita possível correlação *in vitro* – *in vivo*. Durante a fase de produção e controle de qualidade permite detectar desvios de fabricação, uniformidade do produto e reprodutibilidade lote a lote (MARQUES, 2002).

Desse modo, os estudos de dissolução *in vitro* constituem um dos instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações.

Para fármacos que não possuem monografia oficial, existe necessidade de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos (MANADA et al., 2002). A avaliação do perfil de dissolução do fármaco (percentagem de fármaco dissolvido *versus* tempo) em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos testes de dissolução.

Muitas são as variáveis que podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução fazendo com que sua análise seja complexa (MARCOLONGO, 2003). Dentre essas variáveis citam-se:

- relacionadas com fármaco e formulação: solubilidade, tamanho de partícula, natureza química, forma farmacêutica, excipientes e tecnologia de fabricação.

- relacionadas com o equipamento: aparato utilizado, geometria do sistema, velocidade do sistema, vibração do sistema, posição da haste, posição e método de amostragem e dispositivo para formas farmacêuticas que flutuam.

- relacionadas com o meio de dissolução: volume, presença de ar/gases, presença de bolhas de ar, pH, evaporação do meio, temperatura, viscosidade, força iônica/pressão osmótica e tensoativos.

- relacionadas com o meio ambiente: condições de estocagem.

- relacionadas com o método analítico: método de filtração e método analítico.

Para dar credibilidade aos resultados no desenvolvimento de um teste deve-se fazer uma seleção criteriosa das condições do ensaio no sentido de obter o máximo de poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos (MANADA et al., 2002).

Alguns requisitos devem ser avaliados antes da validação propriamente dita do método, pois contribuem para a adequabilidade do mesmo, tais como: utilização de equipamento calibrado, condições *sink*, influência do filtro e estabilidade da solução amostra. Nenhum dos objetivos dos ensaios de dissolução será devidamente alcançado se o teste não for confiável e apresentar, no mínimo, especificidade, linearidade, precisão, exatidão e repetibilidade dos resultados. O conhecimento dos fatores que afetam a dissolução e seu controle favorece a obtenção de resultados reprodutíveis (MARCOLONGO, 2003).

A definição do termo *sink* pode variar de acordo com a fonte bibliográfica. Pode ser definido como não menos que três vezes o volume de meio necessário para obter a solução saturada do fármaco dentro de uma faixa de 500 – 1000 mL. Entretanto, atualmente, aceita-se que um volume de 5 a 10 vezes o necessário para saturação seja suficiente para manter as condições *sink*. Isto deve ser mantido para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste. Também, devido às condições *sink* obtidas naturalmente *in vivo*, os estudos para determinar as taxas de dissolução *in vitro* devem ser conduzidos obedecendo a esse parâmetro (MARQUES, 2002; MARCOLONGO, 2003). O besilato de anlodipino possui alta solubilidade (KASIM et

al., 2004), o que confere a condição *sink* para o teste realizado em produtos contendo 6,9 mg de fármaco, utilizando 500 mL de ácido clorídrico 0,01N como meio de dissolução.

Com o intuito de realizar a validação de ensaios de dissolução para as formas farmacêuticas de cápsulas e comprimidos contendo besilato de anlodipino, buscaram-se na literatura guias contendo diretrizes de validação a serem seguidas. Foram utilizados, então, MARQUES (2002), MARCOLONGO (2003) e USP 28 (2004).

5.1.2 Comparação de perfis de dissolução

Para comparação de produtos de diferentes fabricantes ou quando ocorre uma modificação considerável na formulação recomenda-se a comparação dos perfis de dissolução, obtidos em condições idênticas, entre um produto referência e um produto teste, ou entre a formulação alterada e a original (BRASIL, 2003e).

O perfil de dissolução também pode ser utilizado para comparar um lote de medicamento referência com um lote teste, visto que, como mencionado anteriormente, o estudo *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo*. Estudos comparativos de perfis de dissolução têm sido utilizados como um dos critérios para se isentar a exigência de realização de estudos de bioequivalência para dosagens menores de um determinado medicamento, com várias dosagens, mesma forma farmacêutica e formulações proporcionais, fabricados pelo mesmo produtor, no mesmo local de fabricação (BRASIL, 2003e).

O grande problema em relação a essa comparação é como quantificar o grau em que duas curvas são ou não semelhantes (MARCOLONGO, 2003).

Segundo a ANVISA, o método modelo independente simples, que avalia a comparação da curva como um todo, pode ser utilizado como parâmetro estatístico para analisar a semelhança entre perfis. Outros métodos estatísticos modelos independentes e dependentes podem ser empregados, tais como, testes de razão, análise de variância, ordem zero, primeira ordem, quadráticos, entre outros. Dentre todos estes métodos propostos pela literatura os fatores f_1 e f_2 são os de mais fácil aplicação e interpretação, razões pelas quais levam os órgãos regulatórios, como FDA, ANVISA, e EMEA a adotá-los (COSTA, 2001). O método modelo independente simples emprega um fator de diferença (f_1) e um fator de semelhança (f_2) para comparar perfis de dissolução, onde o fator f_1 calcula a porcentagem de diferença entre os dois perfis avaliados a cada tempo de coleta e corresponde a uma medida do erro relativo entre os perfis:

$$f_1 = \{[\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)] / [\sum_{t=1}^n R_t]\} \times 100$$

onde:

n = número de tempos de coleta;

R_t = valor de porcentagem dissolvida no tempo t , obtido com o medicamento de referência ou com a formulação original (antes da alteração);

T_t = valor de porcentagem dissolvida do produto teste ou da formulação alterada, no tempo t .

O fator f_2 corresponde a uma medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas de ambos os perfis:

$$f_2 = 50 \log \{[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0,5} \times 100\}$$

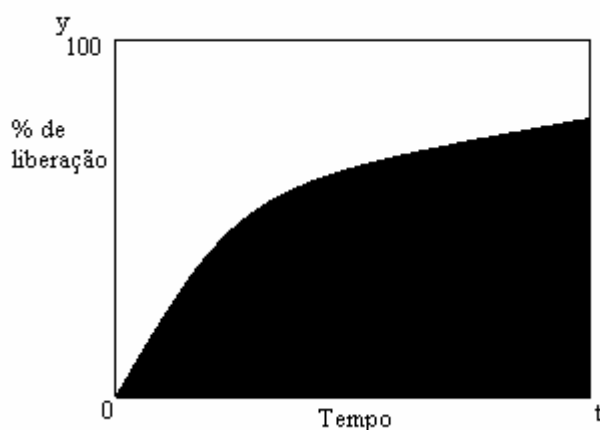
O critério para que os dois perfis sejam considerados semelhantes são: $f_1 = 0$ a 15 e $f_2 = 50$ a 100 .

Para aplicar esse modelo deve-se considerar:

- avaliar doze unidades;
- empregar no mínimo cinco pontos de coleta;
- incluir apenas um ponto acima de 85% de dissolução para ambos os produtos;
- para permitir o uso de médias, os coeficientes de variação para os primeiros pontos (15 minutos, por exemplo) não devem exceder 20%. Para os demais pontos considera-se o máximo de 10%;

Nos casos em que a dissolução for muito rápida, apresentando valor igual ou superior a 85% de fármaco dissolvido em 15 minutos, os fatores f_1 e f_2 perdem o seu poder discriminatório e, portanto, não é necessário calculá-los (BRASIL, 2003e).

Outra forma útil para fazer a comparação é utilizar o parâmetro eficiência de dissolução. Esta pode ser definida como área sob a curva de dissolução até um tempo t , expressa como porcentagem da área do retângulo que corresponderia a 100% de dissolução no mesmo tempo ou o necessário (Figura 16).



$$ED\% = \frac{\text{Área sob a curva (ASC)}}{\text{Área retângulo } y_{100}} \times 100$$

Figura 16 – Eficiência de dissolução (ED) (KHAN, 1975).

Para realizar comparações é necessário estabelecer previamente o intervalo e aplicá-lo a todas as formulações testadas. O conceito de eficiência de dissolução apresenta algumas vantagens, tais como, a plotagem dos dados em um único gráfico, permitindo que se faça uma rápida comparação entre um grande número de formulações e a correlação com dados *in vivo* (KHAN, 1975; MARCOLONGO, 2003).

A comparação do perfil de dissolução de algumas especialidades farmacêuticas contendo AND, comercializadas no mercado nacional, foram realizadas. Os resultados dessa comparação estão apresentados, no entanto, no Capítulo IV, referente ao estudo de equivalência farmacêutica.

5.2 Produtos farmacêuticos

Foram utilizados os mesmos produtos descritos no Capítulo II item 4.2.

5.3 Solventes e reagentes

- Acetonitrila, Tedia[®]
- Ácido clorídrico fumegante, Tedia[®]
- Ácido orto-fosfórico 85%, Merck[®]

- Água destilada
- Água purificada
- Etanol, Tedia[®]
- Fosfato de potássio, Tedia[®]
- Gás hélio, White Martins[®]
- Hidróxido de sódio 1N, Merck[®]
- Metanol, Tedia[®]
- Trietilamina, Merck[®]

5.4 Equipamentos e acessórios

- Aparelho para teste de dissolução, Pharma Test[®]
- Balança analítica, Sartorius[®]
- Banho de ultra-som, Thornton[®]
- Bomba de vácuo, Primar[®]
- Centrífuga, Jouan[®]
- Coluna cromatográfica de fase reversa octadesilcilano Luna[®] (250 mm x 4,6 mm d.i.) 4 μ m, Phenomenex[®]
- Cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com controlador SCL-10 AD_{vp}, com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 AD_{vp}, injetor automático com “loop” variável SIL-10 AD_{vp} e integrador automático computadorizado através do software CLASS VP 5.0[®].
- Destilador, Biomatic[®]
- Espectrofotômetro UV-VIS, Shimadzu[®]
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 μ m, 47 mm, Sartorius[®]
- Membrana filtrante de acetato de celulose, porosidade 0,45 μ m, 13 mm, Sartorius[®]
- Filtro quantitativo faixa preta, Schleicher & Schuell[®]
- Kit para filtração, Millipore[®]
- Pipetador Transferpette, Brand[®]

- Potenciômetro, Fieldlab Schott®
- Termômetro de imersão, Incoterm®

5.5 Desenvolvimento do método para o teste de dissolução

Com o intuito de determinar a dissolução do besilato de anlodipino foi desenvolvido e otimizado método em equipamento de dissolução Pharma Test, equipado com seis cubas. Utilizou-se perfil de dissolução realizado com doze cubas (doze unidades de cada forma farmacêutica), para as duas especialidades farmacêuticas em estudo. Foram testadas diversas condições de dissolução, de acordo com o método geral da USP 28 (2004), variando-se o meio utilizado (500 mL de tampão fosfato pH 6,8, ácido clorídrico 0,1N e 0,01N, desgaseificados), o equipamento (aparato 1 – cesta ou aparato 2 – pá) e a velocidade de rotação (50 e 75 rpm). A temperatura foi mantida a $37,0 \pm 0,5$ °C. Essas condições estão indicadas na Tabela 24.

Tabela 24 – Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos e cápsulas contendo besilato de anlodipino.

Condição	Aparato	Meio (500 mL)	Velocidade (rpm)
I	1 (cesta)	HCl 0,1N	50
II	2 (pá)	HCl 0,1N	50
III	1 (cesta)	HCl 0,1N	75
IV	2 (pá)	HCl 0,1N	75
V	1 (cesta)	Tampão fosfato pH 6,8	50
VI	2 (pá)	Tampão fosfato pH 6,8	50
VII	1 (cesta)	Tampão fosfato pH 6,8	75
VIII	2 (pá)	Tampão fosfato pH 6,8	75
IX	1 (cesta)	HCl 0,01N	50
X	2 (pá)	HCl 0,01N	50
XI	1 (cesta)	HCl 0,01N	75
XII	2 (pá)	HCl 0,01N	75

As coletas de 5 mL de meio foram realizadas manualmente, nos tempos de 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos, efetuando-se reposição do mesmo volume de meio a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A porcentagem dissolvida do fármaco foi determinada, sem posterior diluição, por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida, após filtração das amostras através de filtro quantitativo e membrana de acetato de celulose com poro de $0,45\mu\text{m}$.

Nos cálculos da porcentagem dissolvida levou-se em consideração o teor do fármaco, as concentrações nas alíquotas retiradas e devidas correções referentes às retiradas de fármaco e reposições de meio em cada tempo.

5.6 Avaliação da influência do filtro

A filtração do meio de dissolução antes da quantificação é necessária, pois é responsável pela eliminação de interferentes como excipientes insolúveis e partículas não dissolvidas. Para essa avaliação foram preparadas soluções de SQR e amostra no meio de dissolução, comparando-se a concentração de AND antes e após a filtração, utilizando a espectrofotometria no ultravioleta. A variação máxima adotada foi de $\pm 2\%$ (intervalo de 98 – 102%) para a SQR e para as amostras de cápsulas e comprimidos (MARQUES, 2002).

- **Avaliação da SQR**

Pesou-se 13,8 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de 1 mL de metanol. Solubilizou-se e acrescentou-se 50 mL de ácido clorídrico 0,01N. Completou-se o volume com ácido clorídrico 0,01N e homogeneizou-se. Transferiu-se alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,01N, obtendo-se solução com concentração final de $13,8\ \mu\text{g/mL}$.

Realizou-se leitura da absorvância da solução da SQR, a qual foi utilizada como referência. Filtrou-se essa solução em papel filtro quantitativo e realizou-se nova leitura de absorvância. A mesma solução foi novamente filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de $0,45\mu\text{m}$, e sua absorvância foi avaliada.

- Avaliação das amostras

Realizou-se o teste, para cápsulas e comprimidos, com amostra simulada de excipiente acrescida de 6,9 mg de SQR, utilizando 500 ml de ácido clorídrico 0,01N a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Dissolveu-se por 30 minutos a 50 rpm com aparato 1 para cápsulas e 2 para comprimidos. Alíquotas de 10 mL de cada cuba foram retiradas e filtradas em papel filtro quantitativo, com descarte dos primeiros mililitros, e quantificadas. Após, essas mesmas alíquotas foram filtradas em membrana de acetato de celulose com poro de $0,45\mu\text{m}$ e quantificadas novamente.

5.7 Avaliação da estabilidade de soluções da SQR e amostras no meio de dissolução

A estabilidade das soluções no meio de dissolução foi determinada em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por um período de 24 horas e a temperatura de $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 2 horas.

- Preparo da SQR

Pesou-se 13,8 mg de besilato de anlodipino e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL com o auxílio de 2 mL de metanol. Acrescentou-se 500 mL de ácido clorídrico 0,01N e agitou-se mecanicamente por 10 minutos. O volume foi completado obtendo-se solução com concentração de $13,8 \mu\text{g/mL}$. Filtrou-se uma alíquota e avaliou-se por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

Alíquota de 100 mL dessa solução foi conservada ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 24 horas. Outra alíquota de 500 mL foi transferida para cuba de dissolução e mantida por 2 horas a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Após decorridos seus respectivos tempos foram retiradas alíquotas dessas soluções, que foram filtradas e analisadas por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

- Preparo das amostras

Foi transferida amostra simulada dos excipientes das amostras (cápsula ou comprimidos) acrescida de 6,9 mg de SQR, para balão volumétrico de 500 mL com o auxílio

de 250 mL de ácido clorídrico 0,01N. Agitou-se mecanicamente por 30 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo solução com concentração de 13,8 µg/mL, que foi analisada por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

Retirou-se alíquota de 250 mL que foi conservada ao abrigo da luz por 24 horas. O restante foi transferido para cuba do dissolutor e foi mantida por 2 horas em temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C. Após decorridos seus respectivos tempos foram retiradas alíquotas dessas soluções, que foram filtradas e analisadas por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

5.8 Validação dos métodos de análise

5.8.1 Linearidade

Pesou-se, analiticamente, 10 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, com o auxílio de 2 ml de metanol. Acrescentou-se 50 mL de ácido clorídrico 0,01N, deixou-se em agitação por 5 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se uma solução com concentração de 100 µg/mL. A partir desta foram preparadas soluções, as quais foram diluídas ácido clorídrico 0,01N, nas concentrações de 3, 5, 10, 20 e 30 µg/mL. As curvas foram preparadas em três diferentes dias e foram analisadas por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

5.8.2 Avaliação da especificidade

Foram avaliadas amostras simuladas dos excipientes de comprimidos e cápsulas, empregando as seguintes condições: 500 mL de meio ácido clorídrico 0,01N a $37 \pm 0,5$ °C, 50 rpm, aparato 1 (cápsula) e aparato 2 (comprimido) e tempo de 30 minutos. Análise utilizando a cápsulas sem conteúdo foi igualmente realizada. As amostras foram filtradas e avaliadas por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

5.8.3 Precisão

Foram avaliados seis comprimidos e cápsulas do mesmo lote, no mesmo dia e num segundo dia. Depois de decorridos 30 minutos do teste, empregando as seguintes condições: 500 mL de meio HCl 0,01N a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, 50 rpm, aparato 1 (cápsula) e aparato 2 (comprimido), a percentagem dissolvida do fármaco foi determinada por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida para comprimidos, e somente por cromatografia líquida para cápsulas. Foram calculados a média e o coeficiente de variação. Os resultados obtidos pelos métodos utilizados para avaliar a percentagem dissolvida de AND em comprimidos foram comparados estatisticamente.

5.8.4 Exatidão

A exatidão do método analítico foi avaliada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida da SQR adicionada a amostra simulada de excipientes.

Foram preparadas três amostras simuladas de excipientes de cada forma farmacêutica, as quais foram adicionados 10, 100 e 150% da quantidade declarada de SQR.

Procedeu-se a dissolução por 30 minutos, empregando as seguintes condições: 500 mL de meio HCl 0,01N a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, 50 rpm, aparato 1 (cápsula) e aparato 2 (comprimido). Foram retiradas alíquotas de 10 mL de cada cuba e filtradas. As amostras foram avaliadas por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

5.9 Resultados

Os resultados obtidos, por cromatografia líquida, para as condições I a XII propostas no desenvolvimento do método de dissolução encontram-se nas Figuras 17 a 28. Os resultados obtidos por espectrofotometria no ultravioleta para cápsulas e para comprimidos não foram apresentados, pois para cápsulas verificou-se interferência e, para comprimidos, foram semelhantes aos obtidos por cromatografia líquida.

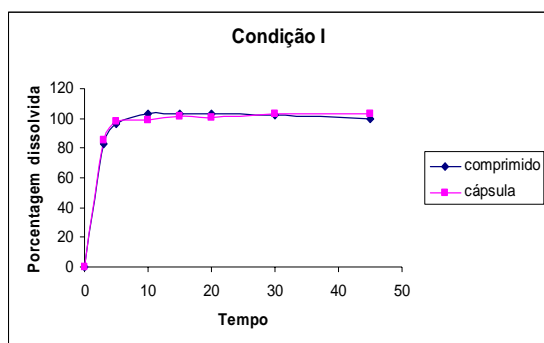


Figura 17 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio HCl 0,1N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.

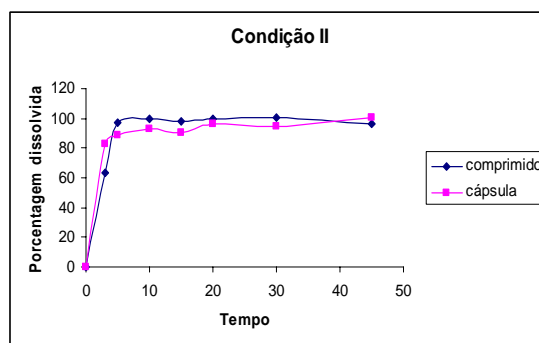


Figura 18 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio HCl 0,1N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.

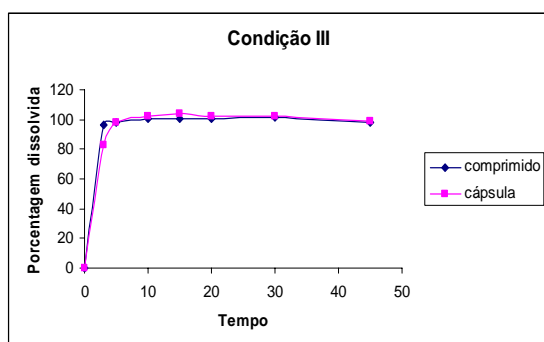


Figura 19 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio HCl 0,1N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.

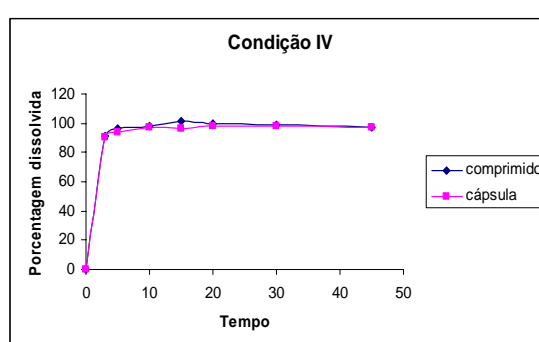


Figura 20 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio HCl 0,1N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.

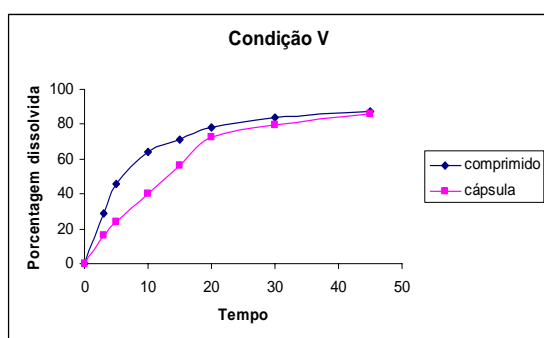


Figura 21 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio tampão fosfato pH 6,8 a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.

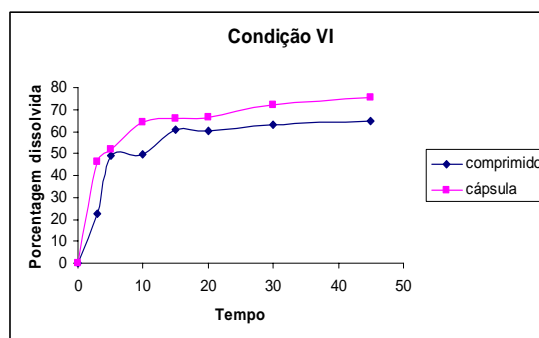


Figura 22 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio tampão fosfato pH 6,8 a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.

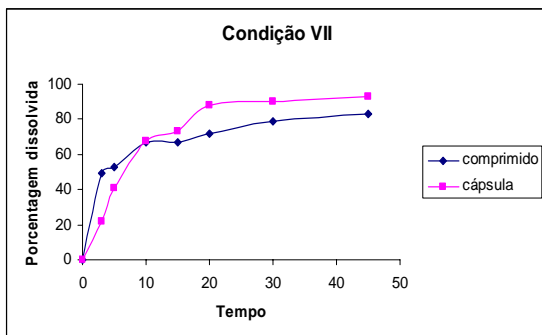


Figura 23 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio tampão fosfato pH 6,8 a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.

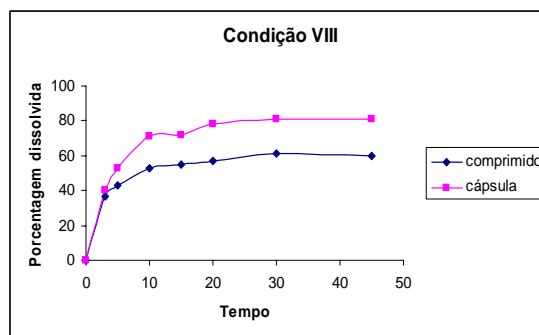


Figura 24 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio tampão fosfato pH 6,8 a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.

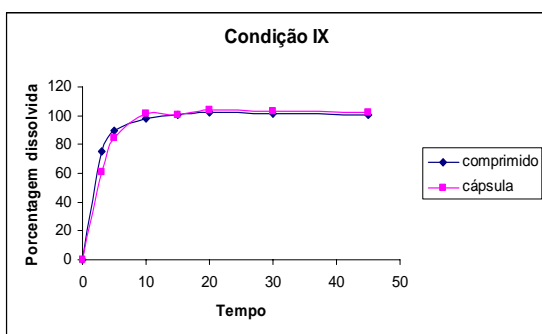


Figura 25 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.

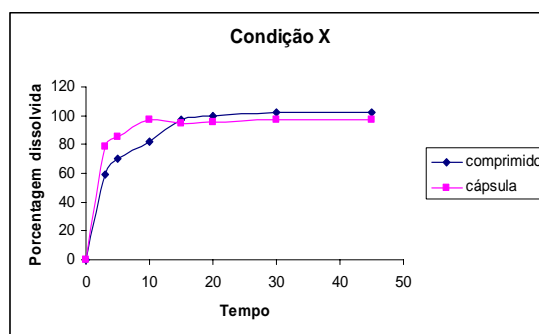


Figura 26 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.

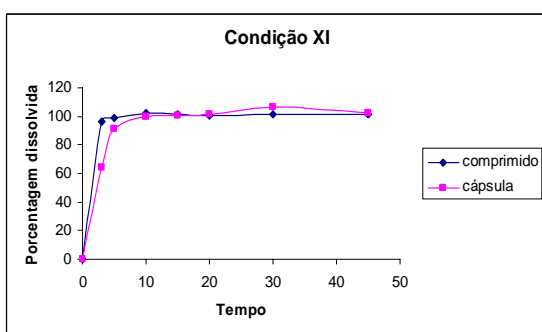


Figura 27 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 1, meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.

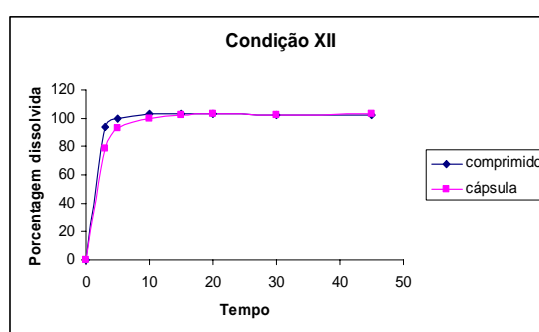


Figura 28 – Perfil de dissolução obtido para o besilato de anlodipino nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido utilizando aparato 2, meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm.

Os resultados da avaliação da influência dos filtros na SQR e amostras em estudo encontram-se na Tabela 25.

Tabela 25 – Resultados encontrados nas avaliações dos filtros utilizados para filtração da solução de SQR e amostras de cápsulas e comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.

Tipos de filtração	SQR	Cápsulas	Comprimidos
	ABS	ABS	ABS
Sem filtração	0,442	0,596	0,565
Filtro quantitativo	0,448	0,502	0,483
Membrana de acetato de celulose com poro de 0,45µm	0,444	0,447	0,450
Filtro quantitativo + membrana de acetato de celulose com poro de 0,45µm	0,446	0,445	0,446

A Tabela 26 apresenta os resultados obtidos na determinação da estabilidade da SQR e amostras de cápsula e comprimido no meio de dissolução.

Tabela 26 – Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade da SQR, amostra de cápsula e amostra de comprimido, por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

Amostra	SQR (%)		Cápsula (%)		Comprimido (%)	
	UV	CL	UV	CL	UV	CL
Recém preparada	-	-	99,38	100,1	98,90	99,30
2 horas a 37,0 ± 0,5 °C	100,70	98,82	99,75	99,89	98,27	99,05
24 horas a temperatura ambiente	99,87	98,56	98,40	99,45	98,50	98,95

A Tabela 27 apresenta os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração para o besilato de anlodipino por cromatografia líquida e a Figura 29 a curva de calibração correspondente.

Tabela 27 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do besilato de anlodipino por cromatografia líquida.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas absolutas			Média	CV%
	1º dia	2º dia	3º dia		
3	112112	112588	111904	112201	0,31
5	188316	189028	188557	188634	0,19
10	377139	379707	373167	376671	0,87
20	754626	759186	751209	755007	0,53
30	1118350	1126701	1127962	1124338	0,46

CV% = coeficiente de variação percentual

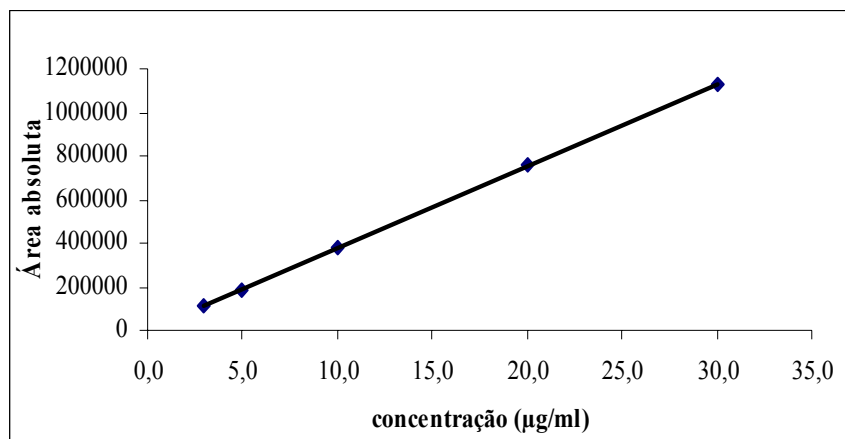


Figura 29 – Representação gráfica da curva de calibração do besilato de anlodipino obtida através de cromatografia líquida.

As Tabelas 28 e 29 apresentam os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva de calibração.

Tabela 28 – Resultados da curva de calibração obtida pelo método dos mínimos quadrados para o método por cromatografia líquida.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	3 – 30 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 37517x + 1140,9$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$37517 \pm 188,3$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$1140,9 \pm 911$
Coeficiente de correlação (r)	0,9999

Tabela 29 – Análise de variância das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva de calibração do besilato de anlodipino por cromatografia líquida.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	4	$2,1502 \cdot 10^{12}$	$5,375 \cdot 10^{11}$	49.393 (3,48)
- regressão linear	1	$2,1501 \cdot 10^{12}$	$2,1501 \cdot 10^{12}$	197.567 (4,96)
- desvio da linearidade	3	$6,04 \cdot 10^7$	$2,014 \cdot 10^7$	1,85 (3,71)
Resíduo	10	$1,09 \cdot 10^8$	$1,088 \cdot 10^7$	
Total	14	$2,1503 \cdot 10^{12}$		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

A Tabela 30 apresenta os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração para o besilato de anlodipino por espectrofotometria e a Figura 30 a curva de calibração correspondente.

Tabela 30 – Valores de absorvâncias obtidas na determinação da curva de calibração do besilato de anlodipino em ácido clorídrico 0,01N por espectrofotometria no ultravioleta.

Concentração (µg/mL)	Absorvâncias			Média	CV%
	1º dia	2º dia	3º dia		
3	0,096	0,097	0,096	0,096	0,60
5	0,158	0,158	0,160	0,159	0,73
10	0,320	0,324	0,324	0,323	0,72
20	0,634	0,634	0,626	0,631	0,73
30	0,949	0,948	0,948	0,948	0,06

CV% = coeficiente de variação percentual

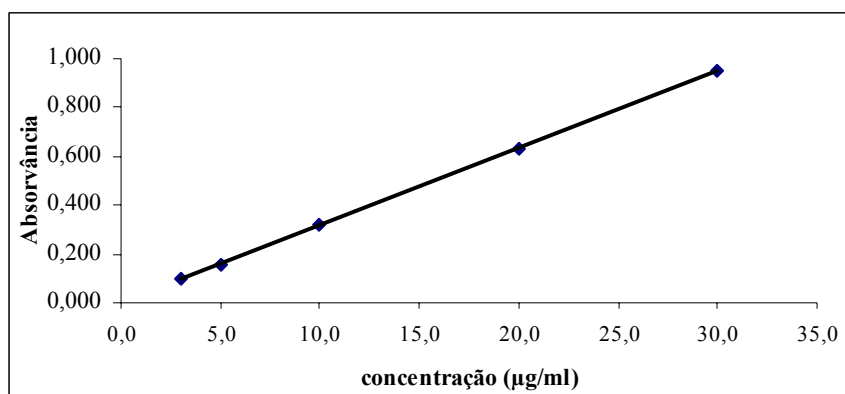


Figura 30 – Representação gráfica da curva de calibração do besilato de anlodipino em ácido clorídrico 0,01N através da espectrofotometria no ultravioleta.

As Tabelas 31 e 32 apresentam os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva de calibração.

Tabela 31 – Resultados da curva de calibração obtida pelo método dos mínimos quadrados para o método por espectrofotometria no ultravioleta.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	3 – 30 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0315x + 0,0029$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,0315 \pm 0,0001$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$0,0029 \pm 0,0023$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999

Tabela 32 – Análise de variância das absorvâncias determinadas para obtenção da curva de calibração do besilato de anlodipino por espectrofotometria no ultravioleta.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	4	1,517	0,379	66.148 (5,99)
- regressão linear	1	1,5169	1,5169	264579 (10,04)
- desvio da linearidade	3	0,0001	0,00003	5,15 (6,55)
Resíduo	10	0,0001	0,00001	
Total	14	1,5171		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,01$.

Os espectros das amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas e das cápsulas sem conteúdo estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 31, 32 e 33.

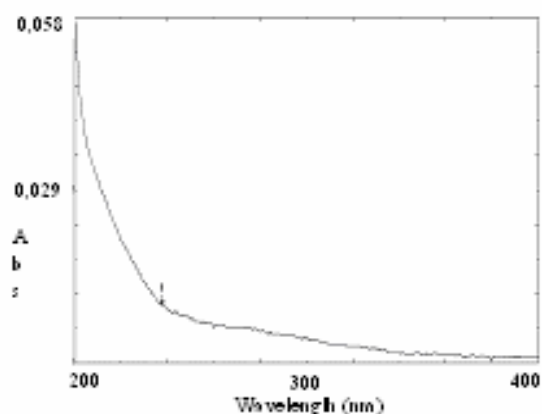


Figura 31 – Espectro de absorção na região do ultravioleta obtido com a amostra simulada de excipiente de comprimido após dissolução em HCL 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm, com aparato 2.

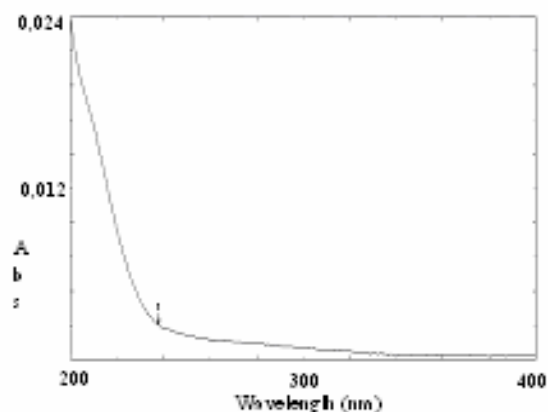


Figura 32 – Espectro de absorção na região do ultravioleta obtido com a amostra simulada de excipiente de cápsulas após dissolução em HCL 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm, com aparato 1.

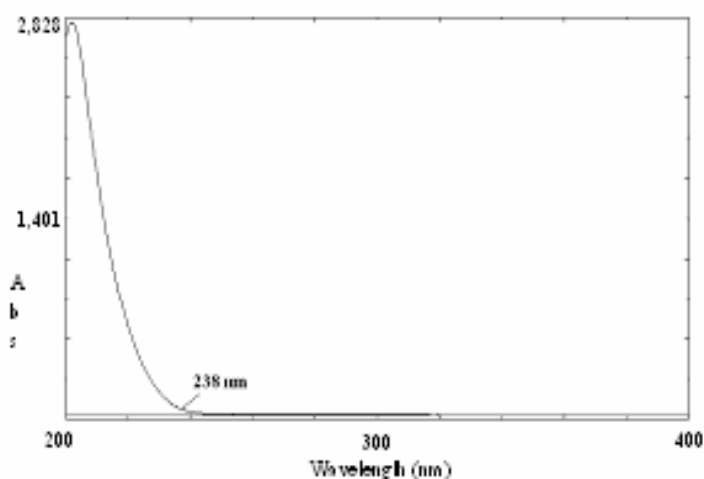


Figura 33 – Espectro de absorção na região do ultravioleta obtido com a cápsula sem conteúdo após dissolução em HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm, com aparato 1.

Os cromatogramas das amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas e das cápsulas sem conteúdo estão apresentados, respectivamente, na Figura 34.

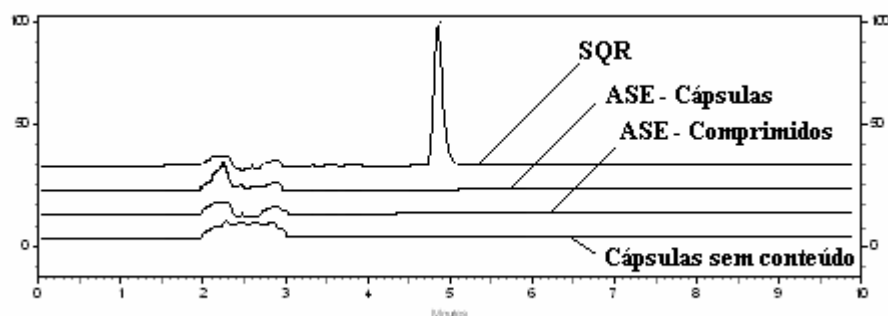


Figura 34 – Cromatogramas obtidos com a SQR, amostra simulada de excipiente de cápsulas (ASE – cápsulas) e comprimidos (ASE – comprimidos) e cápsula sem conteúdo após dissolução em HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm, com aparato 1 e 2.

Os valores experimentais obtidos na determinação da percentagem dissolvida de besilato de anlodipino, em comprimidos, por cromatografia líquida e espectrofotometria no ultravioleta, referentes à precisão do método de dissolução, encontram-se na Tabela 33.

Tabela 33 – Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de besilato de anlodipino em comprimidos, através de espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

Amostras	% dissolvida de besilato de anlodipino			
	Primeiro dia		Segundo dia	
	CL	UV	CL	UV
1	101,33	105,01	100,75	102,75
2	101,84	100,92	100,84	102,69
3	99,26	101,32	99,34	103,80
4	95,85	93,71	93,64	97,12
5	98,34	96,14	95,35	99,11
6	101,64	97,90	96,89	100,26
Média	99,71	99,17	97,80	100,95
CV%	2,36	4,09	3,05	2,54

As Tabelas 34 e 35 apresentam os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a precisão das percentagens dissolvidas de AND em comprimidos por cromatografia líquida e espectrofotometria no ultravioleta, respectivamente.

Tabela 34 – Análise de variância dos valores de percentagem dissolvida de besilato de anlodipino obtidas nos comprimidos por cromatografia líquida, em diferentes dias.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	1	10,9252	10,92	1,51 (4,96)
Resíduo	10	72,317	7,232	
Total	11	83,242		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P = 0,05$.

Tabela 35 – Análise de variância dos valores de percentagem dissolvida de besilato de anlodipino obtidas nos comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta, em diferentes dias.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	1	9,59	9,594	0,83 (4,96)
Resíduo	10	115,31	11,531	
Total	11	124,9		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P = 0,05$.

A comparação estatística dos resultados de porcentagens dissolvidas de besilato de anlodipino nos comprimidos, obtidos pelos diferentes métodos, encontra-se na Tabela 36.

Tabela 36 - Análise de variância das % dissolvidas de besilato de anlodipino em comprimidos, por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre métodos	1	0,885	0,8856	0,08 (4,96)
Resíduo	10	110,26	11,026	
Total	11	111,15		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P = 0,05$.

Os valores experimentais obtidos na determinação das porcentagens dissolvidas de besilato de anlodipino em cápsulas, por cromatografia líquida, referentes à precisão do método de dissolução, encontram-se na Tabela 37.

Tabela 37 – Valores experimentais referentes à determinação da porcentagem dissolvida de besilato de anlodipino em cápsulas por cromatografia líquida.

Amostras	% dissolvida de besilato de anlodipino	
	Primeiro dia	Segundo dia
1	107,84	101,27
2	99,45	94,99
3	96,63	111,04
4	90,56	98,85
5	102,87	103,23
6	100,80	99,64
Média	99,69	101,50
CV%	5,86	5,34

A Tabela 38 apresenta os resultados do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a precisão das porcentagens dissolvidas de AND em cápsulas por cromatografia líquida, através de análise de variância.

Tabela 38 – Análise de variância dos valores de porcentagens dissolvidas obtidos para besilato de anlodipino em cápsulas por cromatografia líquida.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	1	9,85	9,85	0,31 (4,96)
Resíduo	10	317,46	31,75	
Total	11	327,31		

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $P = 0,05$.

Os resultados obtidos no teste de recuperação de besilato de anlodipino, através da cromatografia líquida e da espectrofotometria no ultravioleta, estão apresentados nas Tabelas 39 e 40, respectivamente.

Tabela 39 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado nas amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas de besilato de anlodipino por cromatografia líquida.

Amostras	Quantidade de SQR (mg)		% de Recuperação	% de Recuperação Média
	Adicionada	Recuperada		
Comprimidos	0,7	0,72	102,45	100,78
	6,9	6,56	95,1	
	10,3	10,79	104,80	
Cápsulas	0,7	0,68	96,6	99,76
	6,9	6,81	98,7	
	10,3	10,71	103,98	

Tabela 40 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado nas amostras simuladas de excipientes de comprimidos de besilato de anlodipino por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostras	Quantidade de SQR (mg)		% de Recuperação	% de Recuperação Média
	Adicionada	Recuperada		
Comprimidos	0,7	0,73	104,77	103,44
	6,9	6,99	101,34	
	10,3	10,73	104,20	

5.10 Discussão

Com o desenvolvimento da tecnologia e das pesquisas envolvendo a liberação de fármacos, o teste de dissolução surge como indicativo para avaliação da qualidade de algumas formas farmacêuticas de uso oral. Neste intuito, foi desenvolvido e otimizado teste de dissolução para estudar a liberação de besilato de anlodipino contido nas formas farmacêuticas de cápsula e comprimido, visto que não foram encontrados métodos na literatura com este propósito.

Para o desenvolvimento de um teste necessita-se da seleção criteriosa das condições do ensaio, que deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminatório e

resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos (MANADA et al., 2002).

O desenvolvimento do método de dissolução foi realizado com base na solubilidade e na permeabilidade do fármaco seguindo o sistema de classificação biofarmacêutica, no qual o besilato de anlodipino apresenta alta solubilidade e baixa permeabilidade (KASIN et al., 2004; TARTAR & ATMACA, 2001).

Para tal, foram testadas diversas condições, enumeradas de I a XII, para definir aquela com melhor poder discriminatório na liberação de besilato de anlodipino das formas farmacêuticas em estudo. Diferentes aparatos, meios e rotações, foram testados (Tabela 24).

O volume de meio de dissolução pode variar de 500 até 1000 mL, sendo 900 mL o volume mais utilizado (MARQUES, 2002). No presente estudo, utilizou-se o volume de 500 mL devido à baixa concentração do fármaco nas formas avaliadas. A utilização de volume de 900 mL tornaria o fármaco mais diluído, o que poderia ocasionar problemas na avaliação da porcentagem dissolvida nos primeiros minutos de um teste de perfil de dissolução, quando avaliado por espectrofotometria no ultravioleta.

Nessa fase do desenvolvimento foram utilizados dois métodos para avaliar a porcentagem dissolvida: a cromatografia líquida e a espectrofotometria no ultravioleta, apresentados no Capítulo II. Para comprimidos, os resultados obtidos pelos dois métodos foram similares, o que não ocorreu para cápsulas, sugerindo interferência. Devido a isso, somente os resultados obtidos por cromatografia líquida foram avaliados e apresentados nessa etapa.

Os perfis de dissolução obtidos nas diferentes condições estão apresentados nas Figuras 17 a 28. Os perfis de cápsulas utilizando aparato 2, foram descartados, pelo fato das mesmas ficarem flutuando na superfície do meio. Os resultados obtidos com HCl 0,1N (Figuras 17 a 20), nos diferentes aparatos e rotações, foram considerados inadequados devido a total dissolução do fármaco nos primeiros minutos do teste, condição não relevante para uma possível comparação posterior de perfis e devido a baixa estabilidade do fármaco em meio fortemente ácido. Para os perfis gerados tendo como meio tampão fosfato 6,8 (Figuras 21 a 24) obteve-se dissolução incompleta do fármaco, representando a baixa solubilidade neste meio. As condições IX (aparato 1, 500 mL de meio ácido clorídrico 0,01N e rotação de 50 rpm) e X (aparato 2, 500 mL de meio ácido clorídrico 0,01N e rotação de 50 rpm) foram as que melhor demonstraram o objetivo buscado, ou seja, verificar a liberação do fármaco através do tempo para cápsulas e comprimidos, respectivamente.

Após a definição das condições de dissolução, avaliou-se a influência do filtro, a estabilidade das soluções no meio de dissolução e realizou-se validação do método de determinação da porcentagem dissolvida.

A avaliação da influência do filtro no método proposto é muito importante e foi realizada visando verificar possíveis alterações significativas na concentração do fármaco ou liberação de material para solução. Nessa avaliação foi utilizada a espectrofotometria no ultravioleta, pois a cromatografia líquida não possibilita a uso de amostras não filtradas, porque podem danificar o equipamento e inutilizar a coluna cromatográfica. Na análise dos resultados obtidos (Tabela 25) verificou-se que não houve alteração significativa nas leituras de absorvância para a SQR antes e após a filtração com filtro, membrana ou ambos. Para as amostras de comprimidos e cápsulas verificou-se que a utilização apenas do filtro foi inadequada, pois as soluções ficaram turvas, interferindo nas leituras das soluções. As filtrações empregando apenas membranas de 0,45 μm deixaram as soluções límpidas, com resultados adequados. Ocorreu, no entanto, rápido entupimento das mesmas, diminuindo a vida útil. Os resultados utilizando ambos os filtros foram os melhores, pois ficaram dentro dos limites de $\pm 2\%$ do teor dos placebos e aumentou-se o tempo de utilização da membrana, permitindo maior número de filtrações.

Os valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade de soluções da SQR e amostras de cápsulas e comprimidos ficaram dentro da faixa estabelecida (98 – 102%), demonstrando que o besilato de anlodipino mantém suas propriedades nos parâmetros empregados, conforme Tabela 26.

Como mencionado anteriormente, os métodos utilizados para avaliar a porcentagem de dissolução foram aqueles desenvolvidos e validados no Capítulo II. Algumas alterações foram, no entanto, necessárias nos métodos propostos. Devido à baixa concentração do fármaco as amostras foram analisadas diretamente do meio de dissolução utilizado (ácido clorídrico 0,01N). Nos métodos previamente desenvolvidos as amostras eram analisadas em água (espectrofotometria no ultravioleta) e fase móvel (cromatografia líquida). As concentrações utilizadas para avaliar a linearidade dos métodos previamente analisados variaram de 50 a 150% da concentração de trabalho (10 a 30 $\mu\text{g/mL}$). Foi necessário ampliar essa faixa para o método de dissolução (3 a 30 $\mu\text{g/mL}$). Considerando o exposto, os métodos utilizados para determinar a porcentagem dissolvida de besilato de anlodipino nas amostras foram novamente validados, para avaliar essas alterações.

Em relação à especificidade verificou-se que não houve interferência dos excipientes dos comprimidos e cápsulas tanto para o método espectrofotométrico (Figura 31 e 32), como para o método cromatográfico (Figura 34). No desenvolvimento do método foi verificada interferência para as cápsulas analisadas por espectrofotometria no ultravioleta. Realizou-se, assim, análise utilizando somente o invólucro (cápsula sem conteúdo). Como pode ser verificada na Figura 33, a interferência observada foi inicialmente devido a esse invólucro. Essa interferência foi de aproximadamente 15%, o que inviabilizou a utilização do método espectrofotométrico na região do ultravioleta para cápsulas. Devido ao exposto, utilizou-se somente a cromatografia líquida como método de quantificação na avaliação dos parâmetros de validação da dissolução de cápsulas.

Os resultados obtidos demonstram que as soluções de besilato de anlodipino SQR apresentaram correlação linear entre as respostas (áreas e absorvâncias) às concentrações, nos intervalos utilizados, tanto por espectrofotometria no ultravioleta como por cromatografia líquida. Gráficos de concentração *versus* resposta (área e absorvância) foram plotados e mostraram linearidade adequada na faixa de 3,0 a 30,0 µg/mL (Figura 29 e 30). As equações da reta para os métodos foram: $y = 37517x + 1140,9$, para cromatografia líquida e $y = 0,0315x + 0,0029$, para espectrofotometria no ultravioleta, com coeficiente de correlação de 0,9999, para ambos os métodos. As análises de variância (ANOVA) efetuadas sobre os valores de áreas absolutas e absorvâncias das curvas de calibração de besilato de anlodipino, cujos elementos estão determinados nas Tabelas 28 e 31, respectivamente, demonstraram regressões lineares significativas, não havendo desvios da linearidade ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias), ambas com avaliação de 6 comprimidos por dissolução, pelos dois métodos de quantificação propostos (Tabela 33). O valor experimental médio obtido por cromatografia líquida, para a dissolução do besilato de anlodipino em comprimidos, nas amostras analisadas no mesmo dia, foi de 99,71% e, na análise realizada no segundo dia 97,80%. Para a espectrofotometria no ultravioleta as médias foram de 99,17% e 100,95%, para o primeiro e segundo dia, respectivamente. Os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 5%, indicando boa precisão do método. A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as diferentes análises realizadas na avaliação da precisão do método de dissolução para comprimidos por cromatografia líquida, espectrofotometria no ultravioleta e para a intercambialidade de ambos, de acordo com as Tabelas 34, 35 e 36,

respectivamente ($p < 0,05$). O valor experimental obtido em cromatografia líquida, para a dissolução do besilato de anlodipino em cápsulas, nas amostras analisadas no mesmo dia, foi de 99,69%, na análise realizada no segundo dia obteve-se 101,50% (Tabela 37). A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as diferentes análises realizadas na avaliação da precisão do método de dissolução para cápsulas por cromatografia líquida, de acordo com Tabela 38 ($p < 0,05$).

Na avaliação da exatidão, a percentagem de recuperação obtida por cromatografia líquida variou de 95,1 – 104,8% para comprimidos e 96,6 – 103,98% para cápsulas (Tabela 39). Utilizando a espectrofotometria no ultravioleta, a variação foi de 101,77 – 104,77% para comprimidos (Tabela 40). Segundo Marques (2002) a recuperação deve estar entre 95 a 105%. Os resultados obtidos pelos métodos propostos encontram-se, assim, dentro do especificado.

As especificações para quantidade de fármaco dissolvido envolvem uma quantidade mínima dissolvida em determinado intervalo de tempo. Muitas monografias estabelecem que não menos de 75% do fármaco deve estar dissolvido em 45 minutos (MARCOLONGO, 2003). Para fármacos altamente solúveis uma especificação de único ponto, com 85% dissolvidos em 60 minutos ou menos, é suficiente como teste de controle de qualidade lote a lote (FDA, 1997). Face ao exposto, sugere-se como especificação para o besilato de anlodipino 85% de dissolução em 30 minutos, em ácido clorídrico 0,01N.

6. CAPÍTULO IV – ESTUDO COMPARATIVO DE ALGUNS PRODUTOS CONTENDO BESILATO DE ANLÓDIPINO

6.1 Introdução

A comercialização de medicamentos genéricos e similares no mercado nacional foi uma tentativa do governo de tornar os medicamentos mais acessíveis, já que, inegavelmente, tais produtos constituem-se em alternativa economicamente mais viável que o medicamento de referência ou inovador (PITA et al., 2004; CONSIGLIERI & STORPIRTIS, 2000).

Atualmente, a legislação brasileira estabelece que, para um medicamento ser registrado como genérico ou similar, é necessário que seja comprovada sua equivalência farmacêutica e bioequivalência (mesma biodisponibilidade) em relação ao medicamento referência indicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2003a; Brasil, 2003b).

A equivalência farmacêutica entre dois medicamentos relaciona-se à comprovação de que ambos contêm o mesmo fármaco, na mesma dosagem e forma farmacêutica, o que pode ser avaliado por meio de testes *in vitro*. Assim, pode ser considerada como um indicativo da bioequivalência entre os medicamentos em estudo, sem, contudo, garanti-la (STORPIRTIS et al., 2004).

Nesse contexto, é fundamental ressaltar, tem-se verificado que a eficácia clínica de uma preparação farmacêutica não é atribuída somente à atividade intrínseca da substância ativa. Os componentes da formulação, os processos de fabricação e as características físicas e físico-químicas do fármaco podem afetar o comportamento do medicamento no organismo, dando origem a casos de ineficácia, intoxicações e diferenças na biodisponibilidade. Portanto, formas farmacêuticas sólidas de uso oral, são aquelas que, potencialmente, podem apresentar problemas em relação a biodisponibilidade e a bioequivalência (PINHO & STORPIRTIS, 2001).

Atualmente, no mercado brasileiro, vários laboratórios farmacêuticos comercializam produtos a base de besilato de anlodipino na forma de comprimidos. Outra forma que está amplamente empregada é a cápsula, manipulada por diferentes farmácias magistrais, representando uma alternativa economicamente mais acessível para o tratamento à base do referido fármaco.

Utilizando os métodos validados nos capítulos anteriores, juntamente com os métodos gerais da Farmacopéia Brasileira IV edição (1988), este estudo teve como objetivo realizar uma comparação, através do estudo de equivalência farmacêutica, entre alguns laboratórios produtores de comprimidos contendo 6,9 mg de besilato de anlodipino e entre cápsulas elaboradas por farmácias de manipulação na mesma concentração. O estudo foi realizado segundo Resolução RE nº 310, de 01 de setembro de 2004 (Brasil, 2004), que trata do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica, levando em consideração parâmetros como análise dos rótulos, peso médio, desintegração, umidade, resistência mecânica em comprimidos (dureza e friabilidade), identificação do princípio ativo, doseamento, teste de dissolução, perfil de dissolução e uniformidade de dose.

Pelo fato do besilato de anlodipino representar uma alternativa terapêutica muito utilizada, tornou-se interessante realizar estudo comparativo de alguns produtos disponíveis no mercado nacional, visto que, não foi encontrado na literatura estudos semelhantes que viessem a contribuir para o controle de qualidade deste fármaco, auxiliando, assim, na elucidação do dilema custo *versus* qualidade dos medicamentos.

6.2 Amostras utilizadas no estudo

- Cápsulas

Foram utilizados produtos de cinco farmácias magistrais, sendo que em cada farmácia foi adquirido um lote na concentração de 6,9 mg de besilato de anlodipino. Os produtos foram denominados A, B, C, D e E.

- Comprimidos

Foi utilizado um lote de cada laboratório produtor, na concentração de 6,9 mg de besilato de anlodipino. A amostragem está composta dos seguintes laboratórios:

F – Norvasc[®], Pfizer[®]

G – Besilato de anlodipino, E.M.S.[®]

H – Besilato de anlodipino, Merck[®]

I – Anlodibal[®], Baldacci[®]

J – Besilato de anlodipino, Rambaxy[®]

6.3 Solventes e reagentes

- Acetonitrila, Tedia[®]
- Ácido clorídrico fumegante, Tedia[®]
- Ácido orto-fosfórico 85%, Merck[®]
- Água destilada
- Água purificada
- Gás hélio, White Martins[®]
- Metanol, Tedia[®]
- Solução de Karl-Fisher, Merck[®]
- Trietilamina, Merck[®]

6.4 Equipamentos e acessórios

- Aparelho de desintegração, Nova Ética[®]
- Aparelho para teste de dissolução, Pharma Test[®]
- Aparelho de karl fisher, Titroline Alpha[®]
- Balança analítica, Sartorius[®]
- Banho ultra-sônico, Thornton[®]
- Bomba de vácuo, Primar[®]
- Centrífuga, Jouan[®]
- Coluna cromatográfica de fase reversa octadesilcilano Luna[®] (250 mm x 4,6 mm d.i.) 4 µm, Phenomenex[®]
- Cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com controlador SCL-10 AD_{vp}, com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 AD_{vp}, injetor automático com “loop” variável SIL-10 AD_{vp} e integrador automático computadorizado através do software CLASS VP 5.0[®].
- Destilador, Biomatic[®]
- Durômetro, Pharma Test[®]
- Espectrofotômetro UV-VIS, Shimadzu[®]

- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 μm , 47 mm, Sartorius[®]
- Membrana filtrante de celulose regenerada, porosidade 0,45 μm , 13 mm, Sartorius[®]
- Filtro quantitativo faixa preta, Schleicher & Schuell[®]
- Friabilômetro, Pharma Test[®]
- Kit para filtração, Millipore[®]
- Pipetador Transferpette, Brand[®]
- Potenciômetro, Fieldlab Schott[®]
- Termômetro de imersão, Incoterm[®]

6.5 Análise dos rótulos das amostras

Avaliaram-se as seguintes informações: teor, informações sobre o responsável técnico, lote, data de fabricação, validade e quantidade.

6.6 Determinação de peso médio das cápsulas e comprimidos

Para a realização deste teste foram escolhidas, aleatoriamente, vinte cápsulas de cada produto. Determinou-se o peso das cápsulas cheias e a variação permitida conforme descrito na Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Calculou-se, também, o peso médio do conteúdo das cápsulas, seguindo o mesmo método oficial.

Para a determinação do peso médio dos comprimidos foram escolhidas, aleatoriamente, vinte unidades de cada produto, as quais foram pesadas individualmente. Calculou-se o peso médio e a variação permitida de acordo, também, com o método descrito na Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988).

6.7 Determinação do tempo de desintegração dos comprimidos e cápsulas

Determinou-se a desintegração em água, mantida a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), tanto para cápsulas quanto para comprimidos.

Para este teste foram utilizadas seis unidades de cada produto. Considerou-se como tempo de desintegração o tempo em minutos e segundos em que foi percebida a desintegração total de todas as cápsulas e comprimidos ou quando se observam apenas restos de seus revestimentos.

6.8 Determinação da Umidade por Karl-Fischer

Para determinar a umidade contida nas formulações foi utilizado o método de Karl-Fischer, empregando titulador automático, segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Foram pesadas aproximadamente 200 mg do conteúdo das cápsulas ou dos comprimidos triturados. Para determinar a porcentagem de umidade contida nos produtos utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{\text{gasto do reagente de Karl-Fischer} \times \text{FC}}{\text{quantidade de amostra (mg)}} \times 100$$

Onde:

FC = fator de correção do reagente de Karl-Fischer

6.9 Determinação de resistência mecânica em comprimidos

6.9.1 Friabilidade

Para a determinação da friabilidade em comprimidos procedeu-se conforme a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Pesaram-se, com exatidão, vinte comprimidos. Os mesmos foram introduzidos no aparelho e submetidos a cem rotações num período de cinco minutos. Após, foram removidos quaisquer resíduos de poeira dos comprimidos, e os mesmos

foram novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e o final dos comprimidos representou a friabilidade em função da porcentagem de pó perdido.

6.9.2 Dureza

Para a determinação da dureza em comprimidos procedeu-se conforme a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Dez comprimidos foram submetidos, individualmente, à ação do aparelho, sendo medida a força em Newton necessária para esmagá-lo.

6.10 Identificação do besilato de anlodipino nas amostras

Empregaram-se preparações com 5,0 mg de besilato de anlodipino SQR e o equivalente de besilato de anlodipino em cápsulas e comprimidos, diluídas com a solução de 1% de HCl 0,1 N em metanol (concentração final de 20 µg/mL). Foram traçados espectros de absorção na região de 200 a 400 nm utilizando a mesma solução diluente e cubetas de quartzo com 1 cm de espessura. Compararam-se as equivalências entre os máximos de absorção dos espectros obtidos com as amostras e a SQR.

6.11 Doseamento do besilato de anlodipino nas amostras

Para o doseamento das cápsulas e comprimidos foi utilizado a espectrofotometria na região do ultravioleta. Os preparos do padrão e das amostras foram realizados conforme indicado no Capítulo II item 4.5.1.3. As análises foram realizadas em duplicata.

6.12 Teste de dissolução

Realizou-se o teste de dissolução de besilato de anlodipino nas amostras em estudo utilizando seis comprimidos e as condições determinadas no Capítulo III, conforme Tabela 41. A porcentagem dissolvida do fármaco foi determinada por cromatografia líquida para cápsulas e por espectrofotometria para comprimidos.

Tabela 41 – Parâmetros utilizados para avaliação da porcentagem dissolvida de comprimidos e cápsulas.

Parâmetros	
Meio	HCl 0,01N
Volume	500 mL
Aparato	Pá (comprimido) e cesta (cápsula)
Velocidade de rotação	50 rpm
Volume coletado	5 mL
Tempo de coleta	30 minutos
Temperatura	37,0 ± 0,5 °C

6.13 Perfil de dissolução

O procedimento empregado para avaliação dos produtos foi o mesmo utilizado no item 6.12, conforme Tabela 41. As coletas foram realizadas nos tempos de 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos. Foram submetidas doze unidades de cada produtor ao teste, sendo que para a quantificação do besilato de anlodipino dissolvido utilizou-se a cromatografia líquida.

Através do programa computacional ORIGIN 5.0 foram determinadas as áreas sob a curva da porcentagem de dissolução de besilato de anlodipino *versus* tempo individualmente para doze unidades de comprimidos ou cápsulas de cada produtor. A eficiência de dissolução foi calculada da pela seguinte equação:

$$ED\% = \frac{\text{Área sob a curva (ASC)}}{\text{Área retângulo } y_{100}} \times 100$$

6.14 Uniformidade de dose unitária das amostras

Foram avaliadas, individualmente, dez unidades de cada produto, por espectrofotometria no ultravioleta. As amostras foram preparadas transferindo-se o conteúdo de uma unidade para balão volumétrico de 50 mL, e prosseguindo a diluição e extração da mesma forma que indicado no item 4.5.1.3 (Capítulo II).

A quantidade de fármaco presente em cada unidade foi avaliada seguindo especificação da Farmacopéia Brasileira IV Edição (1988).

6.15 Resultados

No rótulo das cápsulas as informações existentes foram: lote, concentração, quantidade, fabricação e validade. Os comprimidos estavam de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2003c) contendo: informações ao paciente e informações técnicas.

As determinações individuais de peso dos cinco produtos manipulados analisados, bem como o peso médio do conteúdo dos mesmos, encontram-se na Tabela 42. Os valores obtidos para os comprimidos analisados encontram-se na Tabela 43.

Tabela 42 – Valores individuais (mg) obtidos para determinação de peso-médio (PM), desvio padrão (DP), limites inferior e superior permitidos e peso-médio do conteúdo (PMc) para as cápsulas analisadas.

Cápsulas	A	B	C	D	E
1	170,5	191,1	182,6	156,6	156,1
2	164,8	194,0	185,8	153,7	148,5
3	168,0	189,5	187,2	155,0	155,9
4	173,7	188,4	189,0	172,3	158,6
5	162,0	193,2	186,5	155,6	157,1
6	167,1	191,1	178,2	175,2	152,2
7	174,3	184,5	188,3	152,0	149,3
8	166,3	198,1	187,5	160,0	151,4
9	170,0	189,9	185,2	148,2	157,0
10	170,8	191,8	188,6	168,1	152,9
11	172,7	193,9	184,2	156,3	156,9
12	168,1	192,0	186,7	155,5	159,6
13	167,2	190,3	186,3	161,4	154,0
14	167,9	188,5	191,3	157,0	155,1
15	171,3	184,5	192,9	156,7	155,5
16	176,5	194,3	189,3	157,5	158,0
17	181,3	187,0	189,2	175,6	151,5
18	184,6	194,1	192,3	152,6	158,0
19	175,8	191,7	193,1	164,2	156,4
20	182,2	192,2	181,9	166,9	153,0
PM ± DP	171,8 ± 5,9	191,0 ± 3,3	187,3 ± 3,7	160,0 ± 7,8	154,9 ± 3,1
Limite inferior	154,58	171,9	168,57	144,02	139,37
Limite Superior	188,93	210,11	206,04	176,02	170,34
PMc ± DP	130,9 ± 5,9	143,1 ± 3,1	150,0 ± 3,6	109,1 ± 7,8	108,3 ± 3,0

Tabela 43 – Valores individuais (mg) obtidos para determinação de peso-médio (PM), desvio padrão (DP) e limite inferior e superior permitidos para os comprimidos analisados.

Comprimidos	F	G	H	I	J
1	201,5	170,9	61,1	353,6	199,5
2	212,8	167,5	60,9	355,5	197,5
3	194,9	168,8	60,3	352,5	199,7
4	190,1	173,4	57,6	356,6	202,2
5	203,3	171,9	59,2	354,1	200,6
6	204,2	170,0	60,0	353,5	197,7
7	201,6	172,3	59,2	352,7	200,7
8	199,6	169,6	59,0	352,6	196,4
9	200,0	175,7	58,8	352,7	203,1
10	199,7	169,3	60,9	352,9	202,9
11	191,9	171,0	59,6	352,7	200,6
12	204,1	175,2	60,9	355,7	200,4
13	200,8	167,2	58,3	354,6	200,2
14	195,0	170,3	60,4	348,8	200,2
15	195,8	171,9	59,0	354,1	197,0
16	201,9	168,9	60,2	354,7	200,9
17	198,4	171,6	59,9	355,7	201,0
18	200,7	170,0	60,4	352,4	201,3
19	205,0	167,8	60,0	352,4	200,2
20	201,5	168,1	60,1	353,3	200,2
PM ± DP	200,1 ± 5,0	170,6 ± 2,3	59,8 ± 0,9	353,6 ± 1,7	200,4 ± 1,5
Limite inferior	185,13	157,78	53,81	335,88	185,32
Limite Superior	215,15	183,36	65,77	371,23	215,38

Os resultados do teste de desintegração estão demonstrados na Tabela 44.

Tabela 44 – Tempo de desintegração encontrado para cápsulas e comprimidos.

Cápsulas		Comprimidos	
Produto	Tempo	Produto	Tempo
A	2 min e 20 seg	F	11 seg
B	2 min e 7 seg	G	10 seg
C	1 min e 16 seg	H	10 seg
D	1 min e 23 seg	I	15 seg
E	1 min e 56 seg	J	12 seg

Os resultados da determinação de umidade estão demonstrados na Tabela 45.

Tabela 45 – Porcentagem de umidade encontrada para os produtos analisados através do método de Karl-Fischer.

Cápsulas		Comprimidos	
Produto	Umidade (%)	Produto	Umidade (%)
A	6,5	F	4,8
B	12,4	G	7,5
C	11,3	H	4,4
D	6,4	I	6,3
E	6,0	J	6,2

Os resultados do teste de friabilidade e dureza encontrados para os comprimidos analisados encontram-se na Tabela 46.

Tabela 46 – Valores obtidos na determinação de friabilidade e dureza dos comprimidos analisados.

Produto	Friabilidade (%)	Dureza (N)
F	0,16	47,91
G	0,25	35,77
H	0,21	23,34
I	0,14	63,33
J	0,33	38,15

A Figura 35 apresenta a identificação do besilato de anlodipino nas amostras.

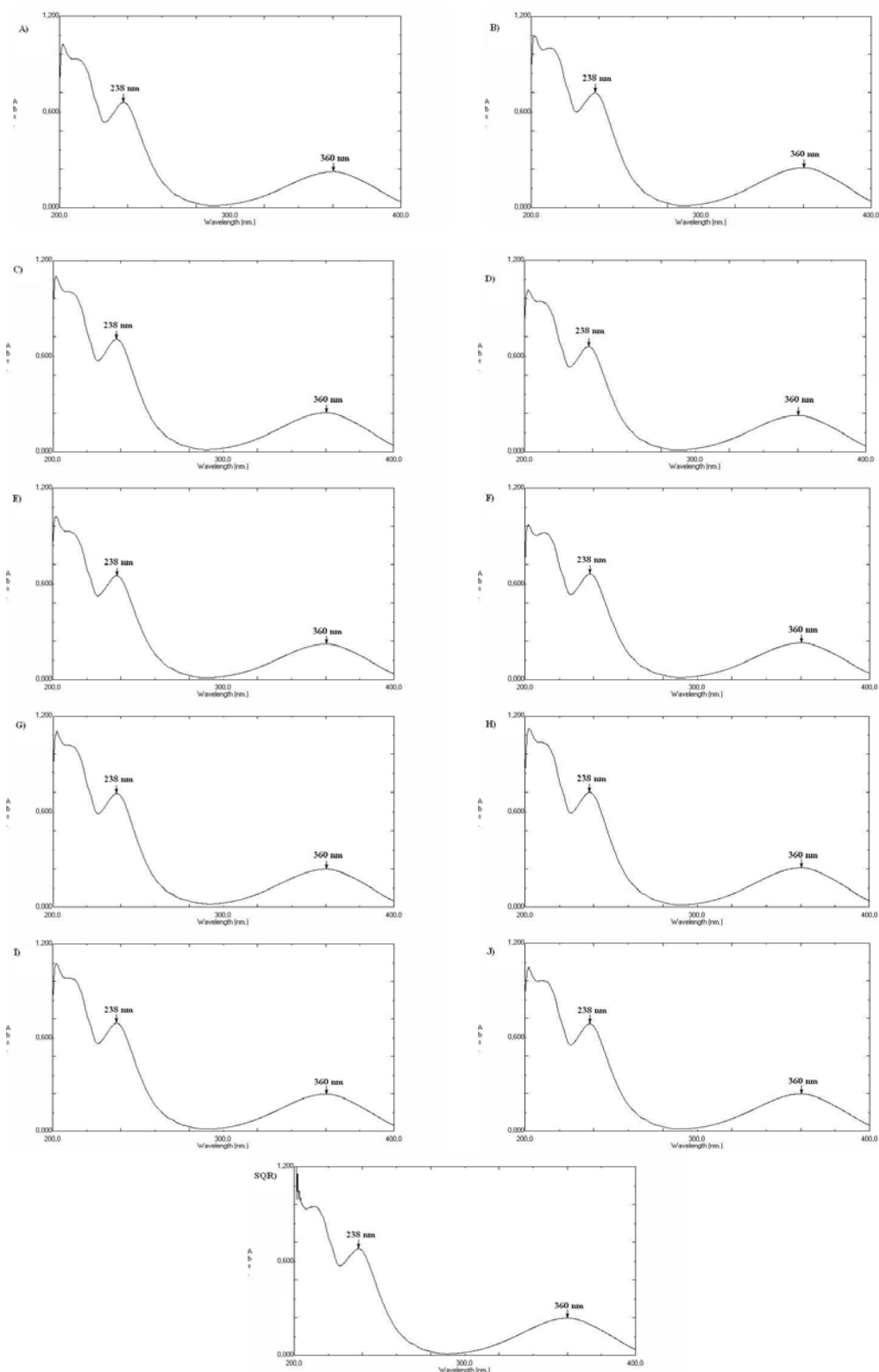


Figura 35 – Espectros de absorção na região do ultravioleta das amostras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e SQR, diluídos com a solução de 1% de HCl 0,1 N em metanol, na concentração de 20 µg/mL.

Os resultados obtidos para a determinação quantitativa de besilato de anlodipino nas cápsulas e comprimidos, encontram-se nas Tabela 47 e 48, respectivamente.

Tabela 47 – Valores experimentais obtidos para análise do teor de besilato de anlodipino em cápsulas por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostra	A		B		C		D		E	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
1	93,77	6,47	105,88	7,31	101,46	7,00	96,31	6,65	96,95	6,69
2	95,14	6,56	104,37	7,20	101,39	7,00	95,87	6,62	97,93	6,75
Média	94,45	6,52	105,13	7,25	101,42	7,00	96,09	6,63	97,44	6,72
DP	0,97	0,07	1,07	0,07	0,05	0,00	0,31	0,02	0,69	0,04
CV%	1,02		1,01		0,05		0,32		0,71	

DP = Desvio padrão

CV% = Coeficiente de variação percentual

Tabela 48 – Valores experimentais obtidos para análise do teor de besilato de anlodipino em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostra	F		G		H		I		J	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
1	98,41	6,79	99,13	6,84	105,09	7,25	97,22	6,71	98,07	6,77
2	99,01	6,83	100,36	6,92	105,94	7,31	98,24	6,78	99,27	6,85
Média	98,71	6,81	99,75	6,88	105,52	7,28	97,73	6,74	98,67	6,81
DP	0,42	0,03	0,87	0,06	0,60	0,04	0,72	0,05	0,85	0,06
CV%	0,43		0,87		0,57		0,74		0,86	

DP = Desvio padrão

CV% = Coeficiente de variação percentual

Os resultados do teste de dissolução *in vitro* obtidos nas amostras de cápsulas e comprimidos, utilizando como meio de dissolução ácido clorídrico 0,01N a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, podem ser observados na Tabela 49 e 50, respectivamente.

Tabela 49 – Valores de porcentagens dissolvidas (%) de besilato de anlodipino em cápsulas obtidas por cromatografia líquida.

Amostra	A	B	C	D	E
1	104,72	89,40	103,08	98,49	93,70
2	96,56	89,73	99,89	95,71	96,73
3	93,83	89,63	102,88	93,35	96,81
4	87,94	95,21	101,68	100,57	95,48
5	99,89	97,67	99,59	93,57	97,72
6	97,88	125,78	98,05	90,33	97,00
Média	96,80	97,90	100,86	95,34	96,24
DP	5,67	14,09	2,01	3,73	1,44
CV%	5,86	14,39	1,99	3,91	1,49

DP = Desvio padrão

CV% = Coeficiente de variação percentual

Tabela 50 – Valores de porcentagens dissolvidas (%) de besilato de anlodipino em cápsulas obtidas por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostra	F	G	H	I	J
1	105,01	91,96	104,12	97,42	103,70
2	100,92	104,12	110,07	97,97	101,83
3	101,32	105,39	102,69	99,11	100,56
4	93,71	98,30	103,75	92,39	92,29
5	96,14	103,11	104,96	95,53	91,43
6	90,17	95,76	100,84	93,20	94,12
Média	97,88	99,78	104,41	95,94	97,32
DP	5,51	5,31	3,12	2,71	5,32
CV%	5,63	5,32	2,98	2,82	5,47

DP = Desvio padrão

CV% = Coeficiente de variação percentual

Os resultados dos perfis de dissolução comprimidos e cápsulas encontram-se nas Figuras 36 e 37, respectivamente.

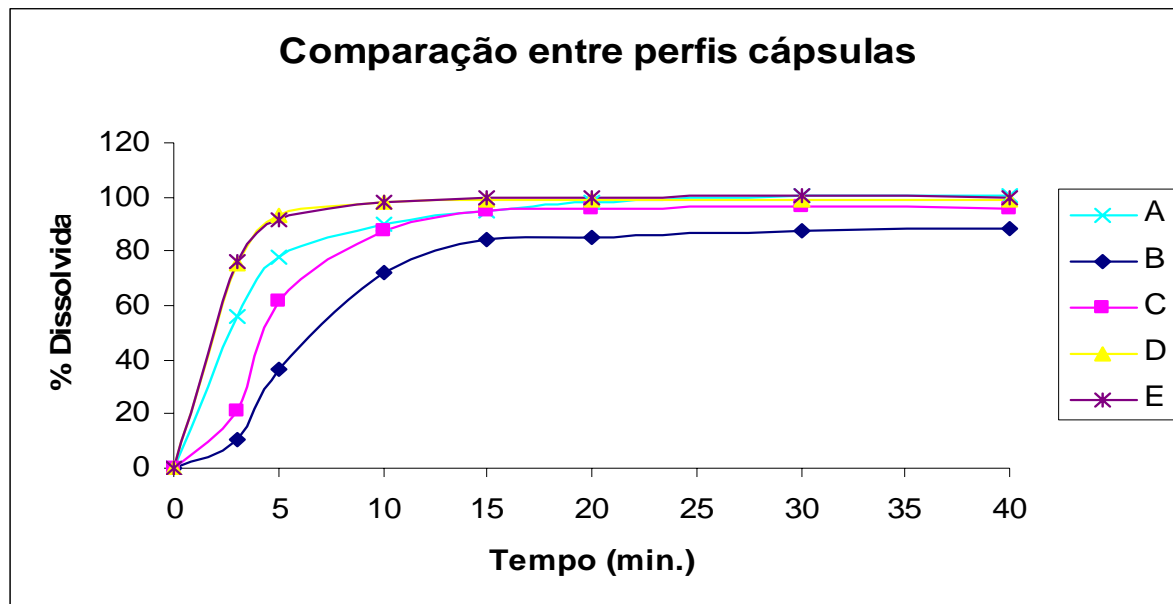


Figura 36 – Representação gráfica das porcentagens dissolvidas de besilato de anlodipino nas cápsulas em meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e 50 rpm, aparato 1.

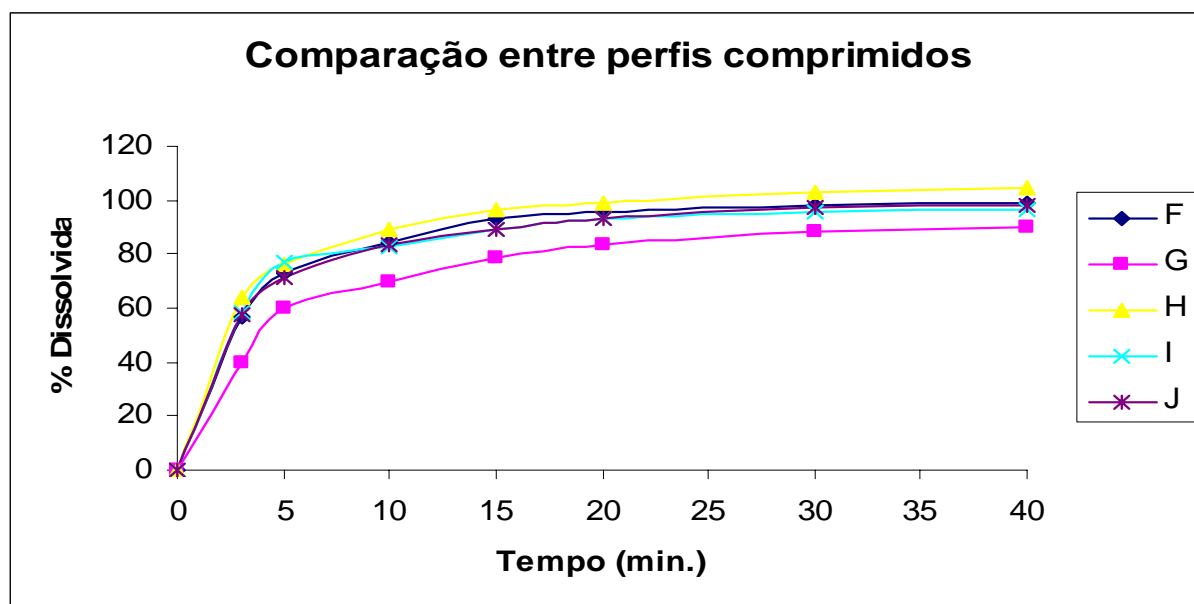


Figura 37 – Representação gráfica das porcentagens dissolvidas de besilato de anlodipino nos comprimidos em meio HCl 0,01N a $37,0 \pm 0,5$ °C e 50 rpm, aparato 2.

Os valores de eficiência de dissolução, os respectivos desvios padrão e os coeficientes de variação obtidos para cápsulas e comprimidos encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 51 e 54, respectivamente.

Tabela 51 – Valores de eficiência de dissolução (%) obtidos para cápsulas de besilato de anlodipino, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).

Amostra	A	B	C	D	E
1	96,09	61,27	87,18	96,83	90,98
2	89,56	67,33	84,95	94,62	94,25
3	87,99	67,49	83,07	92,74	96,13
4	69,38	70,86	81,42	98,37	94,53
5	91,26	73,81	82,76	91,74	95,87
6	92,03	90,55	84,54	89,26	95,23
7	88,62	77,67	88,20	106,95	97,01
8	88,68	72,28	82,72	86,11	94,31
9	98,53	65,83	84,22	87,84	91,20
10	88,69	74,76	83,02	90,26	92,35
11	93,90	74,87	78,52	93,72	87,34
12	89,39	81,76	82,90	90,56	94,94
Média	89,51	73,21	83,63	93,25	93,68
DP	7,15	7,80	2,53	5,59	2,74
CV%	7,99	10,66	3,02	5,99	2,93

Os resultados dos tratamentos estatísticos a que foram submetidos os valores de eficiência de dissolução obtidos para cápsulas encontram-se na Tabelas 52 (ANOVA) e 53 (Tukey).

Tabela 52 – Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de cápsulas de besilato de anlodipino.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	4	3492	873	27,76 (2,57)
Resíduo	55	1730	31	
Total	59	5222		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

Tabela 53 – Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontradas para cápsulas.

Produto	Média (X)	X – 73,21	X – 83,63	X – 89,51	X – 93,25
E	93,68	20,47*	10,05*	4,17 ^{NS}	0,43 ^{NS}
D	93,25	20,04*	9,63*	3,74 ^{NS}	-
A	89,51	16,30*	5,88 ^{NS}	-	-
C	83,63	10,42*	-	-	-
B	73,21	-	-	-	-

* = significativo para $p < 0,05$

NS = não significativo para $p < 0,05$

Tabela 54 – Valores de eficiência de dissolução (%) obtidos para comprimidos de besilato de anlodipino, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).

Amostra	F	G	H	I	J
1	93,04	84,75	98,06	92,82	89,68
2	90,33	79,93	90,59	92,30	90,64
3	89,47	97,10	96,47	92,12	90,47
4	85,45	74,16	90,00	81,46	90,03
5	85,51	65,44	81,63	79,51	85,50
6	89,63	43,53	86,91	76,80	72,24
7	91,52	86,33	95,98	92,53	86,39
8	91,25	90,16	97,05	91,48	87,05
9	88,98	80,04	95,07	87,47	86,96
10	81,19	52,14	91,58	81,66	79,73
11	81,94	69,26	87,63	77,50	83,35
12	75,12	80,28	82,64	79,41	81,01
Média	86,95	75,26	91,13	85,42	85,25
DP	5,29	15,54	5,60	6,58	5,46
CV%	6,09	20,65	6,14	7,70	6,40

Os resultados dos tratamentos estatísticos a que foram submetidos os valores de eficiência de dissolução obtidos para comprimidos encontram-se na Tabelas 55 (ANOVA) e 56 (Tukey).

Tabela 55 – Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução dos comprimidos comerciais de besilato de anlodipino.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	4	1636	409	5,47 (2,57)
Resíduo	55	4113	75	
Total	59	5750		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

Tabela 56 – Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontradas para comprimidos.

Laboratório	Média (X)	X – 75,26	X – 85,25	X – 85,42	X – 86,25
H	91,13	15,87*	5,88 ^{NS}	5,71 ^{NS}	4,18 ^{NS}
F	86,95	11,69*	1,70 ^{NS}	1,53 ^{NS}	-
I	85,42	10,16*	0,17 ^{NS}	-	-
J	85,25	9,99*	-	-	-
G	75,26	-	-	-	-

* = significativo para $p < 0,05$

NS = não significativo para $p < 0,05$

Os valores experimentais obtidos na determinação da uniformidade de dose de besilato de anlodipino nos produtos de cápsulas e comprimidos encontram-se nas Tabelas 57 e 58, respectivamente.

Tabela 57 – Valores experimentais (%) obtidos na determinação da uniformidade de dose de besilato de anlodipino em cápsulas.

Amostra	A	B	C	D	E
1	92,26	102,34	101,54	88,03	100,99
2	97,69	58,95	99,27	96,43	100,31
3	98,71	93,53	101,77	93,48	100,65
4	103,46	92,95	104,05	90,08	97,37
5	103,34	35,37	102,34	91,10	96,46
6	109,11	110,81	98,70	94,16	95,56
7	101,42	95,93	102,23	93,71	100,42
8	94,98	108,18	100,97	106,07	100,20
9	100,52	109,32	101,32	102,89	95,67
10	99,61	79,90	98,13	92,80	99,52
Média	100,11	88,73	101,03	94,87	98,72
CV%	4,72	27,55	1,81	5,92	2,22

CV% = Coeficiente de variação percentual

Tabela 58 – Valores experimentais (%) obtidos na determinação da uniformidade de dose de besilato de anlodipino em comprimidos.

Amostra	F	G	H	I	J
1	100,06	89,91	107,21	96,32	94,57
2	94,51	95,60	108,91	98,36	99,80
3	97,11	97,19	113,23	97,23	96,73
4	99,38	100,03	108,69	98,93	98,32
5	95,41	99,46	111,98	95,75	99,23
6	97,57	99,91	111,18	97,91	95,94
7	99,50	101,05	107,21	96,09	95,14
8	96,32	99,12	105,96	97,57	96,85
9	96,77	99,12	110,05	98,82	98,66
10	99,84	95,37	109,93	98,02	96,39
Média	97,65	97,68	109,44	97,50	97,16
CV%	2,01	3,40	2,09	1,16	1,82

CV% = Coeficiente de variação percentual

6.16 Discussão

A integração do setor produtivo com o controle de qualidade, na indústria de medicamentos, exerce papel fundamental na garantia da execução das boas práticas de fabricação e de laboratório para que o fármaco possa alcançar sua forma farmacêutica final, garantindo ao paciente medicamento de ótima qualidade (SANTORO, 1988). As formas magistrais devem, igualmente, apresentar essa qualidade.

As formas sólidas administradas por via oral possuem uma ampla prescrição na prática médica devido a praticidade, economia, e inclusive uma maior segurança em relação à dosagem em função de ser uma dose unitária (STORPIRTIS, 1999).

Na avaliação das cápsulas e comprimidos devem ser realizados testes que incluam determinações quantitativas e qualitativas através de processos físico-químicos, químicos ou biológicos.

No presente trabalho foram avaliados dez produtos contendo besilato de anlodipino. Cinco eram cápsulas manipuladas e os demais comprimidos. As análises foram realizadas no sentido de verificar a qualidade e contribuir para um estudo de intercambialidade das mesmas, já que os produtos possuem diferenças consideráveis quanto aos seus custos.

Na análise dos rótulos verificou-se que as cápsulas manipuladas não traziam informações importantes, tais como as características da formulação, excipientes, principais indicações, contra-indicações, posologia e efeitos colaterais. Quanto aos comprimidos, tais informações constavam em suas respectivas bulas (BRASIL, 2003c).

Em relação ao peso, cada unidade da cápsula ou do comprimido deve conter uma quantidade específica de princípio ativo relacionada a uma determinada quantidade da formulação do medicamento proposto (LACHMAN et al., 1986). Logo, no ato da produção de comprimidos e da manipulação das cápsulas, o ajuste correto dos pesos constituem-se em etapa importante. As amostras submetidas à determinação de peso médio devem estar dentro das especificações propostas pela Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), onde a variação individual permitida para cápsulas com peso médio de até 300 mg pode ser de até 10%. Para comprimidos a farmacopéia preconiza variações de $\pm 10\%$, para peso médio de até 80 mg; se o peso médio estiver entre 80 e 250 mg, a variação individual permitida poderá ser de $\pm 7,5\%$ e se for acima de 250 mg, a variação permitida é de $\pm 5,0\%$. Os resultados da variação de peso realizados para as cápsulas (Tabela 42) e comprimidos (Tabela 43) mostraram que os

produtos analisados apresentaram todas as unidades dentro dos limites especificados, cumprindo, portanto, com os requisitos do teste.

A desintegração constitui-se em etapa importante na absorção do fármaco. Para que ocorra a liberação do fármaco no organismo, o mesmo deve estar em solução e, para isso, é necessário que ocorra a desagregação em partículas menores ou grânulos. Para o teste de desintegração, os resultados (Tabela 44) demonstram que todos os produtos analisados encontram-se dentro das especificações da Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988): 45 minutos para cápsulas e 30 minutos para comprimidos.

O teste para determinar a umidade contida nas formas farmacêuticas é muito importante devido ao fato de que a água contida junto ao fármaco e aos excipientes pode interferir no peso médio, teor, uniformidade, desintegração e dissolução do fármaco interferindo, assim, na biodisponibilidade do medicamento. Pode interferir, também, na estabilidade do fármaco. Verificou-se que os produtos analisados se encontram com a porcentagem de água entre 4% e 12% (Tabela 45). Os produtos B e C, ambos cápsulas, apresentaram teores de umidade superiores a 11%. Não existe, no entanto, especificação para umidade do besilato de anlodipino nas formas avaliadas.

Para o teste de resistência mecânica (Tabela 46) verificou-se que os comprimidos analisados possuem boa resistência aos choques mecânicos, com menos de 1,5 % de perda durante a execução do teste. Os resultados variaram de 0,14% a 0,33%. Quanto ao teste de dureza, somente o produto H apresentou resultado abaixo do limite especificado, que é de 30 N. Todos os demais produtos cumpriram com a especificação conforme Farmacopéia Brasileira IV Edição (1988).

A presença do fármaco nos produtos foi demonstrada pelo teste de identificação utilizado, a espectrofotometria na região do ultravioleta. A substância ativa foi identificada como sendo besilato de anlodipino, já que seus espectros de absorção ficaram sobrepostos com o espectro da substância química de referência, com os mesmos máximos de absorção, como pode ser observado na Figura 35.

Na análise de doseamento do fármaco nos produtos em estudo foi verificado que todos estavam dentro de uma faixa de 90 a 110% da quantidade declarada de fármaco nas amostras de cápsulas e comprimidos, conforme Tabelas 47 e 48, respectivamente. Verifica-se, no entanto, que houve maior variação de teor entre as cápsulas. Entre o produto A (menor valor) e o produto B (maior valor) a diferença foi superior a 10%. Entre os comprimidos verificaram-se variações menores. Em relação ao produto F (referência), verificou-se que as

diferenças de teores foram $\leq 1\%$ em comparação aos produtos G, H e I. A diferença entre o produto H e o produto F foi superior a 6%. Segundo a ANVISA, para ser submetido a estudo de bioequivalência a diferença de teor entre o medicamento teste e o referência deve ser de no máximo 5% (BRASIL, 2003d).

Segundo a Farmacopéia Brasileira IV edição (1988), o teste de dissolução determina a porcentagem da quantidade de princípio ativo, declarado no rótulo do produto, liberado no meio de dissolução, dentro do período de tempo especificado, sob aparelhagem e condições experimentais descritas. Todos os produtos apresentaram % dissolvida superior a 95% em 30 minutos (Tabelas 49 e 50). O produto B, no entanto, apresentou coeficiente de variação relativamente elevado, entre as seis unidades, em comparação aos demais, sugerindo uma uniformidade inadequada para este lote.

Com base nos resultados obtidos nos perfis de dissolução constatou-se que os valores de porcentagem de fármaco dissolvidos, para grande maioria dos produtos testados, excedem 85% em 15 minutos (Figuras 36 e 37). Devido a isto, não foi possível a realização da comparação utilizando método modelo independente simples que emprega fator de diferença (f_1) e de semelhança (f_2). Em virtude do exposto, o método escolhido para comparação dos perfis foi a eficiência de dissolução (ED), que pode ser utilizada para um estudo comparativo mais detalhado, através da aplicação de um método estatístico para avaliar a existência ou não de diferença significativa.

Em relação ao parâmetro de ED% para cápsulas (Tabela 51) verificou-se através do coeficiente de variação percentual, que os produtos A e B possuem uma maior variabilidade intra-lote que os demais. Na avaliação do tratamento estatístico a que foram submetidos os valores de ED (Tabela 52), foi possível observar que existe diferença significativa entre as diferentes cápsulas. Aplicando o teste de Tukey constatou-se que há diferença significativa entre o produto B e os demais; do produto C com D e E, enquanto que o C foi semelhante ao A, como pode ser observado na Tabela 53. A semelhança foi encontrada entre os produtos A, D e E.

Na avaliação dos parâmetros de ED% para comprimidos (Tabela 54) constatou-se, pelo coeficiente de variação percentual, que o produto G possui grande variabilidade entre as unidades do mesmo lote. Em relação a análise de variância, os produtos apresentaram diferenças estatisticamente significativa, quando se compara o valor de F obtido e o tabelado, conforme indicado na Tabela 55. A Tabela 56 apresenta os resultados obtidos com o teste de

Tukey, onde verifica-se que somente o produto G possui perfil de dissolução diferente dos demais, que não apresentaram diferenças entre si.

As diferenças encontradas em relação aos produtos estudados poderiam alterar sua biodisponibilidade. Amidon et al. (1995) sugerem, no entanto, que produtos contendo fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade ou alta solubilidade e baixa permeabilidade, como é o caso do besilato de anlodipino, podem ser considerados bioequivalentes desde que apresentem dissolução de 85% do fármaco em menos de 15 minutos. Apenas os produtos G e B não cumpriram com essa especificação. A presença ou não de bioequivalência entre os produtos só poderá ser confirmada após realização de estudo *in vivo*, já que não existe correlação *in vivo* – *in vitro* estabelecida para cápsulas e comprimidos contendo besilato de anlodipino.

A uniformidade de conteúdo permite verificar a correta distribuição do fármaco em cada unidade dos produtos. Constitui-se, assim, em análise muito importante, principalmente para fármacos com janela terapêutica estreita. Segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988) os valores individuais podem variar de 85 a 115%, com CV% máximo de 6%.

Todos produtos, exceto B, cumpriram com as especificações para o teste de uniformidade de conteúdo (Tabelas 57 e 58). O produto B apresentou valores abaixo dos limites especificados pela farmacopéia, além do coeficiente de variação ter sido superior ao permitido. Segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), quando o produto não cumpre com as especificações para uniformidade de conteúdo (85% - 115%, CV% máximo de 6%, mas dentro de 75 a 125%) devem ser realizadas novas análises com mais 20 amostras adicionais. Se o produto não cumprir novamente com as especificações (75 a 125%, CV% máximo de 7,8%) é reprovado. Embora duas unidades em dez tenham ficado fora da faixa de 75 a 125%, foram realizadas novas análises com mais 20 unidades. Os resultados obtidos comprovaram a falta de uniformidade do fármaco no lote testado.

Em função dos resultados obtidos, pode-se verificar que os produtos A, C, D e E foram equivalentes farmacêuticos, pois apresentaram resultados adequados em todos os testes a que foram submetidos. Na comparação estatística da eficiência de dissolução detectou-se diferença significativa entre o produto C com E e D. Isto explica-se pela maior cedência de E e D em comparação com C. No entanto, pelo fato do produto C apresentar elevada porcentagem de liberação, superior a 85% em 15 minutos (Figura 36), justifica-se a afirmação de possuir comportamento semelhante aos produtos A, D e E.

Avaliando os resultados obtidos para o produto B, pode-se afirmar que o mesmo não possui qualidade para o consumo humano, não pode ser dispensado e nem submetido a estudo de bioequivalência nessas condições.

Os produtos F, I e J mostraram-se equivalentes farmacêuticos nos testes a que foram submetidos. O produto H, embora tenha apresentado resultados adequados nas análises de peso médio, friabilidade, desintegração, dissolução e uniformidade, não cumpriu com a especificação de dureza indicada Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Também não poderia ser submetido a estudo de bioequivalência, pelo motivo exposto anteriormente.

O lote do produto G apresentou porcentagem de liberação inferior a 85% em 15 minutos (Figura 37), com diferença significativa de eficiência de dissolução em relação aos demais produtos, tornando-se não equivalente farmacêutico aos mesmos.

Os resultados demonstram que tanto os manipulados quanto os comerciais apresentam desvios de qualidade, indicando a necessidade de controle de qualidade mais rigoroso por parte do produtor, antes da liberação do produto para o mercado.

7 CONCLUSÕES

- As análises espectroscópicas (RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV) permitiram a caracterização da substância química utilizada como referência no presente estudo;
- O método desenvolvido através de cromatografia líquida, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de besilato de anlodipino em comprimidos e cápsulas;
- O método desenvolvido através de espectrofotometria na região do ultravioleta a 238 nm, utilizando 1% de HCl 0,1N em metanol (V/V) e água destilada como solventes, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso e exato para análise quantitativa de besilato de anlodipino em comprimidos e cápsulas;
- A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa de besilato de anlodipino demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa, sendo caracterizada a equivalência dos mesmos;
- O uso de 500 mL de ácido clorídrico 0,01N a $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$, aparato pá e velocidade de rotação de 50 rpm, demonstraram resultados satisfatórios para avaliar a dissolução de comprimidos contendo besilato de anlodipino;
- O uso de 500 mL de ácido clorídrico 0,01N a $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$, aparato cesta e velocidade de rotação de 50 rpm, demonstraram resultados satisfatórios para avaliar a dissolução de cápsulas contendo besilato de anlodipino;
- Sugere-se que a especificação: 85% de dissolução em 30 minutos seja suficiente para comprovar a qualidade de comprimidos e cápsulas, nas condições estabelecidas;
- O método por cromatografia líquida mostrou-se adequado para avaliar a % dissolvida de besilato de anlodipino tanto em cápsulas como em comprimidos;

- O método espectrofotométrico mostrou-se adequado para avaliar a % dissolvida de besilato de anlodipino apenas para comprimidos, devido à interferência apresentada pelas cápsulas;
- No estudo comparativo realizado verificou-se que nem todos os produtos cumpriram com as especificações indicadas nas farmacopéias quanto às características gerais;
- O teor de besilato de anlodipino nos produtos analisados ficaram dentro da faixa de 90 – 110%;
- Todos os produtos avaliados apresentaram % de dissolução superior a 95% em 30 minutos;
- Na análise do perfil de dissolução, todos os produtos, exceto os produtos B e G apresentaram % dissolvida superior a 85% em 15 minutos;
- Nem todos os produtos podem ser considerados intercambiáveis.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERNETHY, D. R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of amlodipine. *Cardiology*, v. 80, p. 31-37, 1992.

ALKER, D. et al. Long-acting dihydropyridine calcium antagonists. 9. structure activity relationships around amlodipine. *Europe Journal Medicinal Chemistry*, v. 26, p. 907-913, 1991.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Review*, New York, v. 12, p. 413-420, 1995.

ARGEKAR, A. P.; POWAR, S. G. Simultaneous determination of atenolol and amlodipine in tablets by high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 6, p. 1137-1142, 2000.

AVENDAÑO, C. Síntesis de fármacos. Principios generales e introducción al análisis farmacéutico. In: LOPES, M. C. A. *Introducción a la Química Farmacêutica – Madri: Intramericana McGraw-Hill*, Cap 19, p. 549 e Cap. 27, p.843 – 857, 1993.

BARANDA, A. B.; JIMÉNES, R. M.; ALONSO, R. M. Simultaneous determination of five 1,4-dihydropyridines in farmaceuticals formulation by high-performance liquid chromatography-amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1031, p. 275-280, 2004.

BASAVAIHAH, K.; CHANDRASHEKAR, U.; PRAMEELA, H. C. Sensitive spectrophotometric determination of amlodipine and felodipine using iron (III) and ferricyanide. *Il Farmaco*, v. 58 (2), p. 141-148, 2003.

BASAVAIHAH, K.; CHANDRASHEKAR, U.; NAGEGOWDA P. Spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of amlodipine besylate in pharmaceuticals, *ScienceAsia*, v. 31, p. 13-21, 2005

BISOGNANO, J. et al. Incremental effectiveness of amlodipine besylate in the treatment of hypertension with single and multiple medication regimens. *American Journal of Hypertension*, v. 17, p. 676-683, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento Técnico para medicamentos genéricos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 jun. 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 133, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 jun. 2003b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 140, de 29 de maio de 2003. Estabelece regras das bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003c.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 901, de 29 de maio de 2003. Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003e.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 310, de 01 de setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. Diário Oficial da União, Brasília, 03 set. 2004.

BRITISH PHARMACOPOEIA (BP), Her Majesty's Stationary Office, London, 2003.

BROOK, R. D. Drug selection in hypertension. American College of Cardiology Current Journal Review, December, p. 21-26, 2004.

BURGES, R. A.; DODD, M. G. Amlodipine. Cardiovascular Drug Review, v. 8, p. 25-44, 1990.

CHOWDARY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. East Pharmaceutical, v. 30, p. 51-54, 1987.

CLURCZAK, E. W. Validação de métodos em espectroscopia para análises farmacêuticas. Pharmaceutical Technology, p. 22-28, junho, 1998.

CONSIGLIERI, V. O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 36, p. 13-21, 2000.

COSTA, P. An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. International Journal of Pharmaceutics 220, p. 77 – 83, 2001.

DIBIANCO, R. et al. Amlodipine combined with beta blockade for chronic angina: results of a multicenter, placebo-controlled, randomized double-blind study. Clinical Cardiology, v. 15, p. 519-524, 1992.

EISENBERG, M. J.; BROX, A.; BESTAWROS, A. N. Calcium Channel Blockers: An Update. The American Journal of Medicine, v. 16, p. 35-43, 2004.

EYE, G. V. Hipertensão. ABC da Saúde, p. 244-245, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª edição, Atheneu, São Paulo, 1988.

FAULKNER, J. K. et al. The pharmacokinetics of amlodipine in healthy volunteers after single intravenous and oral doses and after 14 repeated oral doses given once daily. *Br Journal Clinical Pharmacology*, v. 22, p. 21-26, 1986.

FAULKNER, J. A. et al. Absorption of amlodipine unaffected by food. *Arzneim-Forsch Drug Research*, v. 39, p. 799-801, 1989.

FLECKESNSTEIN, G. G. et al. Prospective effects of various calcium antagonists against experimental atherosclerosis. *Journal Human Hypertension*, v. 6, p. S13-S18, 1992.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), System Suitability Workshop, Nutley, NJ, June 1997.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for human Use, “Guideline on Validation of Analytical Procedure: Methodology”. 1996.

JOSEFSSON, M.; NORLANDER, B. Coupled-column chromatography on a chiral-AGP phase for determination of amlodipine enantiomers in human plasma: An HPLC assay with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 2, p. 267-277, 1996.

KASIN, N. A. et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*, v. 1, p. 85-96, 2004.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. *Journal Pharmaceutical Pharmacology*, v. 28, p. 48-49, 1975.

KIM, S.; CHOI, K.; CHEONG, C. Synthesis of amlodipine using aza diels-alder reaction. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 23, p. 143-144, 2002.

KLINKENBERG, R.; STREEL, B.; CECCATO, A. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of amlodipine residues on manufacturing equipment surfaces. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 32, p. 345-352, 2003.

LANG, R.; STEFFEN, H. M.; KAUFMANN, W. Traditions of antihypertensive therapy in different countries – continental Europe. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 93, 811-820, 1990.

LACKMAN, L.; LIERMAN, H.; KANIG, J. The theory and practice of industrial pharmacy. 30 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.

LEMMER, B.; SCHEIDEL, B.; BEHNE, S. Chronopharmacokinetics and chronopharmacodynamics of cardiovascular active drugs. Propranolol, organic nitrates, nifedipine. *Annals NY Academic Science*, v. 618, p. 166-191, 1991.

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

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M. R. C. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. *Revista Analítica*, agosto nº 1, p. 48-51, 2002.

MATALKA, K. et al. Enzyme linked immunosorbent assay for determination of amlodipine in plasma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 1, p. 47-53, 2001.

METHA, A. C. Quality management in drug analysis. *Analyst*, v. 122, p. 83R-88R, 1997.

MEHTA, J. L. et al. Double-blind evaluation of the dose-response relationship of amlodipine in essential hypertension. *American Heart Journal*, v. 125, p. 1704-1710, 1993.

MONKMAN, S. C. et al. Automated gas chromatographic assay for amlodipine in plasma and gingival crevicular fluid. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, v. 2, p. 360-364, 1996.

MUNTWYLER, J.; FOLLATH, F. Calcium channel blockers in treatment of hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 44, n. 3, p. 207-216, 2001.

NAYLER, W. G. Classification and tissue selectivity of calcium antagonists. *Journal Cardiology*, v. 79, p. 107-118, 1990.

OHMORI, M. et al. Stereoselective pharmacokinetics of amlodipine in elderly hypertensive patients. *American Journal of Therapeutics*, v. 10, p. 29-31, 2003.

PAHOR, M. et al. Long-term survival and use antihypertensive medications in older persons. *Journal American Geriatric Society*, v. 43, p 1191-1198, 1995.

PINHO, J. J. R. G.; STORPIRTS, S. Estudo comparativo *in vitro* das propriedades biofarmacotécnicas de comprimidos de cloridrato de metformina comercializados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 1, jan./abr., 2001.

PITA, N. O. G.; PRATES, E. C.; FERRAZ, H. G. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de ciprofloxacino 250 mg comercializados como similares no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 3, jul./set., 2004.

RAFTERY, E. B. Circadian variation in blood pressure: consideration for therapy. *Postgraduate Medicinal Journal*, v. 67, p. 9-14, 1991.

RAGNO, G.; GAROFALO, A.; VETUSCHI, C. Photodegradation monitoring of amlodipine by derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 1-2, p. 19-24, 2002.

RAGNO, G. et al. Design and monitoring of photostability system for amlodipine dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 265 (1-2), p. 125-132, 2003.

RAHMAN, N.; AZMI, S. N. H. Spectrophotometric method for the determination of amlodipine besylate with ninhydrin in drug formulations. *Farmaco*, v. 10, p. 731-735, 2001.

RAHMAN, N.; HODA, M. N. Validated spectrophotometric methods for the determination of amlodipine besylate in drug formulations using 2,3-dichloro 5,6-dicyano 1,4-benzoquinone and ascorbic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 2, p. 381-392, 2003.

RUDD, P. Partial compliance: implications for clinical practice. *Journal Cardiovascular Pharmacology*, v. 22, p. S1-S5, 1993.

SANTORO, M. I. R. M. *Introdução ao controle de qualidade de medicamentos*, São Paulo: Atheneu, 1988.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. *Spectrometric identification of organic compounds*, 4ª edição, 1981.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. *Pharmaceutical Technology On-Line*. p. 1-14, 2000.

SOBEY, C. G. et al. Impaired endothelium-dependent relaxation of dog coronary arteries after myocardial ischaemia and reperfusion: prevention by amlodipine, propranolol and allopurinol. *Br Journal Pharmacology*, v. 105, p. 557-562, 1992.

SRIDHAR, K. et al. Spectrophotometric determination of amlodipine besylate in pure forms and tablets. *Analytical Letters*, v. 1, p. 121-133, 1997.

STEFFEN, H. M. Amlodipine – a third generation dihydropyridine calcium antagonist. *Journal of Clinical and Cardiology*, v. 2, p. 45-52, 1999.

STORPIRTIS, S. et al. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: Bases técnicas e científicas. *Infarma*, v. 16, nº 9-10, 2004.

STREEL, B. et al. Enantiomeric determination of amlodipine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 1-3, p. 357-368, 2002.

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

TATAR, S.; ATMACA, S. Determination of amlodipine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, v. 2, p. 305-310, 2001.

TRIGGLE, D.; RAMPE, D. 1,4-Dihydropyridine activators and antagonists: structural and functional distinctions. *TiPS*, v. 10, p. 507-511, 1989.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 28 ed. Rokville, United States Convention, 2004.

YASUDA, T.; TANAKA, M.; IBA, K. Quantitative determination of amlodipine in serum by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 8, p. 879-884, 1996.

ZWIETEN, V.; PFAFFENDORF, M. Similarities and differences between calcium antagonists: pharmacological aspects. *Journal Hypertension*, v. 11, p. S3-S11, 1993.

9 ANEXO

9.1 Artigo aceito